

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY EXTRAKTŮ ZE STÉVIE CUKROVÉ

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

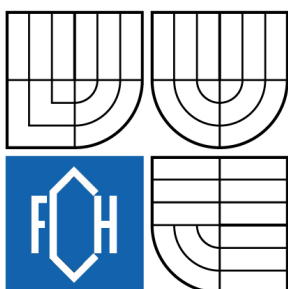
TEREZA MLATEČKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY EXTRAKTŮ ZE STÉVIE CUKROVÉ

AN ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF STEVIA REBAUDIANA EXTRACTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

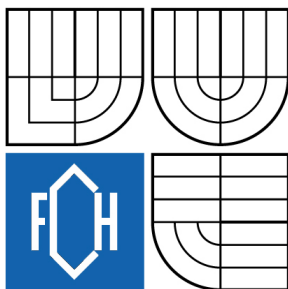
TEREZA MLATEČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2008



## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	<b>FCH-DIP0171/2007</b>	Akademický rok: <b>2007/2008</b>
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	<b>Mlatečková Tereza</b>	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (M2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce	<b>RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.</b>	
Konzultanti diplomové práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	

### Název diplomové práce:

Antimikrobiální účinky extraktů ze stévie cukrové

### Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- Přehled zdravotně významných látek obsažených ve stévii
- Přehled o antimikrobiálním působení stéviových extraktů
- Možnosti přípravy extraktů ze stévie cukerné

Experimentální část:

- Vypracování postupů přípravy extraktů ze sušené rostliny
- Ověření antimikrobiálního působení extraktů ze stévie cukerné na vybraných mikroorganizmech
- Zpracování a vyhodnocení výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

---

Tereza Mlatečková  
student(ka)

---

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.  
Vedoucí práce

---

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

---

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na studium antimikrobiálních účinků extraktů a macerátů ze sušené stévie cukerné (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

V teoretické části jsou shrnuty základní informace o rostlině stévii cukerné, přehled zdravotně významných látek obsažených ve stévii a možnosti přípravy extraktů ze stévie.

Antimikrobiální účinky extraktů a macerátů ze sušené stévie cukerné byly sledovány na běžně se vyskytujících bakteriích (*Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus*) a kvasinkách (*Geotrichum candidum* a *Hansenula anomala*), které patří mezi časté potravinové kontaminanty. Mikroorganismy, extrakty a maceráty byly vybrány na základě předchozí studie (Studium antimikrobiálních účinků extraktů stévie cukerné, Eva Rakovská).

Pro sledování antimikrobiální aktivity byly stanoveny růstové křivky použitím turbidimetrie u bakterií a přímého stanovení počtu buněk u kvasinek. Antimikrobiální působení bylo dále ověřeno aplikací difúzní jamkové metody na agarových plotnách.

Z výsledků vyplývá, že testované extrakty a maceráty ze stévie cukerné vykazují antimikrobiální účinky. Největší účinek byl prokázán u macerátů a nejcitlivější byla bakterie *Micrococcus luteus*, která vykazovala největší inhibiční účinky.

## ABSTRACT

This master thesis is oriented on study antimicrobial effects extracts and macerates from cure *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Theoretical part describes basic information about plant Stevia, summary of health significant matters contained in Stevia and possibilities preparing extracts from Stevia.

Antimicrobial effects extracts and macerates from cure Stevia were testing on food-borne bacteria (*Bacillus cereus* and *Micrococcus luteus*) and yeasts (*Geotrichum candidum* and *Hansenula anomala*). Microorganism, extracts and macerates were chosen on basis previous study (Study of antimicrobial effects Stevia Rebaudiana extracts, Eva Rakovská).

For screening antimicrobial activity were determined the growth curves by using turbidimetrie for bacteria and direct treatment method of cells number for yeasts. Antimicrobial effects were confirmed application with diffusion pit method on the agar ranges.

From the results flow the testing extracts and macerates from stevia analysed antimicrobial effects. The best effect was demonstrated on macerates and the most sensitive was bacteria *Micrococcus luteus* with the best inhibiting effects.

## KLÍČOVÁ SLOVA

*Stevia rebaudiana* Bertoni, růstová křivka, antimikrobiální účinky, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Geotrichum candidum*, *Hansenula anomala*

## KEYWORDS

*Stevia rebaudiana* Bertoni, growth curve, antimicrobial effects, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Geotrichum candidum*, *Hansenula anomala*

**MLATEČKOVÁ, T. Antimikrobiální účinky extraktů ze stévie cukrové. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 101 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.**

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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**

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnovala při řešení této diplomové práce, a laborantce pí. Novákové za ochotu, praktické rady a technickou výpomoc v mikrobiologické laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala během celého studia.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Stévie cukerná – <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni</b> .....	<b>8</b>
2.1.1	Historie, původ a rozšíření .....	8
2.1.2	Botanický popis.....	8
2.1.3	Použití.....	10
<b>2.2</b>	<b>Přehled zdravotně významných látek obsažených ve stévii</b> .....	<b>11</b>
2.2.1	Biosyntéza steviolglykosidů.....	13
2.2.2	Steviosid .....	15
2.2.2.1	Fyzikálně – chemické vlastnosti a biosyntéza steviosidu .....	15
2.2.2.2	Biologické testy účinků steviosidu na organismus .....	16
2.2.3	Steviol.....	19
2.2.3.1	Kaurany a Gibereliny .....	20
2.2.3.2	Mutagenita.....	20
2.2.3.3	Metabolismus .....	21
2.2.4	Rebaudiosidy a ostatní steviolglykosidy .....	21
2.2.5	Nesladké glykosidy a Sterebiny .....	24
2.2.6	Flavonoidy.....	26
2.2.7	Fenylpropanoidy.....	27
<b>2.3</b>	<b>Přehled o antimikrobiálním působení stéviových extraktů</b> .....	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Možnosti přípravy extraktů ze stévie cukerné</b> .....	<b>30</b>
2.4.1	Extrakce.....	30
2.4.1.1	Jednotlivé typy extrakce.....	30
2.4.2	Možnosti přípravy extraktů a izolace steviosidu ze stévie cukerné .....	31
2.4.2.1	Rozdělení extrakčních metod na získání extraktů stévie cukerné.....	31
2.4.3	Metody čištění extraktů ze stévie cukerné .....	32
2.4.4	Přehled metod stanovení obsahu steviosidu.....	33
2.4.4.1	Stanovení redukujících cukrů Shoorlovou metodou .....	33
2.4.4.2	TLC analýza .....	34
2.4.4.3	HPLC analýza .....	34
2.4.4.4	NIRS analýza.....	34
<b>2.5</b>	<b>Mikrobiologické metody</b> .....	<b>36</b>
2.5.1	Mikrobiologické stanovení inhibitorů .....	36
2.5.2	Růstová křivka.....	36
2.5.3	Použité mikroorganismy .....	39
2.5.3.1	<i>Bacillus cereus</i> .....	39
2.5.3.2	<i>Micrococcus luteus</i> .....	40
2.5.3.3	<i>Geotrichum candidum</i> .....	41
2.5.3.4	<i>Hansenula anomala</i> .....	42
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Seznam použitých přístrojů, chemikálií a materiálů</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Kultivační media a jejich příprava</b> .....	<b>44</b>

3.2.1	Medium pro kultivaci a uchovávání bakterií.....	44
3.2.2	Medium pro kultivaci a uchovávání kvasinek.....	44
<b>3.3</b>	<b>Použité metody a postupy práce .....</b>	<b>45</b>
3.3.1	Příprava ethanolového extraktu ze sušené stévie cukerné .....	45
3.3.2	Příprava methanolového extraktu ze sušené stévie cukerné .....	45
3.3.3	Příprava ethanolového macerátu ze sušené stévie cukerné.....	46
3.3.4	Příprava methanolového macerátu ze sušené stévie cukerné.....	46
3.3.5	Stanovení růstové křivky.....	46
3.3.6	Ověření antimikrobiálních účinků stévie cukerné.....	46
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Antimikrobiální účinky extraktů a macerátů stévie cukerné .....</b>	<b>48</b>
4.1.1	Růstová křivka a inhibiční zóny bakterie <i>Bacillus cereus</i> .....	48
4.1.1.1	<i>Bacillus cereus</i> .....	48
4.1.1.2	<i>Bacillus cereus</i> – ethanolové extrakty.....	50
4.1.1.3	<i>Bacillus cereus</i> – methanolové extrakty.....	52
4.1.1.4	<i>Bacillus cereus</i> – ethanolové maceráty .....	55
4.1.1.5	<i>Bacillus cereus</i> – methanolové maceráty .....	57
4.1.1.6	Shrnutí inhibičních účinků na bakterii <i>Bacillus cereus</i> .....	60
4.1.1.7	<i>Bacillus cereus</i> – ethanolová a methanolová zkouška .....	61
4.1.2	Růstová křivka a inhibiční zóny bakterie <i>Micrococcus luteus</i> .....	63
4.1.2.1	<i>Micrococcus luteus</i> .....	64
4.1.2.2	<i>Micrococcus luteus</i> – ethanolové extrakty.....	65
4.1.2.3	<i>Micrococcus luteus</i> – methanolové extrakty.....	68
4.1.2.4	<i>Micrococcus luteus</i> – ethanolové maceráty .....	70
4.1.2.5	<i>Micrococcus luteus</i> – methanolové maceráty .....	73
4.1.2.6	Shrnutí inhibičních účinků na bakterii <i>Micrococcus luteus</i> .....	75
4.1.2.7	<i>Micrococcus luteus</i> – ethanolová a methanolová zkouška.....	76
4.1.3	Růstová křivka a inhibiční zóny kvasinky <i>Geotrichum candidum</i> .....	78
4.1.3.1	<i>Geotrichum candidum</i> .....	79
4.1.3.2	<i>Geotrichum candidum</i> – ethanolové extrakty .....	80
4.1.3.3	<i>Geotrichum candidum</i> – ethanolová zkouška .....	83
4.1.4	Růstová křivka a inhibiční zóny kvasinky <i>Hansenula anomala</i> .....	85
4.1.4.1	<i>Hansenula anomala</i> .....	85
4.1.4.2	<i>Hansenula anomala</i> – ethanolové extrakty.....	87
4.1.4.3	<i>Hansenula anomala</i> – ethanolová zkouška.....	89
4.1.5	Shrnutí inhibičních účinků na mikroorganismy .....	91
4.1.5.1	Shrnutí inhibičních účinků na bakterie.....	91
4.1.5.2	Shrnutí inhibičních účinků na kvasinky .....	91
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>101</b>

# 1 ÚVOD

V současné době je velký zájem o výrobky obsahující látky přírodního původu, které mají příznivý vliv na zdraví člověka. Předmětem studia je výzkum antimikrobiálních účinků těchto látek a jejich využití v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.

*Stevia rebaudiana* Bertoni je tropická rostlina původem z jihoamerického kontinentu. Stévie cukerná obsahuje látky - diterpenové glykosidy, především steviosid, rebaudiosid A, rebaudiosid C a dulkosid A, které jsou až 300krát sladší než sacharosa. Proto jsou stévie, její extrakty a steviosid používány jako sladidlo v některých zemích Ameriky, Asie a EU. Pěstování stévie a produkce steviosidu přináší velký národohospodářský efekt, v důsledku vysoké výtěžnosti. Stévie je bezpečná pro diabetiky, lidi trpící fenylketonurií a u obézních lidí dochází ke snížení tělesné váhy. Tato rostlina má pozitivní účinek na hladinu cukru v krvi, hodnoty krevního tlaku, kardiovaskulární systém, trávení a pokožku. Steviosid vykazuje nulovou energetickou hodnotu, neobsahuje uhlohydráty, nahrazuje všechna umělá sladidla, navíc se v těle neukládá v podobě tuků, nepříspěvá k artróze a neovlivňuje koncentraci cholesterolu a triacylglycidů v krvi.

Studie ukázaly, že stévie vykazuje antimikrobiální účinky. Extrakty ze stévie inhibují růst zubního plaku a potlačují růst bakterií způsobujících zubní kaz a zánět dásní (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* a *Streptococcus mutants*). Dále je prokázáno, že extrakty ze stévie cukerné inhibují replikaci všech čtyř serotypů viru *Rotavirus*.

Stévie má široké uplatnění v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu v Americe a Asii. V Evropě užití stévie není zatím rozšířeno, v důsledku zákazu potravinové komise EU o používání stévie, na základě nedostatečných studií prokazujících zdravotní nezávadnost této rostliny.

Tato diplomová práce je zaměřena na studium a ověření antimikrobiálních účinků a sestavení růstových křivek extraktů a macerátů ze sušené stévie cukerné na vybrané mikroorganismy, které jsou častými potravinovými kontaminanty.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Stévie cukerná – *Stevia rebaudiana* Bertoni

#### 2.1.1 Historie, původ a rozšíření

Rostlina *Stevia Rebaudiana* Bertoni pochází z jihoamerického kontinentu, z oblastí kolem řeky Paraná, která protéká územím Brazílie i Paraguaye, kde je odnepaměti používána jako sladidlo a léčivo indiány kmene Guaráni, kteří jí říkají „ká – hí“ (sladká tráva) [1, 2, 3].

Poprvé popsal stévii v roce 1887 paraguayský přírodovědec dr. Bertoni. Teprve v roce 1931 však francouzští chemici Brindell a Lavielle získali z listů této rostliny bílou krystalickou látku – steviosid, se sladivostí až 300krát vyšší než sacharosa. V roce 1971 byla semena stévie dovezena z Brazílie do Japonska a začala se pokusně pěstovat především na ostrově Hokkaidó. O šest let později zde začala firma Maruzen Kasei Co. vyrábět extrakty ze stévie na obchodní bázi. V současné době je rozhodujícím světovým producentem Japonsko, kde se ročně sklízí několik desítek tisíc tun suchých listů a vyrábí se asi 3 000 tun sladidla. Stévie se rozšířila i do ostatních oblastí východní a jihovýchodní Asie (Čína, Korejská Republika, Thajsko, Vietnam). Mimo uvedené země se pěstuje také v USA (Kalifornie), ale i v oblastech mírného pásu, např. na Ukrajině a v Bulharsku, zkoušela se pěstovat i v Německu. Téměř pět let probíhaly pokusy s jejím pěstováním také u nás, a to s kladnými výsledky [3, 4, 5].

#### 2.1.2 Botanický popis

Tab. č. 1: Taxonomické rozdělení [6]

říše	rostliny ( <i>Plantae</i> )
podříše	cévnaté rostliny ( <i>Tracheobionta</i> )
oddělení	krytosemenné ( <i>Magnoliophyta</i> )
třída	vyšší dvouděložné ( <i>Rosopsida</i> )
řád	hvězdnicotvaré ( <i>Asterales</i> )
čeleď	hvězdnicovité ( <i>Asteraceae</i> )
rod	stevia ( <i>Stevia</i> )
druh	rebaudiana
kultivar	Bertoni
synonyma	stévie sladká, stévie cukerná, sladká tráva, medové lístky

Stévie je víceletá bylina, jejíž stonek dosahuje výšky 0,3 - 1,8 m a hojně se větví. V mládí jsou stonky a listy hustě chlupaté, později je odění řidší. Kořenový systém se rozkládá mělce pod povrchem půdy a je poměrně slabý, je také jediným orgánem rostliny, který neobsahuje sladké látky. Listy jsou vstřícné, světle až tmavě zelené, s čepelí 3 – 8 cm dlouhou a 3,5 cm širokou, úzce deltovité až obvejčité a v horní části výrazně vroubkované. Úbory jsou rozloženy ve vrcholové části stonku i větví a tvoří je 3 - 5 trubkovitých květů. Ty jsou

oboupohlavné, drobné, bílé až narůžovělé. Plod je drobná tmavě hnědá nažka s chmýrem, která se snadno přenáší větrem [3, 5].



Obr. č. 1 : stévie cukerná (1 – část rostliny, 2 – list, 3 – květenství, 4 – květ, 5 – plod) [5, 7]

Stévie je teplomilná rostlina, náročná na vodní režim. V místě původního rozšíření (Paraguay, Brazílie) roste v oblastech s ročním úhrnem srážek 1000 mm v nadmořské výšce 200 až 600 m. Klíčí při teplotě 20 °C, převážně na světle. Při teplotě 8 °C zastavuje růst nadzemní fytomasy. Na Slovensku má nejvhodnější podmínky v hlinito-písčitých půdách s regulovaným obsahem humusových látek a nízkým obsahem živin, s pH 4,5-6,5, na nivních a částečně zamokřených půdách, okrajích močálů. Stévie má menší nároky na světlo - je fotoperiodicky krátkodenní. V podmínkách krátkého dne s vyššími teplotami kvete a poskytuje vyšší úrodu listu se zvýšeným obsahem účinných látek. V podmínkách dlouhého dne nekvete [8, 9].

Stéviová nať - *Herba stevii*: Nať se sbírá v našich podmínkách uřezáváním cca 50 mm nad povrchem půdy před příchodem mrazů. Suší se v malých vrstvách na stinném a vzdušném místě. Při použití umělého sušení nesmí teplota přesáhnout 40 °C. Poměr usušení je 5:1. Úroda suchých listů je 1,0 - 2,0 t na hektar [36].

Stéviový list - *Folium steviae rebaudiana*: Častěji se sbírá jen samostatný list, který se po usušení natě zdrhuje [9].

Stévie byla původně jednoletou rostlinou, ale různými šlechtitelskými postupy se zařadila mezi víceleté. Je propracována technologie pěstování v jednoletém i ve víceletém cyklu a technologie vegetativního množení pomocí zelených řízků, řízků kořenů, odnoží a dalších vegetativních částí rostlin včetně metody in vitro [8].

Využití půdy při pěstování stévie je asi dvacetinásobné ve srovnání s cukrovou řepou nebo cukrovou třtinou. Pěstování stévie a produkce steviosidu přináší velký národohospodářský efekt, neboť na jednom hektaru porostu stévie – výnos 2 t sušiny, výtěžnost steviosidu 6 % – může nahradit minimálně 10 ha porostu cukrové řepy – výnos 30 t/ha s výtěžností cukru 12 % – při již zmíněné úrovni [3].

Keřík stévie dospívá po cca 14 - 17 týdnech, přičemž z jediné dospělé rostliny lze získat cca ½ kg sušiny ročně. To je ekvivalent asi 100 až 150 kg cukru. Lze jí pěstovat i u nás. Musí být ale předpěstována a pak vysazena na slunném, teplém a bezvětrném místě. Úspěšné jsou pokusy ji pěstovat i ve skleníku a jako hrnkovou rostlinu v bytě. S poklesem teploty nať ale uvadá. Oddenky a kořeny přezimují při 5-10 °C při velmi omezené zálivce [8].

Je zde možné dosáhnout výnosu až 5 tun suché hmoty z hektaru při obsahu 5–11 % steviosidu. Hmotnost tisíce semen je 0,3 až 0,4 g. Semena rychle ztrácí klíčivost, která je poměrně nízká 40 až 60 %. Klíčivá schopnost semen trvá 6 až 8 měsíců. Je jednou ze 150 druhů rodu *Stevia*, ovšem jen tento druh obsahuje sladké šťávy [8].

### 2.1.3 Použití

Stévie cukerná, její extrakty a steviosid jsou používány jako sladidlo v Jižní Americe, Asii, Japonsku, Číně a v různých zemích EU. Používání sladidla na bázi steviosidu lze použít ke slazení potravin a čajů, nápojů, v cukrářství a konzervářském průmyslu. Vykazují nulovou energetickou hodnotu a neobsahují uhlohydráty. Steviosid nahrazuje všechna umělá sladidla, ale na rozdíl od umělých sladidel nemá karcinogenní účinky a na rozdíl od bílého cukru nepřispívá k artróze a neukládá se v těle v podobě tuku a na rozdíl od sóji neovlivňuje koncentraci cholesterolu a triacylglyceridů v krvi [5].

Steviosid je také používán při výrobě zubních past, ústních vod a žvýkaček, neboť likviduje řadu patogenních bakterií ústní mikroflóry. Steviosid a aglykon steviol ovlivňuje řadu mitochondriálních funkcí, a to především narušením dílčích pochodů oxidační fosforylace. Studie ukázali, že steviosid má antimikrobiální účinky, které lépe vyniknou v kombinaci s řepíkem, tymiánem, šalvějí a listem pravého čajovníku, léčí kožní problémy: aplikuje se na akné, dermatitis a ekzém [5].

Drcené lístky, jednoduše připravené extrakty nebo i rafinovaný steviosid se používají jako sladidlo, které je vhodné pro diabetiky, osoby s vysokým krevním tlakem, pacienty s fenylketonurií<sup>1</sup> a lidi trpící nadváhou.

---

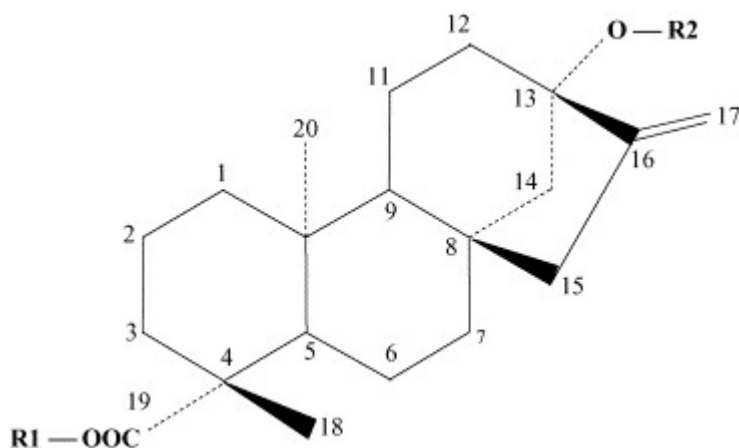
<sup>1</sup> pacienti trpící fenylketonurií nemohou používat aspartam a podobná peptidová náhradní sladidla obsahující aminokyselinu fenylalanin, protože tuto kyselinu nedokáží rozštěpit

## 2.2 Přehled zdravotně významných látek obsažených ve stévii

Nejdůležitější sekundární metabolity listů *Stevia rebaudiana* Bertoni jsou sladké diterpenové glykosidy. Mezi hlavní glykosidy patří steviosid, rebaudiosid A, rebaudiosid C a dulcosid A. Uvedené látky odpovídají dohromady 5 – 10 % váhy sušeného listu. Ostatní složky jako steviolbiosid, rebaudiosid B, D, E a F jsou obsaženy v nižších koncentracích [4, 10, 11].  
*Tab č. 2.*

Alkalickou hydrolyzou sladkých glykosidů lze získat glykosidický aglykon nazývaný steviol, jehož biosyntetickým prekurzorem je kyselina *ent* – kaurenová. Tato kyselina je také jedním z intermediátů při syntéze giberelinů. Od názvu steviol se glykosidy nazývají steviolglykosidy.

Z listů stévie cukerné byly izolovány i nesladké glykosidy, sterebiny, flavonoidy, fenylypropanoidy, longipininy, organické kyseliny (vinná, citrónová, mravenčí, mléčná, jablečná, jantarová) a pigmenty (chlorofyl a a b,  $\beta$  – karoten) [4].



*obecný vzorec steviolglykosidů [1]*

Tab. č. 2: Sladké diterpenické glykosidy obsažené v listech stévie cukerné [1, 2]

Název sloučeniny	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Steviosid	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Glc <sup>1</sup>
Rebaudiosid A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Glc <sup>1</sup>   <sup>3</sup> $\beta$ -Glc
Rebaudiosid B	H	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Glc <sup>1</sup>   <sup>3</sup> $\beta$ -Glc
Rebaudiosid C	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\alpha$ -Rha <sup>1</sup>   <sup>3</sup> $\beta$ -Glc
Rebaudiosid D	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Glc <sup>1</sup>	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Glc <sup>1</sup>   <sup>3</sup> $\beta$ -Glc
Rebaudiosid E	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Glc <sup>1</sup>	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Glc <sup>1</sup>
Rebaudiosid F	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Xyl <sup>1</sup>   <sup>3</sup> $\beta$ -Glc
Steviolbiosid	H	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\beta$ -Glc <sup>1</sup>
Dulcosid A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc <sup>2</sup> — $\alpha$ -Rha <sup>1</sup>

Glc-glukosa, Rha-rhamnosa, Xyl-xylulosa

Tab. č. 3 : Vlastnosti diterpenových glykosidů a jejich derivátů [2, 12]

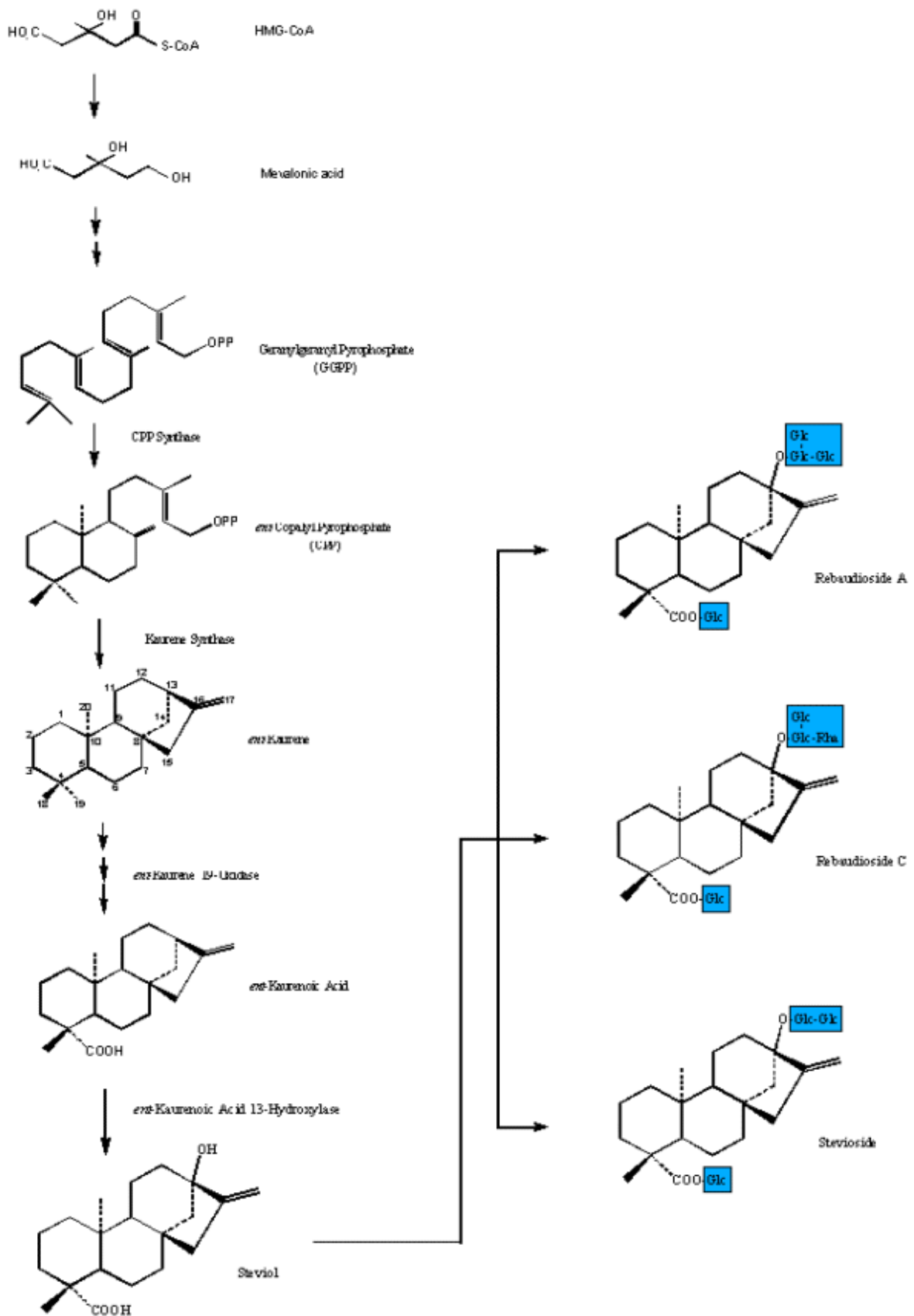
Diterpenový glykosid	t <sub>f</sub> (°C)	Specifická otáčivost [α] <sub>D</sub> <sup>25</sup> (°)	Molekulová hmotnost (g / mol)	Sladivost (sacharosa =1)	Průměrný obsah v suchých listech (%)	Rozpustnost ve vodě (%)
Steviosid	197-198	-30.9	804	150 – 300	5 - 22	0.13
Rebaudiosid A	242-244	-20.8	966	250 - 450	1,5 - 10	0.80
Rebaudiosid B	193-195	-45.4	804	300 - 350	0,4	0.10
Rebaudiosid C	193-195	-29.9	958	50 -120	0,4	0.21
Rebaudiosid D	283-286	-22.7	1128	200 - 300	0,03	1.00
Rebaudiosid E	205-207	-34.2	966	150 - 300	0,03	1.70
Steviolbiosid	188-192	-34.5	642	100 - 125	0,03	0.03
Dulkosid A	193-195	-50.2	788	50 - 120	-	0.58

### 2.2.1 Biosyntéza steviolglykosidů

Biosyntéza steviolglykosidů je odvozena od biosyntetické dráhy kyseliny mevalonové. Ta je základní metabolickou dráhou, která poskytuje 2 pětiuhlíkaté stavební molekuly: isopentenylpyrofosfát (IPP) a dimethylallylpyrofosfát (DMAPP), které jsou nezbytné pro syntézu všech isoprenoidních sloučenin. Klíčovým enzymem pro biosyntetickou cestu mevalonové kyseliny je HMG-Co A reduktasa. Biosyntéza byla lokalizována v plastidech buněk stévie. Počáteční kroky vedoucí k steviolglykosidům jsou identické s biosyntézou giberelinů, ale později se rozchází s cestou giberelinů a kaurenu. Kauren je přeměněn na steviol, který je následně glykosylován nebo rhamnosylován k tvorbě základních steviolglykosidů. Kvalita chuti a sladivosti rhamnosylovaných glykosidů je nižší než jejich glykosylované protějšky. Steviol je produkován hydroxylací *ent*-kaurenové kyseliny v poloze C-13. [4, 11].

