

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin**

---



**Antimikrobiální efekt semen révy vinnej**  
Diplomová práce

*Vedoucí práce:*  
Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.

*Vypracoval:*  
Bc. Adam Záhora

---

Brno 2016



## ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som túto prácu „*Antimikrobiálny efekt semien révy vinnej*“ vypracoval samostatne a všetky použité pramene a informácie sú uvedené v zozname použitej literatúry. Súhlasím aby diplomová práca bola zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v znení neskorších predpisov a v súlade s platnou *Smernicou o zverejňovaní vysokoškolských záverečných prácach*.

Som si vedomý, že sa na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000 Zb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brne má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy a užití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 Autorského zákona.

Ďalej sa zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o využití diela inou osobou (subjektom), si vyžiadam písomné stanovisko univerzity o tom, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity a zaväzujem sa uhradiť prípadný príspevok na úhradu nákladov spojených so vznikom diela a to až do ich skutočnej výšky.

V Brne dňa:

.....

podpis

## **POĎAKOVANIE**

Chcel by som sa poďakovať predovšetkým môjmu vedúcemu práce, pánovi Ing. Kalhotkovi PhD., že viedol moju prácu a svojim ochotným a odborným prístupom pomohol zrealizovať túto diplomovú prácu. Ďalšia vďaka patrí pánovi doc. Jiřímu Sochorovi, že mi pomáhal pri experimentálnej časti a umožnil pracovať v Lednici na záhradníckej fakulte, za jeho cenné rady a že mi celú experimentálnu časť pri príprave hroznového extraktu garantoval. Ďakujem pánovi Ing. Kumštovi že mi pomohol pri vymýšľaní témy diplomovej práce a za jeho asistenciu počas experimentu. Neodmysliteľná vďaka patrí pánovi Ing. Martinovi Duškovi za pomoc pri separácii hroznových semien a pánovi prof. Pavlovi Zemánkovi za odborné poznámky pri experimente a za požičanie príviesného vozíka. Ďakujem pánovi Bc. Zdeňkovi Pavlů, že mi požičal nádoby na matoliny a hroznové semená. Ďakujem za cennú radu pánovi Milanovi Spěvákovi, ktorý mi pomohol získať matoliny. Ing. Lenke Tomáškovéj ďakujem za odborné poznámky a pomoc pri príprave hroznového extraktu. Za pomoc pri sušení a mletí hroznových semien a ochotný prístup ďakujem pani Marcelle Hořínkovej. Ďakujem za ochotný prístup študentke Anne Pasičovej, ktorá mi pomáhala pri čistení usušených semien a ušetrila veľa času. Ďakujem diplomantke Ing. Eve Burdovej ktorá mi venovala čas a pomáhala pri experimentálnej časti s prípravou mikrobiálnej kultúry v laboratóriu. Ďakujem aj svojim rodičom a blízkym priateľom za motiváciu a podporu. **ĎAKUJEM.**

## **ABSTRAKT**

Práca sa zaoberá testovaním antimikrobiálnej aktivity semien révy vinnej, v literárnej rešerši súhrnom poznatkov biologicky aktívnych látok obsiahnutých v semenách révy vinnej (*Vitis vinifera*) a stručnou všeobecnou charakteristikou vybraných druhov mikroorganizmov. V praktickej časti práce sa testoval antimikrobiálny efekt extraktu semien získaného z moštových odrôd pestovaných v ČR. Prvá časť práce pojednáva o postupe výroby extraktu. Testoval sa naoxidovaný bezmethanolový extrakt, čerstvý methanolový a bezmethanolový extrakt v príslušných koncentráciach riedenia. Testovaniu boli podrobené mikroorganizmy *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a *Candida tropicalis*. Ako metóda testovania bola zvolená disková difúzna metóda a kultivácia mikroorganizmov bola v optimálnych podmienkach pre rast a rozmnožovanie mikroorganizmov po dobu 24 a 48 hodín. Nazáver bolo prevedené meranie inhibičných zón.

**Kľúčové slová:** antimikrobiálny efekt, extrakt zo semien révy vinnej, fenolické zlúčeniny, mikroorganizmy.

## **ABSTRACT**

The thesis deals with testing the antimicrobial activity of the seed extracts from grapevine, in the research data summary of biologically active substances contained in the vine seed (*Vitis vinifera*) and brief general characteristic of selected species of microorganisms. In the practical part of thesis was examined antimicrobial effect of seed extracts obtained from grape wine varieties grown in ČR. The first part of thesis deals with the process of producing extract. It was tested nonmethanol extract exposed to oxidation, fresh methanol and nonmethanol extract in appropriate diluted concentrations. These extracts at 100 %, 50 %, 10 % concentrations were tested by using the agar diffusion method, including *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Candida tropicalis*. All tested microorganisms were inhibited by the grape seed extracts using agar well diffusion method and they were cultivated in their optimal conditions for the growth and reproduction after 24 hours and 48 hours. Finally were performed measurements of the inhibition zones.

**Key words:** antimicrobial effect, grape seed extract, phenolic compounds, microorganisms.

## **OBSAH**

1 ÚVOD.....	8
2 CIEĽ PRÁCE.....	9
3 LITERÁRNY PREHLAD .....	10
3.1 Semená révy vinnej .....	10
3.1.1 Morfológická stavba hrozna a bobule .....	10
3.1.2 Obsahové látky semena.....	11
3.1.3 Chemické zloženie biologicky aktívnych látok v semene .....	11
3.1.4 Preukázaný antimikrobiálny efekt extraktu z hroznov révy vinnej .....	16
3.2 Charakteristika vybraných druhov mikroorganizmov.....	19
3.2.1 Bunková stena vybraných mikroorganizmov.....	19
3.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	22
3.2.3 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	23
3.2.4 <i>Candida tropicalis</i> .....	25
4 MATERIÁL A METODIKA.....	27
4.1 Príprava extraktu .....	27
4.1.1 Zber matolín .....	27
4.1.2 Separácia hroznových semien .....	28
4.1.3 Čistenie a sušenie semien.....	30
4.1.4 Extrakcia a odparovanie .....	31
4.2 Spektrofotometrické stanovenie obsahu polyfenolických zlúčenín .....	33
4.2.1 Stanovenie celkových polyfenolických zlúčenín v čerstvom extrakte zo semien révy vinnej .....	33
4.2.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity extraktu vystaveného oxidácii metódou DPPH.....	33
4.3. Postup vlastného testovania antimikrobiálneho účinku extraktu. ....	34
4.3.1 Príprava laboratórnych pomôcok .....	34

4.3.2 Zloženie a príprava živných pôd .....	34
4.3.3 Príprava inokula .....	35
4.3.4 Disková difúzna metóda.....	35
5 VÝSLEDKY A DISKUSIE .....	37
5.1 Stanovenie celkových polyfenolických zlúčenín a antioxidačnej aktivity .....	37
5.2 Vyhodnotenie inhibičného účinku extraktu semien diskovou difúznou metódou	38
5.2.1 Antimikrobiálny efekt extraktu vystaveného oxidácii .....	39
5.2.2 Antimikrobiálny efekt čerstvého bezmethanolového a methanolového extraktu .....	42
5.3 Štatistické spracovanie výsledkov .....	48
5.3.1 Extrakt vystavený oxidácii .....	48
5.3.2 Čerstvý methanolový a bezmethanolový extrakt .....	50
5.3.3 Účinky extraktov (naoxidovaný, čerstvý bezmethanolový a methanolový extrakt) porovnané Kruskal – Wallisovým testom.....	51
6 ZÁVER .....	54
7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	55
8 ZOZNAM POUŽITÝCH TABULIEK.....	66
7 ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV .....	67
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	68
11 PRÍLOHY .....	69

## 1 ÚVOD

Réva vinná je vo svete pestovaná už tisícročia a vo svete je hojne zastúpená. Z celosvetového hľadiska je tento ovocný druh jednou z najpestovanejšou trvalou kultúrou s ročnou produkciou približne 58 miliónov ton. Jej vlastnosti a zloženie sú značne sledované. Veľký podiel a význam predstavujú v hroznách za poslednú dobu často skúmané fenolické látky. Najväčšiu koncentráciu a množstvo možno nájsť v semenách, čo vo vinohradníkej praxi predstavuje vedľajší produkt pri výrobe vína vo forme matolín, ktoré sa v malej miere separujú a semená sa využívajú na výrobu vinného oleja. Okrem oleja je možnosť spracovania matolín na výrobu matolinového vína, destilátu alebo využitie ako krmivo prípadne na energetické účely.

V posledných rokoch je zameraná tiež pozornosť na možnosť využitia matolín ako druhotného odpadného produktu, lebo semená sú okrem fenolických látok taktiež zdrojom bioaktívnych látok. Zo zdravotného hľadiska sú fenolické látky cenené pre svoje antioxidantné vlastnosti a pripisujú sa im aj antimikrobiálne vlastnosti, ktorými sa táto práca zaoberá. Látky obsiahnuté v semenách sú zaujímavé pre svoje dietetické hodnoty a majú priaznivé účinky na zdravie človeka. Podieľajú sa napríklad na znížení incidencie rakoviny a srdcovo-cievnych ochorení, zníženie hladiny LDL lipoproteínov v krvi, majú neuroprotektívne a antihepatotoxické účinky atď.

Mikrobiálna aktivita je primárny spínač kazenia mnohých potravín a je zodpovedná za stratu kvality a bezpečnosti potravín. V posledných rokoch je trend zdravej výživy dosť rozšírený a s tým prichádza aj snaha v potravinárstve znižovať obsah aditívnych a konzervačných látok a hľadať nové spôsoby konzervácie potravín. Preto sa v súčasnej dobe zvyšuje záujem o štúdiá využitia prírodných antibakteriálnych a antimykotických látok, ako sú extrakty z rastlín, bylín a korenia pre konzerváciu potravín, ktoré okrem antimikrobiálnych a antioxidantných vlastností vykazujú vlastnú charakteristickú chuť a arómu.

Legislatíva európskej únie stále sprísňuje národné predpisy v oblasti odpadového hospodárstva so snahou hľadať nové bezodpadové technológie, ktoré by zabezpečili efektívne využitie odpadných produktov. Perspektívne riešenie predstavuje separáciu hroznových semien z matolín a následné spracovanie semien.



## **2 CIEĽ PRÁCE**

Cieľom diplomovej práce bolo vypracovať literárnu rešerše na zadanú tému a vybrať vhodné druhy mikroorganizmov pre testovanie antimikrobiálnej aktivity extraktu zo semien révy vinnej. V literárnom prehľade opísať obsahové zloženie semien révy vinnej, charakterizovať dané druhy mikroorganizmov, experimentálne otestovať extrakt zo semien révy vinnej na vybraných mikroorganizmoch a získané dáta spracovať a vyhodnotiť.

### **3 LITERÁRNY PREHĽAD**

Literárna rešerše je rozdelená do dvoch častí. V prvej časti sú charakterizované semená révy vinnej, morfológická stavba hrozna a obsahové zloženie semien révy vinnej. Druhá časť je zameraná na charakteristiku vybraných druhov mikroorganizmov testovaných v praktickej časti. Charakteristika mikroorganizmov pojednáva o zložení bunkovej steny a o všeobecnom prehľade konkrétnych druhov mikroorganizmov.

#### **3.1 Semená révy vinnej**

##### **3.1.1 Morfológická stavba hrozna a bobule**

Plodom révy vinnej sú bobule, ktoré sú stopkami uchytené k strapine a spolu tak vytvárajú hrozno. Bobuľa je dužinatý plod, ktorý sa vyvíja z pletív vajíčka. Bobuľa révy je viacsemenná. Podľa farby šupky sa odrody delia do bielych a modrých moštových odrôd. Modré dostali názov podľa prítomnosti antokyanového farbiva v šupke ktoré ich zafarbuje domodra (PAVLOUŠEK, 2011).

Bobuľa sa skladá z troch hlavných častí: šupka, dužnina a semená. Vo vnútri bobule sa nachádza spleť pletív nazývaných perikarp (oplodie), ktoré obklopujú semená. Perikarp je ešte rozdelený na exokarp (šupku), mezokarp (dužninu) a endokarp (pletivo ohraničujúce semená) (COOMBE, DRY, 1993). Strapina obsahuje stopové množstvo cukru, kyselinu vinnú, kyselinu jablčnú, veľké množstvo trieslovín, dusikaté a minerálne látky (KADISCH, MÜLLER, 1999).

Šupka je zložená z troch častí, nazývaných kutikula, epidermis a hypodermis. Na povrchu kutikuly je vosková vrstva, ktorá chráni bobuľu pred vysychaním. Pod kutikulou sa nachádzajú 1 - 2 vrstvy tangenciálne pretiahnutých buniek, s vysokým podielom kyselín, zvlášť kyselina citrónová. Šupka sa podieľa na celkovej hmotnosti bobule z 8 – 20 %. V šupke sa vyskytujú sekundárne metabolity ako sú fenolické látky – antokyanové farbivá aromatické látky a taníny (ŠULC, 2006).

Dužina obsahuje veľké mnohouholníkové bunky s tenkými bunkovými stenami. Dužnina tvorí 75 – 80 % celkovej hmotnosti bobule. Dužina obsahuje cukry, dominantne monosacharidy glukózu a fruktózu, v malom množstve sacharózu. Nájdeme tu ešte organické kyseliny, kyselinu jablčnú a kyselinu vinnú. Z anorganických kyselín prevláda kyselina fosforečná. Ďalej sú tu prítomné katióny, draslík, vápnik, horčík, sodík a zinok. V dužine je veľké zastúpenie dusikatých látok, hlavne aminokyselín,

amónnych jónov, bielkovín. Zo sekundárnych metabolitov sa tu vyskytujú aromatické látky a u farbiarok ešte antokyanové farbivá (BURG a kol., 2014).

Semená révy vinnej majú hruškovitý tvar, v ktorom sa na jednej strane nachádza klíčok a na strane druhej žliabok. Dĺžka semien je najčastejšie v rozmedzí 3 – 6 mm. Z celkovej hmotnosti bobule predstavujú 0 – 6 %. Semená sú významným zdrojom fenolických látok, z čoho väčšie zastúpenie nájdeme u modrých odrôd (LAFKA a kol., 2007).

### **3.1.2 Obsahové látky semena**

Semeno révy vinnej je dobre známa olejnatá plodina ktorá obsahuje 8 - 20 hmotnostných % oleja a predstavuje najvýznamnejší zdroj polyfenolických látok v hrozne (PASSOS a kol, 2010). Kvalitu tukov zo semien zaručuje vysoký obsah nenasýtených mastných kyselín (90 %), z nich asi 75 % je zastúpené kyselinou linolovou (C18:2) a v menšej časti kyselinou olejovou (C18:1). Stopové množstvo predstavuje kyselina linolenová (C18:3) a palmitolejová (C16:1) (BAYDAR, AKKURT, 2001).

Polyfenoly sú najdôležitejšou zložkou fytochemikálii v hroznách, pre ich biologicky aktívne vlastnosti a taktiež pre ich zdravotný prospech. Biologicky aktívnymi vlastnosťami sa rozumejú antioxidantné, antimikrobiálne, kardioprotektívne, antikarcinogénne, protizápalové vlastnosti. Fenolické zlúčeniny zahŕňajú antokyány, flavonoly, flavan-3-oly, stilbény a fenolické kyseliny (XIA a kol, 2010).

Silné antioxidanty predstavujú predovšetkým oligomerné proantokyanidinové komplexy (oligomeric proanthocyanidin complexes – OPCs). Štúdia na zdravých dobrovoľníkoch preukázala pri užívaní extraktu zo semien révy vinnej podstatné zvýšenie hladiny antioxidantov v ich krvi. Vitamín E, A a C, flavonoidy, linolová kyseliny a OPCs sú v semenách hroznov révy vinnej zastúpené vo vysokých koncentráciách a v nižších množstvách sa môžu vyskytovať aj v hroznových šupkách (BURG a kol., 2014).

### **3.1.3 Chemické zloženie biologicky aktívnych látok v semene**

Podstatnú časť semena tvorí olej a mnoho biologicky aktívnych látok. Ďalej sú to bielkoviny, cukry, celulóza a minerálne látky (ŠULC, 2006). Biologicky aktívna látka je charakterizovaná ako látka, ktorá je i pri nízkych koncentráciách schopná ovplyvňovať životné pochody. Toto ovplyvnenie môže byť pozitívne i negatívne. Sú to látky

izolované z prírodných zdrojov, ktoré sa svojou štruktúrou jedna od druhej môžu odlišovať (BURG a kol., 2014).

Hlavnú skupinu biologicky aktívnych látok tvoria fenolické látky, ktoré sa označujú aj ako polyfenoly, lebo tvoria viacej fenolických jednotiek. Polyfenoly rozdelujeme na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a ligniny (CÍCHOVÁ a kol., 2008). PAVLOUŠEK, (2011) delí fenolické látky podľa chemickej štruktúry na flavonoidné a neflavonoidné čo ukazuje tabuľka č.1. Podľa výskumov sa ukázalo, že zmrazovanie, chladenie, pasterizácia a bežné kuchynské úpravy potravín rastlinného pôvodu pravdepodobne neovplyvňujú obsah biologicky aktívnych foriem polyfenolov (ZLOCH, 2003).