Shibata a kol. r. 1995 izolovali z extraktu stévie glukosyltransferasy. Tyto enzymy připojují glukosylové zbytky na molekulu aglykonu – steviolu, resp. steviolglykosidů. Mezi izolované enzymy patří GTasa I, GTasa IIA a GTasa IIB, liší se svojí účinností a substrátovou specifitou. GTasa I ( $M_r = 51\ 000\ \text{g/mol}$ ) vykazuje substrátovou specifitu pro steviol a s nižší účinností i pro steviolmonosid. Isosteviol není GTasou I glykosylován stejně jako steviolbiosid (13-*O*- $\beta$ -soforosyl-steviol), steviosid a rebaudiosid A. Vhodným substrátem pro GTasu IIA ( $M_r = 260\ 000\ \text{g/mol}$ ) je isosteviol a steviol, pro který enzym vykazuje velice nízkou aktivitu. GTasa IIB ( $M_r = 61\ 000\ \text{g/mol}$ ) má ve srovnání s GTasou I podstatně širší substrátovou specifitu. Vhodným substrátem jsou steviol, steviolmonosid, steviolbiosid a steviosid. Steviol má 2 místa (hydroxyl na C<sub>13</sub> a karboxyl na C<sub>19</sub>), kam se může navázat glukosa při vzniku glykosidů. GTasa I katalyzuje přenos glukosy z UDP-glc na hydroxylovou skupinu na uhlíku C<sub>13</sub> steviolu a steviolmonosidu (steviol-13-*O*-glukopyranosa). GTasa IIB provádí glykosylaci jednak na hydroxylové skupině na uhlíku C<sub>13</sub>, ale také na karboxylové skupině uhlíku C<sub>19</sub>, k níž má větší afinitu. [4].

Enzymy GTasa I a GTasa IIB mají optimální hodnotu pH 6,5 a GTasa IIA 7,0. Oba enzymy také účinně působí na všudypřítomné flavonové aglykony, quercetin a kemferol. GTasy využívající UDP-glc se nacházejí v podstatě ve všech vyšších rostlinách a konjugační reakce katalyzované těmito enzymy hrají významnou fyziologickou roli. Glukosylace je důležitým krokem pro syntézu flavonoidních glykosidů, které jsou nejrozšířenější a nejrozmanitější skupinou sekundárních metabolitů u rostlin [4] (*Obr. č. 2*).



Obr. č. 2 : syntéza steviolglykosidů [13]

## 2.2.2 Steviosid

Steviosid je hlavní sladkou složkou stévie cukerné. Je to bílý krystalický glykosid, 300krát sladší než sacharosa (0,4% roztok). Je složený z jedné molekuly steviolu (kyselý aglykon steviosidu), diterpenového karboxylového alkoholu a tří molekul glukosy. Ve struktuře steviosidu je jedna sacharidová jednotka ( $\beta$ -D-glukopyranosa) navázaná na karboxylovou skupinu, druhá karboxylová jednotka je soforosa ( $\beta$ -D-glukopyranosyl- $\beta$ -D-glukopyranosa) navázaná na kyslík z hydroxylové skupiny steviolu. Enzymově katalyzovanou hydrolýzou steviosidu vzniká aglykon steviol a kysele katalyzovanou hydrolýzou steviosidu vzniká isosteviol. Zmýdelněním steviosidu velmi silnou zásadou vzniká steviolbiosid [11].

Obsah steviosidu je největší právě v listech a činí obvykle mezi 3 a 10 % suché hmotnosti. Jedním z mnoha činitelů ovlivňujících produkci steviosidu je vliv délky dne a intenzita dopadajícího světla. Při krátkém dni je podporováno kvetení, zatímco za dlouhého dne je produkována biomasa a ukládán steviosid. Jako další aspekt ovlivňující obsah steviosidu je vliv teploty kultivace. Nejvyšší produkce steviosidu bylo dosaženo při teplotách kultivace 25 °C ve dne a 20 °C v noci a nejnižšího výtěžku při teplotách kultivace 15 °C ve dne a 10 °C v noci. [8].

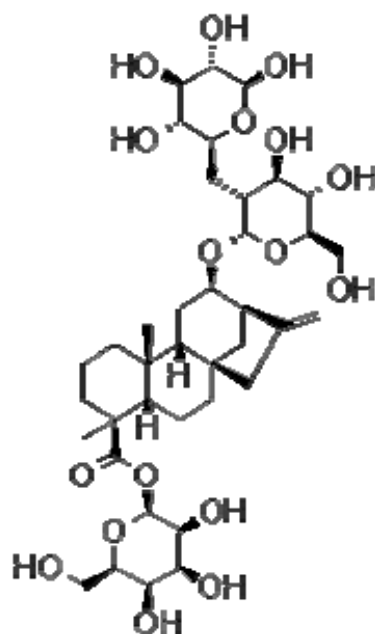
### 2.2.2.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti a biosyntéza steviosidu

V čisté formě je steviosid bílá krystalická látka s teplotou tání 197 – 198 °C, molekulovou hmotností 804,881 g/mol a se sumárním vzorcem  $C_{38}H_{60}O_{18}$ . Jeho systematický název je odvozen od steviolu: 13-O-(2- $\beta$ -glukosyl- $\beta$ -glukosyl)-19-O- $\beta$ -glukosylsteviol, nebo-li 13-O- $\beta$ -soforosyl-19-O- $\beta$ -glukosylsteviol. Je rezistentní ke kyselé hydrolýze. Krystaly stáčí rovinu polarizovaného světla:  $[\alpha]_D^{25} = -30,9^\circ$  (pyridin,  $c = 0,56$ ), a v oblasti IR (KBr) jsou získána absorpční maxima při následujících vlnótech v  $[cm^{-1}]$  charakteristických pro danou funkční skupinu: 3390, 2930, 1730, 1080. Je částečně rozpustný ve vodě 1 g se rozpustí v 800 ml vody, jen 2 g se dají rozpustit v 100 ml vody při teplotě 30 °C, ale je rozpustný v dioxanu a málo rozpustný v ethanolu [8].

Pevný steviosid je stabilní při pH 3 až 9 a při teplotě 100 °C po dobu jedné hodiny, k rozkladu dochází při teplotách nad 140 °C. Vodný roztok steviosidu je pozoruhodně stabilní při pH 2 až 10 za teploty 80 °C, ale v silné kyselině (pH = 1) je pozorován významný pokles koncentrace steviosidu. Steviosid je dlouhodobě stabilní při pokojové teplotě [8, 12].

V rozsáhlých studiích steviosidu inkubovaného po dobu 3 měsíců při hodnotách pH 2 až 8 a teplotě kolísající od 5 do 90 °C, nebyl zaznamenán jeho rozklad na steviol, což ukazuje na vysokou stabilitu při vaření, skladování a výrobních procesech [4, 8].





vzorec steviosidu [14, 15]

*Ent*-kaurenový skeleton steviosidu a gibereliny jsou tvořeny přes 2-C-methyl-D-erythriol-4-fosfát cestu. V prvním kroku cesty 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát syntasa (DXS) a 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát reduktoisomerasa (DXR) jsou geny enzymové katalýzy klonovány použitím reverzní transkriptasy PCR. DXS a DXR ze stévie obsahují N-terminální plastid cílené sekvence a vykazují vysokou homologii k ostatním známým rostlinným DXS a DXR enzymům [11].

Kim a kol. r. 1996 našel vysokou aktivitu HMG-CoA reductasy, klíčového enzymu biosyntetické cesty mevalonové kyseliny. Ta je základní metabolickou dráhou, která poskytuje dvě pětiuhlíkaté stavební molekuly, isopentenylpyrofosfát (IPP) a dimethylallylpyrofosfát (DMAPP), které jsou nezbytné pro syntézu všech isoprenoidních sloučenin. Biosyntéza byla lokalizována v plastidech buněk stévie cukerné [4, 11].

### 2.2.2.2 *Biologické testy účinků steviosidu na organismus*

#### *Akutní a chronická toxicita*

Toxikologie a bezpečnost steviosidu používaného jako sladidlo bylo nedávno zhodnoceno Geuns a Huxtable r. 2002. ADI<sup>2</sup> je 7,94 mg steviosidu/kg tělesné hmotnosti člověka. To znamená 476 mg pro dospělého člověka o hmotnosti 60 kg a 160 mg pro dítě o hmotnosti 20 kg. Tato hodnota ADI by ale měla být považována za minimální hodnotu, protože autoři neprovedli test koncentrace steviosidu při hodnotě vyšší než 793 mg/kg tělesné hmotnosti [11].

<sup>2</sup>Acceptable Daily Intake – přijatelná denní dávka

Steviosid měl velmi nízkou akutní orální toxicitu na myších, potkanech a křečcích. Letální dávka LD<sub>50</sub> byla zjištěna mezi 8,2 a 17 g/kg tělesné hmotnosti. Při studiu chronické subakutní toxicity na potkanech po dobu 3 měsíců byla stanovena hodnota NOEL<sup>3</sup> na 2,5 g/kg tělesné hmotnosti člověka. Z něj byla vypočítána hodnota ADI 25 g/kg tělesné hmotnosti člověka (bezpečnostní faktor 100) [11].

### *Metabolismus*

Bylo prokázáno, že žádný ze zaživacích enzymů gastrointestinálního traktu zvířat a člověka není schopen odbourat steviosid na steviol. Bakterie izolované z lidského střeva jsou schopné přeměnit steviosid na steviol *in vitro*, ale nebylo to prokázáno i v případě *in vivo*, ani že steviol tvořený ve střevech, je jimi přímo vstřebáván [10, 11, 16, 17]. Studie s kohouty a kuřaty ukázaly, že steviosid je vyloučen z těla nezměněn. Ale u prasat byl orálně podávaný steviosid zcela přeměněn na steviol, který byl jediným metabolitem ve fekáliích. Ale ani steviosid ani steviol nebyly nalezeny v krvi [4, 10, 11, 16, 17].

Dále bylo prokázáno v experimentu, že bakterie lidského střeva tvoří epoxid steviolu *in vitro*, který je znovu metabolizován na steviosid. *In vivo* tvorba epoxidu se nebude vyskytovat v důsledku anaerobních podmínek lidského střeva. Steviol je tedy pouze metabolitem střev a není dále vstřebáván a metabolizován. Epoxid steviolu byl testován na mutagenitu a ukázal se být inaktivní [4, 10, 11, 16, 17].

Steviosid je metabolizován v játrech a prostřednictvím žluči je exkretován [8].

### *Karcinogenita*

U steviolu byl prokázán slabý mutagenní účinek (90 % čistota) na *Salmonella typhimurium* TM 677, ale tento výsledek nepoukazuje na karcinogenitu steviosidu používaného jako sladidlo. Bezpečnost orálně podávaného steviosidu ve vztahu ke karcinogenní aktivitě je zpracována Yamada a kol. r. 1985, Xili a kol. r. 1992, Todyoda a kol. r. 1997 a Hagiwara a kol. r. 1984 na krysách. V roce 1999 JECFA uvedla, že nebyl zaznamenán žádný náznak karcinogenity steviosidu [10, 11].

### *Teratogenita*

Planas a Kuc r. 1968 zaznamenali, že 5% roztok extraktu z listů stévie má silné nežádoucí účinky na plodnost u samců a samic krys. Výsledky poklesu počtu narozených živých mláďat u krys vlivem extraktů z listů stévie byly vyvráceny Shiotsu r. 1996, který provedl více pokusů s více zvířaty použitím metod podobných metodám Planase a Kuce. Nebyly nalezeny žádné účinky steviosidu na plodnost nebo na rozmnožování u myší, krys a křečků [11].

---

<sup>3</sup> No Observed Effect Level – hladina bez pozorovaného účinku

Nebyl pozorován žádný významný účinek steviosidu na spermatogenezi a na intersticiální buněčné dělení testovaných F344 potkanů krmených porcemi obsahujícími více jak 1 % steviosidu (95,2% čistoty) po dobu 22 měsíců [11].

Melis r. 1999 uvedl možný pokles plodnosti samců krys vlivem velmi vysoké dávky extraktů z listů stévie, Oliviera-Filho a kol. r. 1989 pracovali s extrakty s podobným složením steviosidu a na základě výsledků uvedl, že lze vyloučit účinek na plodnost samců. Použité koncentrace extraktu byly extrémně vysoké, na začátku experimentu až 5,34 % tělesné váhy (5,3 g steviosidu/kg tělesné váhy). Pro dospělého člověka vážícího 65 kg to znamená 3,47 kg sušených listů stévie nebo 34,7 kg čerstvých listů stévie na den, to znamená více než 50 % tělesné váhy [4, 11].

Při podávání steviosidu slepicím a vstříknutí steviosidu do vajíčka, nebyl pozorován žádný účinek steviosidu na plodnost, rozmnožování, počet plodů, plodnost potomstva, příjem potravy, přírůstek hmotnosti, snášení a složení vaječ [11, 12].

### *Nutriční význam*

Boeckh-Haebisch r. 1992 uvedli, že koncentrované extrakty z listů stévie mohou být používány ke slazení zdravými lidmi stejně jako diabetiky. Stévie je také bezpečná pro lidi trpícími fenylketonurií. U obézních lidí dochází ke snížení tělesné váhy konzumací stévie nebo potravin obsahujících steviosid, které mají příznivý účinek na vyvážený denní příjem potravin a zdraví lidí [11].

Curi a kol., r. 1986 uvedli, že extrakty z 5 g sušených listů stévie podávaných 3krát denně zdravým lidem snížily jejich hodnoty glukosy v krevní plazmě [4].

Nitrožilní podávání steviosidu (95% čistoty) v dávkách 50, 100 nebo 200 mg/kg tělesné váhy mělo za následek výrazný pokles krevního tlaku u hypertenzních krys, bez negativních účinků na srdce [11].

Při studiích steviosidu podávaného člověku 3krát denně v dávkách 250 mg po dobu jednoho roku byl po 3 měsících zaznamenán pokles systolického a diastolického tlaku, který přetrvával po dobu jednoho roku. Biochemické parametry krve včetně lipidů a glukosy zůstaly nezměněné [4, 8, 18].

### *Použití*

Steviosid je na trhu prodáván pod různými obchodními názvy jako steviosin (pod tímto obchodním názvem je prodáván v Číně a Japonsku), stevin, eupatorin a rebaudin. Je součástí některých směsí sladidel určených pro diabetiky [8].

Steviosid je termostabilní sloučenina, takže je možné ho použít při přípravě různých tepelně upravovaných pokrmů. Svůj význam našel hlavně při slazení nejrůznějších pokrmů jako

např. při přípravě mořských živočichů, zeleniny nakládané na kyselo, dezertů a jiných cukrářských výrobků a dále ke slazení dietních nealkoholických nápojů či jako součást polyherbálních čajů. Ve farmaceutickém průmyslu může být použit k potahování tablet [3, 4, 8].

#### *Vliv steviosidu na hodnotu krevního tlaku a cukru*

Steviosid je vhodný pro obě formy diabetu, pacienty trpící fenylketonurenií a pro lidi trpící obezitou. Nebyly zjištěny žádné alergické reakce.

Oviedo a kol. r. 1970 zaznamenali pokles hodnot krevního tlaku o 35,2 % už po 6 – 8 hodinách po podání extraktů z listů stévie. Dále uvedli, že stévie snižuje hodnoty krevního tlaku u zdravých jedinců [4].

Hsieh a kol. r. 2003 zaznamenali snížení systolického i diastolického tlaku u hypertenzních lidí (ve věku 20 – 75 let) v důsledku podávání 250 mg steviosidu 3krát denně po dobu 2 let. Ve zkušební skupině lidí byl průměrný krevní tlak na začátku studie 150/95 a na konci 140/89 [18].

Dále byl zaznamenán posilující účinek na kardiovaskulární systém při dlouhodobém užívání stévie [4].

#### *Vliv steviosidu na mikroorganismy*

Steviosid *in vitro* nepodporuje růst mnoha mikroorganismů odpovědných za tvorbu zubního kazu (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* a *Streptococcus mutants*). V koncentraci  $10^{-2}$  M dochází k inhibici aktivity dextransacharasy produkované bakterií *S. mutants*. Z toho důvodu může steviosid působit při prevenci výskytu zubního kazu a je spolu s ostatními steviolglykosidy přidáván do zubní pasty a ústní vody [8].

Steviolglykosidy přidávané do koupelových a kožních přípravků pomáhají při léčbě alergických a atopických dermatitid, ekzému, hrubé a suché pokožky [4].

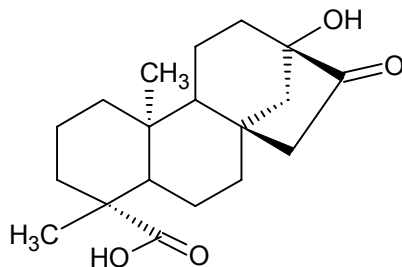
### **2.2.3 Steviol**

Steviol je diterpenoidní aglykon. Systematický název steviolu je *ent*-13-hydroxykaur-16-en-19-ová kyselina, která vzniká po hydrolytickém odštěpení sacharidových jednotek. Jeho teplota tání je v rozmezí 245 až 246 °C, sumární vzorec  $C_{20}H_{30}O_3$ , molekulová váha  $M_r = 318$  g/mol a v oblasti IR (KBr) byla zjištěna absorpční maxima při následujících vlnových délkách v  $[cm^{-1}]$  charakteristických pro danou funkční skupinu: 3450, 3250, 1185, 1090, 1025, 875 [8].

Steviol vykazuje aktivitu podobnou růstovému faktoru giberelinu. Tento poznatek uveřejnili ve své práci Ruddat a kol. r. 1963 v pokusu s pěstováním kukuřice *in vitro* na médiu

s giberelinem A<sub>3</sub> v koncentraci 1 mg/l a na médiu se sodnou solí steviolu (100 mg/l). Stejného účinku giberelinu na růst kukuřice bylo dosaženo 100krát vyšší koncentrací steviolu (jako kontrola byla kultivována rostlina na médiu bez hormonů) [8].

Steviol je kauranový derivát a je prekurzorem, který může být konvertován na gibereliny.



vzorec steviolu [15, 19]

### 2.2.3.1 Kaurany a Gibereliny

Kaurany jsou diterpeny s rigidní tetracyklickou strukturou. V přírodě se většina kauranových derivátů vyskytuje ve formě kaurenu. Kauren je též inintermediátem biosyntézy řady rostlinných a houbových metabolitů, včetně giberelinů a diterpenových alkoholů. Kaurany jsou v rostlinách velmi rozšířené a vykazují významnou biologickou aktivitu včetně toxicity [20].

Gibereliny patří mezi terpeny s 18 až 20 uhlíky ve 4 kruhových systémech a nejméně jednou karboxylovou skupinou, to znamená tetracyklické diterpeny. Označují se zkratkou GA (Giberellic Acid) s číselným indexem.

Syntéza giberelinů *in vivo* vychází z acetátových skupin, ze kterých se tvoří kyselina mevalonová a isopentenpyrofosfát, jako základní stavební prvek všech terpenů. Degradace giberelinů v rostlinách je velmi pomalá, ale často dochází k inaktivaci vazbou s jinými sloučeninami. Konjugáty s glukosou (glukosidy) jsou velmi důležitou zásobní formou giberelinů.

Gibereliny jsou skupinou fytohormonů, které mají mnoho funkcí v regulaci ontogeneze [21].

### 2.2.3.2 Mutagenita

Pezzuto a kol. zaznamenali, že metabolicky aktivní steviol je mutagenní. Steviol je mutagenní jako důsledek bioaktivace. V přítomnosti metabolického aktivačního systému je steviol mutagenní v *Salmonella typhimurium* a v lidských a krysích mikrosomech. Strukturální analogy steviolu, ve kterých je dvojná vazba mezi uhlíky C<sub>16</sub> a C<sub>17</sub> prostorově zakrytá nebo redukována, nejsou aktivní mutageny.

Za mutagenní vlastnosti může hydroxylová skupina na uhlíku C<sub>13</sub>. Provede-li se acetylace této hydroxylové skupiny, eliminují se mutagenní účinky steviolu, což odpovídá vzorci kyseliny *ent*-kaurenové, která nevykazuje mutagenní vlastnosti.

Aktivovaný metabolit steviolu nebyl ještě identifikován a není známo, že by aktivace steviolu mohla u člověka nastat [22].

### 2.2.3.3 *Metabolismus*

Steviosid může být degradován na steviol bakteriemi slepého střeva (u myší, krys, křečků a kuřat) a nebo bakteriemi tlustého střeva (u prasat a lidí). Bakterie lidského tlustého střeva 16,17 $\alpha$ -epoxid steviolu přeměňují na steviol *in vitro*, který je zpět metabolizován na steviosid. *In vivo* se epoxidová přeměna nebude uskutečňovat u lidí díky anaerobním podmínkám lidského tlustého střeva. Steviosid se po přeměně na steviol absorbuje skrz gastrointestinální trakt a steviol je jen metabolitem fekálií a není dále metabolizován a nebyl nalezen v krvi. Úplné vyloučení steviolu lidskými mikrosomy je 4krát nižší než krysími mikrosomy [10, 11].

LD<sub>50</sub> steviolu (90% čistoty) u křečků je 5,2 u samic a 6,1 g/kg tělesné váhy u samců [10].

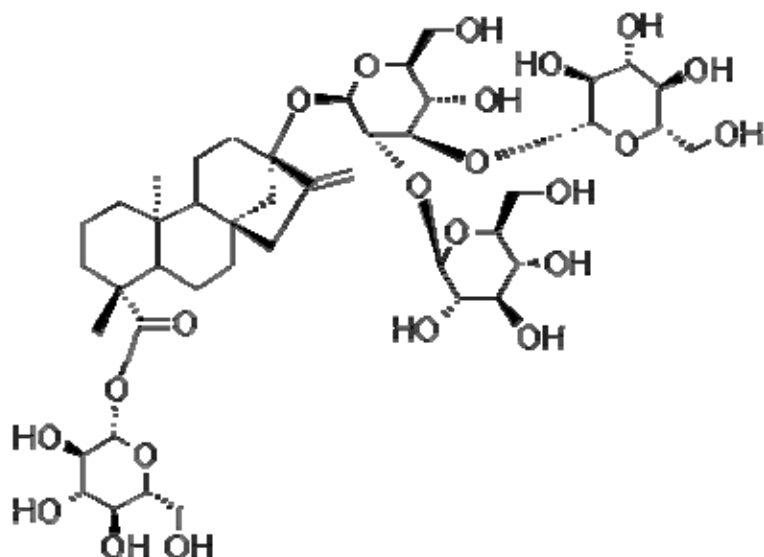
Bylo zjištěno, že steviol inhibuje oxidativní fosforylaci v jaterních mitochondriích potkanů a také aktivitu enzymů intestinálních mitochondrií, což se projevuje poklesem aktivity NADH-cytochrom *c* reduktasy a cytochrom oxidasy, a to má za následek pokles intestinálního mukózního ATP. Tento pokles ATP má pravděpodobně za následek snížení absorpce glukosy [10].

### 2.2.4 Rebaudiosidy a ostatní steviolglykosidy

#### *Rebaudiosid A*

Rebaudiosid A má na uhlíku C<sub>19</sub> navázanou jednu glukosu v poloze  $\beta$  a na uhlíku C<sub>13</sub> rozvětvený oligosacharid se třemi glukosami vázanými  $\beta$  do poloh 2 a 3 větvící glukosy. Rebaudiosidu proto odpovídá systematický název 2'-*O*- $\beta$ -glukosyl-13-*O*- $\beta$ -soforosyl-19-*O*- $\beta$ -glukosyl-steviol a má sumární vzorec C<sub>44</sub>H<sub>70</sub>O<sub>23</sub> · 3H<sub>2</sub>O. Jeho teplota tání je v rozmezí mezi 242 až 244 °C a krystalizací z methanolu vznikají bezbarvé jehličkovité krystalky. Krystaly stáčí rovinu polarizovaného světla:  $[\alpha]_D^{24} = -20,8^\circ$  (MetOH, *c* = 0,84) [4, 8].

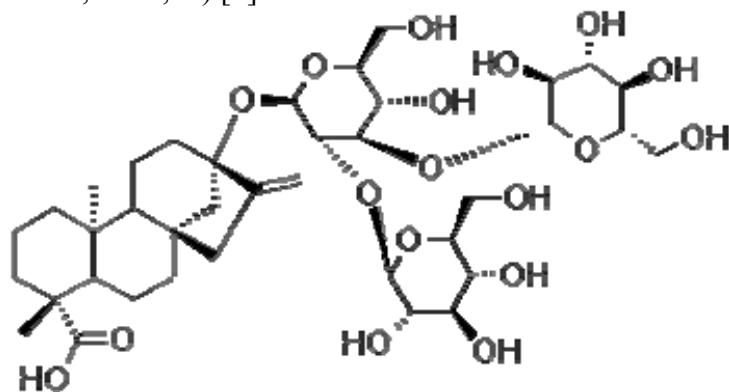
Hydrolyzou rebaudiosidu A kyselinou vzniká isosteviol a hydrolyzou rebaudiosidu A s hesperidinem vzniká rebaudiosid B. Rebaudiosid A je podstatně víc rozpustný ve vodě než steviosid, protože obsahuje další glukosovou jednotku v molekule a je více stabilnější v kyselém prostředí než steviosid A, je dlouhodobě stabilní při pokojové teplotě. U rebaudiosidu A se prokázalo nejmenší množství pachutí (je více sladký a obsahuje málo hořkých látek na rozdíl od steviosidu a byl zaznamenán jeho rozklad vlivem slunečního světla. Má nejpříznivější vlastnosti ze všech 4 hlavních glykosidů listů stévie cukerné (steviosid, rebaudiosid A a C a dulkosid A) [4, 8].



vzorec rebaudiosidu A [4, 15]

### *Rebaudiosid B*

Rebaudiosid B má na rozdíl od rebaudiosidu A na uhlíku C<sub>19</sub> hydroxylovou skupinu, která způsobuje jeho kyslejší charakter stejně jako u steviolbiosidu. Jeho sumární vzorec je C<sub>38</sub>H<sub>60</sub>O<sub>18</sub> · 2H<sub>2</sub>O a teplota tání je v rozmezí mezi 193 až 195 °C. Krystalizací z methanolu vznikají bezbarvé jehličkovité krystalky, které stáčí rovinu polarizovaného světla:  $[\alpha]_D^{24} = -45,4$  (MetOH, c = 0,96) [8].



vzorec rebaudiosidu B [15]

### *Rebaudiosid C*

Rebaudiosid C neboli dulkosid B se od rebaudiosidu A liší náhradou glukosu vázané na větvící glukosu do polohy 2 rhamnosou vázanou  $\alpha$ . Jeho sumární vzorec je C<sub>44</sub>H<sub>70</sub>O<sub>22</sub> · 3H<sub>2</sub>O a teplota tání je v rozmezí 235 až 238 °C. Krystalizací z methanolu v vznikají bezbarvé jehličkovité krystalky, které stáčí rovinu polarizovaného světla:  $[\alpha]_D^{24} = -45,4^\circ$  (MetOH, c = 0,96) [8].

### *Rebaudiosid D a E*

Rebaudiosid D přibírá oproti rebaudiosidu A ještě jednu glukosu do polohy 2 glukosy vázané na uhlíku C<sub>19</sub> [8].

Rebaudiosid E má ve srovnání s rebaudiosidem D o jednu glukosu méně na větvící glukose (vázaná na uhlík C<sub>13</sub>) v poloze 2 [8].

### *Rebaudiosid F*

Brandle r.1999 separoval sloupcovou chromatografií malé množství nekrystalického rebaudiosidu F ze směsi rebaudiosidu C a F. Jeho sumární vzorec je C<sub>43</sub>H<sub>68</sub>O<sub>22</sub>. Rebaudiosid F je derivát steviolu s trisacharidovým zbytkem ze dvou molekul glukosy a jedné molekuly xylulosity navázané přes kyslík na uhlík C<sub>13</sub>. Stáčí rovinu polarizovaného světla  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -25,5^{\circ}$  (MetOH, c = 1) [8, 22].

### *Dulkosid A*

Dulkosid A je svojí strukturou blízký rebaudiosidu C (dulkosidu B), ale na rozdíl od něj má na větvící glukose v poloze 3 atom vodíku. Jeho sumární vzorec je C<sub>38</sub>H<sub>60</sub>O<sub>17</sub> · 2H<sub>2</sub>O a teplota tání je v rozmezí mezi 193 až 195 °C. Krystalizací z methanolu vznikají bezbarvé jehličkovité krystalky, které stáčí rovinu polarizovaného světla:  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -46,7^{\circ}$  (MetOH, c = 0,45) [8].

### *Steviolbiosid*

Steviolbiosid je svou strukturou nejpodobnější steviosidu, od něhož se liší náhradou glukosy na uhlíku C<sub>19</sub> za vodíkový atom [8].

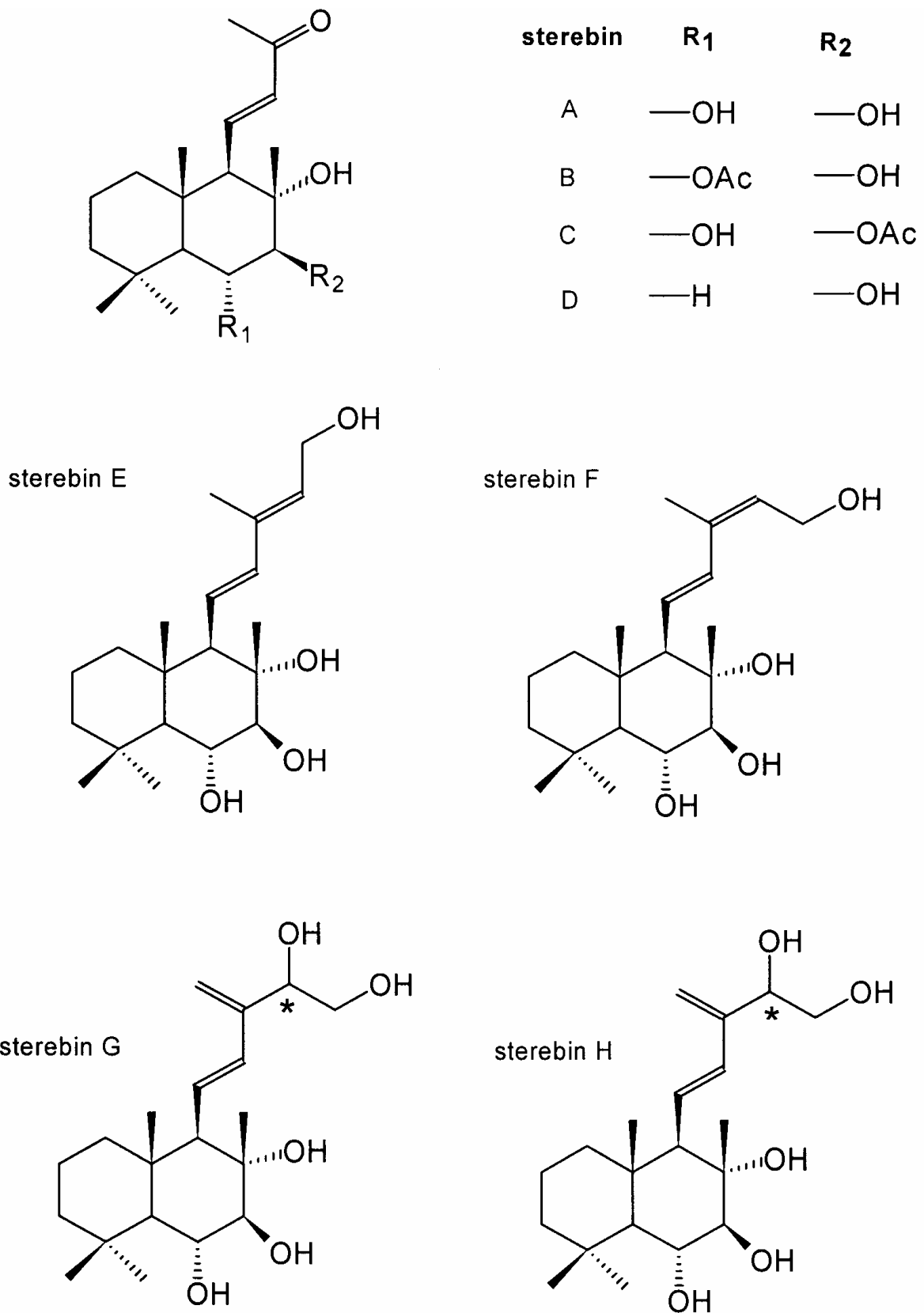


### 2.2.5 Nesladké glykosidy a Sterebiny

Z listů stévie cukerné byly izolovány 3 nesladké glykosidy a to stigmasterol- $\beta$ -D-glukosid,  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glukosid a apigenin-7-*O*- $\beta$ -D-glukosid [8].

Sterebyny jsou látky, které patří do skupiny bisnoditerpenů. Jejich struktura a základní fyzikálně chemické vlastnosti byly stanoveny a publikovány Oshimou a kol. v letech 1986 a 1988. Z listů stévie bylo izolováno a identifikováno 8 neglykosidických diterpenů, jenž jsou označovány jako sterebyny A až H [8].

McCarvey a kol. r. 2003 izolovali dalších 6 sterebinů z listů stévie (I,J,K,L,M,N) na základě chemických a spektroskopických metod.



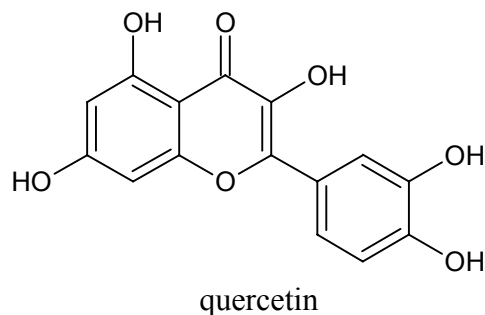
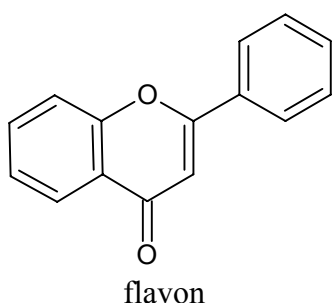
Obr. č. 3: Strukturní vzorce sterebinů A, B, C, D E, F, G a H [8].

## 2.2.6 Flavonoidy

Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace pyranového kruhu (kruh C) [23].

Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku [23].

Flavonoidy jsou přírodní rostlinná barviva významná pro svoji chuť nebo mají významné biologické účinky. Jsou významnou součástí antioxidačního systému, zabráňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (železo, měď). Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule, vliv má i jejich glykosilace [4, 23].



vzorce flavonoidů [23]

### Biologická aktivita

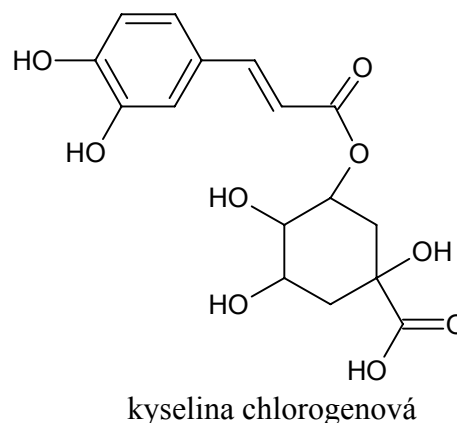
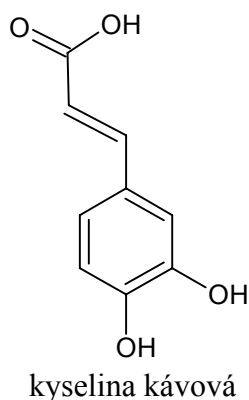
Flavonoidní glykosidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů obsahujících v molekule 2 benzenové kruhy spojené tříuhlíkovým řetězcem. V listech stévie byly nalezeny: quercetin (3,5,7,3',4'-pentyhydroxyflavon), avikularin (quercetin-3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosid), guayaverin (quercetin-3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosid), quercetin (quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnosid), apigenin-4'-O-glukosid, luteolin-7-O-glukosid, quercetin-3-O-glukosid, kemferol-3-O-rhamnosid. Kromě výše jmenovaných byl též izolován methoxylový flavonoid kentaureidin, který byl identifikován jako 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavon. Kentaureidin fluoreskuje v UV světle purpurovou barvou a dále poskytuje absorpční maxima při následujících vlnových délkách:  $\lambda_{\max}$  [nm] MetOH: 253, 346; NaOMetOH: 265, 400; AlCl<sub>3</sub>: 270, 394; AlCl<sub>3</sub>/HCl: 265, 366; NaOAc: 264, 400; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 256, 354 [8].

## 2.2.7 Fenylpropanoidy

### *Deriváty kyseliny skořicové*

Ve skupině látek odvozených od kyseliny skořicové byly nalezeny kyselina kávová (kyselina 3,4-dihydroxyskořicová) a kyselina chlorogenová (kyselina 5-koфейnyl-chininová). Kyselina kávová má sumární vzorec  $C_9H_8O_4$ , teplotu tání v rozmezí 206 až 209 °C, v UV oblasti světla poskytuje absorpční maxima při následujících vlnových délkách:  $\lambda_{max}$  [nm] EtOH: 235, 299 [4, 8, 24].

Kyselinu chlorogenovou lze vyjádřit pomocí sumárního vzorce  $C_{16}H_{18}O_9$ . Její teplota tání je v rozmezí 205 až 207 °C, je opticky aktivní se stáčivostí roviny polarizovaného světla:  $[\alpha]_D = 32^\circ$  a v UV oblasti světla poskytuje absorpční maxima při následujících vlnových délkách:  $\lambda_{max}$  [nm] EtOH: 240, 298, 325 [4, 8, 24].



*vzorce derivátů kyseliny skořicové [24]*

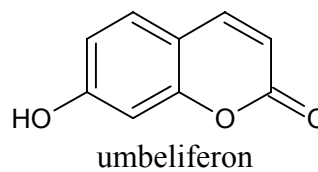
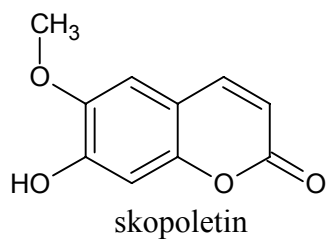
### *Deriváty kumarinu*

Jako poslední podskupina látek izolovaných z listů stévie jsou látky odvozené od kumarinu: skopoletin (6-methoxy-7-hydroxykumarin) a umbeliferon (7-hydroxy-kumarin) [4, 8].

Skopoletin má sumární vzorec  $C_{10}H_8O_4$ , teplotu tání v rozmezí 203 až 205 °C, v UV oblasti poskytuje absorpční maxima při následujících vlnových délkách:  $\lambda_{max}$  [nm] v EtOH: 230, 255, 297, 344 a v oblasti IR (KBr) jsou získána absorpční maxima při následujících vlnových délkách v  $[cm^{-1}]$  charakteristických pro danou funkční skupinu: 1610 (C – H); 1730 (C = O); 2985, 2843 (-OCH<sub>3</sub>); 3350 (-OH) [4, 8].

Umbeliferon má sumární vzorec  $C_9H_6O_3$ , molekulovou hmotnost 162,14, teplotu tání v rozmezí 232 až 234 °C, v UV oblasti poskytuje absorpční maxima při následujících vlnových délkách:  $\lambda_{max}$  [nm] v EtOH: 230, 257, 232 a v oblasti IR (KBr) jsou získána absorpční maxima při následujících vlnových délkách v  $[cm^{-1}]$  charakteristických pro danou funkční

skupinu: 1616, 1576 (C – H); 1690, 1720 (C = O); 3260 (-OH). Inhibuje *in vitro* aflatoxin B<sub>1</sub> a steroidní 5- $\alpha$ -reduktasu [4, 8].



*vzorci derivátů kumarinu [24]*

### 2.3 Přehled o antimikrobiálním působení stéviových extraktů

Masaaki a kol. r. 1997 zjistili, že steviosid *in vitro* nepodporuje růst mnoha mikroorganismů odpovědných za tvorbu zubního kazu (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* a *Streptococcus mutans*). V koncentraci  $10^{-2}$  M dochází k inhibici aktivity dextransacharasy produkované bakterií *Streptococcus mutans*. Účinek proti vzniku zubního kazu je připisován taninům obsažených v listech stévie cukerné. Z tohoto důvodu může steviosid působit při prevenci výskytu zubního kazu a je spolu s ostatními steviolglykosidy přidáván do zubních past a ústních vod. Navíc steviosid je stoprocentě kompatibilní s fluoridem a inhibuje růst zubního plaku [4, 8, 25].

Steviolglykosidy přidávané do koupelových a kožních přípravků pomáhají při léčbě alergických a atopických dermatitid, ekzému, akné, hrubé a suché pokožky [8]. Dokonce se používají i do pleťových masek.

Tomita a kol. r. 1997 prokázali vysokou baktericidní účinnost fermentovaných vodných extraktů z listů stévie cukerné proti nežádoucím patogenním mikroorganismům vyskytujících se jako potravinové kontaminanty. Předmětem zkoumání byly tyto bakterie *Escherichia coli* O157:H, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhirium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahemolyticus* a *Yersinia enterocolitica*. Extrakty z listů stévie nebyly účinné na *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* [4].

Byla prokázána účinnost horkých vodných extraktů z listů stévie cukerné na *Rotavirus*. Lidské rotaviry jsou původci gastroenteritid, které se projevují akutním průjmem a způsobují smrt více než 850 000 lidí ročně v rozvojových zemích. Extrakty ze stévie (SE) inhibují replikaci všech čtyř serotypů viru *Rotavirus in vitro*. Tento inhibiční účinek SE nebyl snížen ani při podmínkách, kdy byly SE rozpuštěny v HCl při pH = 2 a po dobu 30 minut. Inhibiční účinek SE na replikaci rotavirů byl zkoumán inhibicí virů způsobenou cytotoxicitou na MA104 buňkách a bylo dokázáno, že přídavek SE během adsorpce rotavirů na MA104 buňky mělo za následek inhibici plaku a to naznačuje, že inhibiční mechanismus SE je adsorpční inhibice. Jako inhibiční látky SE byly nalezeny heterogenní aniontové polysacharidy s rozdílným iontovým nábojem. Jednotlivé analýzy naznačují, že přečištěné frakce nazývané jako Stevian s vyšším inhibičním účinkem se skládá z aniontových polysacharidů s molekulovou hmotností 9800 a obsahuje aminokyseliny serin a alanin. SE inhibují navázání anti-VP7 monoklonální antilátky, ale neinhibují navázání anti-VP4 monoklonální antilátky na buňky a to naznačuje, že SE se navazují na VP7 nejnižší vrstvu glykoproteinů, ale nevylučuje to možnost, že by se mohl navázat i na VP4 protein. SE s molekulovou hmotností 9800 navázané na VP7 pravděpodobně zasahují do navázání VP7 sterickými překážkami, které mají za následek blokování připojení rotavirů na buňky [25].

Dále výzkum ukázal antimikrobiální účinky ethanolových extraktů na kvasinky (*Candida albicans*, *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rosei* a *Saccharomyces avarum*) a plíseň (*Sclerotinia trifoliorum*) [4].

## 2.4 Možnosti přípravy extraktů ze stévie cukerné

Mezi nejčastější metody získávání extraktů z listů stévie cukerné patří extrakce rozpouštědlem nebo superkritická kapalinová extrakce. Na přečištění steviolglykosidů se používají procesy jako například flokulace, precipitace, iontová výměna, adsorpce s polymerními adsorbenty, adsorpce s anorganickými adsorbenty, ultrafiltrace, separace sloupcovou chromatografií a membránová separace [12].

### 2.4.1 Extrakce

Extrakce je separační metoda, jejímž principem je převedení látky z jedné fáze, v níž je rozpuštěna nebo suspendována, do fáze jiné. Toto převedení je možné, protože látka se v určitém poměru rozdělí mezi obě fáze [4].

#### 2.4.1.1 Jednotlivé typy extrakce

##### *Macerační extrakce*

Látka v pevné fázi je za studena extrahována opakovanou dávkou rozpouštědla.

##### *Digesční extrakce*

Látka v pevné fázi je za tepla extrahována opakovanou dávkou rozpouštědla.

##### *Perlokační extrakce*

Látka v pevné fázi je za studena extrahována rozpouštědlem protiproudně.

##### *Soxhletova extrakce*

Látka v pevné fázi je za horka extrahována rozpouštědlem, extrakt je stále zahuš'ován.

##### *Vytřepávací extrakce*

Látka v roztoku je extrahována jednou dávkou rozpouštědla (jednoduché vytřepávání) nebo opakovaně (opakované a frakční vytřepávání).

##### *Perforační extrakce*

Látka v roztoku je extrahována nepřetržitě rozpouštědlem, popřípadě na protiproudovém principu.

##### *Roztřepávací extrakce*

Látka je extrahována protiproudě přetržitě mezi dvě kapalně fáze [4].

##### *Superkritická kapalinová extrakce*

Je to metoda využívající k extrakci analytů z matrice CO<sub>2</sub> v nadkritickém stavu (teplota > 31 °C a tlak > 73 atm). V tomto stavu má CO<sub>2</sub> vlastnosti kapaliny i plynu a to poskytuje ideální podmínky pro rychlé extrakce s maximální výtěžností. Regulací tlaku a teploty lze měnit sílu a hustotu nadkritické kapaliny a to se dosahuje vlastností organických rozpouštědel. CO<sub>2</sub> je nepolární, proto se přidává při extrakci polárních látek k nadkritické kapalině polární rozpouštědlo (modifikátor) [26].

## 2.4.2 Možnosti přípravy extraktů a izolace steviosidu ze stévie cukerné

Základním postupem pro získání steviolglykosidů z listů stévie cukerné je extrakce vroucí vodou, vysrážení nečistot  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  nebo  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , filtrace, odpaření filtrátu *in vacuo* a krystalizace steviosidu z methanolu. Pro dosažení vyšší čistoty steviosidu se používá ionexová chromatografie na anexu, která se aplikuje po vysrážení nečistot z extraktu pomocí  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , neutralizaci  $\text{CO}_2$  a filtraci. Pro odbarvení extraktu byly použity  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  a aktivní uhlí. Pro vylepšení metody izolace byly kombinovány různé typy ionexové chromatografie v pořadí silný katex a slabý anex a na závěr bylo provedeno přečištění směsí ethanol-ether (1:5). Během posledních let se vývoj zabývá přípravou vhodného nosiče, například polyakrylát-polyaminové pryskyřice, jejímž použitím lze docílit i odbarvení extraktu [4, 8, 27].

Odstranění nežádoucích chuťových vlastností lze dosáhnout povařením listů stévie cukerné ve vodě o teplotě 90 – 110 °C za anaerobních podmínek. Extrakce horkou vodou je tedy vhodná jako první krok při izolaci steviosidu. Dalším způsobem je extrakce organickými rozpouštědly, například ethylacetátem, dioxinem, methylenchloridem, chloroformem, tetrahydrofuranem nebo ethylendichloridetherem za teploty 10 °C [8].

### 2.4.2.1 Rozdělení extrakčních metod na získání extraktů stévie cukerné

*Extrakční roztok:*

- voda - nejčastěji používaný extrakční roztok
  - některé extrakční postupy doporučují používat destilovanou vodu
  - některé extrakční postupy zase doporučují použít vodu s upraveným pH
- směs vody a alkoholu (ethanol, methanol apod.)
- organická rozpouštědla (aceton, éter) [12]

*Teplota extrakce:*

Nejčastěji se používá laboratorní teplota. Při zvýšené teplotě se sice extrakce steviolglykosidů urychluje, ale do extraktů přechází velké množství balastních látek, které zhoršují chuť eluátu, rychle se rozkládají a špatně se z eluátu odstraňují [8, 12].

*Extrakce perlukací*

Je možné pracovat s jedním válcem, zatímco extrakční roztok se pomocí čerpadla v určitý čas vrací zpět. Extrahuje se až když se mění refrakce eluátu. Eluát se přenesení do sběrné nádrže a použije se nový extrakční roztok. Extrakce se opakuje dokud do eluátu nepřejde minimálně 95 % steviolglykosidů. Výhodou je, že se může použít buď jen jeden extrakční válec, to když se extrahuje menší množství nebo víc extrakčních válců na extrakci velkého množství [8, 12].



### *Stacionární extrakce*

Výhodou je, že se využívá dobrá rozpustnost všech steviolglykosidů, které do eluátu přechází difúzí. Nevýhodou je, že přechod steviolglykosidů difúzí je velmi pomalý [8, 12].

### *Protiproudová extrakce*

Extrakce probíhá ve válci, ve kterém je šnek, látka prochází jedním směrem a v protisměru prochází extrakční roztok. Nevýhodou je, že šnek musí být dlouhý a musí být použita velká hnací síla, která posouvá látku ve válci [8, 12].

### *Superkritická kapalinová extrakce – SCFE*

Tan a kol. (1988) vlastní japonský patent na produkci steviolglykosidů superkritickou kapalinovou extrakcí s CO<sub>2</sub> a spolurozpouštědlem (methanol, ethanol, aceton). Steviolglykosidy jsou nerozpustné v CO<sub>2</sub>, ale jsou rozpustné ve směsi CO<sub>2</sub> a polárního rozpouštědla (např. ethanol, methanol, voda apod.). SCFE steviolglykosidů z listů stévie cukerné je provedena ve dvou krocích. Prvním krokem je extrakce CO<sub>2</sub> při tlaku 200 bar a teplotě 30 °C a druhým krokem je extrakce směsi CO<sub>2</sub> + voda. V prvním kroku probíhá částečné odstranění hořkých látek drastickou redukcí v CO<sub>2</sub> rozpustných složek jako jsou alkoholy, alifatické uhlovodíky, seskviterpeny a triterpeny a následuje SCFE použitím spolurozpouštědla. V prvním kroku SCFE CO<sub>2</sub> bylo měření vykonané při tlaku 200 bar a teplotě 30 °C a jedno měření bylo uskutečněno při tlaku 250 bar a teplotě 30 °C. Výtěžky vzorků byly odebrané každou hodinu a extrakce trvala 12 hodin. Extrakce s fází CO<sub>2</sub> + voda byla vykonaná při tlaku 120 a 250 bar a teplotě 10 a 16 °C. Výtěžky vzorků byly odebrané každou hodinu a extrakce trvala 12 hodin. Experimentální podmínky byly vybrané na základě Pasquel a kol. (r. 2000), který na extrakci využil směs CO<sub>2</sub> + voda, CO<sub>2</sub> + ethanol a CO<sub>2</sub> + voda + ethanol. Výtěžek byl 1,6 %, bylo obnoveno přibližně 72 % látek rozpustných v CO<sub>2</sub> a nejhojněji se vyskytujícími látkami byly diterpeny (hlavně astroinulin). Celková extrakční křivka pro systém stévie + CO<sub>2</sub> měla typický tvar a je úspěšně popsána v Sovová modelu. Systém CO<sub>2</sub> + voda + ethanol se choval podle očekávání při teplotě 10 a 16 °C a tlaku 120 a 250 bar, ale jeho chování bylo neobvyklé při teplotě 30 °C a tlaku 250 bar. Proces oddělil 50 % originálního steviosidu a 72 % rebaudiosidu A [28].

## **2.4.3 Metody čištění extraktů ze stévie cukerné**

### ***Rozpuštění ve vodě nebo jiném rozpouštědle***

Použitím methanolu je extrakce a purifikace vysoce účinná a umožňuje separaci jednotlivých steviolglykosidů. Ale i když se methanol úplně odstraní z finálního produktu a chemicky nezasahuje do produktu, použití methanolu bylo příčinou zařazení extraktů stévie cukerné mezi potravinová aditiva a ne mezi přírodní potraviny. V současnosti se používá hlavně extrakce vodou a tím se získá přírodní produkt a dosahuje se tím čistoty 96 % [12].

## ***Intově-výměnná separace***

Intově-výměnná a adsorpční sloupcová chromatografie může být používána na rafinaci extraktů. Na separační účinnost a kapacitu kolon má vliv rychlost toku, pH a eluce. Adsorpce steviolglykosidů je založena na hydrofóbní interakci, ale dekolizace je založena na iontové výměně a hydrofóbní interakci [12].

## ***Membránové procesy***

Membránovými procesy je provedena frakcionace látek podle velikosti molekul, což lze využít k odstranění nečistot. V sérii membránových procesů je v prvním kroku provedena ultrafiltrace, s níž lze odstranit až 96 % pigmentů. Dále je extrakt přečištěn diafiltrací a permeát je v posledním kroku zakoncentrován reverzní osmózou. Všechny membránové procesy probíhají za stejných podmínek: průtok 25 l/min a při teplotě 25 °C [8, 12].

## ***Krystalizace a sušení***

### **2.4.4 Přehled metod stanovení obsahu steviosidu**

- 1) Stanovení redukujících cukrů Shoorlovou metodou [12]
- 2) Tenkovrstvá chromatografie (TLC) [8]
- 3) Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [8, 12]
- 4) Reflexní spektroskopie v oblasti blízkého IR spektra (NIRS) [8, 12]
- 5) Kapilární elektroforéza (CE) [8]
- 6) Spektrofotometrie ve viditelné oblasti [12]
- 7) Spektrofotometrie v UV oblasti [12]
- 8) Enzymatická metoda [12]

#### ***2.4.4.1 Stanovení redukujících cukrů Shoorlovou metodou***

Tato metoda je teoreticky, prakticky i časově nejméně náročná. Nevyžaduje speciální zařízení ani chemikálie a je dostatečně přesná.

Redukující cukry, které přešly do vodného výluhu, vyredukuje za varu z Fehlingových roztoků  $\text{Cu}_2\text{O}$ , který se vysráží. Souběžně se provádí slepý pokus, kterým se zjistí skutečná koncentrace  $\text{Cu}^{2+}$  v pipetovaném objemu Fehlingova roztoku I. Postup je stejný jako při vlastním stanovení, ale na místo cukerného roztoku se pipetuje stejný objem destilované vody. Rozdíl spotřeby thiosíranu sodného mezi slepým pokusem a vzorkem udává množství thiosíranu, které odpovídá  $\text{Cu}_2\text{O}$  vyredukováného cukry za podmínek metody. Z tabulek pro Shoorlovou metodu se odečte odpovídající množství redukujících cukrů a přepočítá se na hmotnostní procenta v původním vzorku.

Při stanovení obsahu steviosidu se nejprve stanoví přirozené množství redukujících cukrů v extraktu Shoorlovou metodou, poté se uskuteční hydrolyza v kyselém prostředí HCl (při hydrolyze se uvolní molekuly glukosy vázané na steviosid) a následně se stanoví ve vzorku obsah redukujících cukrů Shoorlovou metodou. Odečtením vypočítaného množství glukosy

stanovené hydrolýzou a bez hydrolýzy získáme množství glukosy uvolněné ze steviosidu, které se následně přepočítá na 100 g listů stévie cukerné při zjišťování výtěžnosti extrakce nebo na 100 ml roztoku při zjišťování ztrát před a po vyčištění extraktů a po vynásobení koeficientem 1,491 získáme množství steviosidu ve vzorku.

#### **2.4.4.2 TLC analýza**

K dělení steviolglykosidů bylo použito dělení na tenké vrstvě silikagelu (GF<sub>254</sub>). Nanesené látky na tenké vrstvě se dělí v systému rozpouštědel CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O (30:20:1). Chromatogram se separovanými steviolglykosidy byl detekován postříkem směsi kyseliny sírové a anisaldehydu a inkubován po dobu 5 minut při 100 °C.

Yoshida r. 1986 ve své práci použil dvourozměrnou tenkovrstvou chromatografii. První dělení probíhalo v systému rozpouštědel n-ButOH-MetOH-voda (8:1:1) a ve druhém směru n-ButOH-ethylacetát-isopropanol-voda (30:100:65:30).

#### **2.4.4.3 HPLC analýza**

Nejčastěji používanou metodou na stanovení steviolglykosidů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Je to poměrně rychlá a spolehlivá metoda. Využívá se převážně chromatografie na obrácených fázích – nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Separace probíhá na koloně (250 x 4 mm i.d.) a jako stacionární fáze se používá Zorbax NH<sub>2</sub> a mobilní fáze je složena ze směsi acetonitril-voda (84 – 70 %, pH = 5,0) v systému s lineárním gradientem, o tlaku 8,27 MPa a průtoku kolonou 2 ml/min. Nederivatizované steviolglykosidy jsou detekovány v UV oblasti při vlnové délce 210 nm.

Před samotnou HPLC analýzou je nutná účinná předseparační úprava vzorků. Protože rostlinný materiál je v pevném skupenství, je nutné extrahovat steviolglykosidy z listů stévie cukerné do roztoku.

#### **2.4.4.4 NIRS analýza**

NIRS analýza se používá jako rychlý, přesný a nedestruktivní postup stanovení proteinů v potravě, v krmivech a v zrnech ječmene, pšenice a hrachu. Dále se používá na zjištění vlhkosti a alkaloidů v obilí.

Při použití této metody se měří množství odraženého světla, které není vzorkem absorbováno, od reflexní podložky umístěné pod měřeným vzorkem. Měření při hledání charakteristického spektra probíhá v oblasti blízkého IR spektra, což je oblast vlnových délek 1100 – 2500 nm. Steviosid v této oblasti poskytuje spektrum s charakteristickými hodnotami maxim při těchto vlnových délkách: 1332, 2240, 2264, 2284, 2356, 2496 nm. Z naměřených hodnot reflektancí při výše uvedených vlnových délkách je dále pomocí statistických metod získána dvojice nejvhodnějších signálů při vlnových délkách 2264 a 2284 nm. Tyto dvě hodnoty nám ukazují nejvhodnější oblast vlnové délky pro měření obsahu steviosidu.

Ke stanovení koncentrace steviosidu v neznámém vzorku je nutné vypracovat kalibraci asi z 20 až 50 vzorků se známou koncentrací steviosidu. Vzniklé rozpětí koncentrací steviosidu

ze známých vzorků určí oblast měření NIR spektra, ve které je při měření obsahu steviosidu v neznámém vzorku zaručena relativní přesnost měření.

NIRS může být používána na přesnou analýzu vzorků listů stévie cukerné na zjištění koncentrace steviosidu. NIRS byla prokázána jako osvědčená nedestruktivní metoda pro určení koncentrace steviosidu v surových materiálech určených pro průmyslové zpracování.

Všechny běžné extrakční procesy uvedené v odborné literatuře mají podobnou metodiku. Listy stévie jsou extrahovány horkou vodou nebo pomocí alkoholů. V některých případech jsou listy předběžně upraveny nepolárními rozpouštědly (chloroform, hexan) k odstranění éterických olejů (silice), lipidů a chlorofylu. Extrakt je přečištěn srážením solemi nebo alkalickými roztoky, následně zakoncentrován a znovu rozpuštěn v methanolu pro krystalizaci glykosidů [4].

## 2.5 Mikrobiologické metody

### 2.5.1 Mikrobiologické stanovení inhibitorů

Určováním citlivosti mikroorganismů na antimikrobiální látky zjišťujeme nejen jejich spektrum účinnosti, ale i jejich koncentraci. Mnohé antimikrobiální látky se používají při dočasné úpravě některých nestálých potravin jako tzv. konzervační prostředky, nebo při chemické dezinfekci na usmrcování patogenních mikroorganismů, tzv. dezinfekčními prostředky [4].

#### *Způsob stanovení*

*nefelometrické:* hodnotíme odpověď testovaného mikroorganismu na řadu koncentrací účinné látky měřením intenzity růstu (zákalu) v tekutém prostředí; pomocí standardní křivky je možné stanovit koncentraci v neznámých vzorcích [4].

*difúzní:* využívají tuhé agarové medium, ve kterém je naočkovaný citlivý mikroorganismus a testovaná látka difunduje mediem, čím způsobuje vznik inhibičních zón; velikost zón je závislá na koncentraci testované látky, na složení kultivační půdy, vlhkosti půdy, tloušťce kultivační půdy, pH půdy, doby inkubace a stability látky [4].

#### *Způsob nanášení testované látky*

*jamkové:* zde se testovací látky pipetují do jamek vyhloubených korkovrtem přímo do naočkované agarové vrstvy [4].

Při všech uvedených metodách je důležité, aby vrstva kultivačního media byla rovnoměrně vysoká, aby mikroorganismus byl rovnoměrně naočkovaný po celém povrchu (v celém objemu) a aby jednotlivé vzorky byly dostatečně vzdálené od okrajů plotny a navzájem se nedotýkaly [4].

### 2.5.2 Růstová křivka

Mikrobní buňka, která má ve svém okolí vhodné chemické a fyzikální podmínky roste. Přijímá z okolí energii a živiny, podle genetického programu syntetizuje sebe sama, zvětšuje svoji hmotnost a objem. Po dosažení určité velikosti se začne rozmnožovat a nové buňky opět rostou. Mikroorganismy se za optimálních podmínek rozmnožují obrovskou rychlostí. Růst mikroorganismů neprobíhá stále exponenciálně, je zpomalován spotřebou živin v kultivačním mediu nebo tvorbou toxických produktů metabolismu. Nahromadí-li se určité množství produktů metabolismu v růstovém prostředí, dalšímu rozmnožování mikroorganismů je

zabráněno. Maximální koncentrace živých buněk v 1 ml kultivačního media je u bakterií  $10^9$  a u kvasinek  $10^8$  [29].

Růstová křivka je grafické znázornění vzrůstu počtu živých buněk při submerzní batch kultivaci v tekutém mediu. Při batch systému je celý systém uzavřený vůči okolí, v průběhu kultivace nejsou přidávány ani odebírány jeho jednotlivé složky. Na osu  $x$  se vynáší čas (hod) a na osu  $y$  přirozený logaritmus počtu živých buněk. Růst mikroorganismů se sleduje buď měřením nárůstu buněčné hmoty turbidimetricky nebo nepřímou metodou počítáním buněk mikroskopicky v Bürkerově komůrce. Turbidimetrické stanovení je založeno na zvyšování zákalu tekutého živného média rostoucí kulturou. Zařízení k jeho měření se nazývá spektrofotometr. Principem stanovení je ozáření vzorku v kyvetě světlem o vlnové délce od 550 do 650 nm, podmínkou je použití čirého živného média, přičemž některé paprsky se na buňkách rozptýlí mimo optickou dráhu. Detektor pak zaznamená intenzitu světla, které prošlo kyvetou bez rozptýlení. Z poměru intenzity světla, které do vzorku vchází a které je detektorem zaznamenáno se vypočítá tzv. *optická densita* (OD) a ta je v intervalu 0-1 přímo úměrná buněčné koncentraci [30].

$$OD = \log \frac{I_{in}}{I_{out}}$$

Průběh růstu mikroorganismů je charakterizován několika fázemi:

### 1) LAG – FÁZE

Počáteční fáze, která vzniká při zahájení kultivace, záhy po zaočkování. Je charakteristická tím, že buněk zatím nepřibývá, naopak starší odumírají. Buňky se nerozmnožují, pouze se adaptují na kultivační prostředí a připravují se k buněčnému dělení. Zvětšují svůj objem a aktivuje se jejich enzymový systém, například se syntetizují indukovatelné enzymy nutné pro využití přítomných substrátů. Délka lag – fáze závisí na druhu mikroorganismu, fyziologickém stavu buněk, složení růstového prostředí a na velikosti a stáří inokula. V průmyslových procesech je tato fáze nežádoucí a je snaha o co největší zkrácení. Možnosti zkrácení této fáze jsou připravit inokulum na stejné půdě jako v reaktoru, připravit optimální množství inokula (5 – 10 % objemu media), mít vhodné stáří inokulační kultury a oddělit buňky mikroorganismů od inokulačního media.