Tabuľka č. 1 Základné rozdelenie fenolických zlúčenín v hroznách (PAVLOUŠEK, 2011).

flavonoidné fenolické látky	antokyany	malvidín-3-glukosid, cyanidín-3-glukosid, peonidín-3-glukosid, delphinidín-3-glukosid, petunidín-3-glukosid a estery s kyselinou octovou, kumarovou a kávovou
	flavan-3-oly	katechín, epikatechín, gallokatechín, epigallokatechín
	flavonoly	kvercetín, myricetín, kaempferol, isorhamnetín, rutín
Neflavonoidné fenolické látky	hydroxybenzoové kyseliny	kyselina gallová, protokatechová, vanilová syringová
	hydroxyškoricové kyseliny	kyselina kumarová, kávová, ferulová, koutarová, fertarová
	stilbeny	trans a cis-resveratrol, piceid, piceatannol, astringín

Polyfenolické zlúčeniny predstavujú jednu z najvýznamnejších skupín látok v horznách. Tieto látky sú hojne zastúpené v červených odrodách. V červených vínach ich celkový obsah kolísava v rozmedzí 1000 - 4000 mg/l (Li a kol., 2009). Obsah celkových polyfenolov je často kvantifikovaný kolorimetrickým meraním za použitia Folin-Ciocalteuovho činidla. Táto metóda je široko využívaná, jednoduchá a dobre reprodukovateľná (Huang a kol., 2005).

Analýza pomocou HPLC a LC-DAD/ESI-MS v jednej štúdií odhalila prítomnosť nasledujúcich bioaktívnych zložiek z extraktu semien révy vinnej. Fenolické kyseliny – kyselina kávová, galová, protokatechínová, 4-hydroxybenzoová a syringová. Ďalej flavonoidy - (+)-katechín, dimér katechínu, (-)-epicatechín, epicatechín gallát trimér. Proantokyanidíny B1, proantokyanidín B2, quercetín-3-O-rhamnosid, trans-polydatin, a trans-resveratrol. Celkový obsah polyfenolov bol stanovený na 327.6 (GAE)/g vyjadrených v ekvivalentoch galovej kyseliny (FRIEDMAN, 2014).

VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009 delia flavonoidy do nasledovných základných skupín:

- katechíny (flavan-3-oly)
- leukoantokyanidíny (flavan-3,4-dioly)
- flavanony
- flavanonoly
- flavony
- flavonoly (dihydroflavony)
- antokyanidíny.

Flavonoidy niekedy označované tiež ako flavonoidné látky, sú rozsiahlou skupinou rastlinných fenolov. Flavonoidy plnia v prírode mnoho funkcií. Ochrávajú rastliny pred UV žiarením, hmyzom a byľinožravcami. Tieto zlúčeniny hrajú rolu v rastlinách v signálnych mechanizmoch pri regulácii rastu. V neposlednej rade preukazujú antimikrobiálne a antioxidačné vlastnosti (YILMAZ, TOLEDO, 2004). Odhaduje sa že v prírode sa nachádza okolo 5 000 zlúčenín. Chemicky vo svojej molekule obsahujú dva benzénové kruhy a štruktúrnym základom všetkých flavonoidov je konfigurácia  $C_6 - C_3 - C_6$ . Vyskytujú sa vo forme glykosidov, acylovaných glykosidov, polymérov alebo ako voľná látka. Veľká časť flavonoidov je glykosylovaná. Naviazaná cukorná zložka býva najčastejšie glukóza, rhamnóza, menej často galaktóza, arabinóza či xylóza (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). Flavonoidy pôsobia ako primárne antioxidanty, chelátory a vycytávače superoxidového aniónu

(O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Aglykóny sú účinnejšie ako glykosidy (BENEŠEOVÁ a kol., 2000). Flavonoidy majú schopnosť sa akumulovať ako fytoalexíny. Tie inhibujú klíčenie spór rastlinných patogénov ako je napríklad *Botrytis cinerea* (ŠULC a kol., 2006).

Flavan-3-oly sú svojou koncentráciou v rozsahu 330 - 1390 mg/kg najpočetnejšou zložkou. Avšak ich koncentrácia závisí od odrody a vplyv má tiež agrotechnika a klimatické podmienky. Okrem iného sú vo víne zodpovedné za horkú chuť (MONTEALEGRE a kol., 2006). V šupkách a semenách sa vyskytujú tieto zlúčeniny: katechín, epikatechíngalát a epigalokatechín. Flavan-3-oly v semenách polymerizujú do podoby tanínov. Stupeň polymerizácie ovplyvňuje chuťové vlastnosti hroznov a vín, a semená vykazujú nižší stupeň polymerizácie než šupky. Semená obsahujú vyššiu koncentráciu monomérnych, oligomérnych a polymérnych flavan-3-olov. Taníny možno rozdeliť ešte na kondenzované a hydrolyzovateľné (MONAGAS a kol., 2003). Taníny sa v semenách vyskytujú v jeho obalových vrstvách. Obsah extrahovateľných tanínov zo semien sa znižuje v priebehu dozrievania bobule. Tieto zmeny v zložení možno zaznamenať aj zmenou farby semien kedy sa ostro zelená farba mení v hnedú až čiernu (KRAUS, 2003). Taníny sú sledované kvôli ich zdravotne prospešným účinkom. Taníny môžu inhibovať rast niektorých baktérií vyskytujúc sa v ľudskom tráviacom trakte ako napríklad *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium* zatiaľ čo nebol preukázaný baktériostatický vplyv na *B. infantis* alebo baktériu mliečneho kvasenia *Lactobacillus acidophilus* (YILMAZ, TOLEDO, 2004).

Proantokyanidíny je iný názov pre kondenzované triesloviny alebo kondenzované taníny. Kondenzované taníny v hroznách sú viac či menej polymérnymi komplexami flavan-3-olov alebo katechínov. Teplotným zohrevom týchto polymérov sa v roztoku s kyslým médiom uvoľňuje nestabilný uhlíkový atóm s kladným nábojom a následne konvertujú do hnedých kondenzačných produktov, hlavne červených kyanidínov, odkiaľ pochádza názov týchto zlúčenín proantokyanidíny, ktoré nahradili predošlý názov leukokyanidíny (RIBEREAU-GAYON a kol., 2006). Chemicky sú to oligoméry a polyméry flavonoidov so štruktúrou flavan-3-olu. Medzi monoméne proantokyanidíny sa radia katechíny (flavan-3-oly), ktoré sa delia ešte podľa počtu hydroxyskupín na afzelechíny, gallokatechíny a katechíny. V prípade že sa tieto látky vyskytujú v podobe esterov s gallovou kyselinou hovoríme potom o afzelechín-gallátoch, katechín-gallátoch a gallokatechín-gallátoch. Tieto látky obsahujú vo svojej molekule

dva chirálne atómy uhlíku a existujú v štyroch izomérnych formách. Tie čo majú vodíky na uhlíkoch C-2 a C-3 v (E)-konfigurácii, voláme (+)-afzelechíny, (+)-katechíny, (+)-gallokatechíny, (-)-afzelechíny, (-)-katechíny a (-)-gallokatechíny. Pri (Z)-konfigurácii sa názov vytvorí pridaním predpony *epi* napríklad (-)-epikatechín. Znamienko plus označuje (R)-konfiguráciu, znamienko mínus (S)-konfiguráciu. V prírode sa vyskytujú len (+)-afzelechíny, (+)-katechíny, (+)-gallokatechíny, (-)epiafzelechíny, (-)-epikatechíny a (-)-epigallokatechíny. Medzi dimérne proantokyanidíny patria proantokyanidín B1 – B7 a proantokyanidín A1 – A2 (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009).

Všeobecne sa v semenách vyskytujú najviac katechíny, až na výnimku pár odrôd, kde v Ryzlinku rýnskom je viacej prokyanidínu B1 a v odrode Shiraz je najviac epikatechínu (MONTEALEGRE a kol., 2006). Na množstvo vyextrahovaných proantokyanidínov zo semien má vplyv hrubosť namletých semien. V štúdiu sa ukázalo, že hrubo namleté vzorky vykazovali najväčšiu koncentráciu proantokyanidínov, menej potom mierne podrtené semená a najmenej bolo nameraných v extraktoch z jemne pomletých semien (ROBLOVÁ a kol., 2011).

Medzi významné flavanoly vo víne patrí kvercetin ako žlté farbivo. Vyskytuje sa najmä vo forme glykosidu alebo ako kopigment doprevádzajúci antokyány. Jeho najznámejším glykosidom je rutín, ďalej napríklad avikularin, kvercitrin, hyperin alebo spiraein (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). V štúdiu bol stanovený obsah rutínu z extraktu hroznových semien zo šiestich vybraných modrých odrôd (*Vitis vinifera* a *Vitis labrusca*) a to v množstve 2,57 – 9,05 mg.100 g<sup>-1</sup> sušiny (ROCKENBACH a kol., 2011).

Zo skupiny stilbénov je v semenách prítomný polyfenol resveratrol. Vyskytuje sa v dvoch izoméroch. V izoméry *cis* a *trans*. Jeho prítomnosť bola detekovaná vo viac než sedemdesiatich dvoch druhoch rastlín, kde sa vyskytujú oba jeho izoméry s prevahou *trans*-resveratrolu (*trans*-3,5,4',-trihydroxy-*trans*-stilbén) (BURG a kol., 2014). Resveratrol je významný fytoalexín a je produkovaný ako odpoveď rastliny na biotický či abiotický stres. Má významné antimikrobiálne a antioxidačné vlastnosti a v poslednej dobe je sledovaný vďaka svojim antikarcinogénnym a kardioprotektívnym účinkom (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). V čerstvej bobuli je koncentrácia resveratrolu vyššia v šupkách než v semenách. V semenách bol jeho obsah stanovený v množstve 1,11–3,75 mg.100 g<sup>-1</sup> sušiny. Resveratrol obsiahnutý v šupkách sa v procese výroby do vína dostane ale o semenách to neplatí (ŠULC a kol., 2005). Táto fenolická

zlúčenina inhibuje rast niektorých mikrobiologických druhov ako je napríklad *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a *Pseudomonas aeruginosa* a inhibuje taktiež niekoľko patogenických hubových dermatofytov, ktoré spôsobujú zápalové ochorenia kože. Inhibujú tvorbu biofilmu baktérií *Escherichia coli* sérovar O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* a *Vibrio cholerae*. Resveratrol vykazuje cytotoxicitu voči *Trichomonas vaginalis*, ktorý zapríčiňuje pohlavne-prenosnú chorobu trichomonázu. Je zrejmé, že resveratrol má antimikrobiálne, antiparazitické a protizápalové vlastnosti, ktoré majú potenciál vo farmaceutickom priemysle a potenciálny benefit v mikrobiologickej bezpečnosti potravín (FRIEDMAN, 2014).

V tukoch je prítomné vysoké zastúpenie tokotrienolov, ktoré spolu s tokoferolmi patria do skupiny vitamínov E. Tokotrienoly vykazujú omnoho vyššiu antioxidantnú kapacitu oproti tokoferolom, ktoré sú v ostatných rastlinných olejoch často jedinou zložkou vitamínu E (CHOI, LEE, 2009). Významnou zložkou tukov v semenách sú tokoferoly. Tvoria skupinu chemicky príbuzných tokolov a tokotrienolov. Všetky zlúčeniny, homológy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  vykazujú antioxidantnú aktivitu a aktivitu vitamínu E.  $\alpha$  – tokoferol je najrozšírenejší zo všetkých tokoferolov a jeho biologická aktivita je dvakrát vyššia než  $\beta$  a  $\gamma$  homológov a 100x vyššia než  $\delta$  homólu (BENEŠOVÁ a kol., 2000). Najvyšší obsah vitamínu E obsahuje v semenách odroda Rulandské šedé v priemere 779  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  sušiny. Z jednotlivých zložiek sú najviac zastúpené tokotrienoly, hlavne  $\gamma$ -tokotrienol. V priemere je zastúpenie tokotrienolov a tokoferolov v semenách révy vinnej vyjadrené v percentách a to v poradí  $\gamma$ -tokotrienol (55,12%) >  $\alpha$ -tokotrienol (31,33%) >  $\alpha$ -tokoferol (8,49%) >  $\gamma$ -tokoferol (4,10%) >  $\delta$ -tokotrienol (1,13%) (BURG a kol., 2014). Zo zdravotného hľadiska tokotrienoly pôsobia preventívne proti proliferácii rakoviny a indukujú apoptózu rakovinových buniek.  $\gamma$ -tokoferol,  $\alpha$ - a  $\gamma$ -tokotrienol z hroznových semien preukázali významný antioxidantný účinok a antiproliferačnú aktivitu proti rakovine pľúc a hrubého čreva (CHOI, LEE, 2009).

### **3.1.4 Preukázaný antimikrobiálny efekt extraktu z hroznov révy vinnej**

Fenolické zlúčeniny majú potenciálny antibakteriálny, antifungálny a antivirálny efekt. Fenolické zlúčeniny môžu ovplyvniť rast a metabolizmus baktérii. Môžu mať aktivačný aj inhibičný dopad na rast mikroorganizmov v závislosti na konštitúcii mikroorganizmov a koncentrácii fenolických zlúčenín. RODRIGUEZ-VAQUERO A KOL. (2007) preukázali, že extrakt z hroznov inhibuje mikrobiálny rast baktérie



*Escherichia coli*. Navyše so zvýšenou koncentráciou polyfenolov sa inhibičný účinok extraktu priamo úmerne zvýšil. Na druhej strane rod *Flavobacterium* nebol inhibovaný všetkými testovanými fenolickými zlúčeninami.

Bezalkoholický extrakt červeného a bieleho vína vykazoval antimikrobiálnu aktivitu voči patogénom ako sú *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Candida albicans*. Z výsledkov sa usúdilo, že za antimikrobiálny efekt sú zodpovedné fenolické zlúčeniny z červeného vína. Niektoré štúdie tvrdia, že fenolické zlúčeniny inhibujú aj alimentárne patogény ako sú *Salmonella typhimurium* a *Listeria monocytogenes* (PAPADOPULOU a kol., 2005).

Rôzne bakteriálne druhy vykazujú odlišnú senzitivitu voči fenolickým zlúčeninám. RADOVANOVIĆ A KOL. (2009) sledovali veľkosť inhibičnej zóny u *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Priemer inhibičnej zóny bol stanovený na 16 – 22 mm u *S. aureus* a 12 – 20 mm u *E. coli*.

Niektoré štúdie prezentujú odlišné výsledky iné sa zhodujú. RHODES a kol. (2006) ukazujú, že beztukový extrakt zo semien révy vinnej inhibuje rast *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, zatiaľ čo nepreukázali žiadny efekt na rod *Salmonella*.

Pri testovaní inhibičného efektu extraktu z hroznov bol sledovaný aj reakčný čas na množiacu sa kultúru baktérií. Napríklad KARAPINAR A KOL. (2007) demonštrovali okamžitý efekt a zníženie počtu populácie *Salmonella typhimurium*, ale u niektorých druhov zapôsobila antibakteriálna aktivita neskôr. XIA a kol. (2010) zistili, že extrakt zo semien révy vinnej účinkoval na *Staphylococcus aureus* až po 48. hodinách a na *Aeromonas hydrophila* po 1 hodine .

Fenolické zlúčeniny získané z rôznych častí hrozna vykazujú rôzny antimikrobiálny efekt. Niektoré výskumy ukazujú že extrakt zo semien je omnoho viac antimikrobiálne účinný než extrakty získané z ostatných častí hrozna. Jedna štúdia preukázala, že minimálna koncentrácia na inhibíciu *Listeria monocytogenes* bola u použitého extraktu zo semien stanovená na 0,26 mg GAE/l vyjadrených v ekvivalentoch gallovej kyseliny a u extraktu zo šupiek 0,34 mg GAE/l (ANASTASIADI a kol., 2009). Extrakt získaný z listov révy vinnej preukázal nižšiu antimikrobiálnu aktivitu než semenný extrakt. Extrakt získaný len z dužiny navykázal žiadnu antimikrobiálnu aktivitu (YIGIT a kol., 2009).

Extrakt z celých hroznov inhiboval rast grampozitívnych baktérií v koncentrácii 680 mg GAE/l a gramnegatívnych baktérií pri koncentrácii 1360 mg GAE/l. V štúdiu od JAYAPRAKASHA A KOL. (2003) to bolo u grampozitívnych baktérií 340 – 390 mg GAE/l a u gramnegatívnych baktérií 475 – 575 mg GAE/l, z čoho možno usúdiť, že gramnegatívne baktérie sú voči fenolickým látkam získaných z hroznového extraktu odolnejšie.

Fenolické zlúčeniny v hrozne, zvlášť resveratrol môžu mať antifungálnu aktivitu. Napríklad koncentrácia 10 - 20 µl resveratrolu inhibovala kvasinku *Candida albicans* (JUNG a kol., 2005). RODRIGUEZ–VAQUERO A KOL. (2007) vo svojej štúdiu prezentovali, že neflavonoidné fenolické látky ako je kyselina kávová a flavonoid rutín a kvercetín mali vysoký inhibičný efekt na rast *Listeria monocytogenes*.

V štúdiu TAGURI A KOL., 2004 bol sledovaný vzťah medzi štruktúrou fenolických zlúčenín a antimikrobiálnym efektom. Štruktúra 3,4,5-trihydroxyfenyl fenolických zlúčenín nájdených v epigalokatechíne, epigalokatechíne-3-O-gallát, kastalagíne a prodelfinidíne môžu mať dôležitú antimikrobiálnu aktivitu. Tento fakt indikuje, že počet hydroxylových skupín a stupeň polymerizácie môže byť kľúčový pri antimikrobiálnej aktivite fenolických zlúčenín.