### 2) FÁZE ZRYCHLENÉHO RŮSTU

Kultura je plně přizpůsobena podmínkám prostředí. Buňky se začínají množit s narůstající rychlostí dělení a zkracující se generační dobou. Zvyšuje se intenzita metabolismu a citlivost na nepříznivé vlivy prostředí. Čím je medium chudší na živiny, tím je tato fáze kratší.

### 3) EXPONENCIÁLNÍ FÁZE

Fáze intenzivního a pravidelného množení. Buňky zde mají nejkratší generační dobu, která je po celou dobu exponenciální fáze konstantní. Počet buněk roste geometrickou řadou exponenciálně s časem. Tato fáze se také označuje jako logaritmická, vzhledem k lineární závislosti mezi logaritmem počtu buněk a dobou růstu. Buněčný metabolismus je aktivní, tvoří se primární metabolity a dochází k rychlému využívání substrátu. Předpokladem exponenciální fáze je dostatek živin, proces není limitován ani jednou

živinou. Úbytek buněk odumíráním v poměru k přírůstku buněk je minimální. V této fázi se zachytí nejvíce buněk v mitóze, což lze využít pro chromozomové vyšetření.

#### 4) FÁZE ZPOMALENÉHO RŮSTU

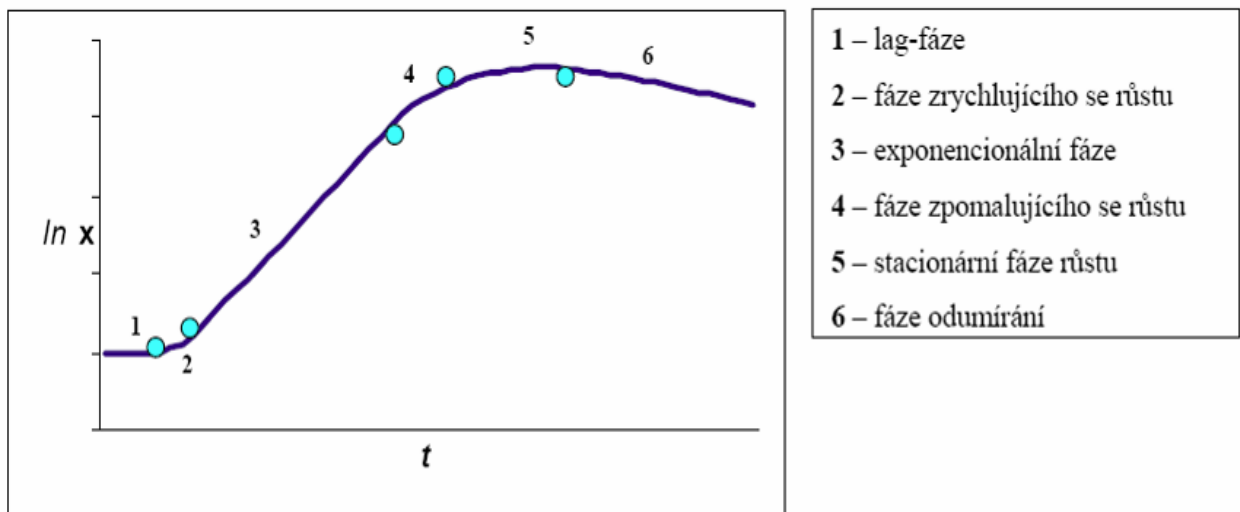
Rychlost rozmnožování se snižuje až k rovnovážnému stavu s odumíráním buněk. Rychlost dělení se snižuje v důsledku vyčerpání živin a hromadění metabolitů.

#### 5) STACIONÁRNÍ FÁZE

Po vyčerpání některé živiny nebo při vzrůstu koncentrace toxického metabolitu nad určitou hranici dojde k zastavení růstu buněčné populace. V této fázi buňky nepřibývají, ale ani neubývají, jejich množství je maximální. Počet odumírajících buněk je kompenzován jejich pomalým rozmnožováním. Maximální délka stacionární fáze pro různé mikroorganismy je různá v závislosti na jejich citlivosti ke stresovým podmínkám (hladovění nebo přítomnost toxického metabolitu). Odumírání buněk ve stacionární fázi je doprovázeno řadou biochemických příznaků. Projevují se inhibiční mechanismy (kontaktní inhibice nebo produkce růstových inhibitorů). Tato fáze má význam z hlediska produkce sekundárních metabolitů.

#### 6) FÁZE ODUMÍRÁNÍ

Postupné odumírání buněk, které převažuje nad přírůstkem buněk. Buňky se již nerozmnožují a hynou. Jejich koncentrace v čase klesá a rychlost dělení klesá pod nulovou hodnotu. U různých mikroorganismů může trvat dny, týdny až měsíce [29, 31, 32].



Obr. č. 4: Průběh růstové křivky mikroorganismů [33]

## 2.5.3 Použité mikroorganismy

### 2.5.3.1 *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 řetízky 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 [34, 35, 36].

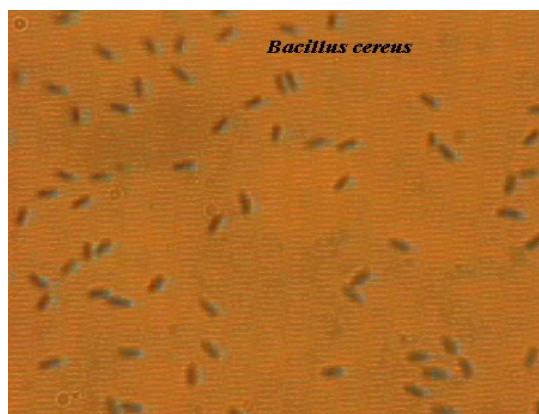
*B. cereus* roste v teplotním rozmezí 8 – 55 °C, optimálně při 28 – 35 °C a není zaznamenána žádná tolerance pro vodní aktivitu (min. ~ 0,95). Rozpětí hodnot pH, které umožňují ještě růst je přibližně 4,9 – 9,3. Je kultivačně nenáročný. Roste na běžných médiích, na krevním agaru vyrůstá ve velkých drsných koloniích s nepravidelnými okraji, obklopených zónou β - hemolýzy [34, 35].

*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. *B. cereus* má bohaté enzymatické vybavení, takže může rozkládat nejrůznější organické kyseliny, produkuje penicilinasu, která inaktivuje β – laktamová antibiotika. Vylučuje proteolytické enzymy, hydrolyzuje kasein a želatinu. Pro svůj růst potřebuje přídavek aminokyselin jako zdroj dusíku, ale nevyžaduje přídavek růstových faktorů. Tvoří 2,3-butandiol a glycerol. Je schopen syntetizovat lecithinasu, která způsobuje zamlženost ve žloutkovaječném bujónu a neprůhledné opalescence okolo kolonií na tomto typu agaru [34, 35].

*B. cereus* je producentem řady enzymů a toxinů. První skupinu tvoří fosfolipasy C, které štěpí fosfatydilcholin, fosfatydilinositol a sfingomyelin. Dále jsou to dva hemolysiny – hemolysin I (cereolysin) je oxygenlabilní a letální pro myš a hemolysin II je oxygenlabilní. Dále je to průjmový toxin – enterotoxin (inaktivace 56 °C, 5 min), který zvyšuje permeabilitu cév, je nekrotizující a letální pro myš. Otrava nastává po inkubaci 8 – 24 hodin a spojuje se s konzumací masových pokrmů a omáček. Druhým toxinem je emetický toxin, který je vysoce termostabilní (není inaktivován záhřevem 128 °C, 90 min), odolný vůči pH a proteázám. Otrava nastává po inkubaci 1 – 6 hodin po požití kontaminované potravy a je dávana do souvislosti s požitím rýžových pokrmů a těstovin [34, 35, 37].

*B. cereus* může způsobovat onemocnění z potravin. Onemocnění vzniká po požití kontaminovaných potravin, enterotoxikogenním 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 potravině na koncentraci buněk 10<sup>7</sup> g<sup>-1</sup> potraviny (u dětí stačí již koncentrace 10<sup>5</sup> g<sup>-1</sup>) [34, 35, 36].





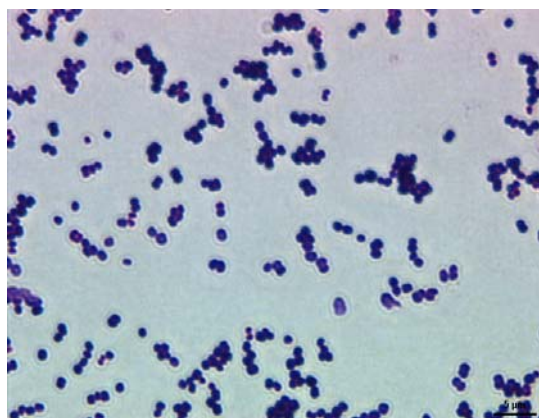
Obr. č. 5: *Bacillus cereus* [37]

### 2.5.3.2 *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  $\mu\text{m}$ , které tvoří balíčky nebo se shlukují do tetrad. Optimální kultivační teplota je v rozmezí teplot 25 – 37  $^{\circ}\text{C}$ . 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 letálními účinky ultrafialové složky slunečního světla, a proto se *M. luteus* vyskytuje jako častá vzdušná kontaminace [4, 36, 38].

Je schopen růst v přítomnosti 5% NaCl, čehož se využívá při jeho stanovení, ale v 15% NaCl už neroste. Hydrolyzuje želatinu a neokyseluje glukosu [36, 38].

*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 [4, 38].



Obr. č. 6: *Micrococcus luteus* [38]

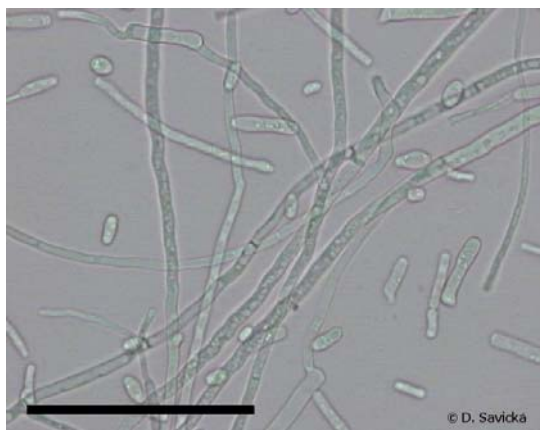
### 2.5.3.3 *Geotrichum candidum*

*Geotrichum candidum* (dříve *Oodidium lactis*) patří mezi asporogenní kvasinky (*Ascomycetes*) z čeledi *Endomycetaceae*. Tvoří přechod mezi kvasinkami a plísněmi. Na sladidinových agarových půdách tvoří jemné kožesinové porosty, které jsou tvořeny velmi nízkým hyalinním myceliem. Mycelium se často dichotomicky větví, tzn. vrchol pučí současně na dvou místech. Vlákna se rozpadají na krátké úseky arthrospory neboli arthrokonidie, které mají cylindrický, válcovitý, soudkovitý až elipsoidní tvar. Kolonie jsou zpočátku matné, později i sliznaté a jsou bílé sametovité až vatovité. V kapalném mediu vytváří jemnou bílou celistvou kožku [36, 39, 40, 41].

*G. candidum* se rozmnožuje vegetativně – vytváří arthrokonidie a pohlavně – je to nesporulující forma perfektního stádia *Galactomyces geotrichum*. Je to celosvětově rošířený saprofyt, který se může vyvinout i v sekundárního patogena [39, 40, 41].

*G. candidum* nemá kvasné schopnosti, cukry nefermentuje, asimiluje glukosu, galaktosu, xylosu, redukuje ureu a reakce s aktidionem je po 48 hodinách pozitivní. Je enzymaticky velmi aktivní, rozkládá sacharidy, bílkoviny i tuky. Optimální teplota buněk izolovaných z rostlin a mrtvého biologického materiálu je 25 – 27 °C, buněk izolovaných ze živočichů 30 – 31 °C [4, 36, 41].

Vyskytuje se ubikvitně v půdě, ve vodě i ve vzduchu, provází tedy člověka i zvířata v každé činnosti. Je to nejčastější kontaminant mléčných výrobků, hlavně tvarohu a jogurtu, mléka, smetany, sýru, droždí, na zkysané kapustě a okurkách a na tukových tkáních masa, neboť obsahuje proteolytické a lipolytické enzymy. Vyskytuje se i v aktivovaných kalech z odpadních vod, z odpadu po zpracování mořských ryb apod. Je to lipolytická kvasinka, vhodná na využití odpadních produktů ze zpracování tučných ryb a tučných mléčných produktů a na neutralizaci zápar z rafinace olejů [36, 39].



Obr.č. 7: *Geotrichum candidum* [39]

#### 2.5.3.4 *Hansenula anomala*

*Hansenula anomala* patří mezi křísotvorné kvasinky z čeledi *Saccharomycetaceae*. Tvoří askospory a lehce sporuluje i v křísu. Vegetativní buňky jsou kulovité nebo elipsoidní. Vytváří i bohatě větvené pseudomycelium a dokonce i pravé hyfy. Nátěr na tuhých půdách je těstovitý, bílý hladký a na povrchu moučný s cípovitým nebo kořínkovitým okrajem. V kapalném mediu tvoří na povrchu kučeravé suché kůžky [36, 42, 43].

*H. anomala* je schopna využívat dusičnan jako zdroj dusíku, zkvašuje sacharidy – maltosu, sacharosu a laktosu. Tvoří kyseliny a estery [36, 42, 43].

*H. anomala* patří mezi nejčastěji se vyskytující kvasinky, převážně jako kontaminant v potravinářském průmyslu. V pivovarech způsobuje zákaly piva. Oxiduje ethanol, z alkoholů a kyselin pak vznikají estery, které způsobují nežádoucí chuť. Používá se pro kvasnou výrobu octanu ethylnatého [36, 42, 43].



Obr.č. 8: *Hansenula anomala* [43]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Seznam použitých přístrojů, chemikálií a materiálů

Autokláv PS 50V (BMT, Vaposperi)  
Biologický termostat (IP 100-U)  
Bürkerova komůrka 17860 (meopta, 0,100)  
Digitální fotoaparát Olympus C-5060 widezoom  
Elektrický vaříč GM Electronic PV-1X  
Laboratorní světelný mikroskop LII 00A  
Laboratorní třepačka LT-2 (Sklárny Kavalier a.s.)  
Laboratorní váhy SPO 61 (SCALTEC, max – 2100 g, d = 0,1g)  
Stolní parní sterilizátor (Legostima)  
Turbidimetr TN-100 (Eutech instruments)  
Vodní lázeň (GFL Burgwedel, Germany)

Bakteriologický agar (HIMEDIA Laboratories Limited, India)  
Destilovaná voda  
Ethanol 99,8% (Riedel-de Haën)  
Masopeptonový agar  
Methanol 99,9% (Riedel-de Haën)  
Sladina (STAROBRNO, Brno)  
Sladinový agar (STAROBRNO, Brno)  
Živný bujón č. 2 (HIMEDIA Laboratories Limited, India)

rostlina - *Stevia rebaudiana* Bertoni (země původu ČR)  
- *Stevia rebaudiana* Bertoni (země původu Uzbekistán)

mikroorganismus - *Bacillus cereus* CCM 2010  
- *Geotrichum candidum* CCM 210  
- *Hansenula anomala* CCY 38-1-16  
- *Micrococcus luteus* CCY 16-1-9

## 3.2 Kultivační media a jejich příprava

### 3.2.1 Medium pro kultivaci a uchovávání bakterií

#### ***M-2: Masopeptonový agar (MPA) č. 2:***

*Složení a příprava:*

masový extrakt.....	10 g
pepton (vyrobený z masa).....	10 g
chlorid sodný (NaCl).....	5 g
agar (dle viskozity).....	15 – 20 g
destilovaná voda.....	1000 ml
pH.....	7,2 – 7,3

Předepsané ingredience se postupně rozpustí v destilované vodě za zahřívání v Kochově parním hrnci. Potom se upraví pH na hodnotu 7,2 – 7,3. Sterilizuje se v autoklávu po dobu 30 minut za přetlaku 0,1 MPa.

#### ***M-4: Živný bujón č. 2:***

*Složení a příprava:*

masový extrakt.....	10 g
pepton (vyrobený z masa).....	10 g
chlorid sodný (NaCl).....	5 g
destilovaná voda.....	1000 ml
pH.....	7

25 g živného bujónu č. 2 se rozpustí za tepla v 1000 ml purifikované vody. Po důkladném rozpuštění se půda podle požadavků plní do zkumavek nebo vhodně zvolených nádob a sterilizuje se 20 min při 115 °C.

### 3.2.2 Medium pro kultivaci a uchovávání kvasinek

#### ***M-5: Sladinový agar:***

*Složení a příprava:*

pivovarská sladina ředěná na 7° dle Ballinga.....	1000 ml
agar.....	20 g

Po krátkém rozvaření agaru se sterilizuje autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Hodnota pH připravovaného media má být 4.

#### ***M-21: Sladinové medium:***

Sladina získaná z pivovaru obsahuje asi 16 % hmot. extraktu. Zředí se na 7 až 8 % hmot. extraktu vodou. Obsah extraktu se měří sacharometrem.

### 3.3 Použité metody a postupy práce

K testování vybraných mikroorganismů a určení jejich růstové křivky byly použity připravené extrakty a maceráty ze sušené stévie cukerné. Na daných mikroorganismech byl také testován inhibiční účinek extraktů ze sušené stévie cukerné.

*Extrakty a maceráty byly připraveny:*

- ze sušené stévie cukerné (pěstované v ČR)
- ze sušené stévie cukerné (pěstované v Uzbekistánu)

#### 3.3.1 Příprava ethanolového extraktu ze sušené stévie cukerné

*Příprava odpařovaného extraktu ze sušené stévie cukerné*

6 případně 10 g rozdrcené rostliny bylo zalito 100 ml 99,8% ethanolu o teplotě 50 °C a extrahováno 15 případně 30 min při laboratorní teplotě (25 °C). Rostlinné extrakty byly zfiltrány a filtráty odpařeny na vodní lázni s nastavenou teplotou 70 °C. Odparky byly rozpuštěny v 10 ml 99,8% ethanolu. Takto připravené extrakty byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

*Příprava neodpařovaného extraktu ze sušené stévie cukerné*

6 případně 10 g rozdrcené rostliny bylo zalito 100 ml 99,8% ethanolu o teplotě 50 °C a extrahováno 15 případně 30 min při laboratorní teplotě (25 °C). Rostlinné extrakty byly zfiltrány a filtráty uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

#### 3.3.2 Příprava methanolového extraktu ze sušené stévie cukerné

*Příprava odpařovaného extraktu ze sušené stévie cukerné*

6 případně 10 g rozdrcené rostliny bylo zalito 100 ml 99,9% methanolu o teplotě 50 °C a extrahováno 15 případně 30 min při laboratorní teplotě (25 °C). Rostlinné extrakty byly zfiltrány a filtráty odpařeny na vodní lázni s nastavenou teplotou 70 °C. Odparky byly rozpuštěny v 10 ml 99,9% methanolu. Takto připravené extrakty byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

*Příprava neodpařovaného extraktu ze sušené stévie cukerné*

6 případně 10 g rozdrcené rostliny bylo zalito 100 ml 99,8% methanolu o teplotě 50 °C a extrahováno 15 případně 30 min při laboratorní teplotě (25 °C). Rostlinné extrakty byly zfiltrány a filtráty uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

### 3.3.3 Příprava ethanolového macerátu ze sušené stévie cukerné

#### *Příprava odpařovaného macerátu ze sušené stévie cukerné*

10 g rozdrcené rostliny bylo zalito 100ml 99,8% ethanolu o teplotě 50 °C a macerováno 24 h při laboratorní teplotě (25 °C). Rostlinné maceráty byly zfiltrány a filtráty odpařeny na vodní lázni s nastavenou teplotou 70 °C. Odparky byly rozpuštěny v 10 ml 99,8% ethanolu. Takto připravené maceráty byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

#### *Příprava neodpařovaného macerátu ze sušené stévie cukerné*

10 g rozdrcené rostliny bylo zalito 100 ml 99,8% ethanolu o teplotě 50 °C a macerováno 24 h při laboratorní teplotě (25 °C). Rostlinné extrakty byly zfiltrány a filtráty uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

### 3.3.4 Příprava methanolového macerátu ze sušené stévie cukerné

#### *Příprava odpařovaného macerátu ze sušené stévie cukerné*

10 g rozdrcené rostliny bylo zalito 100 ml 99,9% methanolu o teplotě 50 °C a macerováno 24 h při laboratorní teplotě (25 °C). Rostlinné maceráty byly zfiltrány a filtráty odpařeny na vodní lázni s nastavenou teplotou 70 °C. Odparky byly rozpuštěny v 10 ml 99,9% methanolu. Takto připravené maceráty byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

#### *Příprava neodpařovaného macerátu ze sušené stévie cukerné*

10 g rozdrcené rostliny bylo zalito 100 ml 99,9% methanolu o teplotě 50 °C a macerováno 24 h při laboratorní teplotě (25 °C). Rostlinné extrakty byly zfiltrány a filtráty uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

### 3.3.5 Stanovení růstové křivky

K 10 ml vysterilizovaného živného média bylo přidáno 10 ml extraktu, macerátu, metOH nebo etOH. Z mikrobiální kultury uchovávané 24 h v termostatu při 30 °C na šikmém agaru bylo zaočkováno 10 ml destilované vody, z takto zaočkovaného media byl přidán 1 ml k 10 ml vysterilizovaného živného media s 10 ml extraktu (macerátu, etOH, metOH). Takto připravené medium bylo umístěno na třepačku, kde kultivace probíhala 7 dní. Pro měření turbidimetrie a pro nepřímé počítání buněk pod mikroskopem byl odebírán vzorek 3krát denně po 3 hodinách.

### 3.3.6 Ověření antimikrobiálních účinků stévie cukerné

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

Do zkumavky se 4,5 ml sterilního živného bujónu č. 2 byla naočkována kultura mikroorganismů, která byla inkubována 24 hodin při 30 °C v termostatu. Za 24 hodin byl

z této kultury přidán 0,1 ml do vysterilizovaného agaru, který byl ochlazen na cca 45 °C. Takto připravené zaočkované medium bylo rozléváno na plastové Petriho misky (15 ml). Do tuhého agaru byly sterilním korkovrtem vyhloubeny tři jamky, do kterých bylo pipetováno 0,1 ml testovaného extraktu a macerátu (etOH a metOH), který byl uchováván 24 hodin při 4 °C. Petriho misky byly inkubovány v termostatu při 30 °C po dobu 72 hodin. Poté byla zhotovena fotografická dokumentace jednotlivých Petriho misek.

Tab. č. 4: Přehled připravených extraktů a macerátů pro stanovení růstové křivky a ověření antimikrobiálních účinků sušené stévie cukerné

		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Hansenula anomala</i>
etOH extrakt	OESU	+	+	+	+
	NESU	+	+	+	+
	OESČR	+	+	+	+
metOH extrakt	OESU	+	+	-	-
	NESU	+	+	-	-
	OESČR	+	+	-	-
etOH macerát	OMSU	+	+	-	-
	NMSU	+	+	-	-
	OMSČR	+	+	-	-
metOH macerát	OMSU	+	+	-	-
	NMSU	+	+	-	-
	OMSČR	+	+	-	-
etOH zkouška		+	+	+	+
metOH zkouška		+	+	-	-

+ ... extrakt a macerát byl připraven, - ... extrakt a macerát nebyl připraven

OESU – odpařovaný extrakt ze sušené stévie cukerné z Uzbekistánu

OMSU – odpařovaný macerát ze sušené stévie cukerné z Uzbekistánu

NESU – neodpařovaný extrakt ze sušené stévie cukerné z Uzbekistánu

NMSU – neodpařovaný macerát ze sušené stévie cukerné z Uzbekistánu

OESČR – odpařovaný extrakt ze sušené stévie cukerné z České republiky

OMSČR – odpařovaný macerát ze stévie cukerné z České republiky



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Antimikrobiální účinky extraktů a macerátů stévie cukerné

#### 4.1.1 Růstová křivka a inhibiční zóny bakterie *Bacillus cereus*

Pro stanovení růstové křivky a ověření inhibičních zón byly vybrány tyto extrakty a maceráty:

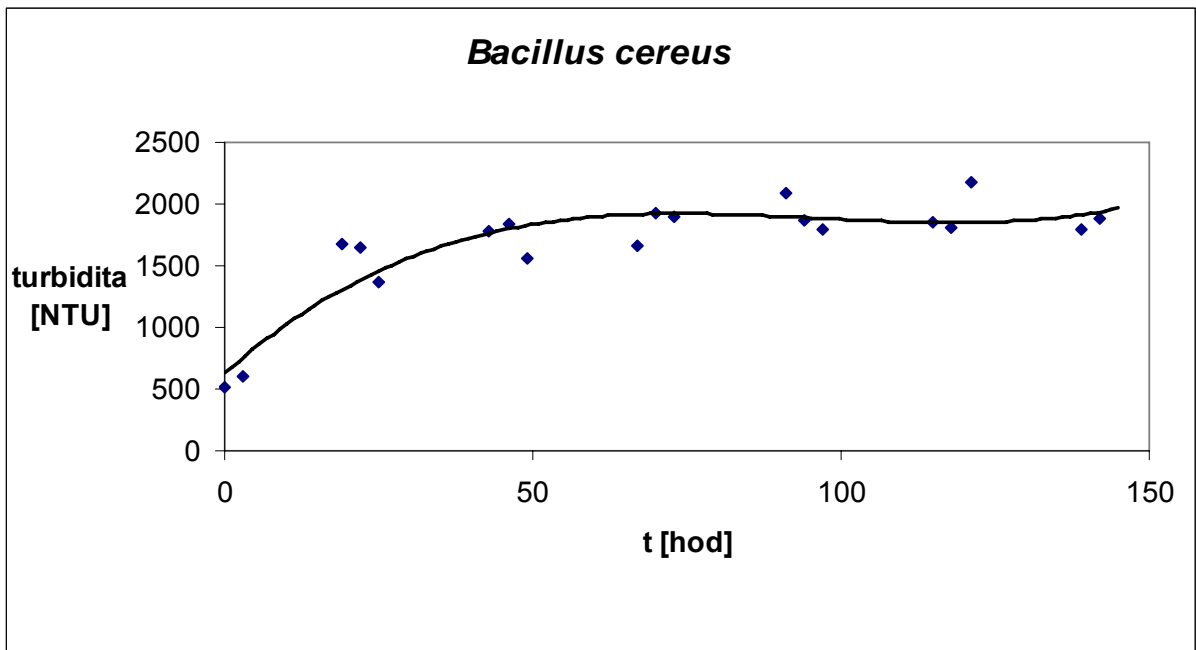
- ethanolový extrakt – množství 10 g a doba extrakce 30 min
- methanolový extrakt – množství 10 g a doba extrakce 30 min
- ethanolový macerát – množství 10 g a doba macerace 24 h
- methanolový macerát – množství 10 g a doba macerace 24 h

V tabulkách jsou uvedeny doba stanovení růstové křivky a vypočítané hodnoty zákalu zaočkovaného živného media s extrakty (maceráty, etOH nebo metOH), tyto hodnoty byly vyneseny do grafu. Na obrázcích jsou znázorněny inhibiční zóny extraktů a macerátů ze stévie cukerné na agarových plotnách po 72 h kultivace.

##### 4.1.1.1 *Bacillus cereus*

Tab. č. 5: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Bacillus cereus*

<i>Bacillus cereus</i>	
t (hod.)	turbidita (NTU)
0	507,67
3	602,67
19	1676,67
22	1645,33
25	1365,00
43	1784,67
46	1834,67
49	1565,33
67	1665,67
70	1930,00
73	1890,33
91	2093,33
94	1870,67
97	1796,33
115	1846,00
118	1806,33
121	2173,33
139	1799,00
142	1889,33
145	2823,33



Graf č. 1: Růstová křivka bakterie *Bacillus cereus*

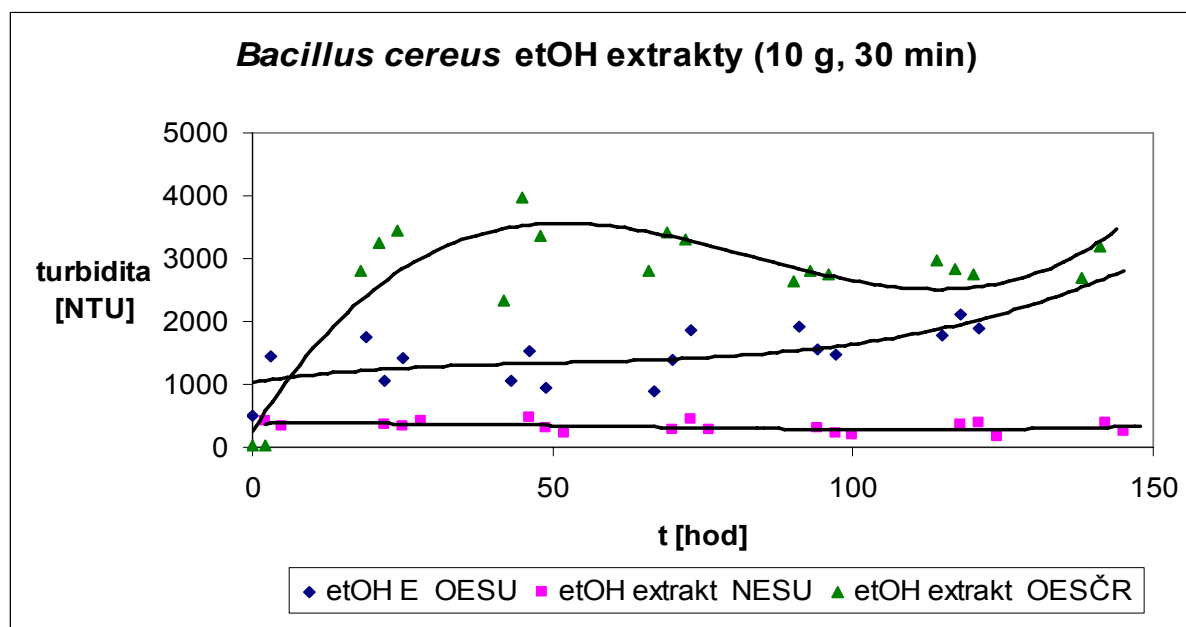


Obr. č. 9: *Bacillus cereus* na masopeptonovém agaru

#### 4.1.1.2 *Bacillus cereus* – ethanolové extrakty

Tab. č. 6: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti etOH extraktů

etOH E OESU		etOH E NESU		etOH E OESČR	
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	506,67	2	529,67	0	15,03
3	2656,67	5	404,33	2	15,04
19	2022,00	22	337,67	18	2803,33
22	1454,33	25	371,67	21	3263,33
25	1761,00	28	342,00	24	3456,67
43	1052,67	46	414,33	42	2346,67
46	1403,33	49	477,67	45	3976,67
49	1064,00	52	309,33	48	3363,33
67	1523,33	70	223,33	66	2806,67
70	957,33	73	280,67	69	3423,33
73	899,00	76	449,67	72	3303,33
91	1384,33	94	290,67	90	2643,33
94	1860,00	97	295,67	93	2803,33
97	1903,67	100	222,00	96	4223,33
115	1564,67	118	203,33	114	2750,00
118	1485,67	121	364,00	117	2966,67
121	1780,00	124	390,33	120	2846,67
139	2122,67	142	172,00	138	2750,00
142	1890,33	145	396,67	141	2703,33
145	1771,67	148	246,33	144	3183,33

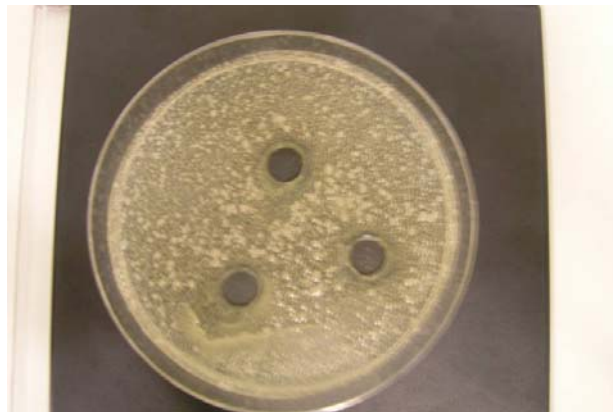


Graf č. 2: růstová křivka bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti etOH extraktů

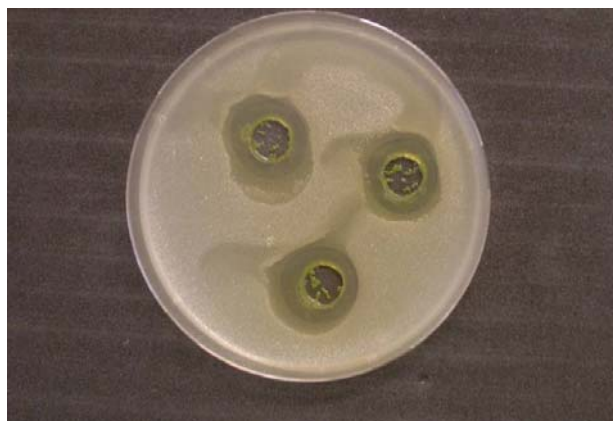
Z hodnot uvedených v *Tab. č. 6* a z jejího grafického zpracování (*Graf č. 2*) vyplývá, že největší inhibiční účinek na bakterii *Bacillus cereus* vykazoval neodpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Naopak nejmenší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky. V porovnání s hodnotami uvedenými v *Tab. č. 5* a s *Grafem č. 1* vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu téměř shodný průběh s růstovou křivkou bakterie *Bacillus cereus*, neodpařovaný extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval výrazně nižší hodnoty, naopak odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky vykazoval dokonce vyšší hodnoty než růstová křivka bakterie *Bacillus cereus*. Z *Grafu č. 2* dále vyplývá, že oba extrakty ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazovaly větší inhibiční účinky než extrakt ze stévie cukerné z České republiky.



*Obr. č. 10: odpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



*Obr. č. 11: neodpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



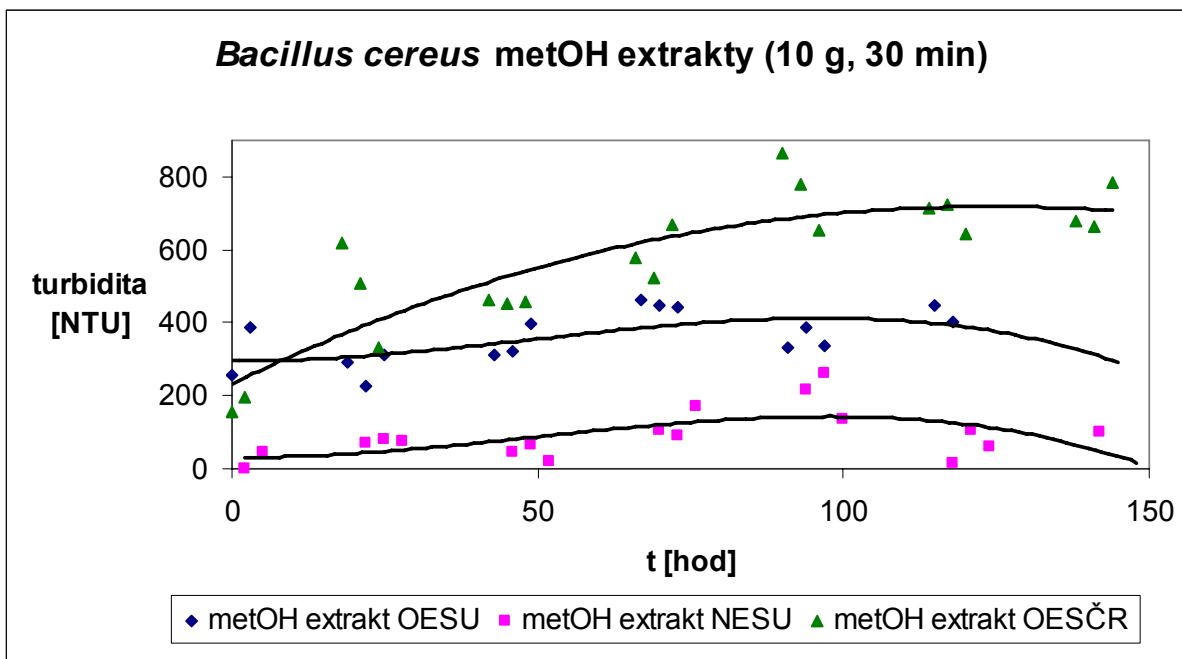
Obr. č. 12: odpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z České republiky

Z Obr. č 10, 11 a 12 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu, naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.1.3 *Bacillus cereus* – methanolové extrakty

Tab. č. 7: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti metOH extraktů

metOH E OESU		metOH E NESU		metOH E OESČR	
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	257,33	2	2,40	0	157,33
3	795,67	5	45,67	2	195,43
19	387,00	22	70,33	18	619,00
22	509,00	25	79,00	21	506,00
25	802,33	28	74,33	24	333,33
43	290,67	46	45,33	42	460,33
46	224,00	49	65,67	45	452,33
49	313,67	52	21,00	48	458,67
67	313,67	70	106,67	66	579,67
70	320,67	73	89,00	69	524,67
73	399,33	76	171,67	72	668,67
91	460,67	94	218,67	90	863,00
94	446,67	97	263,67	93	777,67
97	440,67	100	136,67	96	653,67
115	331,67	118	15,67	114	714,00
118	386,00	121	104,00	117	726,33
121	336,33	124	61,33	120	643,33
139	448,33	142	102,67	138	677,00
142	402,33	145	13,67	141	665,00
145	521,33	148	0,00	144	783,00

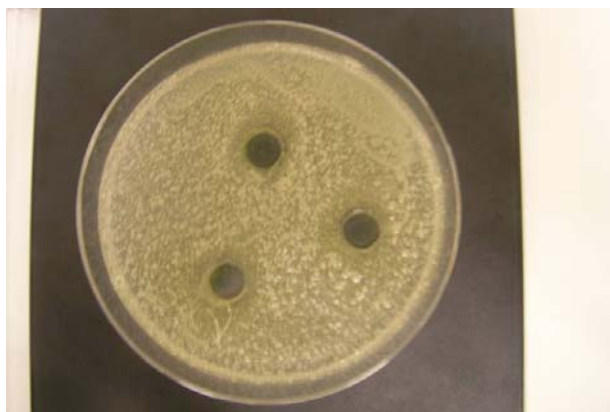


Graf č. 3: růstová křivka bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti metOH extraktů

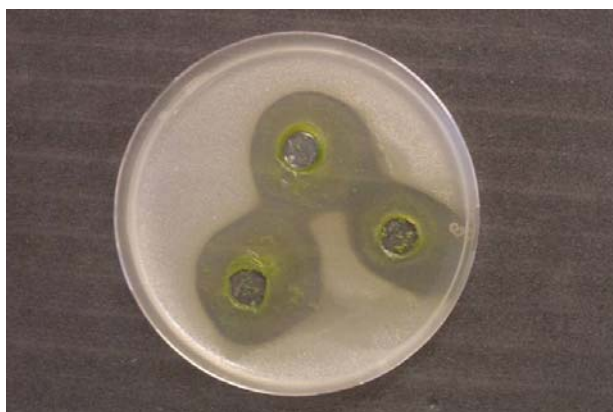
Z hodnot uvedených v Tab. č. 7 a z jejího grafického zpracování (Graf č. 3) vyplývá, že největší inhibiční účinek na bakterii *Bacillus cereus* vykazoval neodpařovaný methanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Naopak nejmenší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný methanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky. V porovnání s hodnotami uvedenými v Tab. č. 5 a s Grafem č. 1 vykazovaly všechny methanolové extrakty výrazné inhibiční účinky, z nichž největší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného methanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Z Grafu č. 3 dále vyplývá, že oba extrakty ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazovaly větší inhibiční účinky než extrakt ze stévie cukerné z České republiky.



Obr. č. 13: odpařovaný metOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu



*Obr. č. 14: neodpařovaný metOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



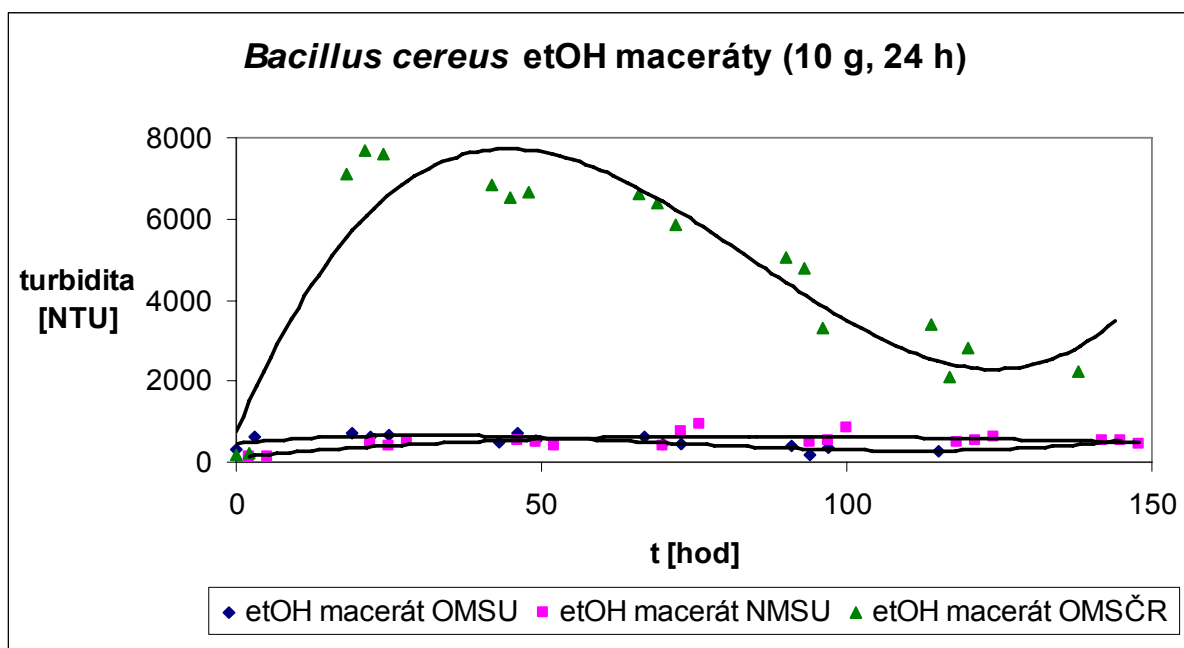
*Obr. č. 15: odpařovaný metOH extrakt ze stévie cukerné z České republiky*

Z Obr. č 13, 14 a 15 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný methanolvý extrakt ze stévie cukerné z České republiky, naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného methanolvého extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.1.4 *Bacillus cereus* – ethanolové maceráty

Tab. č. 8: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti etOH macerátů

etOH M OMSU		etOH M NMSU		etOH M OMSČR	
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	331,33	2	133,00	0	198,97
3	1962,67	5	134,33	2	203,67
19	1755,67	22	512,33	18	7126,67
22	1380,67	25	411,67	21	7670,00
25	1199,00	28	529,33	24	7610,00
43	1233,67	46	545,33	42	6823,33
46	625,33	49	482,00	45	9836,67
49	701,00	52	383,67	48	6526,67
67	648,00	70	400,00	66	6666,67
70	657,67	73	762,67	69	6596,67
73	470,33	76	939,00	72	6393,33
91	723,00	94	469,33	90	8506,67
94	552,33	97	549,33	93	5850,00
97	606,67	100	840,67	96	5053,33
115	460,33	118	512,33	114	4770,00
118	448,67	121	528,00	117	3326,67
121	394,00	124	638,00	120	3410,00
139	193,00	142	537,33	138	2080,00
142	378,67	145	516,33	141	2806,67
145	280,33	148	440,67	144	2236,67



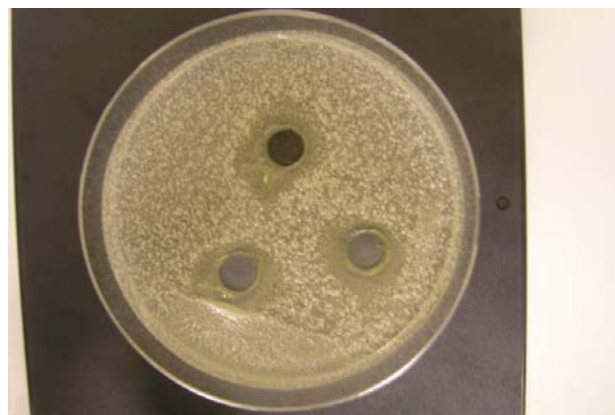
Graf č. 4: růstová křivka bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti etOH macerátů



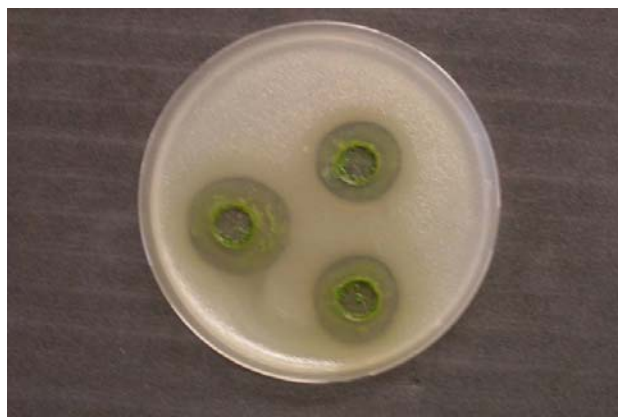
Z hodnot uvedených v *Tab. č. 8* a z jejího grafického zpracování (*Graf č. 4*) vyplývá, že největší inhibiční účinek na bakterii *Bacillus cereus* vykazoval neodpařovaný ethanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu, přičemž odpařovaný ethanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval nepatrně nižší inhibiční účinky. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného ethanolového macerátu ze stévie cukerné z České republiky. V porovnání s hodnotami uvedenými v *Tab. č. 5* a s *Grafem č. 1* vykazovaly všechny ethanolové maceráty výrazné inhibiční účinky, z nichž největší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného ethanolového macerátu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Z *Grafu č. 4* dále vyplývá, že oba extrakty ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazovaly větší inhibiční účinky než extrakt ze stévie cukerné z České republiky.



*Obr. č. 16: odpařovaný etOH macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



*Obr. č. 17: neodpařovaný etOH macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



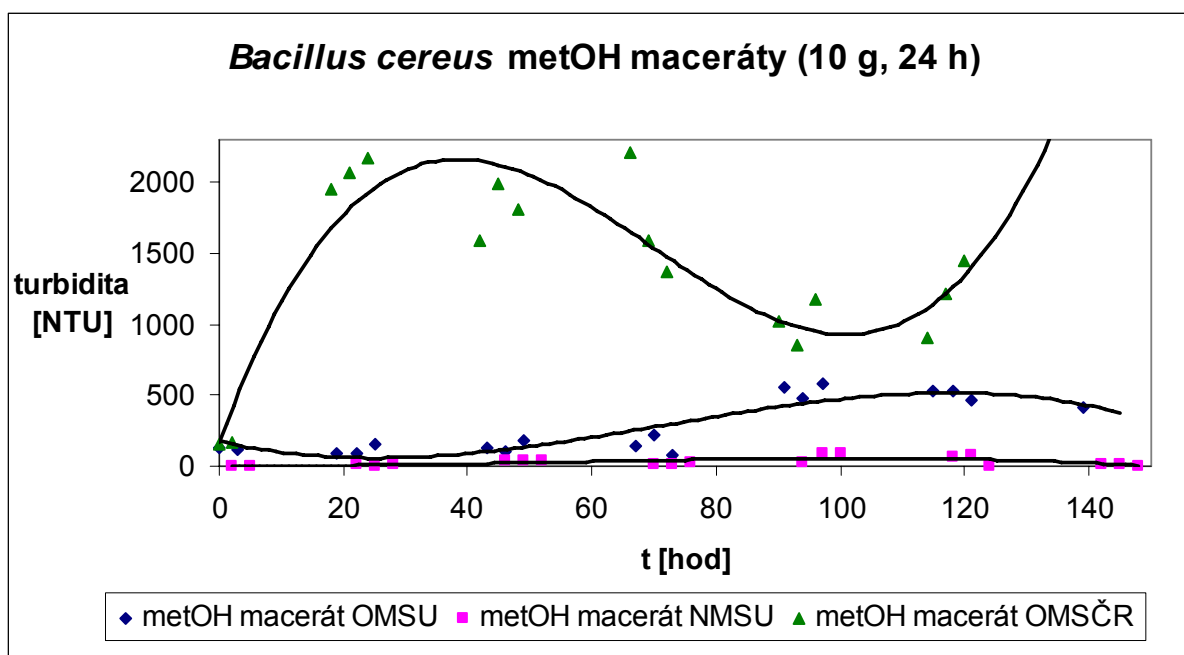
Obr. č. 18: odpařovaný etOH macerát ze stévie cukerné z České republiky

Z Obr. č 16, 17 a 18 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky, naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.1.5 *Bacillus cereus* – methanolové maceráty

Tab. č. 9: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti metOH macerátů

metOH M OMSU		metOH M NMSU		metOH M OMSČR	
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	131,73	2	0,00	0	158,13
3	112,00	5	1,00	2	164,30
19	94,00	22	17,33	18	2760,00
22	95,00	25	0,00	21	2530,00
25	159,33	28	10,00	24	3300,00
43	125,67	46	37,67	42	1951,00
46	107,00	49	42,33	45	2070,00
49	176,00	52	40,67	48	2176,67
67	139,00	70	11,33	66	1588,67
70	221,00	73	16,00	69	1991,67
73	83,00	76	20,67	72	1803,67
91	554,67	94	21,67	90	2206,67
94	483,33	97	86,33	93	1585,67
97	576,67	100	96,00	96	1367,00
115	531,00	118	69,00	114	1021,67
118	535,00	121	77,67	117	853,33
121	459,33	124	1,33	120	1171,33
139	298,67	142	7,00	138	904,00
142	653,67	145	18,67	141	1219,67
145	411,67	148	4,33	144	1442,67



Graf č. 5: růstová křivka bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti metOH macerátů

Z hodnot uvedených v Tab.č. 9 a z jejího grafického zpracování (Graf č. 5) vyplývá, že největší inhibiční účinek na bakterii *Bacillus cereus* vykazoval neodpařovaný methanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného methanolového macerátu ze stévie cukerné z České republiky. V porovnání s hodnotami uvedenými v Tab. č. 5 a s Grafem č. 1 vykazovaly oba methanolové maceráty ze stévie cukerné z Uzbekistánu výrazné inhibiční účinky, z nichž větší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného methanolového macerátu. Z Grafu č. 4 dále vyplývá, že oba extrakty ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazovaly výrazně větší inhibiční účinky než extrakt ze stévie cukerné z České republiky.



Obr. č. 19: odpařovaný metOH macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu



*Obr. č. 20: neodpařovaný metOH macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu*

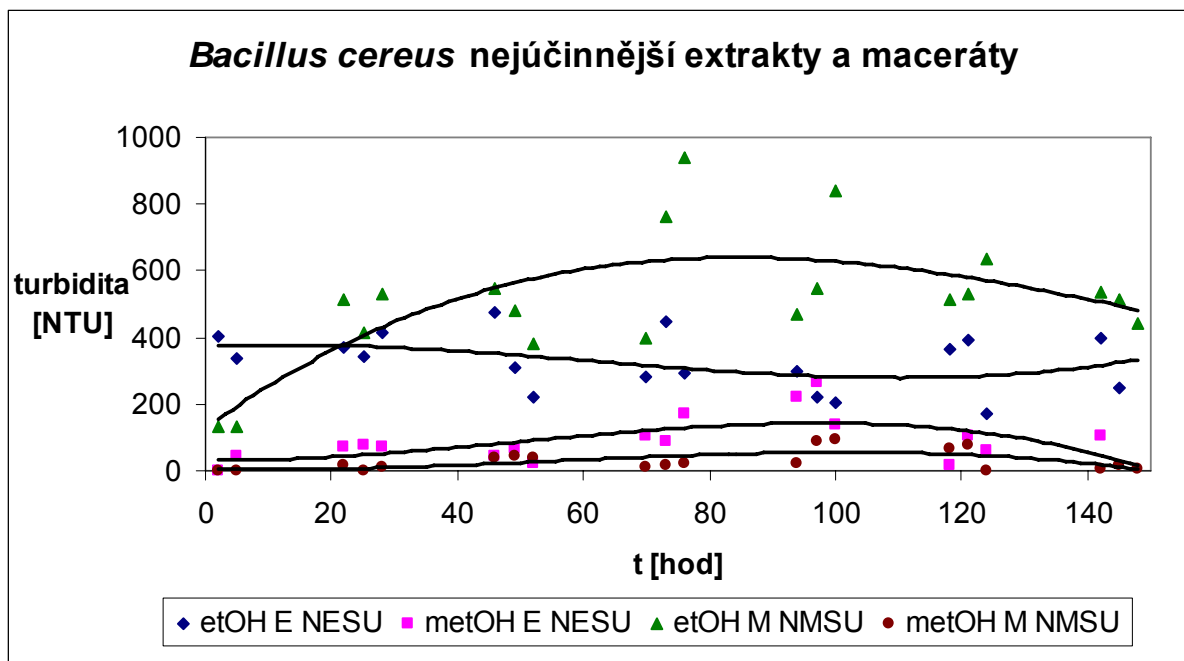


*Obr. č. 21: odpařovaný metOH macerát ze stévie cukerné z České republiky*

Z Obr. č 19, 20 a 21 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu, naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.1.6 Shrnutí inhibičních účinků na bakterii *Bacillus cereus*

Nejúčinnější ethanolové a methanolové extrakty a maceráty byly vyneseny do Grafu č. 6.



Graf č. 6: nejúčinnější etOH a metOH extrakty a maceráty na bakterii *Bacillus cereus*

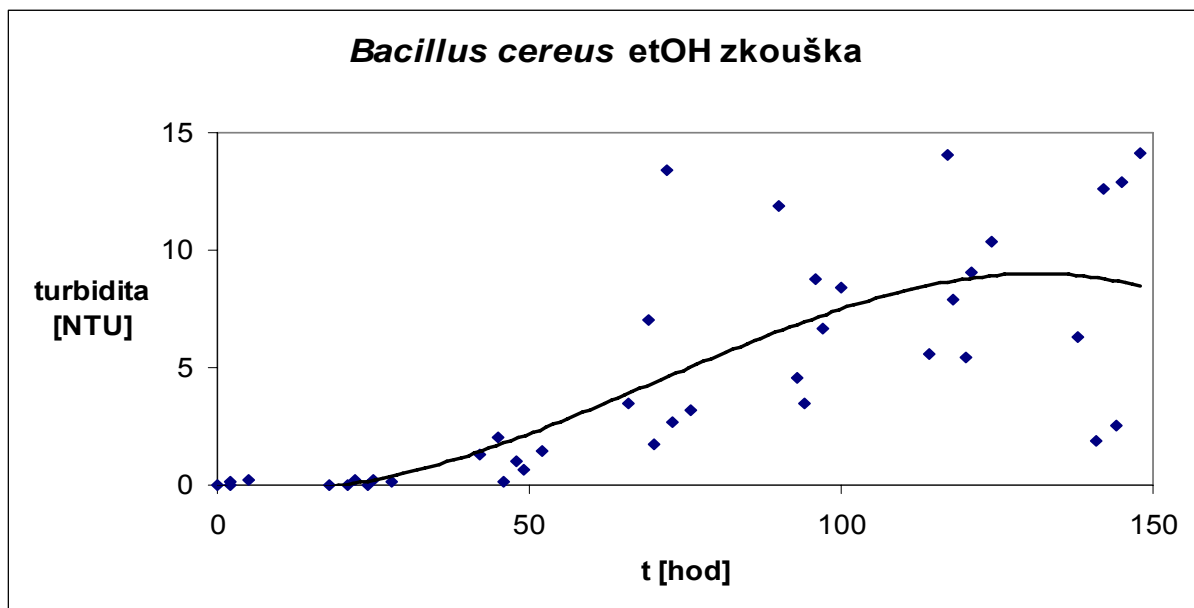
Na bakterii *Bacillus cereus* vykazovaly největší inhibiční účinky neodpařované extrakty a maceráty ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Z Grafu č. 6 vyplývá, že největší inhibiční účinek byl zaznamenán u methanolového macerátu ze stévie cukerné z Uzbekistánu, přičemž methanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval nepatrně nižší inhibiční účinky na bakterii *Bacillus cereus*. Naopak ethanolové a methanolové extrakty ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazovaly výrazně menší inhibiční účinky než ethanolové a methanolové maceráty ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.1.7

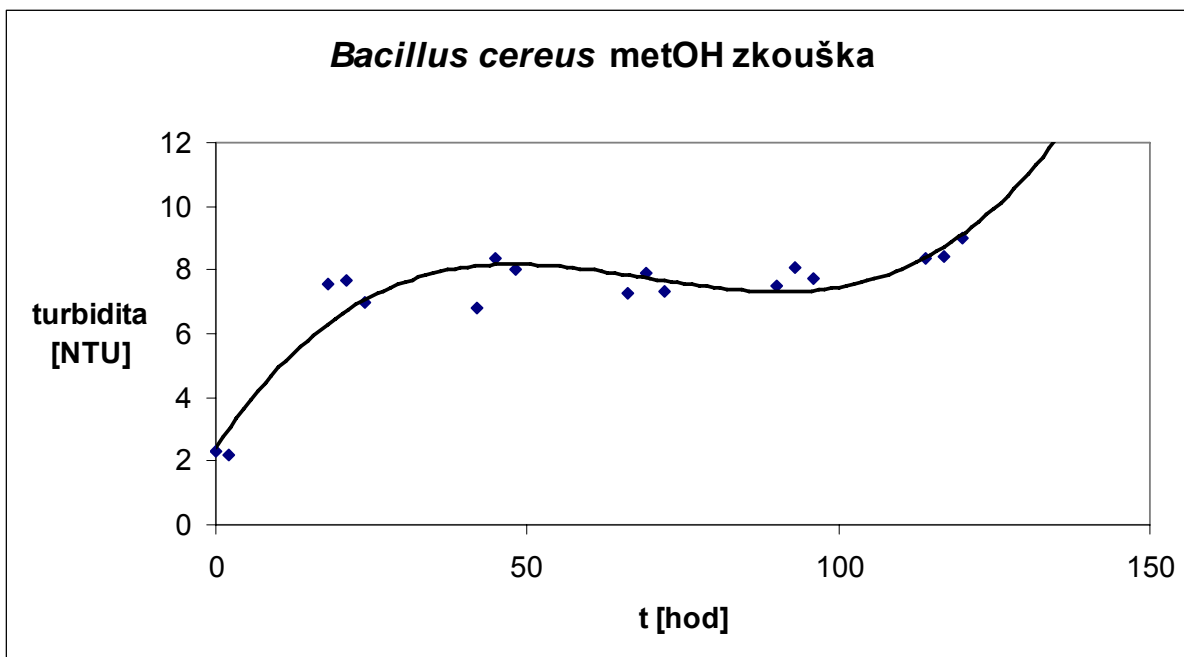
**Bacillus cereus – ethanolová a methanolová zkouška**

Tab. č. 10: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti etOH a metOH

<i>Bacillus cereus</i> etOH zkouška				<i>Bacillus cereus</i> metOH zkouška			
t (hod.)	turbidita	t (hod.)	turbidita	t (hod.)	turbidita	t (hod.)	turbidita
2	0,00	0	0,14	2	0,00	0	2,33
5	0,00	2	0,19	5	0,00	2	2,21
22	0,00	18	0,25	22	0,00	18	12,83
25	0,00	21	0,18	25	0,00	21	11,63
28	0,00	24	0,16	28	0,00	24	10,76
46	1,33	42	0,17	46	0,00	42	7,58
49	2,00	45	0,62	49	17,23	45	7,66
52	1,00	48	1,42	52	10,93	48	6,95
70	3,47	66	1,76	70	15,17	66	6,82
73	7,00	69	2,70	73	15,10	69	8,34
76	13,40	72	3,16	76	25,33	72	8,01
94	11,90	90	3,48	94	18,47	90	7,27
97	4,57	93	6,65	97	27,67	93	7,88
100	8,73	96	8,37	100	22,40	96	7,35
118	5,57	114	7,92	118	20,57	114	7,49
121	14,07	117	9,04	121	19,23	117	8,07
124	5,43	120	10,36	124	18,93	120	7,72
142	6,30	138	12,58	142	19,87	138	8,39
145	1,87	141	12,87	145	18,73	141	8,44
148	2,57	144	14,16	148	18,70	144	8,99

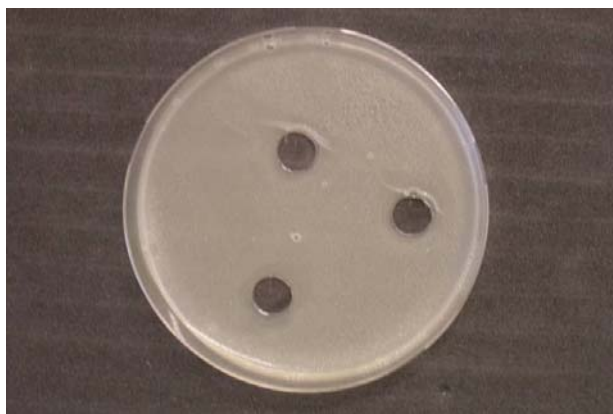


Graf č. 7: růstová křivka bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti etOH



Graf č. 8: růstová křivka bakterie *Bacillus cereus* v přítomnosti metOH

Z hodnot uvedených v Tab. č. 10 a z jejího grafického zpracování (Graf č. 7 a 8) vyplývá, že samotný ethanol i methanol působil výrazně inhibičně na růst bakterie *Bacillus cereus*. Z grafů dále vyplývá, že methanol vykazoval větší inhibiční účinky než ethanol a byl také zaznamenán téměř shodný průběh s růstovou křivkou bakterie *Bacillus cereus*, naopak ethanol vykazoval velmi neuspořádaný průběh růstové křivky.