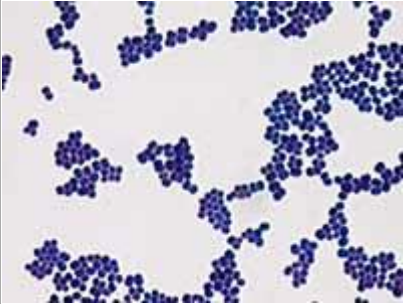
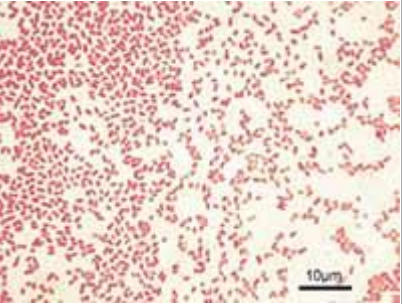
### 3.2 Charakteristika vybraných druhov mikroorganizmov.

Prehľad a charakteristika mikroorganizmov je zameraná len na nižšie spomínané tri rody mikroorganizmov, ktoré boli vybrané ako reprezentatívni zástupcovia pre testovanie antimikrobiálnej aktivity extraktu zo semien révy vinnej. Všeobecná charakteristika vybraných mikroorganizmov je orientovaná na charakteristiku bunkovej steny daných mikroorganizmov.

#### 3.2.1 Bunková stena vybraných mikroorganizmov

Podľa výsledku Gramovho farbenia (podľa Ch. Grama 1884), ktoré zahŕňa dva spôsoby farbenia (morenie jódovým roztokom a pôsobenie organického rozpúšťadla), delíme baktérie na dve základné skupiny. Grampozitívne a Gramnegatívne baktérie. Grampozitívne v bunkovej stene zadržujú prvo použité farbivo (kryštalová violet) aj po morení jódovým roztokom a pôsobením organických rozpúšťadiel (ethanol, acetón). Gramnegatívne sa po pôsobení rozpúšťadla odfarbia a farbja sa druhým použitým farbivom (napr. safranin) (KALHOTKA a TESAŘOVÁ, 2014). Rozdiel vo farbení spočíva v odlišnej stavbe bunkovej steny čo zobrazuje tab. č. 2.

Tab. č. 2: Rozdiel medzi Grampozitívnou a Gramnegatívnou bunkovou stenou (ARYAL, 2015).

N	Charakteristika	Grampozitívna	Gramnegatívna
1	Farebná reakcia	 <p>Ofarbená kultúra mikroorganizmov, ktoré zadržujú farbivo kryštalová violet</p>	 <p>Kultúra mikroorganizmov nafarbená druhým kontrastným farbivom, safraninom.</p>
2	Bunková stena	hrúbka 20-30 nm	hrúbka 8-12 nm.
3	Bunková stena	hladká	vlnitá
4	Vrstva peptidoglykánu	hrubá, viacvrstevná	Tenká, jednovrstevná
5	Kyselina teichoová	prítomná	neprítomná

6	Periplazmový priestor	prítomný	prítomný
7	Vonkajšia membrána	chýba	prítomná
8	Poríny	neprítomné	vyskytujú sa vo vonkajšej membráne
9	Obsah lipopolysacharidov (LPS)	nízky	vysoký
10	Obsah lipoproteínov a lipidov	nízky	vysoký (vďaka prítomnosti vonkajšej membrány)
11	Produkcia toxínov	exotoxíny	endotoxíny a exotoxíny
12	Odolnosť k fyzikálnemu poškodeniu	vysoká	nízka
13	Citlivosť na Penicilin and Sulfonamide	vysoká	nízka
14	Citlivosť na Streptomycin, Chloramphenicol and Tetracyklín	nízka	vysoká
15	Citlivosť na aniónové detergenty	vysoká	nízka
16	Odolnosť voči azidu sodnému	vysoká	nízka
17	Odolnosť voči vysúšaniu	vysoká	nízka

### Grampozitívna bunková stena

Hlavnými komponentami grampozitívnej bunkovej steny sú širokovrstvý peptidoglykán, murein, ktoré sa nevyskytujú nikde inde okrem prokaryotických organizmov a teichoová kyselina. Murein pozostáva z dvoch lineárne viazaných reťazcov N-acetylglukosamin (NAG) a N-acetylmuramová kyselina (NAM). Nachádzajú sa tu ešte polysacharidy a proteíny. Proteíny nazývané adhezíny iniciujú kolonizáciu, prichytením sa k host'ovskej bunke. Zloženie sacharidov je pre jednotlivé skupiny baktérií špecifické a je zodpovedné za imunochemické reakcie (špecifické antigénne vlastnosti). Väčšina enzýmov vyskytujúcich sa v biologických systémoch nedegraduje peptidoglykán, okrem lysozýmu. Výnimku tvoria tiež hydrolázy

produkované samotnou baktériou, ktoré degradujú peptidoglykán aby sa mohli tvoriť nové reťazce NAM a NAG (RYAN a RAY 2004).

#### Gramnegatívna bunková stena

Baktérie, ktoré majú túto štruktúru bunkovej steny označujeme ako gramnegatívne baktérie. Okrem prítomnosti mureínu, existuje podobnosť v chemickom zložení ku grampozitívnej bunkovej stene. Architektonicky sa štruktúra gramnegatívnej bunkovej steny podstatne líši od grampozitívnej a má zložitejšiu stavbu. V Gramnegatívnej bunkovej stene je množstvo mureínu značne redukované (RYAN a RAY, 2004). Gramnegatívna bunková stena je tenšia, 10 – 15 nm. Peptidoglykán tvorí tenkú vrstvu bez kyseliny teichoovej. Významnou zložkou je vonkajšia membrána, ktorá obsahuje fosfolipidy, štruktúrne a enzýmové proteíny, lipoproteíny a lipopolysacharidy. Medzi vonkajšou membránou a vrstvou peptidoglykánu je periplazmový priestor, kde sa nachádzajú hydrolytické enzýmy, živiny a metabolity. Vonkajšiu membránu prestupujú špeciálne proteíny nazývané poríny alebo matrix proteíny, ktoré formujú kanáliky – póry, ktoré umožňujú aktívny transport malých molekúl rozpustených hydrofilných látok cez vonkajšiu membránu do periplazmového priestoru. Tieto póry zasahujú až do peptidoglykánu (KALHOTKA a TESAŘOVÁ, 2014). Okrem porínu je na vonkajšej membráne prítomný aj Braunov lipoprotein alebo murein lipoprotein, ktorý je najhojnejšie zastúpený proteín vo vonkajšej membráne u *Escherichia coli*. Predpokladá sa, že tento proteín tvorí hlavné pripojenie k vrstve mureínu na vonkajšej vrstve u *Escherichia coli* (RYAN a RAY, 2004). Na povrchu vonkajšej membrány sa vyskytuje ešte lipopolysacharid (LPS). Ide o oligomér zložený z niekoľkých monomérnych jednotiek. Tieto jednotky tvoria tri časti: lipid A, základný a špecifický polysacharid. Lipid A je toxický pre živočíšne bunky a zodpovedný za endotoxickú vlastnosť LPS. Špecifický polysacharid z imunologického hľadiska zodpovedá za somatickú antigenitu gramnegatívnych baktérií, označovaný ako O-antigén. Základný polysacharid je zložený z viac než desiatich lineárne i bočne viazaných cukrov a jeho štruktúra je pre všetky gramnegatívne baktérie približne rovnaká (KALHOTKA a TESAŘOVÁ, 2014).

## Eukaryotická bunková stena kvasiniek

Bunková stena predstavuje prvú bariéru pred vplyvom škodlivých a nepriaznivých činiteľov. Má podobne ako u baktérií silnú a pevnú štruktúru. Veľkými pórmi steny môžu samovoľne prechádzať všetky zlúčeniny okrem vysokomolekulárnych zlúčenín, ako sú napríklad polysacharidy a bielkoviny. Hlavnou zložkou bunkovej steny sú polysacharidy, tie predstavujú 80 % (ŠILHÁNKOVÁ, 2002). Bielkoviny tvoria 6 - 10 % a lipidy spolu s fosfolipidmi 3 - 10 %. Sú tu prítomné chitín, chitozan, glukany, manany a polysacharidy zložené z galaktosaminu alebo 6-deoxyhexóz, prevažne z fukózy a ramnózy. V mnohých prípadoch sa tu vyskytuje celulóza a látky podobné lignínu, ktoré dodávajú bunkovej stene pevnosť. Bunková stena obsahuje lipidy a vosky, ktoré spôsobujú nízku zmáčivosť hýf a konídií. Steny konídií obsahujú rôzne farbivá, ktoré chránia bunku pred UV žiarením (KALHOTKA, 2014). V menšom množstve sa v bunkovej stene vyskytujú fosforečnany, viazané esterovými väzbami na polysacharidy. Tieto fosfátové zbytky spolu so skupinami -COOH bielkovín dávajú negatívny náboj, ktorý ovplyvňuje adsorpciu látok z vonkajšieho prostredia (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

### **3.2.2 *Escherichia coli***

*E. coli* zaraďujeme medzi prokaryotické organizmy, to znamená mikroorganizmy s nepravým jadrom. *E. coli* objavil a popísal v roku 1885 nemecký bakteriológ a pediater Theodor Escherich (Pharma-Reports, 2012). Taxonomicky podliehajú nasledovnému zatriedeniu.

Doména: *Bacteria*, Kmeň: *Proteobacteria*, Trieda: *Gammaproteobacteria*, Rád: *Enterobacteriales*, Čeľaď: *Enterobacteriaceae*, Rod: *Escherichia* (SEDLÁČEK, 2007).

*Escherichia coli* je gramnegatívna, fakultatívne anaeróbna, nesporulujúca baktéria. Bunky sú typicky tyčinkovité o dĺžke asi 2  $\mu\text{m}$ , hrúbke 0,5  $\mu\text{m}$  a objeme 0,6 - 0,7  $\mu\text{m}^3$ . Niektoré kmene majú peritrichálne uložené pohyblivé bičíky. *E. coli* sa bežne vyskytuje v prostredí mimo telo človeka a je taktiež súčasťou črevnej mikroflóry cicavcov a vtákov (WIRTH a kol., 2006). Existuje mnoho druhov *E. coli* a jednotlivé druhy možno rozdeliť do sérovarov na základe detekcie povrchových antigénov, O, K a H (RYAN, 2004).

Väčšina kmeňov *E. coli* sú nepatogénne, dokonca prospešné. Niektoré kmene sa pozitívne podieľajú na tráviacom procese a na tvorbe vitamínov, napr. B<sub>12</sub>, K<sub>1</sub> a K<sub>2</sub>

a chrániť zažívacie trakt pred osídlením patogénnymi baktériami. Niektoré kmene sa používajú ako probiotiká (HORKÝ a kol., 2014). Nadruhej strane niektoré kmene, napr. sérovar O157:H7, získali špeciálne mobilné gény pôsobením bakteriofágov alebo plazmidov, ktoré im prepožičali nové faktory virulencie. Tieto gény sú lokalizované na tzv. ostrovoch patogenity (KOMPRDA, 2004). Príslušné kmene *E. coli* sú potom označované ako: enterotoxické *E. coli* (ETEC), enteroinvazívne *E. coli* (EIEC), enterohemoragické *E. coli* (EHEC), enteroagregatívne *E. coli* (EAEC)

Tie sú zodpovedné za závažné choroby ako sú gastroenteritídy, močové infekcie a v menších prípadoch dokonca aj novorodenecké meningitídy, hemolytickouremitický syndróm (HUS), septikémie, mastitídu a gramnegatívnu pneumóniu. Niektoré patogénne kmene *E. coli*, hlavne sérovary O157:H7, O121, O104:H21 a ďalšie, produkujú často toxíny. Napr. tzv. shiga-toxín (STEC) alebo verocytotoxín (VTEC), ktoré môžu byť až letálne (SINHA a kol., 2015; Pharma-Reports, 2012).

*Escherichia coli* ale aj niektoré enterobaktérie sú významným rezervoárom antibiotickej rezistencie. Rezistentná *E. coli* môže šíriť svoje gény pre rezistenciu aj medzi iné druhy ako je napr. *Staphylococcus aureus*. Rezistencia je viazaná na plazmidoch, ktoré sú pri stresových podmienkach prenášané na iné druhy. Tento prenos je uľahčený ešte tým, že *E. coli* často žije v biofilmoch v kontakte s ostatnými baktériami a disponuje fimbriami, čím je prenos genetickej informácie jednoduchší (STEWART, 2001).

### **3.2.3 *Enterococcus faecalis***

*E. faecalis* sa radí medzi prokaryotické mikroorganizmy. Taxonomicky sa zatrieduje nasledovne.

Doména: *Bacteria*. Kmeň: *Firmicutes*. Trieda: *Bacilli*. Rád: *Lactobacillales* Čeľaď: *Enterococcaceae*. Rod: *Enterococcus* (DE VOS a kol., 2009).

*E. faecalis* je grampozitívna, fakultatívne anaeróbna, nepohyblivá baktéria. Pôvodne bola klasifikovaná do skupiny D streptokokov ako súčasť normálnej črevnej mikroflóry. *E. faecalis* a *E. faecium* sú najznámejší zástupci črevnej mikroflóry u teplokrvných živočíchov. V ľudskom organizme sú hojne zastúpené a to v množstve  $10^2 - 10^8$ /g v nestrávených častiach potravín (OGIER a SERROR, 2008). *E. faecalis* fermentuje glukózu za vzniku plynu. Nevykazuje katalázovú reakciu s peroxidom vodíka ale pri raste na krvnom agare môže vykazovať pseudokatalázovú reakciu, ktorá

je obvykle slabá. Redukuje lakmusové mlieko ale nezkvapaľňuje želatínu (Pharma-Reports, 2012).

Enterokoky sú dôležitý rod, ktorý sa radí medzi homofermentatívne baktérie mliečneho kvasenia. Skvasujú cukry na kyselinu mliečnu. Väčšina druhov enterokokov má schopnosť rásť v prítomnosti 6,5 % NaCl, pri pH 9,6 a teplote medzi 10 - 45° C (MANERO a BLANCH, 1999).

Enterokoky sú chemoorganotrofné mikroorganizmy, ľudske komenzály, adaptované na nutrične bohaté, kyslíku zbavené, ekologicky komplexné prostredie živých organizmov. Vyskytujú sa bežne v gastrointestinálnom trakte (LOVE, 2001). Všetky druhy rodu *Enterococcus* majú teplotné optimum pri 35 - 37° C (GARDINI a kol., 2001).

*E. faecalis* je typický zástupca probiotických baktérií, ktorý potláča vznik rakoviny, redukuje hladinu cholesterolu v krvi. Produkuje antimikrobiálne proteíny bakteriocíny ktoré sú účinné proti grampozitívnym a gramnegatívnym patogénnym druhom baktérií. Antimikrobiálnu aktivitu vykazujú aj voči niektorým hubám, zahrňujúce rody *Candida* a *Aspergillus* (ENAN a kol., 2014).

Podobne ako ostatné enterokoky aj *E. faecalis* môže spôsobovať závažné choroby, hlavne infekcie močového traktu, prostatitídu, epididymitídu, infekcie krvného riečišťa a vnútrobrušnej oblasti. Druhy *Enterococcus* sú spojované s nosokomiálnymi infekciami. K patogenite často prispieva antibiotická rezistencia (TEIXEIRA a kol., 2013). *E. faecalis* je hlavnou príčinou infekcii pri operáciach. V skutočnosti je rod *Enterococcus* treťou najčastejšou príčinou nosokomiálnych infekcii v USA. Významným rizikovým faktorom kolonizácie a infekcie enterokokmi je pôsobenie cefalosporínom (MCKANE a KANDEL, 1996).

*E. faecalis* je obvykle rezistentný na aminoglykosidy, aztreonam, cefalosporíny, klindamycin, polosyntetické penicilíny nafcilín a oxacilín a na thoprim-sulfamethoxazol. K liečbe enterokokových infekcií je oficiálne medicínou často doporučovaný prírodný včelí preparát, propolis. Jeho priaznivé účinky uvádza aj niekoľko vedeckých publikácií (Pharma-Reports, 2012).



### 3.2.4 *Candida tropicalis*

Taxonomicky patrí *Candida tropicalis* medzi eukariotické organizmy. Doména: *Eukaryota*. Skupina: *Ophisthokonta*. Ríša: *Fungi*. Podríša: *Dikarya*. Kmeň: *Ascomycota*. Podkmeň: *Saccharomycotina*. Trieda: *Saccharomycetes*. Rád: *Saccharomycetales*. Čeľad': *Saccharomycetaceae*. Rod: *Candida* (Taxonomy/Browser, 2016)

Kvasinky rodu *Candida* patria medzi mikroskopické huby (mikromycety). Kvasinka *C. tropicalis* má guľovité alebo mierne elipsoidné bunky. Medzi nimi sa však môžu vyskytnúť aj cylindrické a pretiahnuté bunky ako súčasť článkov pseudomycélia. Rozmer buniek sa pohybuje medzi 4,3 - 7,2 x 5,8 - 10,8  $\mu\text{m}$  (KALHOTKA, 2014). Kolónie sú na pohľad mäkké, krémovité až mliečne, hladké, často radiálne pásované, guľatého až oválneho tvaru. V prípade, že sa vytvára pravé mycélium môže sa mäkký charakter kolónií meniť až na kožovitý. Najčastejšie je možno pozorovať vznik pseudomycélia, vláknitých buniek s pretiahnutými článkami a jednotlivými blastokonídiami v krátkych retiazkoch. V optimálnych podmienkach je kolónia schopná vyrásť rýchlosťou 4,7 - 5,4 mm za 100 hodín. V kvapalnom živnom médiu vytvára *C. tropicalis* mierny zákal, na spodku až sediment, pri okraji prstenec prípadne na povrchu mázdu (Savická, Miniatlas mikroorganizmů, 2014).