Obr. č. 22: etOH zkouška bakterie *Bacillus cereus*



Obr. č. 23: metOH zkouška bakterie *Bacillus cereus*

Z Obr. č. 22 a 23 vyplývá, že ethanol i methanol nevykazovaly žádné inhibiční účinky na bakterii *Bacillus cereus*.

#### 4.1.2 Růstová křivka a inhibiční zóny bakterie *Micrococcus luteus*

Pro stanovení růstové křivky a ověření inhibičních zón byly vybrány tyto extrakty a maceráty:

- ethanolový extrakt – množství 10 g a doba extrakce 15 min
- methanolvý extrakt – množství 6 g a doba extrakce 15 min
- ethanolový macerát – množství 10 g a doba macerace 24 h
- methanolvý macerát – množství 10 g a doba macerace 24 h

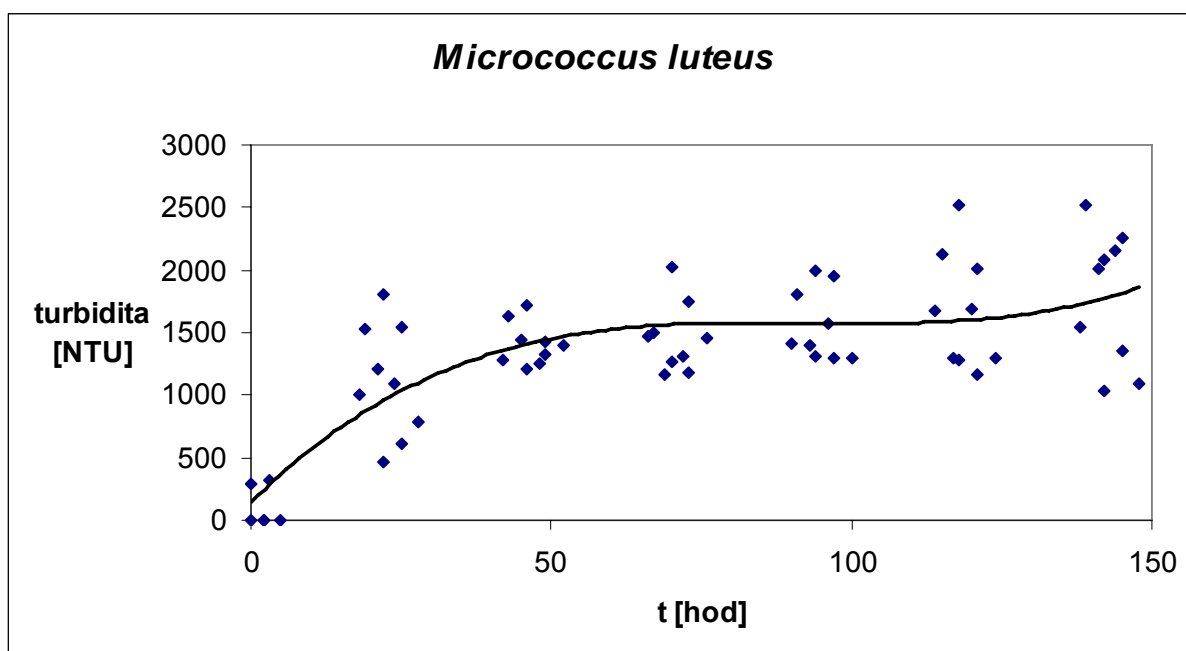
V tabulkách jsou uvedeny doba stanovení růstové křivky a vypočítané hodnoty zákalu zaočkovaného živného media s extrakty (maceráty, etOH nebo metOH), tyto hodnoty byly vyneseny do grafu. Na obrázcích jsou znázorněny inhibiční zóny extraktů a macerátů ze stévie cukerné na agarových plotnách po 72 h kultivace.



#### 4.1.2.1 *Micrococcus luteus*

Tab.č. 11: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Micrococcus luteus*

<i>Micrococcus luteus</i>					
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	290,67	2	0,00	0	3,57
3	324,00	5	0,00	2	3,98
19	1535,00	22	462,00	18	999,67
22	1805,00	25	615,67	21	1215,67
25	1545,67	28	791,33	24	1094,00
43	1626,00	46	1211,33	42	1285,33
46	1720,33	49	1422,33	45	1439,00
49	1324,00	52	1401,00	48	1254,00
67	1493,00	70	1262,67	66	1471,67
70	2030,00	73	1173,00	69	1169,00
73	1754,67	76	1456,00	72	1310,67
91	1808,67	94	1309,67	90	1410,33
94	1990,33	97	1289,00	93	1393,33
97	1944,33	100	1292,00	96	1572,67
115	2123,33	118	1280,00	114	1681,67
118	2520,00	121	1168,00	117	1296,67
121	2016,67	124	1298,00	120	1685,33
139	2520,00	142	1033,00	138	1545,00
142	2080,33	145	1349,00	141	2015,67
145	2253,33	148	1091,67	144	2153,33



Graf. č. 9: růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus*

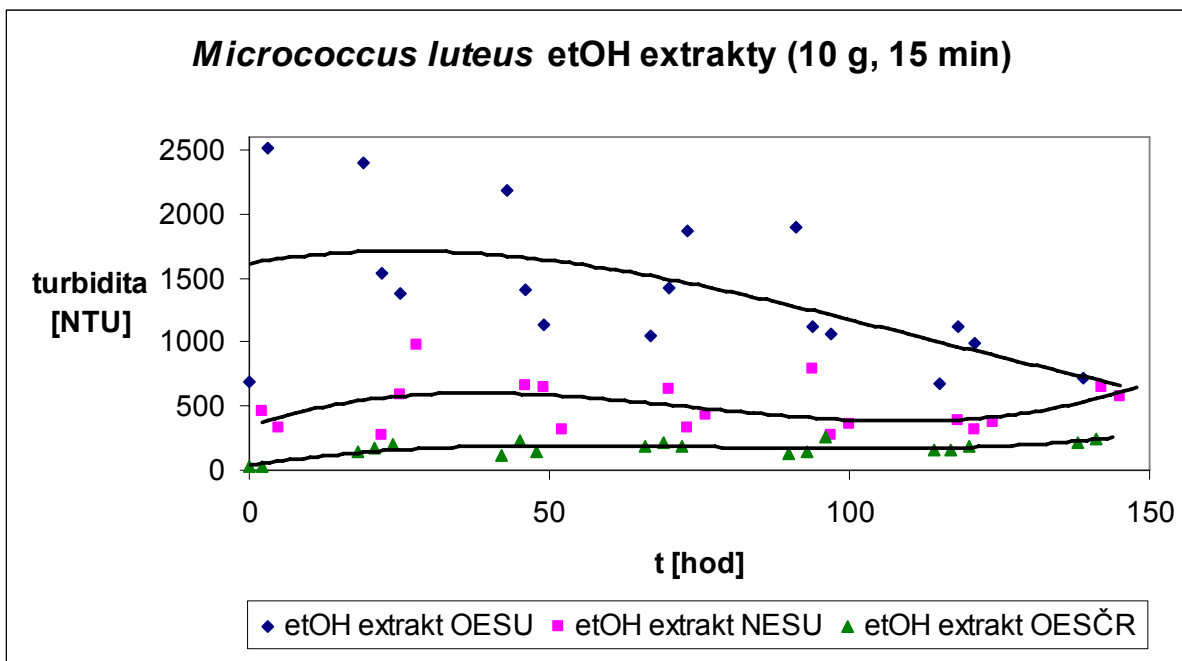


Obr. č. 24: *Micrococcus luteus* na masopeptonovém agaru

#### 4.1.2.2 *Micrococcus luteus* – ethanolové extrakty

Tab. č. 12: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti etOH extraktů

etOH E OESU		etOH E NESU		etOH E OESČR	
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	691,33	2	795,33	0	31,47
3	3313,33	5	461,33	2	32,53
19	2506,67	22	325,00	18	146,00
22	2396,67	25	267,00	21	170,00
25	2823,33	28	586,67	24	195,00
43	1535,67	46	971,67	42	120,67
46	1383,33	49	657,33	45	235,00
49	2183,33	52	649,67	48	138,67
67	1405,00	70	312,67	66	186,00
70	1139,00	73	627,67	69	488,00
73	1055,33	76	329,33	72	210,00
91	1426,67	94	430,33	90	190,33
94	1862,67	97	795,33	93	125,67
97	1893,33	100	274,00	96	145,33
115	1124,67	118	355,33	114	259,00
118	1066,00	121	386,33	117	155,67
121	680,00	124	313,33	120	158,67
139	1117,67	142	377,67	138	186,00
142	988,33	145	648,00	141	215,67
145	712,00	148	576,33	144	249,00

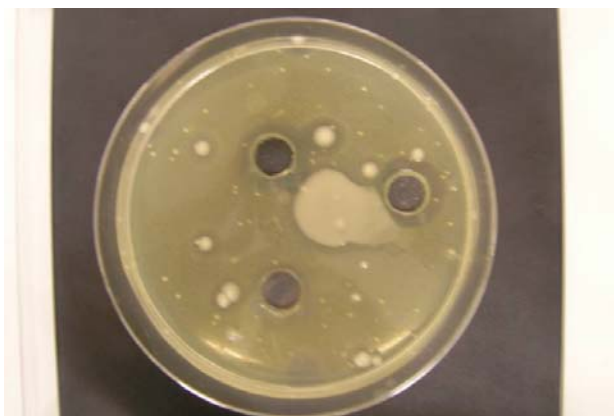


Graf č. 10: růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti etOH extraktů

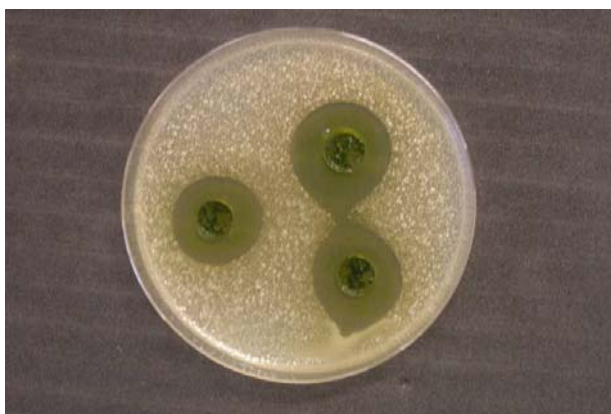
Z hodnot uvedených v Tab.č. 12 a z jejího grafického zpracování (Graf č. 10) vyplývá, že největší inhibiční účinek na bakterii *Micrococcus luteus* vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. V porovnání s hodnotami uvedenými v Tab. č. 11 a s Grafem č. 9 vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu opačný průběh než růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus*, neodpařovaný extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval výrazně nižší hodnoty a odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky vykazoval nejnižší hodnoty. Z Grafu č. 10 dále vyplývá, že oba extrakty ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazovaly menší inhibiční účinky než extrakt ze stévie cukerné z České republiky.



Obr. č. 25: odpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu



*Obr.č. 26: neodpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



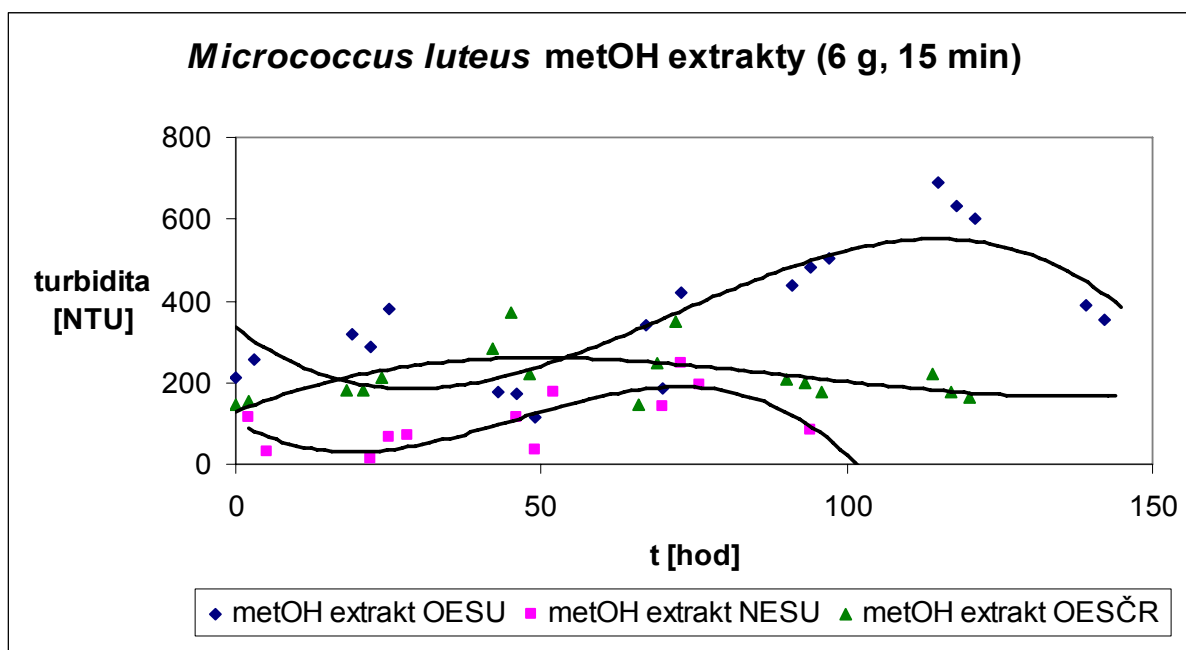
*Obr. č. 27: odpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z České republiky*

Z Obr. č 25, 26 a 27 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazovaly oba odpařované ethanolové extrakty, naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.2.3 *Micrococcus luteus* – methanolvé extrakty

Tab. č. 13: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti metOH extraktů

metOH E OESU		metOH E NESU		metOH E OESČR	
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	212,67	2	113,50	0	143,70
3	928,33	5	31,00	2	153,50
19	256,67	22	0,00	18	181,67
22	316,67	25	12,00	21	180,67
25	288,00	28	67,00	24	214,33
43	381,67	46	70,33	42	852,67
46	178,33	49	113,33	45	913,33
49	171,33	52	0,00	48	611,00
67	115,67	70	0,00	66	281,33
70	340,33	73	495,67	69	370,67
73	186,00	76	37,33	72	221,33
91	420,67	94	458,33	90	146,67
94	436,67	97	179,00	93	245,67
97	482,67	100	141,67	96	350,33
115	502,33	118	0,00	114	206,00
118	690,67	121	524,33	117	199,00
121	631,67	124	249,33	120	177,00
139	603,00	142	0,00	138	219,33
142	391,00	145	196,00	141	174,67
145	353,67	148	84,33	144	165,00

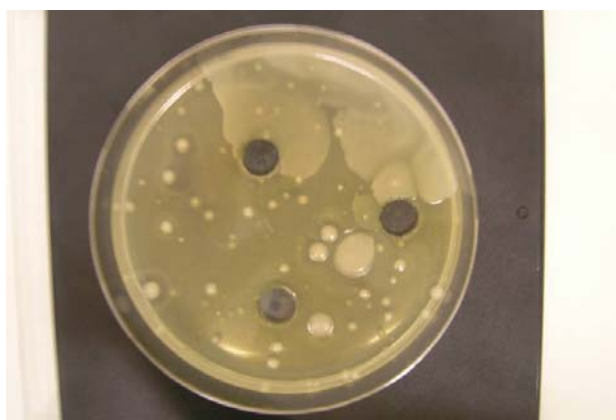


Graf č. 11: růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti metOH extraktů

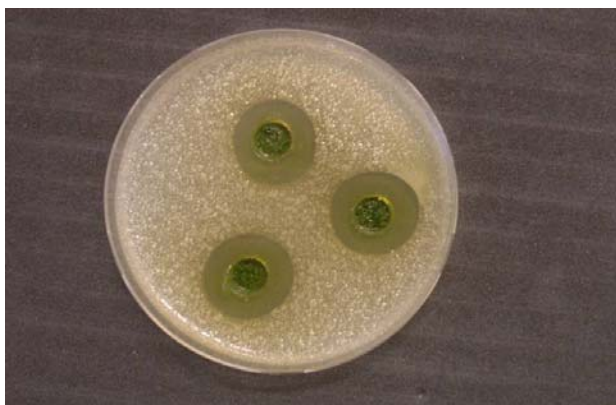
Z hodnot uvedených v *Tab. č. 13* a z jejího grafického zpracování (*Graf č. 11*) vyplývá, že největší inhibiční účinek na bakterii *Micrococcus luteus* vykazoval neodpařovaný methanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného methanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. V porovnání s hodnotami uvedenými v *Tab. č. 11* a s *Grafem č. 9* vykazovaly všechny methanolové extrakty výrazně nižší hodnoty než jaké má růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus*, z nichž nejnižší hodnoty byly zaznamenány u neodpařovaného methanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Z *Grafu č. 11* dále vyplývá, že všechny methanolové extrakty vykazovaly odlišný průběh růstové křivky od růstové křivky bakterie *Micrococcus luteus*.



*Obr. č. 28: odpařovaný metOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



*Obr. č. 29: neodpařovaný metOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



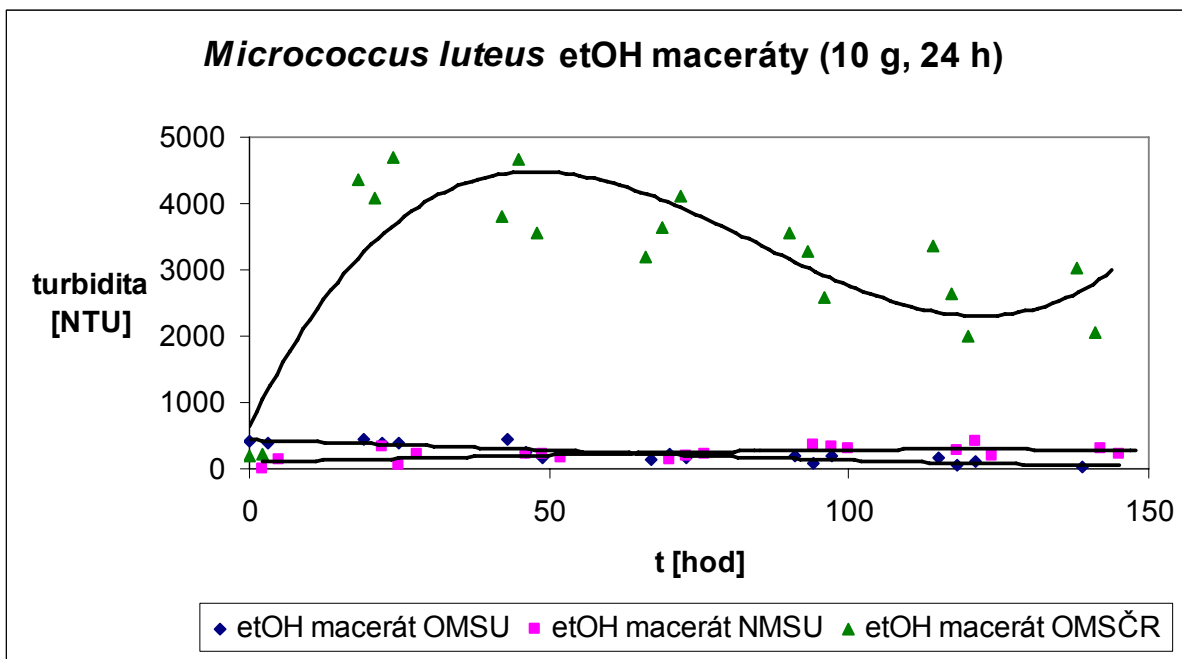
*Obr.č. 30: odpařovaný methanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky*

Z Obr. č 28, 29 a 30 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný methanолоvý extrakt ze stévie cukerné z České republiky, přičemž odpařovaný methanолоvý extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval téměř stejný účinek. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného methanолоvého extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.2.4 *Micrococcus luteus* – ethanolové maceráty

Tab. č. 14: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti etOH macerátů

etOH M OMSU		etOH M NMSU		etOH M OMSČR	
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	418,33	2	12,87	0	207,70
3	1994,67	5	130,00	2	211,44
19	376,67	22	391,33	18	4363,33
22	445,33	25	341,00	21	4090,00
25	396,00	28	53,33	24	4706,67
43	388,00	46	229,33	42	3816,67
46	453,67	49	214,67	45	4660,00
49	254,33	52	212,33	48	3543,33
67	157,33	70	170,00	66	5466,67
70	139,33	73	134,00	69	3206,67
73	227,00	76	192,00	72	3646,67
91	176,33	94	220,00	90	4123,33
94	192,00	97	349,00	93	3560,00
97	810,00	100	341,33	96	3276,67
115	84,33	118	312,67	114	2590,00
118	195,00	121	264,00	117	3353,33
121	176,67	124	415,33	120	2630,00
139	50,00	142	207,67	138	2007,67
142	107,00	145	307,67	141	3016,67
145	17,00	148	235,67	144	2058,00



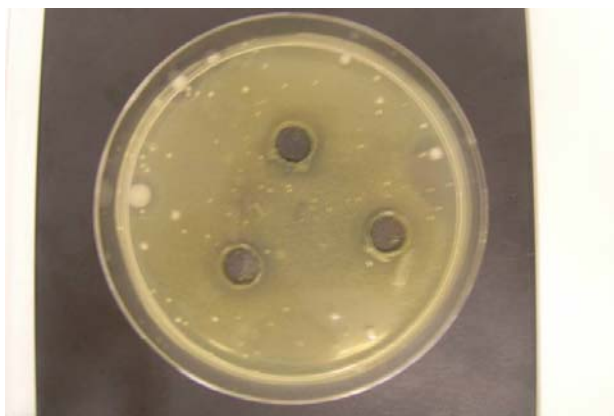
Graf č. 12: růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti etOH macerátů

Z hodnot uvedených v Tab. č. 14 a z jejího grafického zpracování (Graf č. 12) vyplývá, že největší inhibiční účinek na bakterii *Micrococcus luteus* vykazoval neodpařovaný ethanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu, přičemž odpařovaný ethanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval podobné inhibiční účinky, ale průběh růstové křivky vykazoval klesající tendenci. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného ethanolového macerátu ze stévie cukerné z České republiky. V porovnání s hodnotami uvedenými v Tab. č. 11 a s Grafem č. 9 vykazovaly oba ethanolové maceráty ze stévie cukerné z Uzbekistánu výrazně nižší hodnoty než jaké vykazuje růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus*, naopak růstová křivka odpařovaného ethanolového macerátu ze stévie cukerné z České republiky vykazovala dokonce vyšší hodnoty. Z Grafu č. 12 dále vyplývá, že oba odpařované ethanolové maceráty vykazují odlišný průběh růstové křivky od růstové křivky bakterie *Micrococcus luteus*.

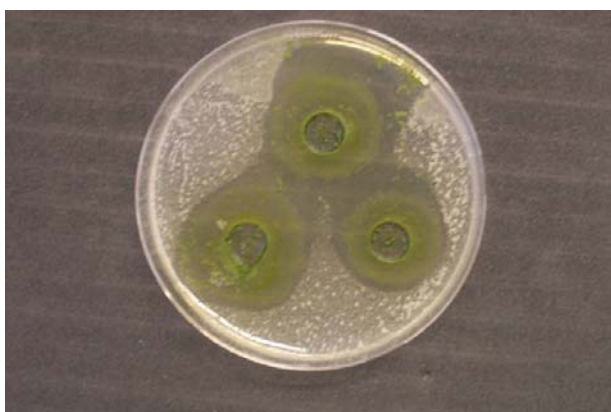


Obr. č. 31: odpařovaný etOH macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu





*Obr. č. 32: neodpařovaný etOH macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



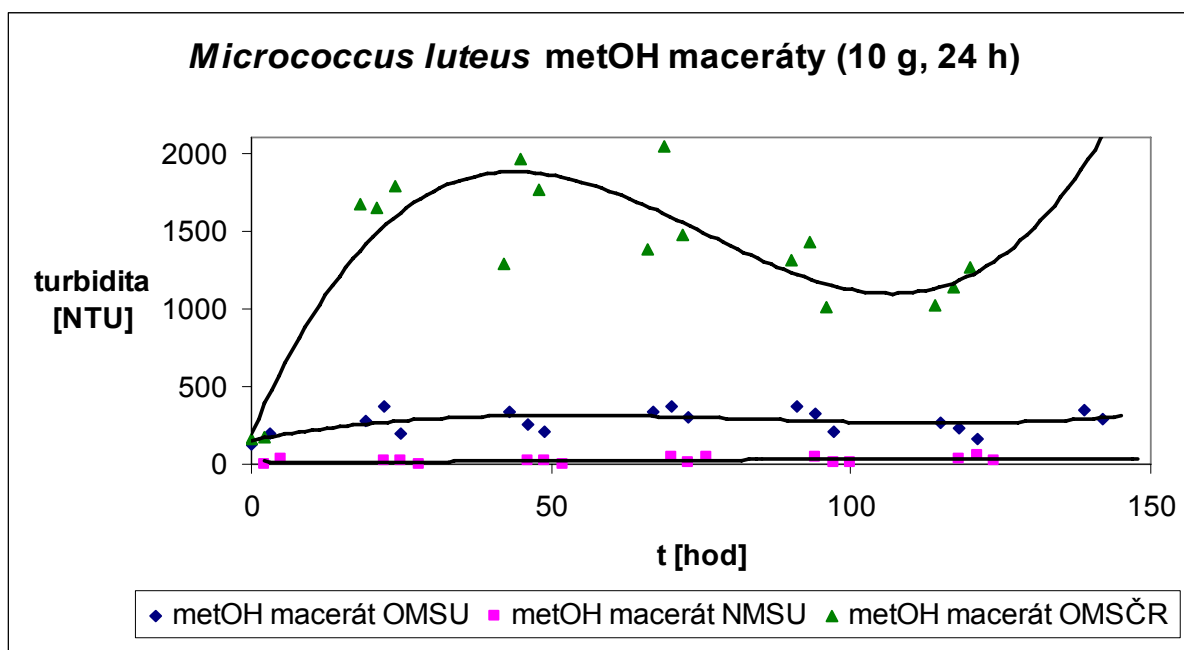
*Obr. č. 33: odpařovaný etOH macerát ze stévie cukerné z České republiky*

Z Obr. č 31, 32 a 33 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný ethanolový macerát ze stévie cukerné z České republiky. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného ethanolového macerátu ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.2.5 *Micrococcus luteus* – methanolvé maceráty

Tab. č. 15: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti metOH macerátů

metOH M OMSU		metOH M NMSU		metOH M OMSČR	
t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)	t (hod.)	turbidita (NTU)
0	132,83	2	2,67	0	167,80
3	804,33	5	36,00	2	171,40
19	192,33	22	0,00	18	2226,67
22	281,67	25	20,00	21	2530,00
25	373,67	28	20,00	24	2580,00
43	191,67	46	4,67	42	1669,67
46	338,33	49	24,67	45	1642,33
49	257,00	52	18,67	48	1791,00
67	211,67	70	3,00	66	1287,67
70	331,67	73	47,67	69	1961,00
73	372,67	76	15,00	72	1767,00
91	301,00	94	45,67	90	1386,33
94	375,00	97	102,67	93	2046,33
97	326,00	100	102,00	96	1471,67
115	208,00	118	49,00	114	1313,33
118	271,00	121	15,00	117	1430,33
121	236,33	124	11,00	120	1009,33
139	167,33	142	34,67	138	1025,00
142	351,67	145	52,67	141	1140,33
145	293,33	148	27,00	144	1261,00

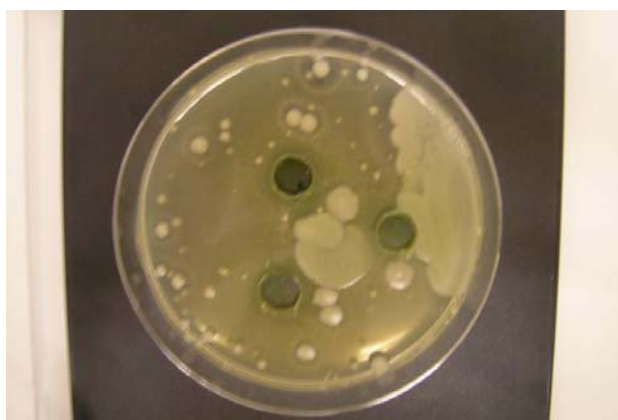


Graf č. 13: růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti metOH macerátů

Z hodnot uvedených v *Tab.č. 15* a z jejího grafického zpracování (*Graf č. 13*) vyplývá, že největší inhibiční účinek na bakterii *Micrococcus luteus* vykazoval neodpařovaný methanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného methanolového macerátu ze stévie cukerné z České republiky. V porovnání s hodnotami uvedenými v *Tab. č. 11* a s *Grafem č. 9* vykazovaly oba methanolové maceráty ze stévie cukerné z Uzbekistánu výrazně nižší hodnoty než jaké vykazovala růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus*, naopak růstová křivka odpařovaného methanolového macerátu ze stévie cukerné z České republiky vykazovala téměř shodné hodnoty, ale s odlišným průběhem růstové křivky od růstové křivky bakterie *Micrococcus luteus*.