*Candida tropicalis* je jedna z bežných kandidid spôsobujúca ľudské choroby v tropických krajinách. Frekvencia invazívnych chorôb kolísava v rôznych geografických polohách a spôsobuje 3 – 66 % kandidózy. Taxonomicky je blízka *Candida albicans* a zdieľa s ňou mnoho patogenických znakov (CHAI a kol., 2010). Veľmi často sa kvasinka vyskytuje ako všeobecný komenzál v ústach, vagíne, tráviacom ústrojí a na pokožke ľudí a zvierat (KWON-CHUNG a BENNETT, 1992).

Kandidy sa rozmnožujú dominantne nepohlavne pučaním alebo delením, ale je možné aj pohlavné rozmnožovanie spórmi. Všeobecne možno povedať, že kvasinky sa vo forme blastokonidií rozmnožujú nepohlavne a kvasinky vo forme vlákien pohlavne (ŠILHÁNKOVÁ, 2002). V rámci vegetatívneho rozmnožovania rozlišujeme niekoľko štádií životného cyklu. Sexuálne aktívna haplofáza, sexuálne inaktívna haplofáza, diplofáza (autodiploidizácia), pupeňová meióza. Nestála diplofáza prechádza na sexuálne inaktívnu haplofázu, ktorá je stála. Pučanie sa realizuje multilaterálne. *C. tropicalis* je anamorfná kvasinka a pohlavné rozmnožovanie je bez schopnosti sporulácie (SILVA a kol., 2011).

Kvasinka sa môže vyskytnúť aj v kvasnom priemysle. *C. tropicalis* je možné izolovať z mlieka a mliečnych produktov, neasimiluje dusičnany a má silný redukčný potenciál (GÖRNER a VALÍK, 2004). Je schopná zkvasovať sacharózu, maltózu, laktózu, glukózu, dextrózu. Kandidy sú všeobecne na kultivačné podmienky nenáročné (MADHAVAN a kol, 2011).

Niektorí autory prirovnávajú *C. tropicalis* k *C. albicans* a za ich teleomorfné štádium pokladajú rod *Syringospora* (KALHOTKA, 2014).

## 4 MATERIÁL A METODIKA

V praktickej časti diplomovej práce bola v prvej fázy experimentu príprava extraktu z rôznych moštových odrôd z hroznov révy vinnej (*Vitis vinifera*). Následne sa vyrobený extrakt testoval na troch odlišných kultúrach mikroorganizmov. Boli vybrané 3 druhy s odlišnou bunkovou štruktúrou. Prvý druh *Candida tropicalis* reprezentoval eukaryotický organizmus, zástupca mikomycét, konkrétne kvasiniek. Druhý zástupca *Escherichia coli* predstavoval prokaryotický organizmus s gramnegatívnou bunkovou stenou. Posledný *Enterococcus faecalis*, taktiež z domény *Bacteria* s prokaryotickou bunkovou štruktúrou, ale zástupca s grampozitívnou bunkovou stenou zo skupiny baktérií mliečneho kvasenia. K testovaniu bola zvolená disková difúzna metóda a meranie inhibičných zón s ohľadom na kontrolnú vzorku. Po 24 hodinovom a 48 hodinovom pôsobení extraktu v kultivačných podmienkach bolo prevedené meranie inhibičných zón.

### 4.1 Príprava extraktu

Prípravu extraktu je možné rozdeliť do nasledujúcich krokov, ktoré majú chronologickú postupnosť a nie je možné zameniť jednu fázu za druhú.

#### 4.1.1 Zber matolín

Na samotnom začiatku je nutné nazbierať matoliny, najlepšie v čerstvom stave, ktoré neboli vystavené poveternostným podmienkam dlhšiu dobu, hlavne dažďu a nedošlo k žiadnym rozkladným procesom alebo k poškodeniu faunou. Matoliny sú odpadným produktom pri výrobe vína, predstavujú výstup po filtrácií hroznového rmutu.

Do plastových nádob boli ručne lopatou pozbierané matoliny v celkovom objeme cca 300 l. Nádoby majú charakter vinárskej bedne, ktorá má širšie steny a nie moc hlboké dno, čo znázorňuje obr. č. 1. Pre tento experiment sú vinárske bedne vhodnou voľbou, aby došlo k lepšiemu prestupu vlhkosti z materiálu a rýchlejšiemu presušeniu. Čerstvé matoliny sa po zbere nechali pri teplote asi 18 °C po dobu 2, 3 dni v suchom prostredí preschnúť. Mokrý materiál spôsobuje upchávanie pórov v sitách vibračného separátoru a tak znižujú efektivitu práce.



Obr. č. 1: Matoliny v nádobách na prívesnom vozíku pripravené k separácii

#### 4.1.2 Separácia hroznových semien

Preschnuté matoliny bolo v ďalšom kroku nutné odseparovať a získať len samotné hroznové semená. Stroj na ktorom sa realizovala separácia hroznov sa nazýva rovinné vibračné sito. Princípom separácie je postupný, posuvný pohyb vrstiev materiálu po rovinatej ploche sita. Pri plynulom pohybe vibráciou sit dochádza k prepadu častíc cez otvory v site o kalibrovanej veľkosti. Pre zlepšenie pohybu materiálu sú sitá naklonené o 5 - 10°. Kmitavý vibračný pohyb sit zaisťuje elektromotor. Separátor odfotený na obr. č. 2 pozostáva z troch sit ktoré sú horizontálne umiestnené v miernych rozostupoch. Separovaná zmes semien a šupiek sa pohybuje po vrchnom site a pri pohybe prepadávajú do nižšieho sita cez kruhové otvory semená, zatiaľ čo šupky a prímesty s väčšími rozmermi odchádzajú zadnou časťou vrchného sita von. Najvrchnejšie sito má otvory s najširším prierezom, ktoré zachytávajú väčšie nečistoty a hlavne šupky, ktoré sú v matolínach zastúpené v najväčšom množstve. Po prechode cez sito sa zmes semien na strednom site s menšími otvormi rozdelí na dve frakcie: prvá tvorená semenami odchádza po site a je zhromaždená do zbernej nádoby, druhá tvorená úlomkami semien a zbytkami šupiek s rozmermi menšími než sú otvory dolného sita, prepadávajú cez sito. Stredné sito má otvory, ktoré umožňujú prepasť len samotných semien na posledné najnižšie umiestnené sito a na konci stredného sita je umiestnený otvor s kánalom ktorý odvádza nepotrebný materiál z vrchného a stredného sita. Spodné sito zachycuje prepadnuté semená z prostredného sita až na koniec kde je taktiež kruhový otvor s napojeným kánalom, ktorý odvádza semená do zbernej nádoby vid' obr. č. 3. Prvý

kanál umiestnený na konci stredného sita odvádza väčší odpad, ktorý predstavuje šupky z hroznov, prípadne kúsky strapiny alebo listov. Kanál umiestnený na konci spodného sita odvádza samotné odseparované semená. Na konci tejto operácie ostanú tri produkty. Jedným sú samotné semená, druhý produkt predstavujú zvyšky matolín, ktoré sa následne kompostovali a posledný produkt sú drobné čiastočky ktoré prepadli na spodnom site. Výťažnosť čerstvých odseparovaných semien od zvyšných matolín ktoré sa kompostovali predstavuje približne 23 %. Z 300 l čerstvých matolín sa získalo cca 70 l čerstvých semien.



Obr. č. 2 : Rovinné vibračné sitá.



Obr. č. 3: Schéma separácie semien révy na rovinných vibračných sitách (BURG a kol., 2013).

#### 4.1.3 Čistenie a sušenie semien

Semená získané v procese separácie majú príliš vysokú vlhkosť. Niektoré semená sú tzv. „vyslepené“ sú prázdne a chýba im vnútorná časť, dreň, ktorá nás z obsahového hladiska najviac zaujíma, keďže obalové vrstvy semena sú zväčša tvorené len polysacharidmi a proteínmi, ktoré nevykazujú žiadny antimikrobiálny účinok, je nutné čerstvé semená premyť v nádobe s vodou. Odseparované čerstvé semená sa nasypali do cca tretiny nádoby a zaliali do 3/4 vodou. Po chvíli prázdne semená s nižšou hustotou vyplávali na povrch a oddelili sa vid'. Obr. č. 4. Semená ktoré ostali na spodku sa použili na experiment. Vysoký podiel vlhkosti a vody v semenách bolo pred mletím nutné odstrániť. Ďalší krok bolo sušenie semien v sušičkách. Čerstvé semená oddelené od vyslepených sa uložili na plech a pri teplote 60 °C po dobu 24 hodín sa sušili v sušičke. Po výstupe zo sušičky bola vlhkosť semien 8 %, ktoré stále obsahovali drobné čiastočky nečistôt. Rôzne organické prímеси a drobné úlomky z matolín a strapín hroznov, ktoré sa fénom oddelili. Semená vystavené prúdu vzduchu od fěna sa prečistili na základe odlišnej hmotnosti. Suché semená s vyššou hmotnosťou spadli hneď do zbernej nádoby a ľahšie úlomky boli odfúknuté ako nevyužitý odpad. Boli získané oddelené čisté suché semená, pripravené na ďalšiu operáciu. Následne boli semená pomleté mlynčekom na kávu. Mletie bolo nastavené na nižšiu zrnitosť aby sa čo najefektívnejšie extrahovali účinné látky do methanolu. Takto pomleté semená a získaný jemnozrnný prášok bol pripravený na extrakciu. K extrakcii bol použitý 75 % methanol.



Obr. č. 4: Premývanie odseparovaných semien a odstránenie vyslepených semien na hladine vody.

#### 4.1.4 Extrakcia a odparovanie

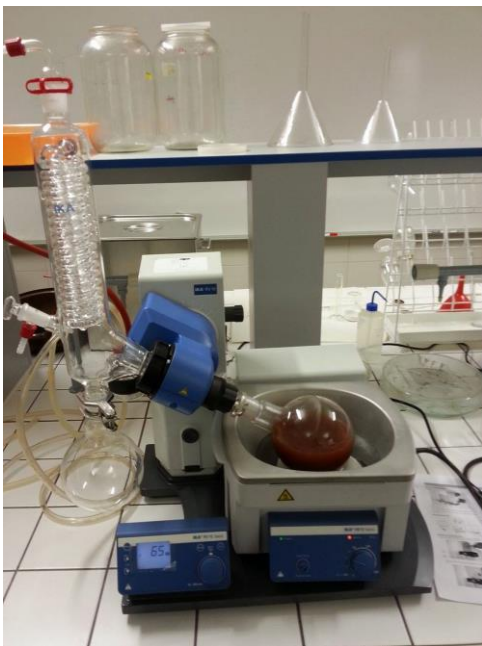
Z hroznového prášku je nutné získať obsahové látky využité pri testovaní v homogénnom stave a vhodnom skupenstve. K tomu poslužil technický 99,6 % methanol, ktorý bol zriedený destilovanou vodou. Empiricky bolo zistené, že najviac obsahových látok sa vyextrahuje použitím 75 % koncentrovaného methanolu. Riedenie bolo prevedené s destilovanou vodou. Pomleté hroznové semená boli prevedené do sklenenej nádoby a zaliate 75 % methanolom ako je možno vidieť na obr. č. 5. Čas potrebný k vyextrahovaniu účinných látok je približne 168 hodín. Celý obsah je v priebehu extrahovania potrebné raz alebo dvakrát za deň premiešať, lebo ťažšie hroznové semená na dne nádoby nie sú v dostatočnom kontakte s methanolom. Po cca týždni extrakcie bol extrakt pripravený k odparovaniu. Na experiment sa použil methanolový a bezmethanolový extrakt. Methanol sa odparuje pri teplote okolo 55 °C. V poslednom kroku bol z methanolového extraktu na odparke vid' na obr. č. odparený methanol a získal sa čistý vodný extrakt hroznových semien pripravený k vlastnému testovaniu.

Príprava extraktu:

Na analytických váhach bolo navážené 100 g prášku z pomletých semien, ktoré sa previedli do skleneného demižónu. Následne sa pripravil 75 % roztok methanolu a ten sa zmiešal s pomletým práškom v pomere 1:10. 225 ml destilovanej vody sa zmiešalo s 675 ml methanolu (99,6 %). 75 % roztok methanolu sa previedol do demižónu s pomletým hroznovým práškom, uzavrel a nechal extrahovať v temne pri teplote 21 °C po dobu 168 hodín (1 týždeň). Po týždni sa z extraktu na odparke odparil methanol a získal čistý bezmethanolový extrakt v tekutom skupenstve vid' obr. č. 6.



Obr. č. 5: Extrakcia pomletého prášku z hroznových semien v sklenenom demižóne.



Obr. č. 6: Odparovanie metanolu z metanolového extraktu semien.



## **4.2 Spektrofotometrické stanovenie obsahu polyfenolických zlúčenín**

### **4.2.1 Stanovenie celkových polyfenolických zlúčenín v čerstvom extrakte zo semien révy vinnej**

K stanoveniu celkových polyfenolických zlúčenín bola použitá Folin - Ciocalteova metóda. Princípom spektrofotometrickej metódy je reakcia hydroxilových skupín a fenolických zlúčenín s Folin – Ciocalteovým činidlom, kde je redukovaný fosfotungsten-fosfomolybdátový komplex fenolmi na modré reakčné produkty. Vzorka extraktu bola zmeraná trikrát a výsledná hodnota bola získaná ako priemer z týchto meraní. Testoval sa celkový obsah polyfenolických zlúčenín u čerstvom extrakte.

Vzorka o objemu 40  $\mu$ l bola napipetovaná do kyvety (3 ml) a zriedená 1960  $\mu$ l destilovanej vody. Následne bolo do kyvety pridaných 50  $\mu$ l Folin-ciocalteova činidla a zmes bola dôkladne zhomogenizovaná. Po 3 minútach bolo pridané 300  $\mu$ l 20 % roztoku dekahydrátu NaCO<sub>3</sub>. Reakčná zmes bola opäť zhomogenizovaná a inkubovaná pri 22 °C po dobu 120 minút. Po tejto dobe bola zmeraná absorbancia na prístroji (SPECORD 210, Carl-Zeiss Jena, Germany) pri  $\lambda = 750$  nm proti slepému vzorku. Výsledok je vyjadrený ako ekvivalent kyseliny gallovej v mg/l.

### **4.2.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity extraktu vystaveného oxidácii metódou DPPH.**

DPPH test je založený na schopnosti stabilného voľného radikálu 2,2-difenyl 1-pykrylhydrazylu reagovať s donórmí vodíka. DPPH vykazuje silnú absorpciu v UV – VIS spektru. K analýze bol použitý extrakt zo semien révy vinnej vystavený oxidácii po dobu 72 hodín.

#### Príprava roztoku

Bola navážená  $m = 9,35$  mg radikálu DPPH•. Toto množstvo bolo prevedené do 250 ml odmernej banky a následne doplnené metanolom.

#### Spektrometrická analýza

Do kyvety (3 ml) bolo napipetované 2000  $\mu$ l roztoku DPPH• a následne bolo pridané 40  $\mu$ l vzorku (extrakt z semien vystavený oxidácii). Zmes bola inkubovaná pri teplote 21 °C po dobu 25 minút. Potom bola zmeraná absorbancia pri  $\lambda = 505$  nm. Antioxidačná aktivita bola vypočítaná z kalibračnej krivky za použitia kyseliny gallovej ako štandardu (10 - 200 mg/l). Výsledok je vyjadrený ako ekvivalent kyseliny gallovej v mg/l.

### **4.3. Postup vlastného testovania antimikrobiálneho účinku extraktu.**

#### **4.3.1 Príprava laboratórnych pomôcok**

Pred vlastným testovaním bolo potreba vysterilizovať laboratórne pomôcky. K experimentu boli použité sterilné skúmavky, sterilná pinzeta, sterilné sklenené tyčinky. Sklo sa sterilizovalo v horkovzdušnom sterilizátore za teploty 165° C po dobu 60 minút. Erlenmayerove banky s živnými pôdami boli sterilizované v parnom sterilizátore pri teplote 121 °C po dobu 20 minút. So všetkými pomôckami a nástrojmi sa zachádzalo po dobu používania sterilne a priebežne boli pri nožnej kontaminácii dezinfikované nad liehovým kahanom. Ďalej boli použité sterilné jednorázové špičky na mikropipety a plastové, sterilné, jednorázové Petriho misky.

#### Testované mikroorganizmy

*Candida tropicalis*

*Escherichia coli*

*Enterococcus faecalis*

#### **4.3.2 Zloženie a príprava živných pôd**

##### Agarová pôda s tryptonom, kvasničným extraktom a glukózou, Plate count agar (PCA)

Zloženie (g/l): trypton 5 g, kvasničný extrakt 2,5 g, glukóza 1g, bakteriologický agar 12g

Príprava: Navážka 20,5 g pôdy sa prevedie do 1000 ml destilovanej pôdy. Pomaly sa privedie k varu a za stáleho miešanie sa úplne rozpustí. pH pôdy sa upraví na 7 +/- 0,2 a teplotu 25 °C a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C po dobu 15 minút.

Výrobca: Biokar Diagnostics, Francúzko.

##### Agarová pôda s kvasničným extraktom, glukózou a chloramfenikolom,

##### Chloramphenicol glucose agar (CHL)

Zloženie (g/l): kvasničný extrakt 5 g, glukóza 20 g, chloramfenikol 0,1 g, bakteriologický agar 15 g.

Príprava: Navážka 40,1 g navážky pôdy sa prevedie do 1000 ml destilovanej vody. Pomaly sa privedie k varu a za stáleho miešanie sa úplne rozpustí. pH pôdy sa upraví na 6,6 +/- 0,2 a teplotu 25 °C a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C.

Výrobca: Biokar Diagnostics, Francúzko.

Pôda so sójovým bujónom a triptonom (Bouillon caseine – soja tryptone soy broth)

Zloženie (g/l): trypton 17 g, enzymaticky natrávená sójová múčka 3 g, glukóza 2,5 g, hydrogénfosforečnan draselný 2,5 g, chlorid sodný 5 g.

Príprava: Navážka 30 g pôdy sa prevedie do 1000 ml destilovanej vody. Pomaly sa privedie k varu a a za stáleho miešania sa rozpustí. pH pôdy sa upraví na 7,3 +/- 0,2 a teplotu 25 °C a sterilizuje sa v autokláve pri 121 °C po dobu 15 minút.

Výrobca: Biokar Diagnostics, Francúzsko.

#### 4.3.3 Príprava inokula

Do sterilného tekutého živného média, ktoré bolo pripravené podľa návodu, ktorý udáva výrobca, vložíme želatinový disk s príslušným mikroorganizmom. *Candida tropicalis* sa kultivuje pri 23 - 25° C v trepačke a *Escherichia coli* spolu s *Enterococcus faecalis* pri teplote 37 °C za stáleho premiešavanie v temperovanej trepačke. Doba kultivácie bola 18 hodín. Otáčky trepačky boli u všetkých mikroorganizmov 200 rpm vid' obr. č. 7.



Obr. č. 7: Kultivácia mikroorganizmov na trepačke

#### 4.3.4 Disková difúzna metóda

Pomocou tejto metódy sa stanovoval antimikrobiálny efekt semien révy vinnej. Testoval sa methanolvý extrakt, zmrazený čerstvý bezmethanolvý extrakt a bezmethanolvý extrakt zmrazený a vystavený oxidácii po dobu 72 hodín. Boli použité 3 rôzne koncentrácie extraktu. Neriedený koncentrovaný 100 % extrakt, 50 % extrakt riedený s destilovanou vodou 1:1 a 10 % extrakt nariadený v pomere 1:9 (1 diel extraktu a 9

dielov destilovanej vody). Paralelne sa s extraktom testoval kontrolný test s čistým 75 % methanolom a samotná kultúra mikroorganizmov bez pridaného extraktu.

Na začiatku metódy sa pripravil extrakt do sterilných skúmaviek a jeho príslušné riedenie s destilovanou vodou. Ďalej sa podľa návodu pripravili živné pôdy a schladili na potrebnú teplotu a pripravili sa označené petriho misky vid' obr. č. 8.



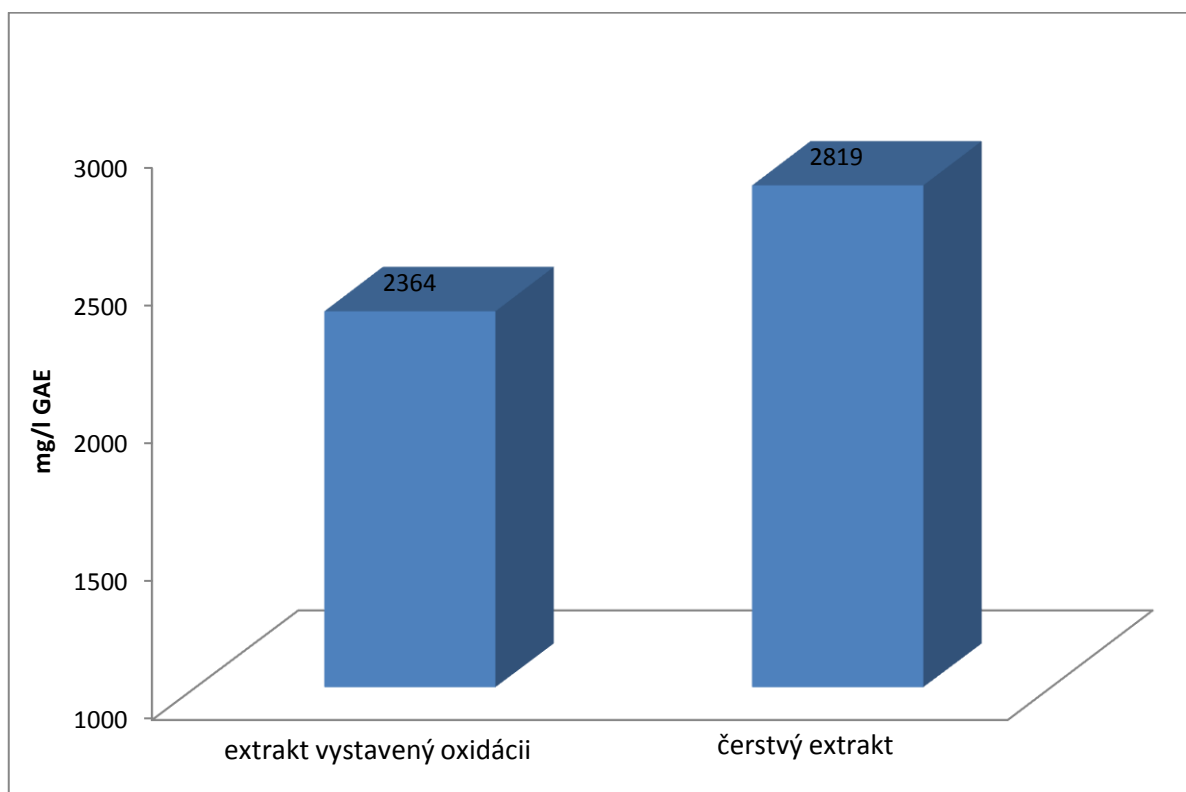
Obr. č. 8: Označené petriho misky s živnou pôdou

Sterilné jednorázové petriho misky boli naplnené živnou pôdou, PCA agar u *E. faecalis* a *E. coli* a CHL agar u *C. tropicalis*. Chloramfenikol potláča rast ostatných mikroorganizmov. Do misky bolo naliate 10 - 15 ml živnej pôdy o teplote cca 45 °C, ktorá bola následne krúživým pohybom kontinuálne rozmiestaná po celom povrchu dna Petriho misky a nechala sa zatuhnúť. Po zatuhnutí agaru bola na povrch živnej pôdy inokulovaná v objeme 0,1 ml 18 hodinová bujónová kultúra s príslušným mikroorganizmom. Vzápätí sa kultúra rozotrela po povrchu sterilnou sklenenou tyčinkou a nechala asi 15 minút vsiaknuť. Papierové disky boli napustené 30 µl príslušných koncentrácií extraktu alebo rozpúšťadla a pomocou pinzety prenesené na Petriho misky s mikrobiálnym inokulom. Pre každú koncentráciu sa použili dve Petriho misky a na každú Petriho misku pripadali 3 papierové disky. Misky sa nechali inkubovať v termostate, *C. tropicalis* pri 25 °C a *E. faecalis* a *E. coli* pri 37 °C, všetky druhy po dobu 24 a 48 hodín. Po kultivácii boli odčítané výsledky - zmerané inhibičné zóny v mm a vyhodnotená účinnosť extraktu.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIE

### 5.1 Stanovenie celkových polyfenolických zlúčenín a antioxidačnej aktivity

Pre meranie celkových polyfenolických látok bola použitá metóda s Folin-Ciocalteuovým činidlom, kde sa namerá celkový obsah polyfenolických zlúčenín u čerstvého extraktu. Antioxidačná aktivita bola zmeraná metódou DPPH u extraktu vystaveného oxidácii po dobu 72 hodín. Všetky hodnoty sú uvedené v GAE (ekvivalenty kyseliny gallovej) v mg/l vid'. obr. č. 9. Priemerná hodnota celkových polyfenolických látok u čerstvom extrakte bola 2819 mg a u extrakte vystavenom oxidácii bola hodnota 2364 mg/l GAE.



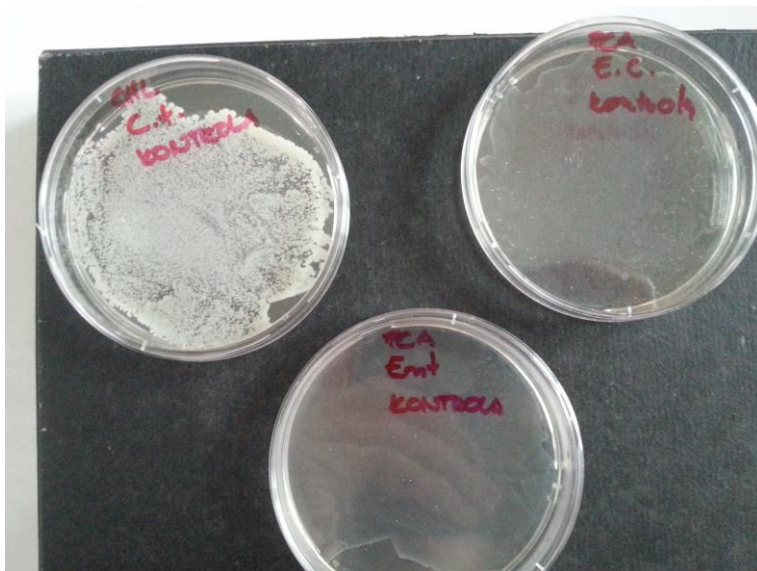
Obr. č. 9: Graf s priemernými hodnotami polyfenolických zlúčenín vyjadrených v mg/l GAE.

## 5.2 Vyhodnotenie inhibičného účinku extraktu semien diskovou difúznou metódou

Inhibičný účinok bol sledovaný diskovou difúznou metódou, meraním priemeru inhibičných zón v mm. Disková difúzna metóda je jednou z najstarších spôsobov vyšetrovania citlivosti mikroorganizmov a inhibičného účinku danej testovanej látky.

V tabulke č. 3 sú vyhodnotené výsledky pôsobenia naoxidovaného extraktu po 24 hodinovej kultivácii a v tabulke č. 4 sú výsledky inhibičných zón rovnakého extraktu po 48 hodinovej kultivácii. Tabulka č. 5 prezentuje výsledky merania inhibičných zón použitím čerstvého metanolového a čerstvého bezmetanolového extraktu po 24 hodinovej kultivácii a v tabulke č. 6 sú priemery inhibičných zón po 48 hodinovej kultivácii. Prehľadný súbor výsledkov, aritmetický priemer inhibičných zón všetkých testovaných extraktov voči všetkým mikroorganizmom znázorňuje tabuľka č. 7.

Pri hodnotení sa inhibičné zóny porovnávali s kontrolným pokusom. U vzorkov kde nebol preukázaný inhibičný účinok extraktu, sa do priemeru inhibičnej zóny započítal priemer jedného disku, ktorý má priemer 9 mm. U metanolového extraktu možno porovnať výsledky s paralelne testovaným 75 % metanolom a u ostatných extraktov sa ako kontrola testuje čistá kultúra mikroorganizmov kultivovaných paralelne s testovaným extraktom vid' obr č. 10.



Obr. č. 10: Kontrolné vzorky mikroorganizmov (*C. tropicalis* vľavo hore, *E. faecalis* dole uprostred a *E. coli* vpravo hore) po 24 hodinovej kultivácii.

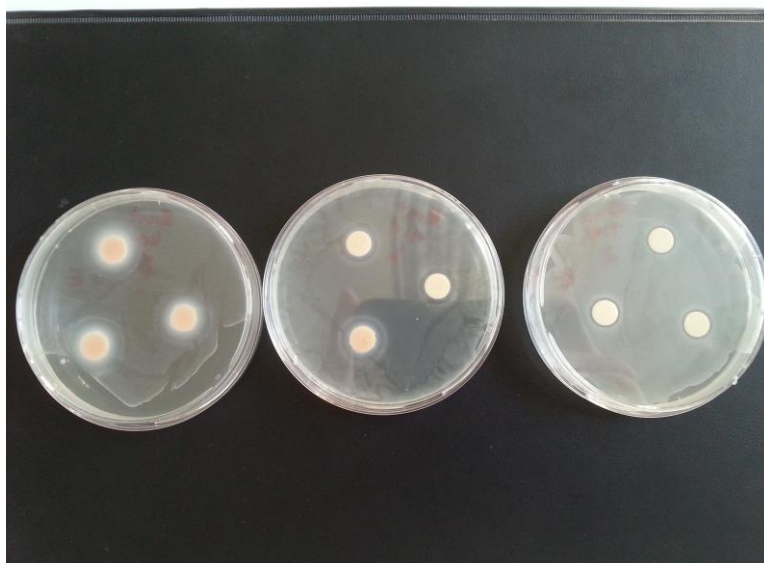
### 5.2.1 Antimikrobiálny efekt extraktu vystaveného oxidácii

#### *Escherichia coli*

Vzhľadom k tomu že má *E. coli* gramnegatívnu bunkovú stenu, ktorá je všeobecne odolnejšia než grampozitívna, možno dopredu predpokladať, že inhibičný účinok extraktu bude nižší než u *Enterococcus faecalis*. Po 24 hodinovej kultivácii nebol preukázaný žiadny inhibičný účinok voči *E. coli*. U všetkých koncentráciach bol priemer inhibičnej zóny 9 mm čo odpovedá len priemeru papierového disku vid' tab. č. 3. Po 48 hodinách bol zaznamenaný náznak inhibičnej zóny u niektorých diskov a to 9,5 mm vid' tab. č. 4, čo možno konštatovať ako zanedbateľný efekt.

#### *Enterococcus faecalis*

U *E. faecalis* bola v účinku extraktu rozhodujúca koncentrácia. Koncentrovaný 100 % extrakt mal priemer inhibičných zón po 24 a 48 hodinách kultivácie priemer 9 mm. V porovnaní s nižšími koncentraciami možno tvrdiť, že koncentrovaný extrakt mal naopak stimulačný efekt a podporoval v raste rozvoj *E. faecalis*, vid' obr. č. 11. Riedený extrakt v pomere 1:1 vykazoval najväčšiu antimikrobiálnu aktivitu. Aritmetický priemer inhibičnej zóny po 24 hodinovej kultivácii bol 12,2 mm a po 48 hodinovej kultivácii 11,1 mm. Riedenie v pomere 1:9 vykazovalo rovnaký inhibičný efekt. Aritmetický priemer bol 10,2 mm po 24 hodinovej kultivácii a po 48 hodinovej kultivácii bol inhibičný efekt silnejší a to s priemerom inhibičnej zóny 11,4 mm.



Obr. č. 11: Vplyv naoxidovaného extraktu na *Enterococcus faecalis* po 24 hodinovej kultivácii (vľavo koncentrovaný extrakt, uprostred riedenie 1:1 a napravo riedenie 1:9)

### ***Candida tropicalis***

U *C. tropicalis* malo vplyv na inhibičný efekt extraktu riedenie. Najväčší antimikrobiálny efekt vykazoval koncentrovaný extrakt s priemerom inhibičnej zóny 12,0 mm po 24 hodinovej kultivácii a zvýšený antimikrobiálny efekt po 48 hodinovej kultivácii s priemerom 12,9 mm. Čím nižšia bola koncentrácia extraktu, inhibičný efekt klesal vid' obr. č. 12. U *C. tropicalis* bol zaznamenaný vyšší inhibičný efekt po 48 hodinovej kultivácii než po 24 hodinovej vid'. tab. č. 3 a 4.



Obr. č. 12: Vplyv naoxidovaného extraktu na *Candida tropicalis* po 48 hodinovej kultivácii (vľavo koncentrovaný extrakt, uprostred riedenie 1:1 a napravo riedenie 1:9)



Tab. č. 3: Antimikrobiálny účinok extraktu vystaveného oxidácii, vyhodnotený pomocou inhibičných zón po 24 hodinovej kultivácii (zóny ihibície sú uvedené v mm).

Riedenie	koncentrovaný			1:1			1:9		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
<b><i>E.coli</i></b>									
1	9	9	9	9	9	9	9	9	9
2	9	9	9	9	9	9	9	9	9
3	9	9	9	9	9	9	9	9	9
<b><i>E. faecalis</i></b>									
1	9	9	9	18	12	12	12	12	12
2	9	9	9	14	16	16	11	11	11
3	9	9	9	9	9	9	12	12	11
<b><i>C. tropicalis</i></b>									
1	13	11	11	9,5	9	9	9	9,5	9
2	12	12	11	11	11	10	9	9,5	9,5
3	13	13	12	10	11	10	10	10	9,5

Legenda: a, b, c - jednotlivé papírové disky na Petriho miske

1, 2, 3 – číselné označenie Petriho misiek

Tab. č. 4: Antimikrobiálny účinok extraktu vystavený oxidácii, vyhodnotený pomocou inhibičných zón po 48 hodinovej kultivácii (zóny ihibície sú uvedené v mm).