*Obr. č. 34: odpařovaný metOH macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



*Obr. č. 35: neodpařovaný metOH macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu*

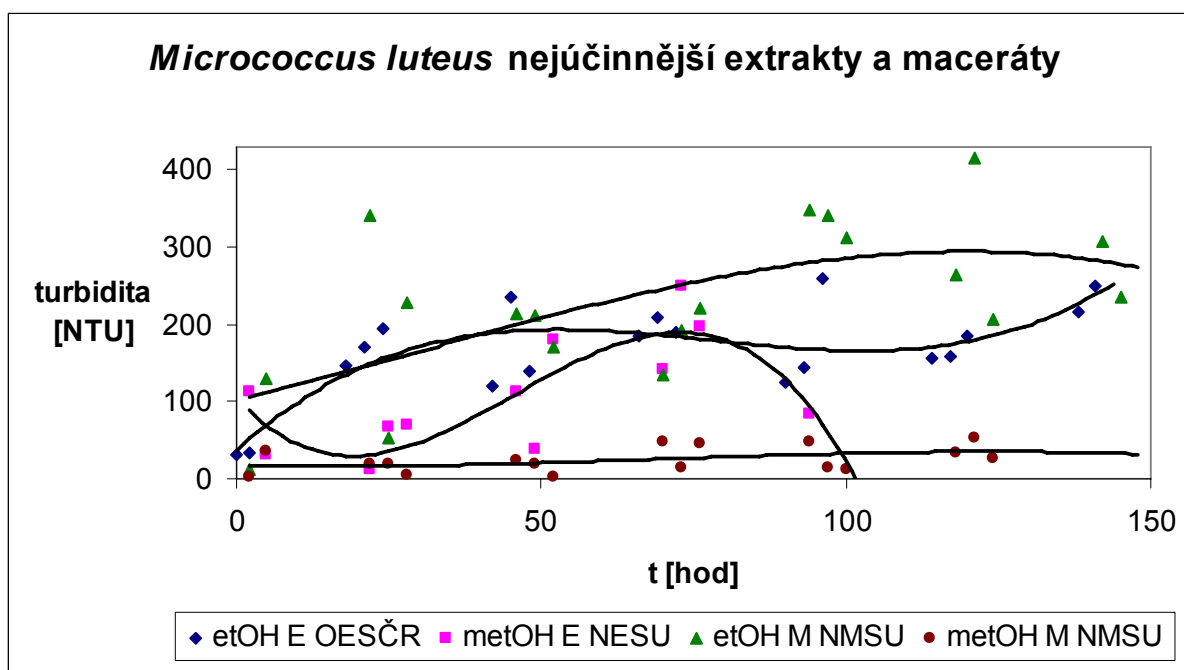


*Obr. č. 36: odpařovaný metOH macerát ze stévie cukerné z České republiky*

Z Obr. č 34, 35 a 36 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný methanolvý macerát ze stévie cukerné z České republiky. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného methanolvého macerátu ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

#### 4.1.2.6 Shrnutí inhibičních účinků na bakterii *Micrococcus luteus*

Nejúčinnější ethanolové a methanolvé extrakty a maceráty byly vyneseny do Grafu č. 14.



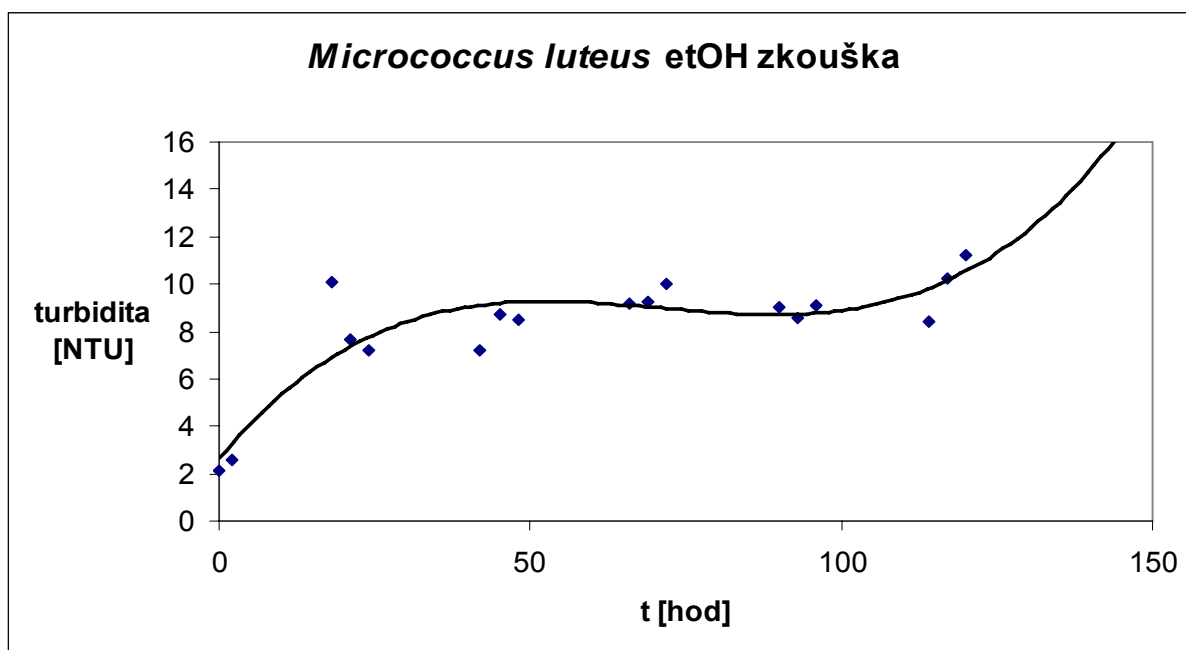
Graf č. 14: nejúčinnější etOH a metOH extrakty a maceráty na bakterii *Micrococcus luteus*

Na bakterii *Micrococcus luteus* vykazovaly největší inhibiční účinky odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky, neodpařovaný methanolvý extrakt a macerát a ethanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Z Grafu č. 14 vyplývá, že největší inhibiční účinek byl zaznamenán u methanolvého macerátu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. U ostatních extraktů a macerátů byl zaznamenán menší inhibiční účinek než u methanolvého macerátu, ale v porovnání s růstovou křivkou bakterie *Micrococcus luteus*, vykazovaly velké inhibiční účinky, z nichž největší vykazoval methanolvý macerát ze stévie z Uzbekistánu.

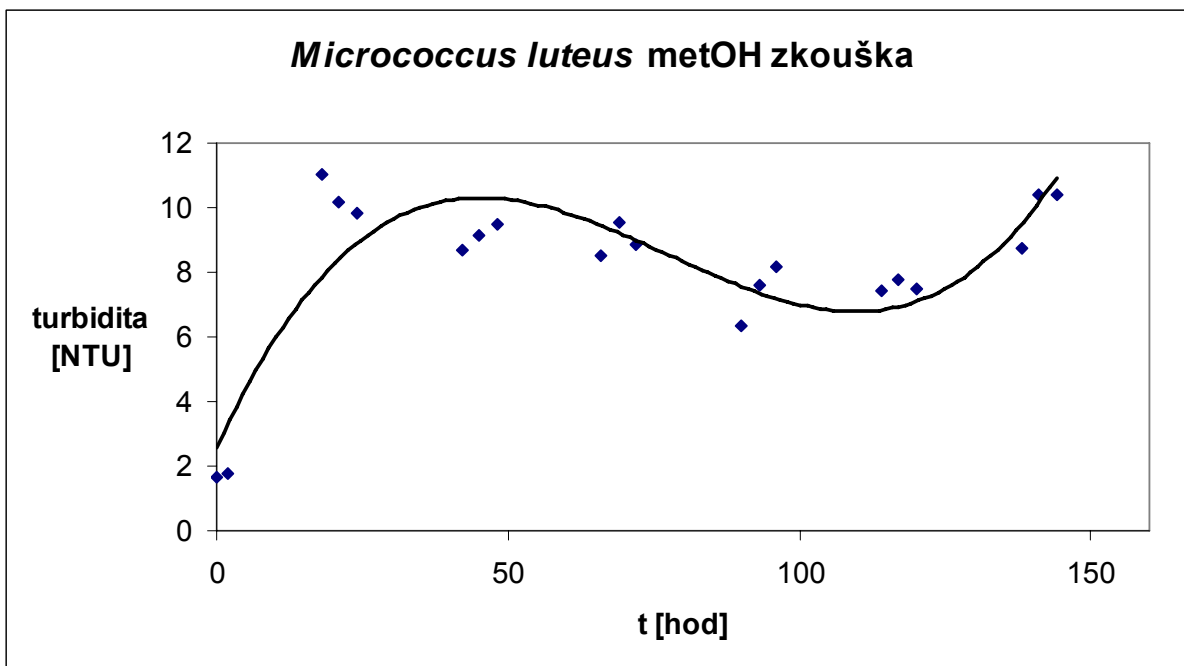
#### 4.1.2.7 *Micrococcus luteus* – ethanolová a methanolová zkouška

Tab. č. 16: Číselné hodnoty pro růstovou křivku bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti etOH a metOH

<i>Micrococcus luteus</i> etOH zkouška				<i>Micrococcus luteus</i> metOH zkouška			
t (hod.)	turbidita	t (hod.)	turbidita	t (hod.)	turbidita	t (hod.)	turbidita
2	0,00	0	2,13	2	0,00	0	1,66
5	0,00	2	2,57	5	0,00	2	1,75
22	0,00	18	16,10	22	0,00	18	11,04
25	0,00	21	15,58	25	0,00	21	10,15
28	0,00	24	13,16	28	5,93	24	9,81
46	0,00	42	10,10	46	8,20	42	8,71
49	0,00	45	7,64	49	11,30	45	9,13
52	0,00	48	7,19	52	8,23	48	9,48
70	0,70	66	7,22	70	6,30	66	8,51
73	1,43	69	8,74	73	11,43	69	9,55
76	26,03	72	8,52	76	12,93	72	8,88
94	0,00	90	9,15	94	19,37	90	6,35
97	8,13	93	9,26	97	10,17	93	7,62
100	7,47	96	10,02	100	12,23	96	8,17
118	0,33	114	9,06	118	9,53	114	7,45
121	3,63	117	8,60	121	10,43	117	7,78
124	0,00	120	9,13	124	7,27	120	7,51
142	0,03	138	8,44	142	7,47	138	8,74
145	0,00	141	10,23	145	14,33	141	10,42
148	2,93	144	11,22	148	8,30	144	10,38



Graf č. 15: růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti etOH



Graf č. 16: růstová křivka bakterie *Micrococcus luteus* v přítomnosti metOH

Z hodnot uvedených v Tab. č. 16 a z jejího grafického zpracování (Graf č. 15 a 16) vyplývá, že samotný ethanol i methanol působil výrazně inhibičně na růst bakterie *Micrococcus luteus*. Z Grafů č. 15 a 16 dále vyplývá, že methanol vykazoval odlišný průběh růstové křivky od průběhu růstové křivky bakterie *Micrococcus luteus*.



Obr. č. 37: etOH zkouška bakterie *Micrococcus luteus*



Obr. č. 38: metOH zkouška bakterie *Micrococcus luteus*

Z Obr. č. 37 a 38 vyplývá, že ethanol i methanol nevykazovaly žádné inhibiční účinky na bakterii *Micrococcus luteus*.

#### 4.1.3 Růstová křivka a inhibiční zóny kvasinky *Geotrichum candidum*

Pro stanovení růstové křivky a ověření inhibičních zón byly vybrány tyto extrakty:

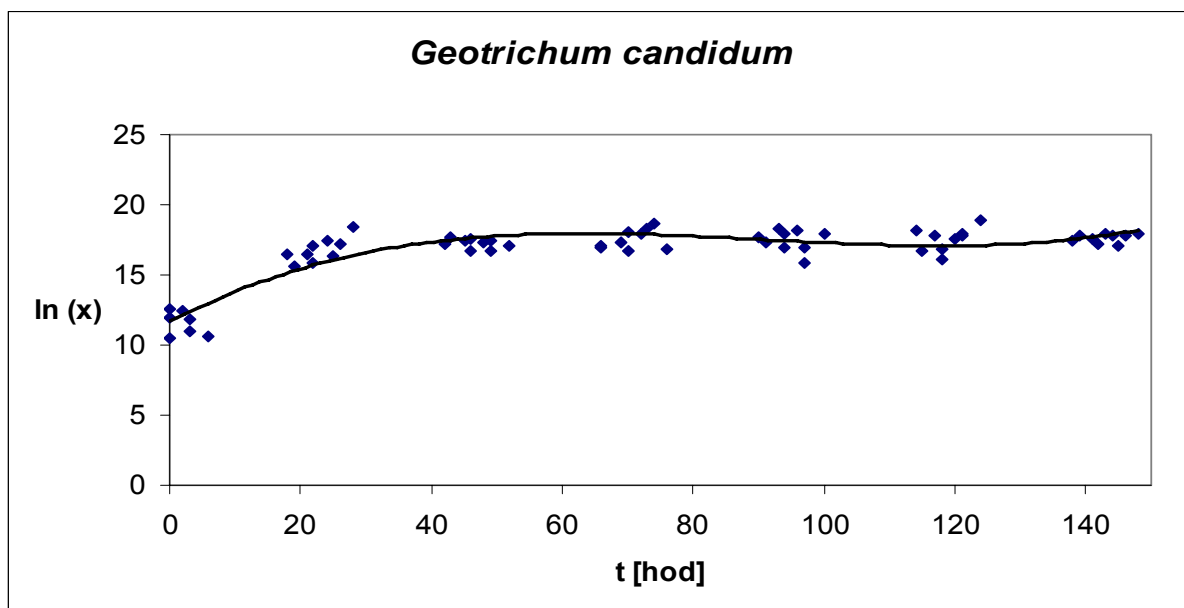
- ethanolový extrakt – množství 10 g a doba extrakce 15 min

V tabulkách jsou uvedeny doba stanovení růstové křivky a vypočítané hodnoty přirozeného logaritmu počtu buněk, tyto hodnoty byly vyneseny do grafu. Na obrázcích jsou znázorněny inhibiční zóny extraktů ze stévie cukerné na agarových plotnách po 72 h kultivace.

#### 4.1.3.1 *Geotrichum candidum*

Tab.č. 17: Číselné hodnoty pro růstovou křivku kvasinky *Geotrichum candidum*

<i>Geotrichum candidum</i>					
t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)
0	12,53	0	10,50	0	11,99
3	11,85	3	10,96	2	12,47
19	15,57	6	10,64	18	16,47
22	17,11	22	15,85	21	16,43
26	17,24	25	16,29	24	17,38
43	17,66	28	18,42	42	17,23
46	16,65	46	17,61	45	17,40
49	16,76	49	17,43	48	17,30
66	16,99	52	17,13	66	17,10
70	16,68	70	18,02	69	17,36
74	18,70	73	18,26	72	17,97
91	17,26	76	16,83	90	17,72
94	17,91	94	16,92	93	18,33
97	15,87	97	16,90	96	18,14
115	16,75	100	17,87	114	18,19
118	16,11	118	16,77	117	17,80
121	17,75	121	17,92	120	17,55
139	17,75	124	18,85	138	17,47
143	17,93	142	17,19	141	17,52
146	17,81	145	17,11	144	17,78
		148	17,98		



Graf č. 17: růstová křivka kvasinky *Geotrichum candidum*



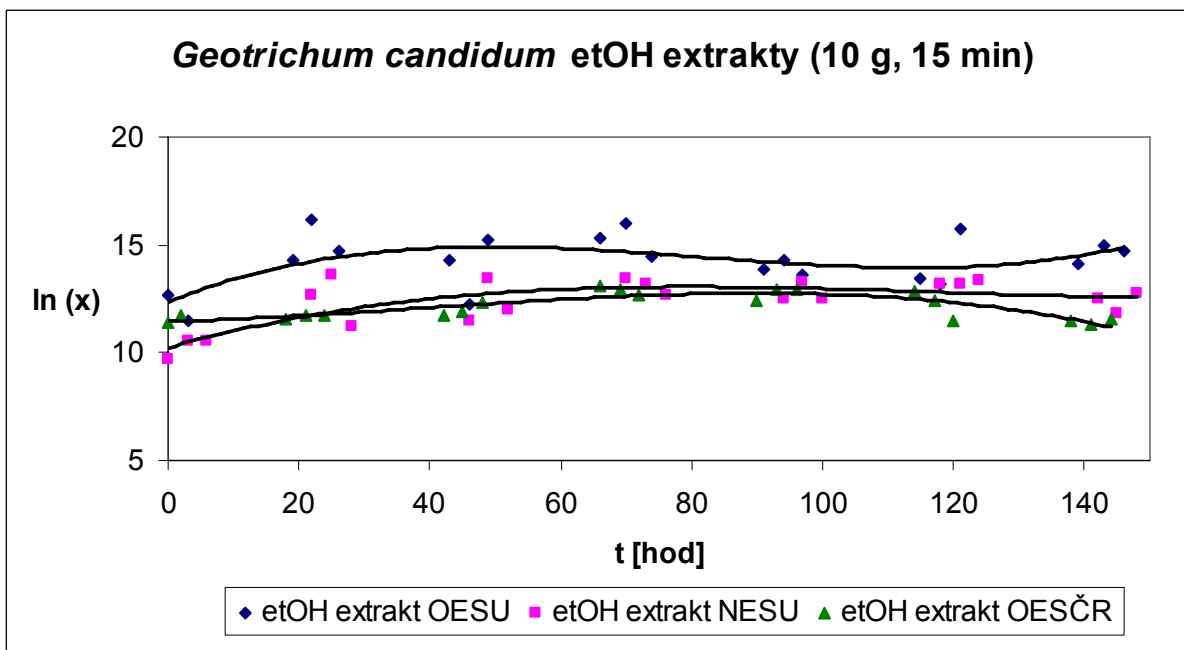


Obr.č. 39: kvasinky *Geotrichum candidum* na sladínovém agaru

#### 4.1.3.2 *Geotrichum candidum* – ethanolové extrakty

Tab.č. 18: Číselné hodnoty pro růstovou křivku kvasinky *Geotrichum candidum* v přítomnosti etOH extraktů

etOH E OESU		etOH E NESU		etOH E OESČR	
t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)
0	12,69	0	9,66	0	11,39
3	11,50	3	10,50	2	11,74
19	14,33	6	10,50	18	11,60
22	16,12	22	12,65	21	11,69
26	14,75	25	13,64	24	11,69
43	14,33	28	11,20	42	11,74
46	12,25	46	11,50	45	11,93
49	15,19	49	13,42	48	12,30
66	15,29	52	11,99	66	13,11
70	16,01	70	13,42	69	12,94
74	14,50	73	13,16	72	12,65
91	13,91	76	12,65	90	12,41
94	14,33	94	12,51	93	12,90
97	13,63	97	13,28	96	12,96
115	13,43	100	12,53	114	12,81
118	13,16	118	13,15	117	12,39
121	15,73	121	13,18	120	11,45
139	14,12	124	13,35	138	11,50
143	14,97	142	12,51	141	11,27
146	14,69	145	11,85	144	11,60
		148	12,78		



Graf č. 18: růstové křivky kvasinky *Geotrichum candidum* v přítomnosti etOH extraktů

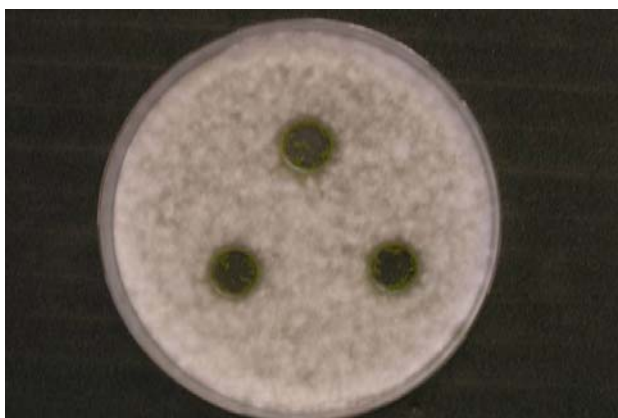
Z hodnot uvedených v Tab. č. 18 a z jejího grafického zpracování (Graf č. 18) vyplývá, že největší inhibiční účinek na kvasinku *Geotrichum candidum* vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky, přičemž neodpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval téměř shodné inhibiční účinky. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. V porovnání s hodnotami uvedenými v Tab. č. 17 a s Grafem č. 17 vykazovaly všechny ethanolové extrakty výrazně nižší hodnoty než jaké vykazovala růstová křivka kvasinky *Geotrichum candidum*, přičemž nejnižší hodnoty byly zaznamenány u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z České republiky. Dále z Grafu č. 18 vyplývá, že všechny růstové křivky ethanolových extraktů vykazovaly téměř shodný průběh s růstovou křivkou kvasinky *Geotrichum candidum*.



Obr. č. 40: odpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu



*Obr. č. 41: neodpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



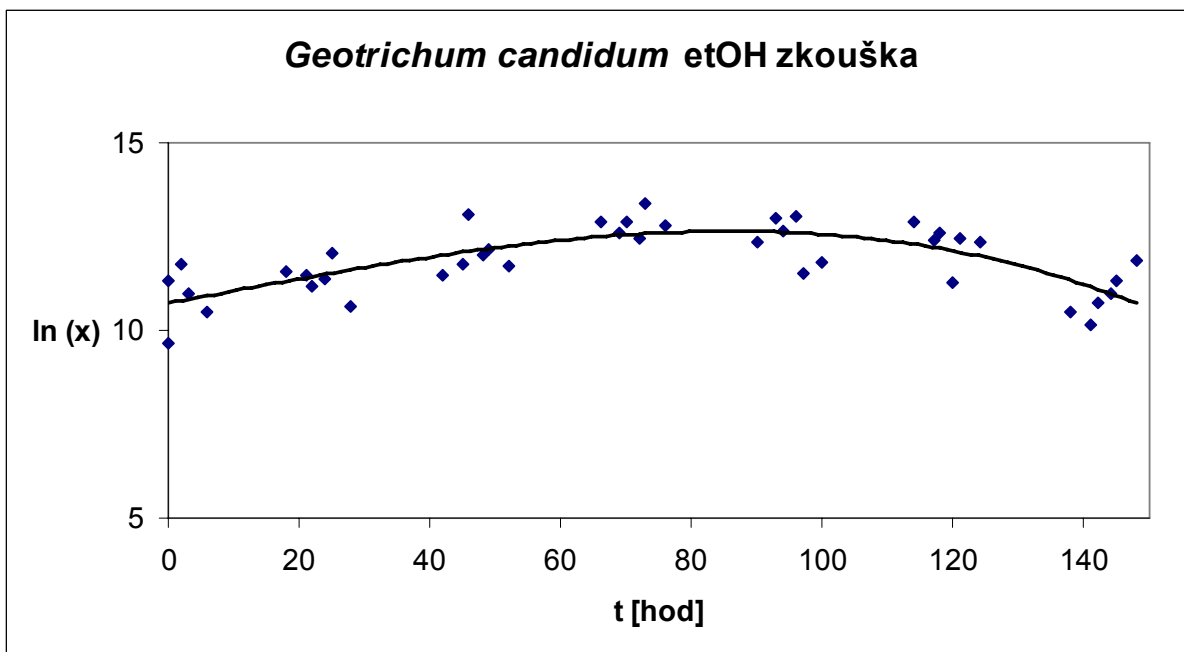
*Obr. č. 42 : odpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z České republiky*

Z Obr. č. 40, 41 a 42 vyplývá, že největší inhibiční účinek vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu a naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z České republiky.

#### 4.1.3.3 *Geotrichum candidum* – ethanolová zkouška

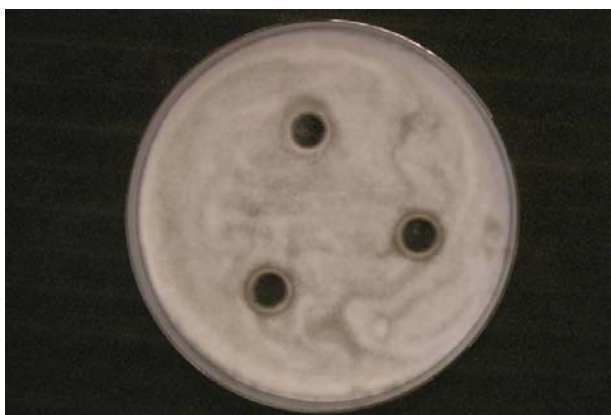
Tab. č. 19: Číselné hodnoty pro růstovou křivku kvasinky *Geotrichum candidum* v přítomnosti etOH

<i>Geotrichum candidum</i> etOH zkouška			
t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)
0	9,66	0	11,33
3	10,96	2	11,78
6	10,50	18	11,55
22	11,20	21	11,45
25	12,05	24	11,39
28	10,64	42	11,45
46	13,10	45	11,78
49	12,14	48	11,99
52	11,69	66	12,88
70	12,91	69	12,62
73	13,39	72	12,45
76	12,78	90	12,34
94	12,65	93	13,01
97	11,50	96	13,06
100	11,82	114	12,90
118	12,60	117	12,39
121	12,47	120	11,27
124	12,36	138	10,50
142	10,76	141	10,17
145	11,33	144	10,96
148	11,85		



Graf č. 19: růstová křivka kvasinky *Geotrichum candidum* v přítomnosti etOH

Z hodnot uvedených v Tab. č. 19 a z Grafu č. 19 porovnáním s hodnotami uvedenými v Tab. č. 17 a Grafem č. 17 vyplývá, že samotný ethanol vykazoval mírné inhibiční účinky na růst kvasinky *Geotrichum candidum*.



Obr. č. 43: ethanolová zkouška kvasinky *Geotrichum candidum*

Z Obr. č. 43 vyplývá, že u ethanolu nebyl zaznamenán žádný inhibiční účinek na růst kvasinky *Geotrichum candidum*.

#### 4.1.4 Růstová křivka a inhibiční zóny kvasinky *Hansenula anomala*

Pro stanovení růstové křivky a ověření inhibičních zón byly vybrány tyto extrakty:

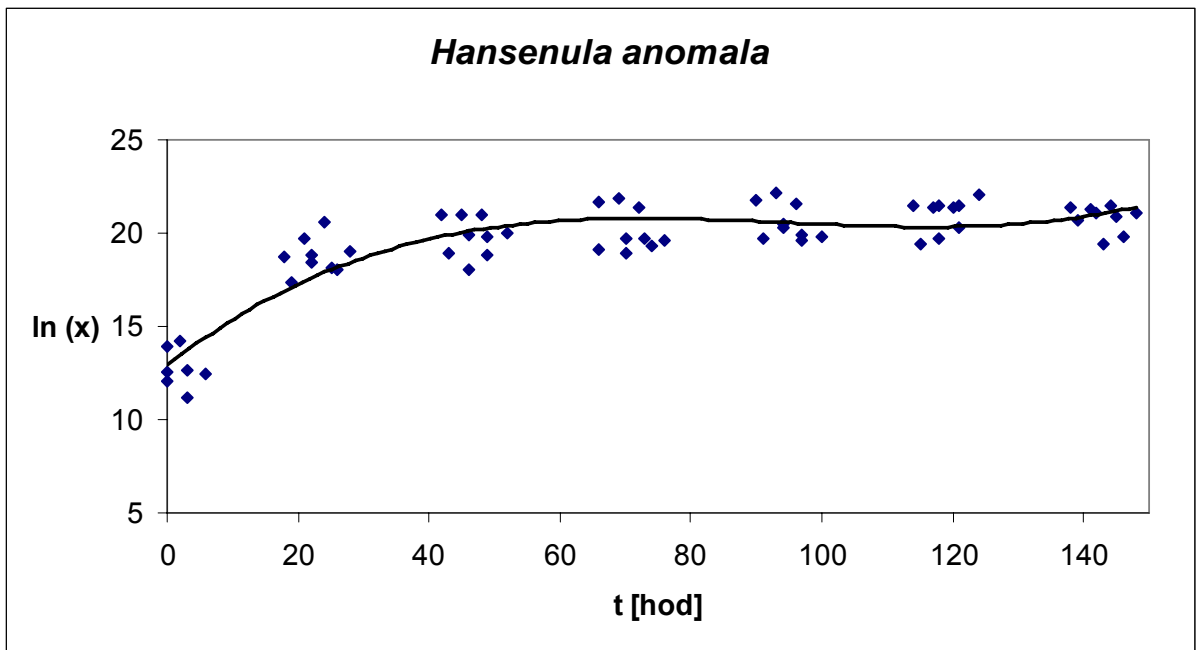
- ethanolový extrakt – množství 6 g a doba extrakce 30 min

V tabulkách jsou uvedeny doba stanovení růstové křivky a vypočítané hodnoty přirozeného logaritmu počtu buněk, tyto hodnoty byly vyneseny do grafu. Na obrázcích jsou znázorněny inhibiční zóny extraktů ze stévie cukerné na agarových plotnách po 72 h kultivace.