Riedenie	koncentrovaný			1:1			1:9		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
<b><i>E.coli</i></b>									
1	9	9	9	9	9,5	9,5	9	9	9
2	9	9	9	9,5	9	9	9	9,5	9
3	9	9	9	9	9	9	9	9	9,5
<b><i>E. faecalis</i></b>									
1	9	9	9	9	12	9	12	11	12
2	9	9	9	13	14	16	11	11	11
3	9	9	9,5	9	9	9	12	12	11
<b><i>C. tropicalis</i></b>									
1	14	15	12	10	10	9,5	9	9,5	9
2	12	12	13	12	12	11	10	10	10
3	13	12	13	12	12	11	11	11	10

Legenda: a, b, c - jednotlivé papírové disky na Petriho miske

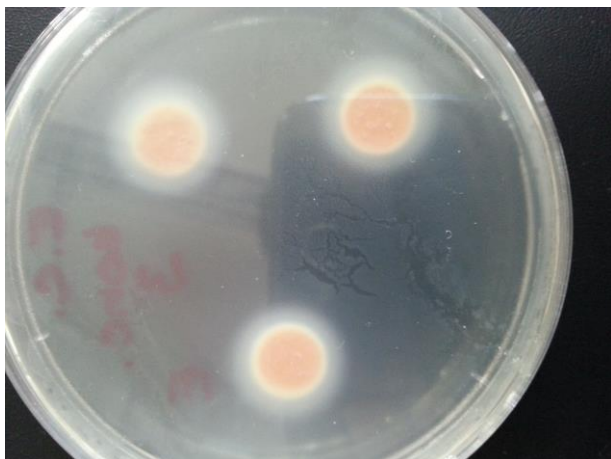
1, 2, 3 – číselné označenie Petriho misiek

### 5.2.2 Antimikrobiálny efekt čerstvého bezmethanolového a methanolového extraktu

#### *Escherichia coli*

U methanolového extraktu bolo dôležité previesť kontrolný test s čistým 75 % methanolom a porovnať priemery inhibičných zón s methanolovým extraktom. Po 24 hodinovej kultivácii s čistým 75 % methanolom neboli pozorované inhibičné účinky ale po 48 hodinovej kultivácii bola nameraná inhibičná zóna 10 mm. Voči *E. coli* mal methanolový extrakt zo všetkých troch extraktov najväčší inhibičný účinok. U koncentrovaného extraktu bol priemer inhibičnej zóny po 24 hodinovej kultivácii 10,2 mm.

Čerstvý extrakt nemal podobne ako naoxidovaný extrakt žiadny antimikrobiálny efekt vid' obr. č. 13.



Obr. č. 13: Vplyv čerstvého, koncentrovaného, bezmethanolového extraktu na *Escherichia coli* po 48 hodinovej kultivácii

### ***Enterococcus faecalis***

U *E. faecalis* mal čistý 75% methanol značný inhibičný efekt po 48 hodinovej kultivácii, dokonca v porovnaní s 24 hodinovou kultiváciou vykazoval methanol vyšší inhibičný efekt. Koncentrovaný methanolvý extrakt mal najväčší inhibičný efekt. Extrakt riedený v pomere 1:1 o niečo nižší a minimálny efekt mal extrakt riedený v pomere 1:9 s hodnotou 9,3 mm vid' obr. č. 15.

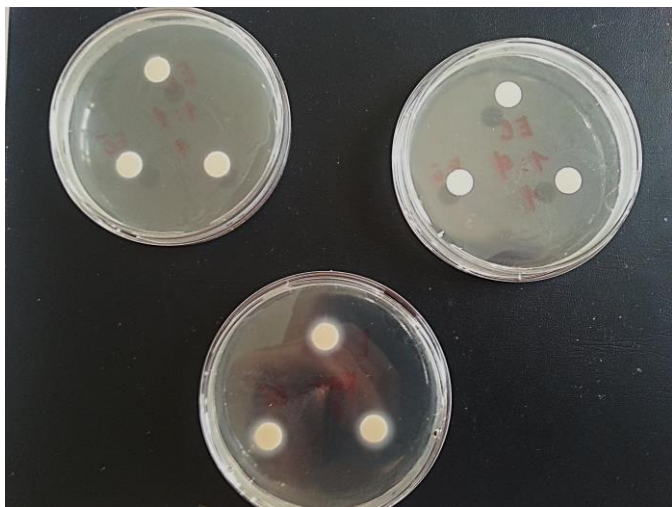
Čerstvý bezmethanolvý extrakt vykazoval podobné účinky ako naoxidovaný. To znamená, koncentrovaný extrakt stimuloval rast baktérii a najvyšší efekt bol u riedenia 1:1 s priemerom inhibičnej zóny 13,7 mm po 24 hodinovej kultivácii vid' obr. č. 14. Inhibičný efekt u riedenia 1:9 u čerstvého bezmethanolvého extraktu bolo u 24 a 48 hodinovej kultivácii približne podobné s priemerom inhibičnej zóny 10,5 a 10,7 mm vid' tab. č. 6.

### ***Candida tropicalis***

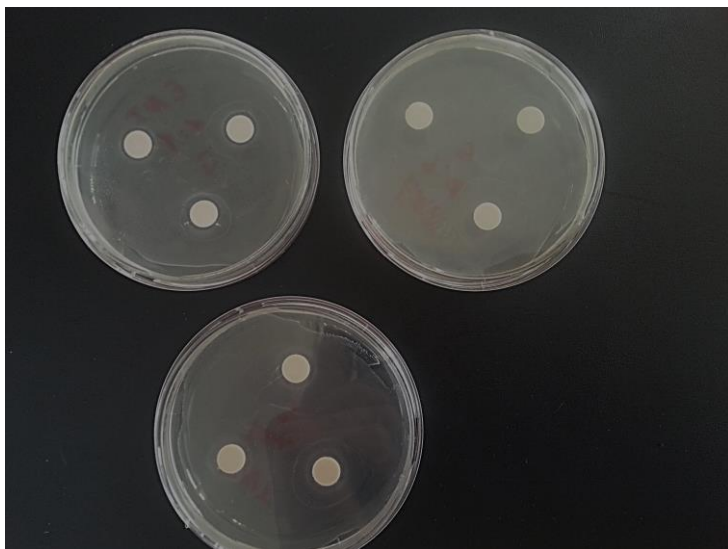
Kontrolný test s čistým 75 % methanolom nevykazoval žiadny inhibičný účinok. Taktiež methanolvý extrakt po 48 hodinách kultivácie nepreukázal žiadny inhibičný efekt. Po 24 hodinovej kultivácii bol najväčší inhibičný efekt zaznamenaný u koncentrovanom methanolvom extrakte a so zvyšujúcim sa riedením antifungálna aktivita extraktu klesala.

Čerstvý bezmethanolvý extrakt mal dokonca nižší inhibičný účinok než naoxidovaný extrakt. U koncentrovanom bezmethanolvom extrakte a riedenom v pomere 1:1 bola zameraná inhibičná zóna po 24 hodinovej kultivácii s priemerom 10 mm. Ostatné

merania u čerstvom bezmethanolovom extrakte nepotvrdili žiadnu antifungálnu aktivitu po 48 hodinovej kultivácii.



Obr. č. 14: Vplyv čerstvého, bezmethanolového extraktu na *Enterococcus faecalis* po 24 hodinovej kultivácii (vľavo hore riedenie 1:1, vpravo hore riedenie 1:9, dole uprostred koncentrovaný extrakt)



Obr. č. 15: Vplyv methanolového extraktu na *Enterococcus faecalis* po 48 hodinovej kultivácii (dole koncentrovaný extrakt, vľavo hore riedenie 1:1, vpravo hore riedenie 1:9)

Tab. č. 5: Antimikrobiálny účinok čerstvého extraktu (označený číslom 1) a metanolového extraktu (označený číslom 2 a 3) vyhodnotený pomocou inhibičných zón po 24 hodinovej kultivácii (zóny ihibície sú uvedené v mm).

Riedenie	koncentrovaný			1:1			1:9		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
<b><i>E.coli</i></b>									
1	9	9	9	9	9	9	9	9	9
2	10,5	9	9	10,5	9	9	9	9	9
3	11	10,5	11	9	9	9	11	11	11
<b><i>E. faecalis</i></b>									
1	9	9	9	14	14	13	10,5	11	10,5
2	12	12	12	12	11	11	9	9	10,5
3	12	12,5	12	11	11	11	9	9	9
<b><i>C. tropicalis</i></b>									
1	10	9	11	10,5	9	10,5	9	9	9
2	11	12	12	9	10,5	10,5	9	9	10
3	12	11	11	10,5	10,5	9	9	9	9
<b>Kontrola</b>	<b>(75% methanol)</b>								
<i>E. coli</i>	9	9	9						
<i>E. faecalis</i>	13	12	12						
<i>C. tropicalis</i>	9	9	9						

Legenda: a, b, c - jednotlivé papírové disky na Petriho miske

1, 2, 3 – číselné označenie Petriho misiiek,

1- bezmetanolový extrakt, 2,3 – metanolový extrakt

Tab. č. 6: Antimikrobiálny účinok čerstvého extraktu (označený číslom 1) a metanolového extraktu (označený číslom 2 a 3) vyhodnotený pomocou inhibičných zón po 48 hodinovej kultivácii (zóny ihibície sú uvedené v mm).

Riedenie	koncentrovaný			1:1			1:9		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
<b><i>E.coli</i></b>									
1	9	9	9	9	9	9	9	9	9
2	9	9	9	10,5	10,5	10,5	9	9	9
3	10,5	10,5	9	9	9	9	9	9	9
<b><i>E. faecalis</i></b>									
1	9	9	9	12	11	11	10,5	10,5	10,5
2	12	12	13	12	11	11	10,5	9	9
3	12	12	12	12	11	11	9	9	9
<b><i>C. tropicalis</i></b>									
1	9	9	9	9	9	9	9	9	9
2	9	9	9	9	9	9	9	9	9
3	9	9	9	9	9	9	9	9	9
<b>Kontrola (75% methanol)</b>									
<i>E. coli</i>	10,5	10,5	9						
<i>E. faecalis</i>	13	12	13						
<i>C. tropicalis</i>	9	9	9						

Legenda: a, b, c - jednotlivé papírové disky na Petriho miske

1, 2, 3 – číselné označenie Petriho misiek

1- bezmetanolový extrakt, 2,3 – metanolový extrakt

Tab. č. 7: Aritmetický priemer inhibičných zón u všetkých použitých extraktoch voči všetkým testovaným mikroorganizmom

Riedenie	koncentrovaný		1:1		1:9		kontrola	
	24	48	24	48	24	48	24	48
Doba kultivácie (hodiny)	Aritmetický priemer inhibičných zón (mm)							
<b><i>E. coli</i></b>								
Naoxidovaný extrakt	9,0	9,0	9,0	9,2	9,0	9,1	-	-
Methanolový extrakt	10,2	9,5	9,3	9,8	10,0	9,0	9,0	10,0
Čerstvý extrakt	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	-	-
<b><i>E. faecalis</i></b>								
Naoxidovaný extrakt	9,0	9,1	12,2	11,1	10,2	11,4	-	-
Methanolový extrakt	12,1	12,2	11,2	11,3	9,3	9,3	11,7	12,7
Čerstvý extrakt	9,0	9,0	13,7	11,3	10,7	10,5	-	-
<b><i>C. tropicalis</i></b>								
Naoxidovaný extrakt	12,0	12,9	10,1	11,1	9,4	10,0	-	-
Methanolový extrakt	11,5	9,0	10,0	9,0	9,2	9,0	9,0	9,0
Čerstvý extrakt	10,0	9,0	10,0	9,0	9,0	9,0	-	-

### 5.3 Štatistické spracovanie výsledkov

Testovala sa každá skupina mikroorganizmov proti 9 mm, čo predstavuje nulový inhibičný účinok. Pokiaľ je rozdiel významne vyšší, tak možno tvrdiť, že extrakt mal preukázané inhibičné účinky.

K testovaniu inhibičného účinku sa použili jednovýberové testy. V prípade, že testovaný výber mal normálne rozdelenie, použil sa t-test, pokiaľ nemal normálne rozdelenie, tak jednovýberový Wilcoxonov test.

Na záver bolo prevedené viacnásobné porovnanie všetkých troch extraktov.

#### 5.3.1 Extrakt vystavený oxidácii

Tab. č. 8: Normálne rozdelenie testované Shapiro-Wilkovým testom

Druh MO, riedenie, doba kultivácie	p-hodnota	Normálne rozdelenie
<i>E. faecalis</i> , 1:9, 24 hod	0	nie
<i>E. faecalis</i> , 1:1, 24 hod	0,22	áno
<i>E. faecalis</i> , koncentrovaný, 24 hod	-	nie
<i>C. tropicalis</i> , 1:9, 24 hod	0,055	áno
<i>C. tropicalis</i> , 1:1, 24 hod	0,10	áno
<i>C. tropicalis</i> , koncentrovaný, 24 hod	0,04	nie
<i>E. coli</i> , 1:9, 24 hod	-	nie
<i>E. coli</i> , 1:1, 24 hod	-	nie
<i>E. coli</i> , koncentrovaný, 24 hod	-	nie
<i>E. faecalis</i> , 1:9, 48 hod	0,02	nie
<i>E. faecalis</i> , 1:1, 48 hod	0	nie
<i>E. faecalis</i> , koncentrovaný, 48 hod	0	nie
<i>C. tropicalis</i> , 1:9, 48 hod	0,15	áno
<i>C. tropicalis</i> , 1:1, 48 hod	0,04	nie
<i>C. tropicalis</i> , koncentrovaný, 48 hod	0,04	nie
<i>E. coli</i> , 1:9, 48 hod	0	nie
<i>E. coli</i> , 1:1, 48 hod	0	nie
<i>E. coli</i> , koncentrovaný, 48 hod	-	nie

Legenda: Tam kde nie je p-hodnota vyplnená, boli všetky hodnoty rovnaké a nebolo možné testovať. Pokiaľ sú však všetky hodnoty vo výbere rovnaké, nejedná sa o normálne rozdelenie.



Tab. č. 9: Testovanie Wilcoxonovým testom a t-testom a rozhodnutie či má extrakt inhibičný účinok

Druh MO, riedenie, doba kultivácie	Použitý test	p-hodnota	Inhibičný účinok
<i>E. faecalis</i> , 1:9, 24 hod	wilcoxonov	0,01	áno
<i>E. faecalis</i> , 1:1, 24 hod	t-test	0,01	áno
<i>E. faecalis</i> , koncentrovaný, 24 hod	wilcoxonov	-	nie
<i>C. tropicalis</i> , 1:9, 24 hod	t-test	0,01	áno
<i>C. tropicalis</i> , 1:1, 24 hod	t-test	0	áno
<i>C. tropicalis</i> , koncentrovaný, 24 hod	wilcoxonov	0,01	áno
<i>E. coli</i> , 1:9, 24 hod	wilcoxonov	-	nie
<i>E. coli</i> , 1:1, 24 hod	wilcoxonov	-	nie
<i>E. coli</i> , koncentrovaný, 24 hod	wilcoxonov	-	nie
<i>E. faecalis</i> , 1:9, 48 hod	wilcoxonov	0,01	áno
<i>E. faecalis</i> , 1:1, 48 hod	wilcoxonov	0,07	nie
<i>E. faecalis</i> , koncentrovaný, 48 hod	wilcoxonov	-	nie
<i>C. tropicalis</i> , 1:9, 48 hod	t-test	0	áno
<i>C. tropicalis</i> , 1:1, 48 hod	wilcoxonov	0,01	áno
<i>C. tropicalis</i> , koncentrovaný, 48 hod	wilcoxonov	0,01	áno
<i>E. coli</i> , 1:9, 48 hod	wilcoxonov	0,18	nie
<i>E. coli</i> , 1:1, 48 hod	wilcoxonov	0,11	nie
<i>E. coli</i> , koncentrovaný, 48 hod	wilcoxonov	-	nie

Legenda: Tam kde nie je p-hodnota vyplnená, boli všetky hodnoty rovné 9 a nebolo možné testovať. Pokiaľ sú však všetky hodnoty vo výbere rovné 9, znamená to, že sa nejedná o inhibičný účinok.

Najvýraznejší inhibičný účinok má kvasinka *C. tropicalis*. Má štatisticky významný výsledok pre doby kultivácie 24 i 48 hodín. Baktéria *E. faecalis* vykázala inhibičný účinok v 3 zo 6 prípadov. U baktérie *E. coli* nebol preukázaný žiadny inhibičný účinok.