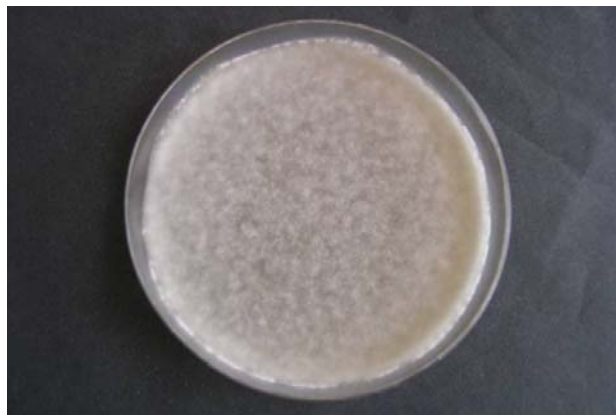
##### 4.1.4.1 *Hansenula anomala*

Tab.č. 20: Číselné hodnoty pro růstovou křivku kvasinky *Hansenula anomala*

<i>Hansenula anomala</i>					
t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)
0	12,05	0	12,51	0	13,95
3	11,20	3	12,64	2	14,19
19	17,38	6	12,47	18	18,72
22	18,81	22	18,44	21	19,67
26	18,07	25	18,12	24	20,62
43	18,94	28	18,98	42	20,99
46	18,08	46	19,91	45	20,95
49	18,81	49	19,84	48	21,02
66	19,13	52	19,97	66	21,64
70	18,89	70	19,70	69	21,91
74	19,32	73	19,74	72	21,39
91	19,72	76	19,64	90	21,80
94	20,52	94	20,32	93	22,12
97	19,56	97	19,93	96	21,58
115	19,45	100	19,81	114	21,45
118	19,67	118	21,51	117	21,37
121	20,32	121	21,44	120	21,37
139	20,66	124	22,07	138	21,41
143	19,38	142	21,12	141	21,30
146	19,82	145	20,92	144	21,49
		148	21,11		



Graf č. 20: růstová křivka kvasinky *Hansenula anomala*

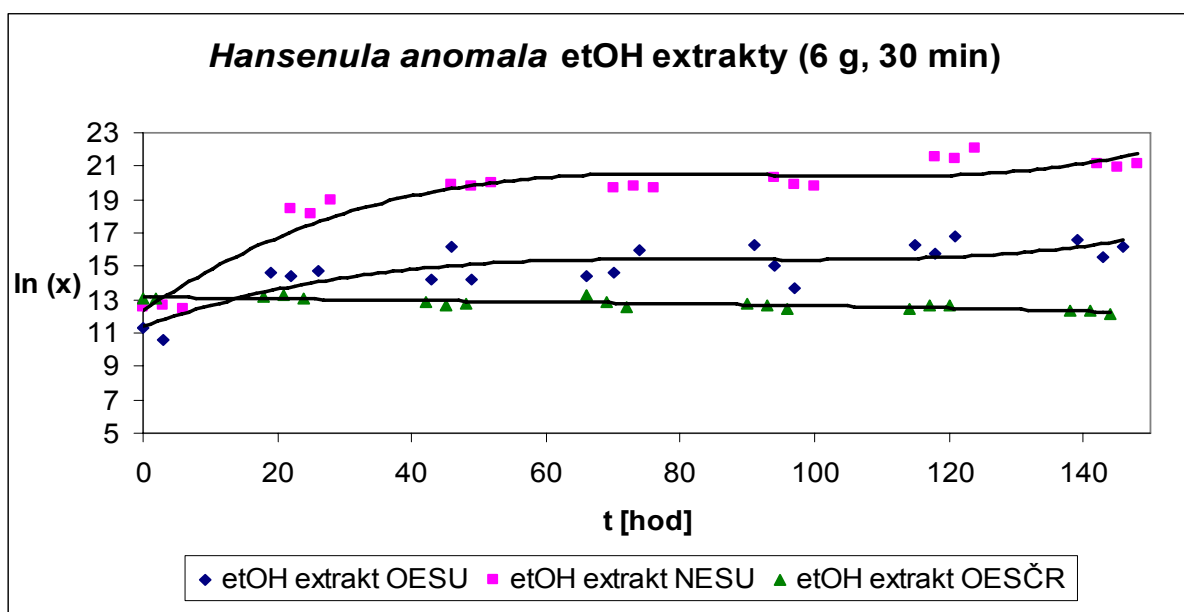


Obr. č. 44: kvasinka *Hansenula anomala* na sladínovém agaru

#### 4.1.4.2 Hansenula anomala – ethanolové extrakty

Tab.č. 21: Číselné hodnoty pro růstovou křivku kvasinky Hansenula anomala v přítomnosti etOH extraktů

etOH E OESU		etOH E NESU		etOH E OESČR	
t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)
0	11,33	0	12,51	0	13,08
3	10,64	3	12,64	2	13,11
19	14,67	6	12,47	18	13,22
22	14,39	22	18,44	21	13,23
26	14,73	25	18,12	24	13,06
43	14,23	28	18,98	42	12,83
46	16,13	46	19,91	45	12,70
49	14,23	49	19,84	48	12,76
66	14,44	52	19,97	66	13,31
70	14,67	70	19,70	69	12,85
74	15,98	73	19,74	72	12,57
91	16,31	76	19,64	90	12,76
94	15,07	94	20,32	93	12,67
97	13,69	97	19,93	96	12,47
115	16,31	100	19,81	114	12,43
118	15,73	118	21,51	117	12,64
121	16,79	121	21,44	120	12,64
139	16,58	124	22,07	138	12,39
143	15,56	142	21,12	141	12,36
146	16,18	145	20,92	144	12,11
		148	21,11		



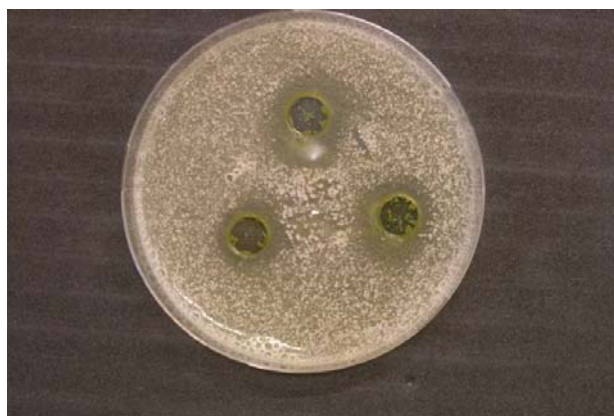
Graf č. 21: růstové křivky kvasinky Hansenula anomala v přítomnosti etOH extraktů



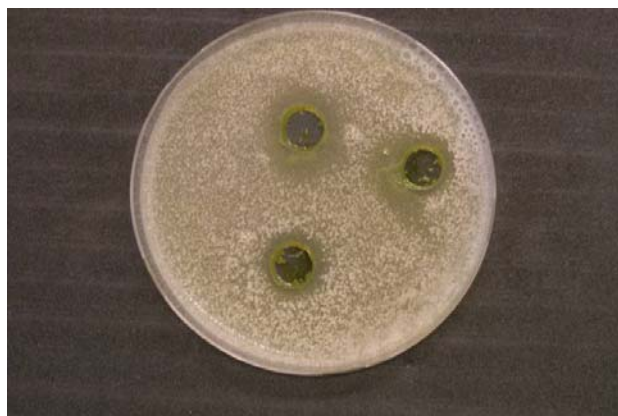
Z hodnot uvedených v *Tab. č. 21* a z jejího grafického zpracování (*Graf č. 21*) vyplývá, že největší inhibiční účinek na kvasinku *Hansenula anomala* vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. V porovnání s hodnotami uvedenými v *Tab. č. 20* a s *Grafem č. 20* vykazovaly oba odpařované ethanolové extrakty nižší hodnoty než jaké vykazovala růstová křivka kvasinky *Hansenula anomala*, přičemž nejnižší hodnoty byly zaznamenány u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z České republiky. Dále z *Grafu č. 21* vyplývá, že neodpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval téměř shodný průběh růstové křivky s průběhem růstové křivky kvasinky *Hansenula anomala*. Naopak odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky vykazoval odlišný průběh, vykazoval klesající průběh růstové křivky.



*Obr. č. 45: odpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



*Obr. č. 46: neodpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu*



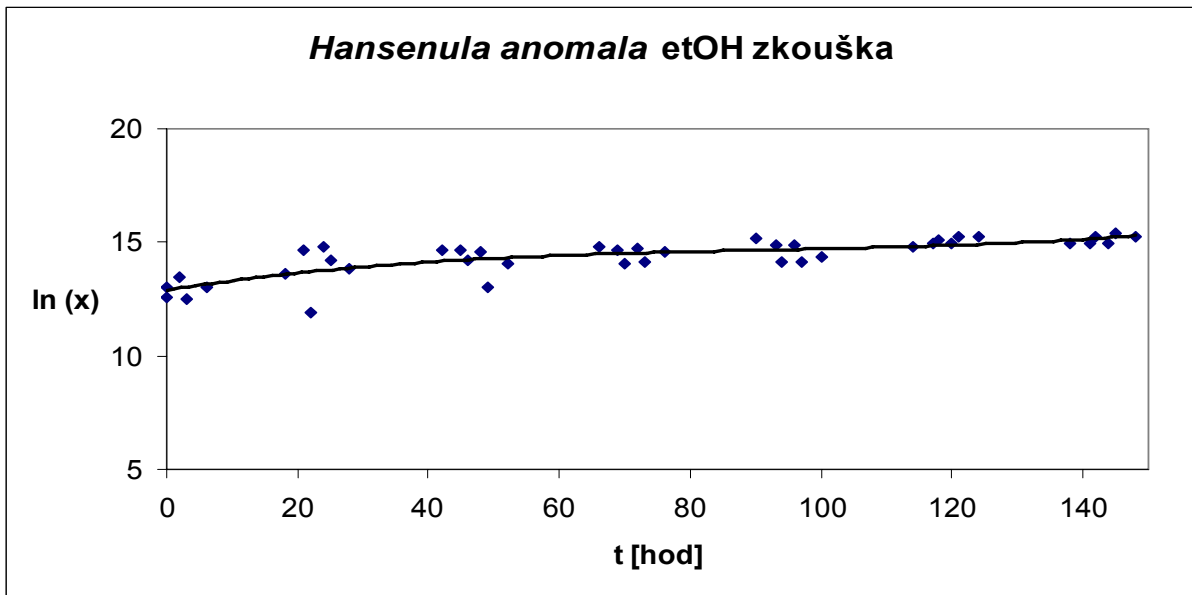
Obr. č. 47: odpařovaný etOH extrakt ze stévie cukerné z České republiky

Z Obr. č. 45, 46 a 47 vyplývá, že největší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Neodpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu a odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky vykazovaly téměř shodný inhibiční účinek.

#### 4.1.4.3 *Hansenula anomala* – ethanolová zkouška

Tab. č. 22: Číselné hodnoty pro růstovou křivku kvasinky *Hansenula anomala* v přítomnosti etOH

<i>Hansenula anomala</i> etOH zkouška			
t (hod.)	ln (x)	t (hod.)	ln (x)
0	12,57	0	13,05
3	12,51	2	13,47
6	12,99	18	13,63
22	11,93	21	14,63
25	14,18	24	14,78
28	13,81	42	14,66
46	14,19	45	14,62
49	13,01	48	14,60
52	14,09	66	14,78
70	14,09	69	14,62
73	14,15	72	14,75
76	14,61	90	15,16
94	14,10	93	14,91
97	14,16	96	14,87
100	14,39	114	14,83
118	15,12	117	14,93
121	15,24	120	14,92
124	15,22	138	14,93
142	15,27	141	14,95
145	15,40	144	14,95
148	15,21		



Graf č. 22: růstová křivka kvasinky *Hansenula anomala* v přítomnosti etOH

Z hodnot uvedených v Tab. č. 22 a z Grafu č. 22 porovnáním s hodnotami uvedenými v Tab. č. 20 a Grafem č. 20 vyplývá, že samotný ethanol vykazoval mírné inhibiční účinky na růst kvasinky *Hansenula anomala*.



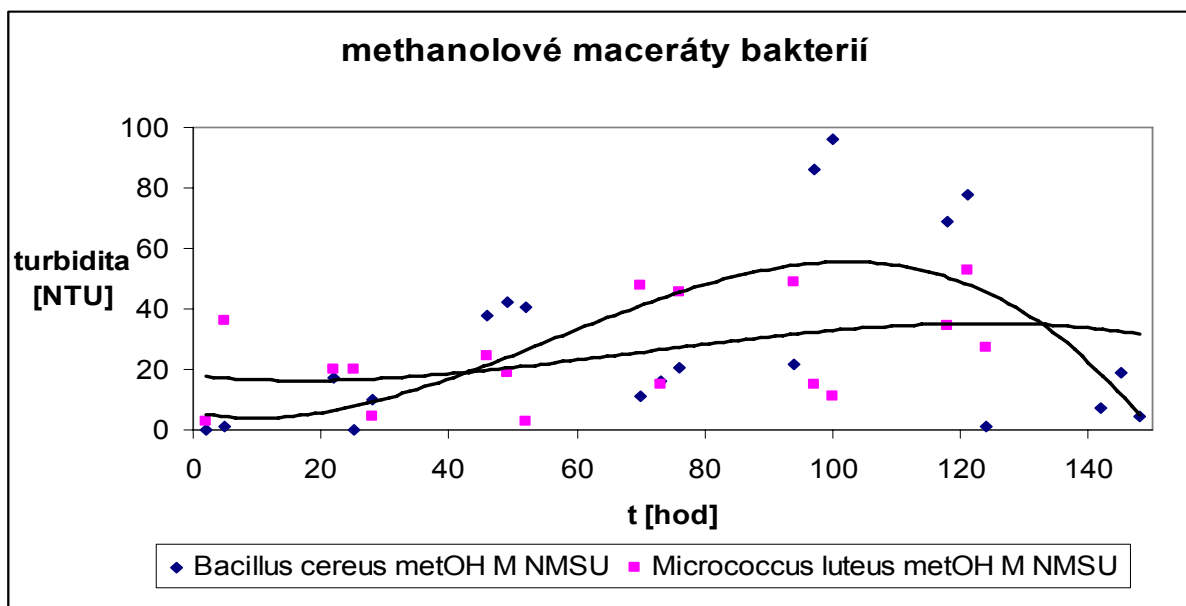
Obr. č. 48: etOH zkouška kvasinky *Hansenula anomala*

Z Obr. č. 48 vyplývá, že u ethanolu byly zaznamenány mírné inhibiční účinky na růst kvasinky *Geotrichum candidum*.

#### 4.1.5 Shrnutí inhibičních účinků na mikroorganismy

##### 4.1.5.1 Shrnutí inhibičních účinků na bakterie

Největší inhibiční účinky u bakterií *Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus* byly zaznamenány u neodpařovaných methanolových macerátů ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Oba maceráty jsou znázorněny v Grafu č. 23.

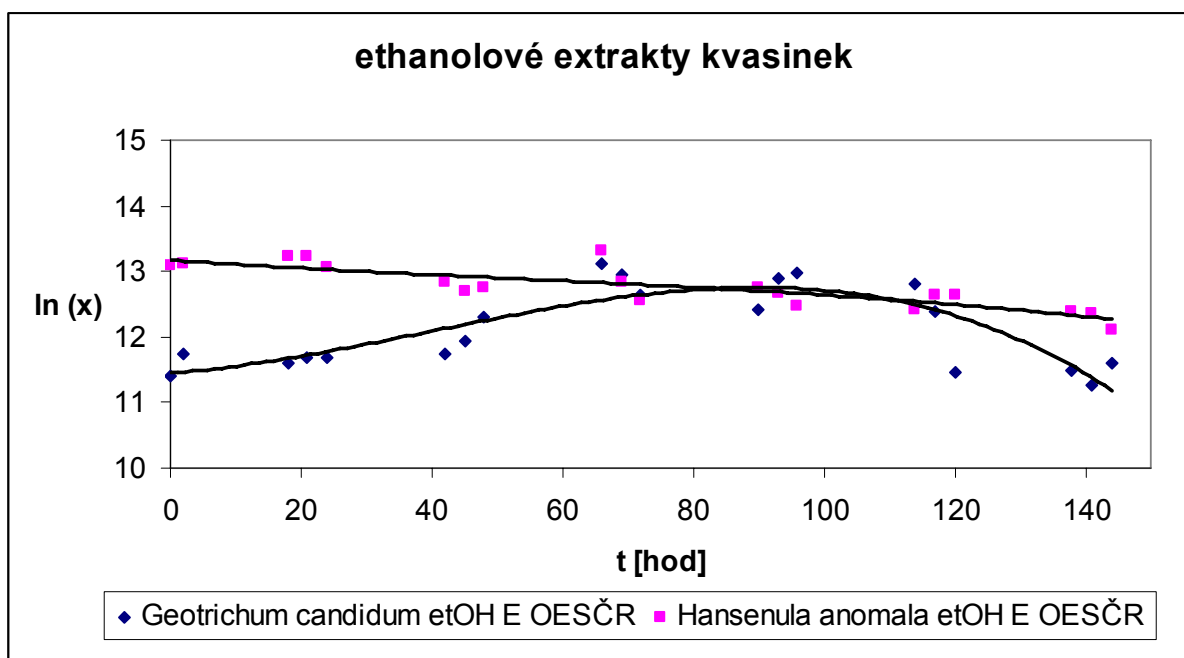


Graf č. 23: růstové křivky bakterií v přítomnosti methanolových macerátů

Z Grafu č. 23 vyplývá, že neodpařovaný methanolový macerát ze stévie cukerné vykazoval větší inhibiční účinky na růst bakterie *Micrococcus luteus* než na růst bakterie *Bacillus cereus*.

##### 4.1.5.2 Shrnutí inhibičních účinků na kvasinky

Největší inhibiční účinky u kvasinek *Geotrichum candidum* a *Hansenula anomala* byly zaznamenány u odpařovaných ethanolových extraktů ze stévie cukerné z České republiky. Oba extrakty jsou znázorněny v Grafu č. 24.



Graf č. 24: růstové křivky kvasinek v přítomnosti ethanolových extraktů

Z Grafu č. 24 vyplývá, že odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky vykazoval větší inhibiční účinek na růst kvasinky *Geotrichum candidum* než na růst kvasinky *Hansenula anomala*.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo ověření antimikrobiálního působení extraktů stévie cukerné na vybrané mikroorganismy a sestrojení jejich růstových křivek. Testovaným materiálem byly extrakty a maceráty ze sušené stévie cukerné pěstované v Uzbekistánu a v České republice. Extrakčními rozpouštědly pro přípravu extraktů a macerátů ze stévie byly alkoholy – ethanol a methanol. Antimikrobiální účinky stévie byly testovány na bakteriích *Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus* a na kvasinkách *Geotrichum candidum* a *Hansenula anomala*. Tyto mikroorganismy, extrakty a maceráty byly vybrány na základě předchozí diplomové práce. Byla sledována kultivace samotných mikroorganismů v tekutém živném mediu při laboratorní teplotě 25 °C po dobu 7 dní a kultivace mikroorganismů s extrakty a maceráty ze sušené stévie cukerné. U bakterií byla použita metoda turbidimetrie, kde byl sledován zákal tekutého media v průběhu kultivace. U kvasinek byla použita metoda přímého počítání buněk pod mikroskopem. Z naměřených výsledků byly sestrojeny jednotlivé růstové křivky. Pro ověření antimikrobiálního působení extraktů a macerátů byla použita difúzní jamková metoda na agarových plotnách, kdy byla zhotovena dokumentace po 72 h kultivace mikroorganismů při 30 °C v termostatu.

Porovnáním naměřených hodnot, vyhodnocených výsledků a sestrojených růstových křivek vyplývá že:

Na bakterii *Bacillus cereus* vykazovaly největší inhibiční účinky neodpařované extrakty a maceráty ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Největší inhibiční účinek byl zaznamenán u methanolového macerátu ze stévie cukerné z Uzbekistánu, přičemž methanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval nepatrně nižší inhibiční účinky. Naopak ethanolové a methanolové extrakty ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazovaly výrazně menší inhibiční účinky než ethanolové a methanolové maceráty ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

Na bakterii *Micrococcus luteus* vykazovaly největší inhibiční účinky odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky, neodpařovaný methanolový extrakt a macerát a ethanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Největší inhibiční účinek byl zaznamenán u methanolového macerátu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. U ostatních extraktů a macerátů byl zaznamenán menší inhibiční účinek než u methanolového macerátu, ale v porovnání s růstovou křivkou bakterie *Micrococcus luteus* vykazovaly velké inhibiční účinky, z nichž největší vykazoval methanolový macerát ze stévie cukerné z Uzbekistánu.

Největší inhibiční účinek na kvasinku *Geotrichum candidum* vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky, přičemž neodpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval téměř shodné inhibiční účinky. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Všechny ethanolové extrakty vykazovaly výrazně nižší hodnoty než jaké vykazovala růstová křivka kvasinky *Geotrichum candidum*, přičemž nejnižší hodnoty počtu buněk byly zaznamenány u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z České republiky. Všechny růstové křivky ethanolových extraktů vykazovaly téměř shodný průběh s růstovou křivkou kvasinky *Geotrichum candidum*.

Největší inhibiční účinek na kvasinku *Hansenula anomala* vykazoval odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky. Naopak nejmenší inhibiční účinek byl zaznamenán u neodpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z Uzbekistánu. Oba odpařované ethanolové extrakty vykazovaly nižší hodnoty než jaké vykazovala růstová křivka kvasinky *Hansenula anomala*, přičemž nejnižší hodnoty byly zaznamenány u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z České republiky. Neodpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z Uzbekistánu vykazoval téměř shodný průběh růstové křivky s průběhem růstové křivky kvasinky *Hansenula anomala*. Naopak odpařovaný ethanolový extrakt ze stévie cukerné z České republiky vykazoval odlišný průběh, vykazoval klesající průběh růstové křivky.

#### *Shrnutí inhibičních účinků na bakterie*

Největší inhibiční účinky u bakterií *Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus* byly zaznamenány u neodpařovaného methanolového macerátu ze stévie cukerné z Uzbekistánu, přičemž tento macerát vykazoval větší inhibiční účinky na růst bakterie *Micrococcus luteus* než na růst bakterie *Bacillus cereus*.

#### *Shrnutí inhibičních účinků na kvasinky*

Největší inhibiční účinky u kvasinek *Geotrichum candidum* a *Hansenula anomala* byly zaznamenány u odpařovaného ethanolového extraktu ze stévie cukerné z České republiky, přičemž, tento extrakt vykazoval větší inhibiční účinek na růst kvasinky *Geotrichum candidum* než na růst kvasinky *Hansenula anomala*.

Výsledkem této diplomové práce je ověření antimikrobiálních účinků extraktů a macerátů ze sušené stévie cukerné na vybrané mikroorganismy a sestavení jejich růstových křivek. Nejúčinnější byly neodpařované methanolové maceráty ze stévie cukerné z Uzbekistánu na bakterie a odpařované ethanolové extrakty ze stévie cukerné z České republiky na kvasinky. Vzhledem k těmto výsledkům lze aplikovat extrakty a maceráty ze stévie cukerné na vybrané potravinářské kontaminanty.

Pro další studie týkající se této problematiky bude nutné izolovat jednotlivé látky obsažené ve stévii cukerné a jednotlivě testovat jejich antimikrobiální účinky. Dále je nutné sestavit růstovou křivku až do fáze odumírání, aby se zjistilo, zda mají extrakty ze stévie vliv i na odumírání buněk mikroorganismů.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BRANDLE, J.E., TELMER, P.G. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*. 2007, vol. 68, is. 14, s. 1855-1863. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [2] DACOME, Antonio S., et al. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*. 2005, vol. 40, is. 11, s. 3587-3594. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [3] Dostupné na www: <http://www.sweb.cz/ekoland.klub/cinnost/stevia.htm>
- [4] RAKOVSKÁ, Eva. *Studium antimikrobiálních účinků extraktů stévie cukerné*. Brno, 2006. 136 s. Fakulta Chemická, Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespálcová, Ph.D.
- [5] Dostupné na www: [http://www.medicina.cz/verejne/clanek.dss?s\\_id=4217&s\\_rub=0&s\\_sv=2&s\\_ts=39167,58](http://www.medicina.cz/verejne/clanek.dss?s_id=4217&s_rub=0&s_sv=2&s_ts=39167,58), poslední revize 15.2.2002
- [6] Dostupné na www: <http://rostliny.studiogarden.cz/sladka-trava-stevia-rebaudiana-bertoni/>
- [7] VALÍČEK Pavel a kol.. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. 2. vyd. Praha: Academia, 2002, 486 s., ISBN 80-200-0939-6
- [8] NEPOVÍM A. *Studium obsahových látek v intaktních a tumorově transformovaných rostlinách u druhu *Stevia Rebaudiana Bertoni**. Praha, 1998. 128s.
- [9] Dostupné na www: <http://www.veronica.host.sk/fytoterapia/herbar/552.html>
- [10] GEUNS, Jan M. C., et al. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, vol. 41, is. 11, s. 1599-1607. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [11] GEUNS, Jan M. C. Stevioside. *Phytochemistry*. 2003, vol. 64, is. 5, s. 913-921. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [12]
- [13] STARRATT A.N., Gijzen M.: *Stevia Rebaudiana: Its biological, chemical and agricultural properties*. Agriculture and Agri-Food Canada, Southern Crop Protection and Food Research Centre London, Ontario N5V 4T3 [online], last revision 19th of August.



- [14] Dostupné na www: [http://www.mdidea.com/support/glossary\\_phytochemicals\\_s.html](http://www.mdidea.com/support/glossary_phytochemicals_s.html)
- [15] Dostupné na www: <http://faf.vfu.cz/html/docs/plants/stevia/ol.html>
- [16] KOYAMA, Eriko, et al. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, vol. 41, is. 6, s. 875-883. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [17] KOYAMA, E., et al. In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, vol. 41, is. 3, s. 359-374. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [18] HSIEH, M.H., et al. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patient with mild essential hypertension: A two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clinical Therapeutics*. 2003, vol. 25, is. 11, s. 2797-2808. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [19] Dostupné na www: <http://www.cem.msu.edu/~reusch/VirtualText/carbhyd2.htm>
- [20] JAHODÁŘ, Luděk, KLEČÁKOVÁ, Jana. TOXICITA HVĚZDNICOVITÝCH S PŘÍHLÉDNUTÍM K FARMACEUTICKY VÝZNAMNÝM DRUHŮM. *Chemické listy* [online]. 1999, roč. 93 [cit. 1998-03-29], s. 320-326. Dostupný z WWW: [www.chemickélisty.cz](http://www.chemickélisty.cz).
- [21] ŠETLÍK, SEIDLOVÁ, ŠANTŮČEK. *Www.natur.cuni.cz* [online]. 12.12.2003. Šetlík, 12.12.2003 , 12.12.2003 [cit. 2003-12-12]. Dostupný z WWW: [www.natur.cuni.cz](http://www.natur.cuni.cz).
- [22] STARRATT, Alvin N., et al. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*. 2002, vol. 59, is. 4, s. 367-370. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [23] [Http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html](http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html) [online]. 6.5.2003 , 6.5.2003 [cit. 2003-05-06]. Dostupný z WWW: <http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html>
- [24] Dostupné na www: <http://faf.vfu.cz/html/txts/kumariny.html>
- [25] TAKAHASHI, Kazuo, et al. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Research*. 2001, vol. 49, is. 1, s. 15-24. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

- [26] LABICOM. *Http://www.labicom.cz/default.aspx?section=70* [online]. 2.5.2008. 2.5.2008 , 2.5.2008 [cit. 2008-05-02]. Dostupný z WWW: <http://www.labicom.cz/default.aspx?section=70>.
- [27] PÓL, Jaroslav, HOHNOVÁ, Barbora, HYÖTYLÄINEN, Tuulia. Characterisation of Stevia Rebaudiana by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, vol. 1150, is. 1-2, s. 85-92. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [28] YODA, Simone K., et al. Supercritical fluid extraction from Stevia rebaudiana Bertoni using CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>+water: extraction kinetics and identification of extracted components. *Journal of Food Engineering*. 2003, vol. 57, is. 2, s. 125-134. Dostupný z WWW: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [29] Dostupné na www: <http://mikrobiologie.webzdarma.cz/5.pdf>.
- [30] Dostupné na www: <http://fzp.ujep.cz/~trogl/Rustovka.doc>.
- [31] Dostupné na www:  
[http://fvl.vfu.cz/export/sites/fvl/sekce\\_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie\\_pro\\_farmaceuty/pr-2.pdf](http://fvl.vfu.cz/export/sites/fvl/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/pr-2.pdf)
- [32] Dostupné na www: [http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/MB\\_kultivace\\_t.pdf](http://botany.upol.cz/prezentace/sedlarova/MB_kultivace_t.pdf).
- [33] Dostupné na www: <http://biomikro.vscht.cz/documents/metmiklab/Metmiklab4.pdf>
- [34] Dostupné na www: <http://sweb.cz/kolar-jiri/>
- [35] Dostupné na www: <http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/rep/bace.htm>
- [36] PROF. ING. ŠILHÁNKOVÁ CSC., Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře*. Academia; Jitka Zykánová. 2. dopl. vyd. Praha : Akademie věd ČR, 2002. 520. ISBN 8-85605-71-6.
- [37] Dostupné na www: <http://www.vscht.cz/kch/galerie/mleko.htm#bacter>
- [38] Dostupné na www:  
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/micr.htm>
- [39] Dostupné na www:  
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/geot.htm>
- [40] Dostupné na www:  
<http://biomikro.vscht.cz/trp/documents/savicka/anamorfy/page4.html>
- [41] Dostupné na www: <http://www.szu.cz/cem/zpravy/zpr0902/E305.htm>

- [42] Dostupné na www:  
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/pich-ano.htm>
- [43] Dostupné na www:  
<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/geot.htm>

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> – specifická otáčivost  
ADI – Acceptable Daily Intake (přijatelná denní dávka)  
ATP – adenosintrifosfát  
*B.c.* – *Bacillus cereus*  
butOH – butanol  
c – celkový počet buněk ve všech počítaných políčkách  
CE – capillar electrophoresis (kapilární elektroforéza)  
ČR – Česká Republika  
DMAPP – dimethylallylpyrofosfát  
DXR – 1-deoxy-D-xylulosa-5 fosfát reduktioisomerasa  
DXS – 1-deoxy-D-xylulosa-5 fosfát syntasa  
E – extrakt  
etOH – ethanol  
EU – Evropská Unie  
*G.c.* – *Geotrichum candidum*  
GA – Gibberellic Acid (kyselina giberelová)  
Glc – glukosa  
*H.a.* – *Hansenula anomala*  
HMG-Co A – 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A  
HPLC – high performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)  
IPP – isopentenylpyrofosfát  
IR – infrared (infra červené světlo)  
JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives (Spojená expertní komise ohledně potravinových přísad)  
LD<sub>50</sub> – letální dávka  
ln – přirozený logaritmus  
M – macerát  
*M.l.* – *Micrococcus luteus*  
metOH – methanol  
MO – mikroorganismus  
MPA – masopeptonový agar  
NADH – nikotinaminadenindinukleotid  
NE(M)SU – neodpařovaný extrakt (macerát) ze stévie cukerné z Uzbekistánu  
NIRS – Near Infrared Spectroscopy (reflexní spektroskopie v oblasti blízkého infračerveného spektra)  
NOEL – No Observed Effect Level (hladina bez pozorovaného účinku)  
obr. – obrázek  
OD – optická densita  
OE(M)SČR – odpařovaný extrakt (macerát) ze stévie cukerné z České Republiky  
OE(M)SU – odpařovaný extrakt (macerát) ze stévie cukerné z Uzbekistánu  
PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)  
Rha – rhamnosa  
SCFE – supercritical fluid extraction (superkritická kapalinová extrakce)

SE – extrakty ze stévie cukerné

SPE – solid phase extraction (extrakce pevnou fází)

t – čas

tab. – tabulka

TLC – thin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie)

$t_i$  – teplota tání

UDP-glc – uridindifosfát-glukosa

UV – ultraviolet (ultrafialové světlo)

x – počet mikroorganismů v  $1 \text{ cm}^3$

Xyl – xylulosa

$\lambda$  – vlnová délka

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Naměřené hodnoty pro stanovení růstové křivky extraktů a macerátů bakterie *Bacillus cereus*

Příloha č. 2: Vypočítané hodnoty pro stanovení růstové křivky extraktů a macerátů bakterie *Bacillus cereus*

Příloha č. 3: Naměřené hodnoty pro stanovení růstové křivky extraktů a macerátů bakterie *Micrococcus luteus*

Příloha č. 4: Vypočítané hodnoty pro stanovení růstové křivky extraktů a macerátů bakterie *Micrococcus luteus*

Příloha č. 5: Naměřené hodnoty pro stanovení růstové křivky extraktů kvasinky *Geotrichum candidum*

Příloha č. 6: Vypočítané hodnoty pro stanovení růstové křivky extraktů kvasinky *Geotrichum candidum*

Příloha č. 7: Naměřené hodnoty pro stanovení růstové křivky extraktů kvasinky *Hansenula anomala*

Příloha č. 8: Vypočítané hodnoty pro stanovení růstové křivky extraktů kvasinky *Hansenula anomala*