### 5.3.2 Čerstvý methanolový extrakt

Tab. č. 10: Porovnanie methanolového extraktu s kontrolou pomocou Mann-Whitneyho testu

Druh MO, riedenie, doba kultivácie	p-hodnota	Významný rozdiel
<i>E. faecalis</i> , 1:9, 24 hod	0,03	áno, v prospech kontroly
<i>E. faecalis</i> , 1:1, 24 hod	0,053	nie
<i>E. faecalis</i> , koncentrovaný, 24 hod	0,70	nie
<i>C. tropicalis</i> , 1:9, 24 hod	0,80	nie
<i>C. tropicalis</i> , 1:1, 24 hod	0,16	nie
<i>C. tropicalis</i> , koncentrovaný, 24 hod	0,03	áno, v prospech meth. extraktu
<i>E. coli</i> , 1:9, 24 hod	0,30	nie
<i>E. coli</i> , 1:1, 24 hod	0,80	nie
<i>E. coli</i> , koncentrovaný, 24 hod	0,16	nie
<i>E. faecalis</i> , 1:9, 48 hod	0,03	áno, v prospech kontroly
<i>E. faecalis</i> , 1:1, 48 hod	0,053	nie
<i>E. faecalis</i> , koncentrovaný, 48 hod	0,30	nie
<i>C. tropicalis</i> , 1:9, 48 hod	-	nie
<i>C. tropicalis</i> , 1:1, 48 hod	-	nie
<i>C. tropicalis</i> , koncentrovaný, 48 hod	-	nie
<i>E. coli</i> , 1:9, 48 hod	0,16	nie
<i>E. coli</i> , 1:1, 48 hod	0,80	nie
<i>E. coli</i> , koncentrovaný, 48 hod	0,52	nie

Legenda: Pokiaľ nastal významný rozdiel, tak je označené, ktorá skupina mala vyššie hodnoty, buď methanolový extrakt alebo kontrola. V prípade nevyplnenej p-hodnoty boli všetky hodnoty oboch výberov rovnaké, čo znamená, že sa nejedná o významný rozdiel.

Methanolový extrakt až na výnimky nevykazuje oproti kontrolnému vzorku štatisticky významný rozdiel.

### 5.3.3 Účinky extraktov (naoxidovaný, čerstvý bezmethanolový a methanolový extrakt) porovnané Kruskal – Wallisovým testom

V prípade že bol preukázaný rozdiel medzi účinkami jednotlivých extraktov, previedlo sa viacnásbné porovnanie pre jednotlivé dvojice. V prílohe sú uvedené grafy znázorňujúce porovnanie extraktov.

Tab. č. 11: Porovnanie účinku extraktov Kruskal – Wallisovým testom

Skupina mikroorganizmov, riedenie, doba kultivácie	p-hodnota	Interpretácia
<i>E. faecalis</i> , 1:9, 24 hod	0	naoxidovaný extrakt má významne vyšší inhibičný účinok než methanolový extrakt
<i>E. faecalis</i> , 1:1, 24 hod	0,18	medzi 3 extraktmi nie je rozdiel
<i>E. faecalis</i> , koncentrovaný, 24 hod	0	methanolový extrakt má významne vyšší účinok než ostatné extrakty
<i>C. tropicalis</i> , 1:9, 24 hod	0,10	medzi 3 extraktmi nie je rozdiel
<i>C. tropicalis</i> , 1:1, 24 hod	0,99	medzi 3 extraktmi nie je rozdiel
<i>C. tropicalis</i> , koncentrovaný, 24 hod	0,03	naoxidovaný extrakt má významne vyšší účinok než bezmethanolový
<i>E. coli</i> , 1:9, 24 hod	0,03	methanolový extrakt má významne vyšší účinok než ostatné extrakty
<i>E. coli</i> , 1:1, 24 hod	0,37	medzi 3 extraktmi nie je rozdiel
<i>E. coli</i> , koncentrovaný, 24 hod	0,01	methanolový extrakt má významne vyšší účinok než ostatné extrakty
<i>E. faecalis</i> , 1:9, 48 hod	0	naoxidovaný extrakt má významne vyšší účinok než methanolový extrakt
<i>E. faecalis</i> , 1:1, 48 hod	0,86	medzi 3 extraktmi nie je rozdiel
<i>E. faecalis</i> , koncentrovaný, 48 hod	0	methanolový extrakt má významne vyšší inhibičný účinok než ostatné dva

		extrakty
<i>C. tropicalis</i> , 1:9, 48 hod	0,01	naoxidovaný extrakt má významne vyšší inhibičný účinok než ostatné dva extrakty
<i>C. tropicalis</i> , 1:1, 48 hod	0	naoxidovaný extrakt má významne vyšší inhibičný účinok než ostatné dva extrakty
<i>C. tropicalis</i> , koncentrovaný, 48 hod	0	naoxidovaný extrakt má významne vyšší inhibičný účinok než ostatné dva extrakty
<i>E. coli</i> , 1:9, 48 hod	0,35	medzi 3 extraktmi nie je rozdiel
<i>E. coli</i> , 1:1, 48 hod	0,22	medzi 3 extraktmi nie je rozdiel
<i>E. coli</i> , koncentrovaný, 48 hod	0,12	medzi 3 extraktmi nie je rozdiel

Celkovo mal najčastejšie významne najvyšší inhibičný účinok naoxidovaný extrakt, konkrétne v 5 prípadoch. V 4 prípadoch mal štatisticky významne najvyšší inhibičný účinok čerstvý metanolový extrakt. Čerstvý bezmetanolový extrakt nemal v žiadnom prípade štatisticky významne vyšší inhibičný účinok než ostávajúce dva extrakty. Celkovo môžeme zhrnúť, že čerstvý metanolový a naoxidovaný extrakt majú vyšší inhibičný účinok než čerstvý bezmetanolový extrakt.

Ďalej z tabuľky vyplýva, že koncentrovaný extrakt mal významné výsledky v piatich zo šiestich testov. Extrakty riedené v pomere 1:1 mali významný výsledok len v jednom prípade a roztok 1:9 mal významný výsledok v štyroch zo šiestich prípadov. Z toho je možné odvodiť, že extrakty riedené v pomere 1:1 majú najmenšie rozdiely v inhibičnom účinku jednotlivých extraktov.

Jediný mikroorganizmus, pre ktorý sme dostali štatisticky významný výsledok pre všetky 3 koncentrácie roztoku, bola *C. tropicalis* s dobou kultivácie 48 hodín.

Vo všetkých 3 prípadoch vyšiel najvyšší inhibičný účinok v prospech naoxidovaného extraktu.

Mnoho vedeckých prácí sa venuje testovaniu antimikrobiálneho účinku extraktov zo semien révy vinnej.

JAYPARAKASHA a kol. (2003) testovali antibakteriálnu aktivitu extraktu z hroznových semien. Zistili že aktívnou zložkou ktorá inhibuje *Escherichia coli* je kyselina gallová. Taktiež preukázali že extrakcia pomocou acetónu a kyseliny octovej vyextrahuje viac fenolických látok z hroznových semien než extrakcia pomocou methanolu a kyseliny octovej. Testovali acetónový aj methanolový extrakt a preukázali, že oba extrakty majú vyšší inhibičný účinok voči grampozitívnym baktériam než voči gramnegatívnym baktériam.

BAYDAR a kol. (2004) stanovovali antibakteriálnu aktivitu a celkový obsah polyfenolických zlúčenín v extrakte zo semien révy vinnej. Bol zistený celkový obsah polyfenolických zlúčenín 627,98 mg GAE/g v acetónovom extrakte a 667,87 mg GAE/g v methanolovom extrakte. Testovali sa extrakty voči *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, kde nebol preukázaný u obidvoch baktériach žiadny inhibičný efekt v koncentráciach 1 % a 2 %. Za použitia vyššej koncentrácie než 4 %, extrakty z hroznových semien voči baktériam vykazovali inhibičný účinok. Methanolový extrakt vykazoval priemer inhibičnej zóny 28,36 mm při 20 % koncentrácii a při 4 % koncentrácii bol nižší s priemerom inhibičnej zóny 16,89 mm. K testovaniu použili semenný extrakt s ethyl acetátom, methanolom a destilovanou vodou v pomere 60:30:10.

V práci BAYDAR a kol. (2006) sa taktiež stanovoval antibakteriálny efekt extraktu z hroznových semien. K extrakcii použili acetón, destilovanú vodu a kyselinu octovú v pomere 90:9,5:0,5. Testovali 10 % extrakt proti *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis*. Použili kultiváciu na bujónovom agare pri teplote 37 °C po dobu 22 hodín. Ako metóda testovania inhibičného efektu bola disková difúzna za použitia papierových diskov o priemere 4 mm. Po 22 hodinovej kultivácii zmerali priemery inhibičných zón, ktoré čítali priemer 22,67 mm u *Enterococcus faecalis* a u *Escherichia coli* 24,67 mm.

Výsledky testovania antimikrobiálneho efektu v diplomovej práci nekorešponujú s výsledkami preukázanými v spomínaných publikáciách. Dôvodom je použitie iného materiálu v testovaní antimikrobiálnej aktivity a použitím inej metodiky výroby extraktu.

## 6 ZÁVER

Hrozná révy vinnej sú významnou ovocnou plodinou využívanou vo vinárskej produkcii, čo vedie ku vzniku veľkého množstva semien, ktoré majú potenciál využitia okrem výroby oleja aj v iných odvetviach. Napríklad vo farmaceutickom priemysle alebo výrobe potravinových doplnkov a v neposlednej rade aj v potravinárskom priemysle ako antimikrobiálny agens alebo konzervant. V mnohých vedeckých publikáciách bol preukázaný antimikrobiálny efekt z extraktu semien révy vinnej ale v praxi doposiaľ nenašiel uplatnenie. V súčasnej praxi sa semená vo väčšom množstve využívajú prevažne na výrobu oleja. Samotná separácia semien z matolín a výroba extraktu je časovo a finančne náročná.

Obsahové látky semien, fenolické zlúčeniny, vitamín E majú vysokú antioxidačnú kapacitu, ktorá má význam pri znižovaní rizika vzniku karcinómu a znižuje obsah LDL v krvi. Biologicky aktívne komponenty semien otestované v praktickej časti práce mali inhibičný efekt najmä voči *Enterococcus faecalis* a bol preukázaný aj inhibičný efekt proti *Candida tropicalis*. U *Escherichia coli* bol inhibičný efekt extraktu minimálny. Najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu voči *E. coli* mal methanолоvý extrakt. Bezmethanолоvý extrakt nemal na *E. coli* takmer žiadny efekt.

Najväčší priemer inhibičnej zóny bol u *C. tropicalis* po 24 hodinovej kultivácii. S postupujúcim časom po 48 hodinovej kultivácii inhibičný efekt extraktu výrazne klesol. O *E. faecalis* neplatí, že by po 48 hodinovej kultivácii klesol antimikrobiálny účinok výrazne. Antifungálny účinok z týchto výsledkov po dlhšiu dobu nie je významný. V potravinárskej praxi extrakt ako konzervant nemožno doporučiť proti kvasinkám. U *E. faecalis* bola pri testovaní antimikrobiálnej aktivity dôležitá aj koncentrácia extraktu. Koncentrovaný bezmethanолоvý extrakt nevykazoval žiadnu aktivitu z čoho možno usúdiť že mal práve opačný, stimulujúci efekt. Najvyššiu antibakteriálnu aktivitu malo riedenie 1:1 z čoho možno vyvodit', že extrakt z hroznových semien aj v nižších koncentráciách má preukázané antimikrobiálne účinky a môže byť pre potravinárske odvetvie realizovateľné ako antibakteriálny agens a konzervant proti bakteriálnemu kazeniu potravín a užitočné aj z dietetického hľadiska. So zvyšujúcim sa dopytom po zdravých, „raw“, „bio“ potravinách je použitie hroznového extraktu atraktívne ako konzervant a má potenciál aj zo zdravotného hľadiska.

## 7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

ANASTASIADI M., CHORIANOPOULOS N. G., NYCHAS GEORGE-JOHN E., HAROUTOUNIAN S. A., 2009: *Antilisterial Activities of Polyphenol-Rich Extracts of Grapes and Vinification Byproducts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(2). Strany 457–463. DOI: 10.1021/jf8024979. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf8024979>

ARYAL S., 2015: *Differences between Gram Positive and Gram Negative Bacteria* [online]. *Online Microbiology Notes*. [Cit. 22.03.2016]. Dostupné z: <http://www.microbiologyinfo.com/differences-between-gram-positive-and-gram-negative-bacteria/>

BAYDAR, Nilgün Göktürk, Gülcan ÖZKAN a Osman SAĞDIÇ, 2004: Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* [online]., 15(5), 335-339 [cit. 2016-04-14]. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00083-5. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713503000835>

BAYDAR N., G., SAGDIC O., OZCAN G., CETIN S., 2006. *Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (Vitis vinifera L.) seed extracts*. *Science Direct. International Journal of Food Science and Technology*. 41(7), 799-804. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.01095.x [Cit. 15.2.2016]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2005.01095.x/epdf>

BAYDAR, N. G., AKKURT, M., 2001: *Oil content and oil quality properties of some grape seeds*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25(3): 163–168. ISSN 1300-011X. [Cit. 16.2.2016]. Dostupné z: <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/abstract.htm?id=4671>

BENEŠOVÁ L., FINK L., KVASNIČKOVÁ A., KOPÁČOVÁ O., LEPEŠKOVÁ I., PERLÍN C., POHLOVÁ M., VLKOVÁ A., 2000: *Potravinářství 6*. Praha: ÚZPI.150 s. ISBN 80-7271-003-6

BIZERRA F., C., NAKAMURA V., CELINA DE POERSCH, SVIDZINSKI T., I. E., QUESADA, SAMUEL GOLDENBERG R., M., B., KRIEGER M., A., YAMADA-OGATTA S., F., 2008: *Characteristics of biofilm formation by Candida tropicalis and antifungal resistance*. Yeast Research Fems. Oxford University Press. 8(3). Strany 442 – 450. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00347.x> 442-450. [Cit. 14.03.2016]. Dostupné z: <https://femsyr.oxfordjournals.org/content/8/3/442>

BURG, Patrik. *Separace semen révy vinné z matolin: uplatněná certifikovaná metodika*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova univerzita, 2013. ISBN 978-80-7375-925-4.

BURG P., DĚDINA M., HEJTMANKOVA A., HEJTMANKOVA K., JELINEK A., LACHMAN J., LIPAVSKY J., MAŠAN V., PIVEC V., SKALA O., STŘÁLKOVA R., TABORSKY J., ZEMANEK P., 2014. *Studium biologicky aktivních látek v semenech a letorostech révy vinné a možnosti získávání oleje ze semen*. Mendelova univerzita v Brně. 1st Edition, FOLIA VII, 2014, 7. ISBN 978-80-7509-165-9. [Cit. 15.2.2016]. Dostupné z: <http://www.vuzt.cz/svt/vuzt/publ/P2014/073.pdf>

CÍCHOVA, M., PETŘÍČEK, J. a FIALA, J., 2008: *Vliv vitamínů na obsah a složení polyfenolů růžových vín*. In: STAVEK, J. (ed.) Sborník přednášek a příspěvků odborné vinařské konference Rose 2008. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 39–41. ISBN 978-807-3751-838. [Cit. 16.2.2016]. Dostupné z: <http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/555/Rose08/Sbornik08b.pdf>

COOMBE, B. G., DRY, P. R., 1993: *Viticulture*. 4th ed., vol. 2. South Australia: Hyde Park Press, Adelaide. 340 s. ISBN 1-875130-01-2.

DEÁK T., 2008: *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. Second edition. Boca Raton: CRC Press. 325 s. ISBN 978-1-4200-4493-5.

DE VOS, Paul, William Barnaby WHITMAN a Aidan C PARTE, 2009: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York, N.Y.: Springer, c2009. ISBN 978-0-387-95041-9. [Cit. 23.03.2016]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=0-VqgLiCPFcC&oi=fnd&pg=PR1&dq=Family+IV.+Enterococcaceae+.&ots=kGBfCUFr>



5x&sig=ASgtmfoygCfKhqFZKNS9pbuUZkw&redir\_esc=y#v=onepage&q=Family%20IV.%20Enterococcaceae%20.&f=false

ENAN, Gamal, Abdul-Raouf Al- MOHAMMADI, Gamal El- DIDAMONY, Mahmoud E.F. Abdel- HALIEM a Azza ZAKARIA, 2014: *Antimicrobial activity of Enterococcus faecium NM2 Isolated from Urine: Purification, Characterization and Bactericidal Action of Enterocin NM2*. Asian Journal of Applied Sciences [online]. 2014-7-1, 7(7), 621-634 [cit. 2016-04-07]. DOI: 10.3923/ajaps.2014.621.634. ISSN 19963343. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajaps.2014.621.634>

FRIEDMAN M., 2014: *Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Properties of Wines and Winery Byproducts in Relation to Their Flavonoid Content*. ACS Publications. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 62(26). Strany 6025-6042. DOI: 10.1021/jf501266s. [Cit. 01.03.2016]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf501266s>

GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI, 2001: *Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology [online]. 2001, 64(1-2), 105-117 [cit. 2016-03-23]. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160500004451>

GÖRNER F., VALÍK L', 2004: *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín*. Vydavateľstvo MALÉ CENTRUM, Bratislava, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

HORKÝ, Pavel, Šárka HOŠKOVÁ a Marie BALABÁNOVÁ. *Škodlivé mikroorganizmy v zemědělství*. V Brně: Mendelova univerzita, 2014. ISBN 978-80-7375-965-0.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. 2005. *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 6: 1841-1856. ISSN:0021-8561

HYUN JUN JUNG, WOO SANG SUNG, HYUNGU KANG, BEOM SIK KANG, YOUNG BAE SEU, DONG GUN LEE, 2005: *Fungicidal Effect of Resveratrol on Human Infectious Fungi*. Springer Link. Archives of Pharmacal Research. 28 (5). Strany 557-560. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02977758>

CHOI Y., LEE, J., 2009. *Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds*. Science Direct. Food Chemistry 114(4): 1386–1390. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.11.018. [Cit. 16.2.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608013599>

JAY M. J., LOESSNER J. M., GOLDEN A. D., 2005: *Modern Food Microbiology*. Seventh Edition. New York: Springer Science+Business Media. 790s. ISBN 0-387-23413-6.

JAYAPRAKASHA G.K., SINGH R.P., SAKARIAH K.K., 2001. *Antioxidant activity of grape seed (Vitis vinifera) extracts on peroxidation models in vitro*. Science Direct. Food Chemistry 73(3), 285 – 290. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00298-3.[Cit. 16.2.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814600002983>

JAYAPRAKASHA G.K., SELVI T., SAKARIAH K.K., 2003: *Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts*. Science Direct. Food Research International. 36 (2). Strany 117-122. DOI: 10.1016/S0963-9969(02)00116-3. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996902001163>

KADISCH, E., MÜLLER, E., 1999: *Weinbau*. 2. Auflage. Germany: Regensburg. 538 s. ISBN 3-8001-1216-7.

LAFKA, T. I., SINANOGLU, V. and LAZOS E. S., 2007: On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 1206–1214. ISSN 0308-8146.

KALHOTKA, L. *Mikromycety v prostředí člověka: vláknité mikromycety (plísňe) a kvasinky*. V Brně: Mendelova univerzita, 2014. ISBN 978-80-7375-943-8.

KALHOTKA, Libor a TESAŘOVÁ, Marta. *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-016-4.

KARAPINAR, Mehmet a Ilkin Yucel SENGUN, 2007: *Antimicrobial effect of koruk (unripe grape—Vitis vinifera) juice against Salmonella typhimurium on salad vegetables*. *Food Control* [online]. 2007, 18(6), 702-706 [cit. 2016-03-31]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.03.004. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713506000867>

KOMPRDA, Tomáš. *Obecná hygiena potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-7157-757-X.

KRAUS V., 2003: *Pěstujeme évu vinnou*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s., 2003. 102 s. ISBN 80-247-0562-1.

KWON-CHUNG, K a John E BENNETT. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992. ISBN 0-8121-1463-9.

LI, H.; WANG, X. Y.; LI, Y.; LI, P. H.; WANG, H. 2009. *Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines*. *Food Chemistry*, 112, 2: 454-460. ISSN:0308-8146

LOVE, R. M., 2001: *Enterococcus faecalis - a mechanism for its role in endodontic failure*. *International Endodontic Journal* [online]. 2001, 34(5), 399-405 [cit. 2016-03-

23]. DOI: 10.1046/j.1365-2591.2001.00437.x. ISSN 0143-2885. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2591.2001.00437.x>

MADHAVAN, Priya, Farida JAMAL a Pei Pei CHONG, 2011: *Laboratory Isolation and Identification of Candida Species*. Journal of Applied Sciences [online]. 2011-12-1, **11**(16), 2870-2877 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.3923/jas.2011.2870.2877. ISSN 18125654. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jas.2011.2870.2877>

MANERO A., BLANCH A., R., 1999: *Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key*. Applied and Environmental Microbiology. 65(10). Strany 4425-4430. [Cit. 23.03.2016]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/65/10/4425.full>

MCKANE, Larry a Judy KANDEL. *Microbiology: essentials and Applications*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, c1996. ISBN 0-07-045154-0.

MONAGAS M., GÓMEZ-COROVÉS C. , BARTOLOMÉ B. ,LAUREANO O , RICARDO DA SILVA J. M., 2003: *Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from Vitis vinifera L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **51**(22). 6475–6481 s. DOI: 10.1021/jf030325+. [Cit. 29.2.2016]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf030325%2B>

MONTEALEGRE R. R., PECES R. R., VOZMEDIANO J. L. CH., GASCUEÑA J. M., ROMERO E. G., 2006: *Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape Vitis vinifera varieties grown in a warm climate*. Science Direct. Journal of Food Composition and Analysis, **19** (6–7): 687–693. DOI: 10.1016/j.jfca.2005.05.003. [Cit. 26.2.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157505000797>

O'BYRNE P., 2009: *Red Wine and Health*. Food and Beverage Consumption and Health Series. New York: Nova Science Publisher. 527 s. ISBN 978-1-60692-718-2

PAPADOPOULOU CH., SOULTI K., ROUSSIS I. G., 2005: *Potential Antimicrobial Activity of Red and White Wine Phenolic Extracts against Strains of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida albicans*. Web of Science. Food Technology and Biotechnology. 43(1). Strany 41- 46. ISSN 1330-9862. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: [http://scholar.google.cz/scholar?cluster=3737968466238816931&hl=cs&as\\_sdt=0,5](http://scholar.google.cz/scholar?cluster=3737968466238816931&hl=cs&as_sdt=0,5)

OGIER, J a P SERROR, 2008: *Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus*. International Journal of Food Microbiology [online]. 2008, **126**(3), 291-301 [cit. 2016-03-23]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160507004473>

PASSOS C. P., SILVA R. M., . DA SILVA F. A., COIMBRA M. A., . SILVA C. M., 2010: *Supercritical fluid extraction of grape seed (Vitis vinifera L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity*. Science Direct. Chemical Engineering Journal. 160(2), 634 – 640. DOI: 10.1016/j.cej.2010.03.087. [Cit. 16.2.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894710003232>

PAVLOUŠEK, P., 2011: *Pěstování révy vinné. moderní vinohradnictví*. Praha: Grada. 333 s. ISBN 978-80-247-3314-2.

Pharma-Reports. *Klinicky významné bakterie*. 1. vyd. Praha: Triton, 2012. ISBN 978-80-7387-588-6.

RADOVANOVIĆ A., RADOVANOVIĆ B., JOVANČIĆEVIĆ B., 2009: *Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines*. Science Direct. Food Chemistry. 117(2). Strany 326 – 331. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.008. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609004592?np=y>

RHODES P.L., MITCHELL J.W., WILSON M.W., MELTON L.D., 2006: *Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from Vitis vinifera variety Ribier*. Science Direct. International Journal of Food Microbiology. 107(3). Strany 281 – 286.

DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.022. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160505005659>

RIBEREAU-GAYON P., GLORIES Y., DUBOURDIEU D., MAUJEAN A., DON`ECHEA B., 2006: *Handbook of enology volume 2. The Chemistry of Wine. Stabilization and Treatments 2nd Edition.* West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, England, , 441 s., ISBN: 0-470-01034-7. [Cit. 16.2.2016]. Dostupné z: <https://vinumvine.files.wordpress.com/2011/08/p-riberEAU-gayon-y-glories-a-maujean-d-dubourdieu-handbook-of-enology-volume-2-the-chemistry-of-wine-stabilization-and-treatments.pdf>

ROBLOVÁ, V., BITTOVÁ, M., KUBÁŇ, V., 2011: *Analysis of polyphenolics in viticultural material.* In: ŠKARPA P., MendelNet 2011. Brno: Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, 1051–1059. ISBN 978-80-7375-563-8. [Cit. 26.2.2016]. Dostupné z: [https://mnet.mendelu.cz/mendelnet2011/articles/30\\_roblova\\_539.pdf](https://mnet.mendelu.cz/mendelnet2011/articles/30_roblova_539.pdf)

ROCKENBACH, I. I., GONZAGA, L. V., RIZELIO, V. M., GONCALVES, A. E., GENOVESE, M. I., FETT, R., 2011: *Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (Vitis vinifera and Vitis labrusca) pomace from Brazilian winemaking.* Science Direct. Food Research International, 44(4). 897–901. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.01.049. [Cit. 29.2.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691100072X>

RODRÍGUEZ VAQUERO M. J., ALBERTO M. R., MANCA DE NADRA M. C., 2007: *Influence of phenolic compounds from wines on the growth of Listeria monocytogenes.* Science Direct. Food Control. 18(5). Strany 587 – 593. DOI: 10.1016/j.foodcont.2006.02.005. [Cit. 01.03.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713506000272?np=y>

RYAN K. J., RAY C., G., 2004: *Sherris Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases. Fourth Edition.* Champoux J. J., Drew W. L., Neidhardt F. C., Plorde J. J.. The McGraw-Hill companies, Inc., USA; 979 s. DOI: 10.1036/0838585299 [Cit. 22.03.2016]. Dostupné z:

[http://lalashan.mcmaster.ca/theobio/projects/images/c/c0/An\\_Introduction\\_to\\_Infectious\\_Diseases.pdf](http://lalashan.mcmaster.ca/theobio/projects/images/c/c0/An_Introduction_to_Infectious_Diseases.pdf)

VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J., 2009. *Chemie potravin 2*. Tábor: OSSIS. 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9.

VLKOVÁ E., RADA V., KILLER J., 2009: *Potravinářská mikrobiologie*. 2. vydání. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. 168 s. ISBN 978-80213-1988-2.

SAVICKÁ, D., Kvasinky. In: Chumchalová, J., Němec, M., Koutoučková, L., Páčová Z., Savická, D., Kubátová, A., Patáková, P., 2014. Miniatlask mikroorganismů. [Cit. 22.03.2016]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/cand-trop.htm>

SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0.

SILVA, Sónia, Melyssa NEGRI, Mariana HENRIQUES, Rosário OLIVEIRA, David W. WILLIAMS a Joana AZEREDO, 2011: *Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species*. Trends in Microbiology [online]. 2011, 19(5), 241-247 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1016/j.tim.2011.02.003. ISSN 0966842x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X11000448>

SINHA, Neha, D. P. KSHIRSAGAR, M. N. BRAHMBHATT a J. B. NAYAK, 2015: *Detection and virulence gene characterization of Shiga toxinogenic E. coli from buffalo meat samples*. Indian Journal of Animal Research [online]. 2015, (OF), - [cit. 2016-03-23]. DOI: 10.18805/ijar.5584. ISSN 0976-0555. Dostupné z: [http://arccjournals.com/index.php?option=com\\_journals&view=article&id=6226&Itemid=641](http://arccjournals.com/index.php?option=com_journals&view=article&id=6226&Itemid=641)

STEWART, Philip S a J WILLIAM COSTERTON, 2001: *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. The Lancet [online]. 2001, 358(9276), 135-138 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1. ISSN 01406736. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673601053211>

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.

ŠULC, M., 2006: *Polyfenolické antioxidanty v révě vinné*. Disertační práce. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. 176 s.

ŠULC, M., LACHMAN, J., HEJTMANKOVA, A. and ORSAK, M., 2005: *Relationship between antiradical activity, polyphenolic antioxidants and free trans-resveratrol in grapes*. Horticultural Science. (32) 4. Strany 154–162. [Cit. 01.03.2016]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Alena\\_Hejtmankova/publication/237742271\\_Content\\_of\\_polyphenolic\\_antioxidants\\_and\\_trans-resveratrol\\_in\\_grapes\\_of\\_different\\_varieties\\_of\\_grapevine\\_\(Vitis\\_vinifera\\_L.\)/links/55a77efd08aeceb8cad62eee.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alena_Hejtmankova/publication/237742271_Content_of_polyphenolic_antioxidants_and_trans-resveratrol_in_grapes_of_different_varieties_of_grapevine_(Vitis_vinifera_L.)/links/55a77efd08aeceb8cad62eee.pdf)

ŠULC, M., PIVEC, V. a LACHMAN, J., 2006: *Obsah fenolických látek v révě vinné ve vztahu k působení stresových faktorů*. In: HNILÍČKA, F. Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2006 (Sborník příspěvků). Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. 302 s. ISBN 80-213-1484-2. [Cit. 26.2.2016]. Dostupné z: <http://www.vurv.cz/files/Publications/ISBN80-86555-85-2.pdf>

TAGURI T., TAKASHI TANAKA A. B., KOUNO I., 2004: *Antimicrobial Activity of 10 Different Plant Polyphenols against Bacteria Causing Food-Borne Disease*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 27 (12). Strany 1965-1969. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/27/12/27\\_12\\_1965/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/27/12/27_12_1965/_article)

Taxonomy Browser, 2016: National Center for Biotechnology Information. [Cit. 22.03.2016]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>

TEIXEIRA N, VARAHAN S, GORMAN MJ, PALMER KL, ZAIDMAN-REMY A, YOKOHATA R, a kol., 2013: *Drosophila* Host Model Reveals New *Enterococcus*



*faecalis* Quorum-Sensing Associated Virulence Factors. PLoS ONE 8(5): e64740. doi:10.1371/journal.pone.0064740. [Cit. 23.03.2016]. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064740>

WHITEWAY M. A BACHEWICH C., 2007: *Morphogenesis in Candida albicans*. Annual Review of Microbiology. 2007, 61(1). Strany: 529–553. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093341 [Cit. 14.03.2016]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4452225/>

WIRTH, Thierry, Daniel FALUSH, Ruiting LAN, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology* [online]. 2006, 60(5), 1136-1151 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x. ISSN 0950-382x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>

XIA EN-QIN, DENG GUI-FANG, GUO YA-JUN, AND HUA-BIN LI, 2010: *Biological Activities of Polyphenols from Grapes*. International Journal of Molecular Sciences. 11(2). Strany 622 – 646. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms11020622. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852857/>

YIGIT D., YIGIT N., MAVI A., YILDIRIM, A., GÜLERYÜZ M., 2009: *Antioxidant and antimicrobial activities of methanol and water extracts of fruits, leaves and seeds of Vitis vinifera L. cv. Karaerik*. Cab Direct. Asian Journal of Chemistry. 21 (1). Strany 183-194. ISSN: 0970-7077. [Cit. 02.03.2016]. Dostupné z: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20093256190.html;jsessionid=ECD5FB98445292CC73A0485FE4F7576D?freeview=true>

YILMAZ Y., TOLEDO R., T., 2004: *Health aspects of functional grape seed constituents*. Science Direct. Trends in Food Science & Technology. 15(9). 422-433 s. DOI: 10.1016/j.tifs.2004.04.006. [Cit. 01.03.2016]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224404001128>

ZLOCH, Z., 2003: Zdravotní efekt polyfenolů z hlediska jejich příjmu a využitelnosti. *Vojenské zdravotnické listy*, 67, 5: 226–229. ISSN 0372-7025. [Cit. 16.2.2016]. Dostupné z: [http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL5\\_2003/Vz15\\_8.pdf](http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL5_2003/Vz15_8.pdf)

## **8 ZOZNAM POUŽITÝCH TABULIEK**

Tab. č. 1 Základné rozdelenie fenolických zlúčenín v hroznách (PAVLOUŠEK, 2011).

Tab. č. 2: Rozdiel medzi Grampozitívnou a Gramnegatívnou bunkovou stenou (ARYAL, 2015).

Tab. č. 3: Antimikrobiálny účinok extraktu vystaveného oxidácii, vyhodnotený pomocou inhibičných zón po 24 hodinovej kultivácii (zóny ihibície sú uvedené v mm).

Tab. č. 4: Antimikrobiálny účinok extraktu vystavený oxidácii, vyhodnotený pomocou inhibičných zón po 48 hodinovej kultivácii (zóny ihibície sú uvedené v mm).

Tab. č. 5: Antimikrobiálny účinok čerstvého extraktu (označený číslom 1) a metanolového extraktu (označený číslom 2 a 3) vyhodnotený pomocou inhibičných zón po 24 hodinovej kultivácii (zóny ihibície sú uvedené v mm).

Tab. č. 6: Antimikrobiálny účinok čerstvého extraktu (označený číslom 1) a metanolového extraktu (označený číslom 2 a 3) vyhodnotený pomocou inhibičných zón po 48 hodinovej kultivácii (zóny ihibície sú uvedené v mm).

Tab. č. 7: Aritmetický priemer inhibičných zón u všetkých použitých extraktoch voči všetkým testovaným mikroorganizmom

Tab. č. 8: Normálne rozdelenie testované Shapiro-Wilkoxonovým testom

Tab. č. 9: Testovanie Wilcoxonovým testom a t-testom a rozhodnutie či má extrakt inhibičný účinok

Tab. č. 10: Porovnanie metanolového extraktu s kontrolou pomocou Mann-Whitneyho testu

Tab. č. 11: Porovnanie účinku extraktov Kruskal – Wallisovým testom

## 9 ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV

Obr. č. 1: Matoliny v nádobách na privesnom vozíku pripravené k separácii

Obr. č. 2 : Rovinné vibračné sitá.

Obr. č. 3: Schéma separácie semien révy na rovinných vibračných sitách (BURG a kol., 2013).

Obr. č. 4: Premývanie odseparovaných semien a odstránenie vyslepených semien na hladine vody.

Obr. č. 5: Extrakcia pomletého prášku z hroznových semien v sklenenom demižóne.

Obr. č. 6: Odparovanie methanolu z methanolového extraktu semien.

Obr. č. 7: Kultivácia mikroorganizmov na trepačke

Obr. č. 8: Označené petriho misky s živnou pôdou

Obr. č. 9: Graf s priemernými hodnotami polyfenolických zlúčenín vyjadrených v mg/l GAE.

Obr. č. 10: Kontrolné vzorky mikroorganizmov (*C. tropicalis* vľavo hore, *E. faecalis* dole uprostred a *E. coli* vpravo hore) po 24 hodinovej kultivácii.

Obr. č. 11: Vplyv naoxidovaného extraktu na *Enterococcus faecalis* po 24 hodinovej kultivácii (vľavo koncentrovaný extrakt, uprostred riedenie 1:1 a napravo riedenie 1:9)

Obr. č. 12: Vplyv naoxidovaného extraktu na *Candida tropicalis* po 48 hodinovej kultivácii (vľavo koncentrovaný extrakt, uprostred riedenie 1:1 a napravo riedenie 1:9)

Obr. č. 13: Vplyv čerstvého, koncentrovaného, bezmethanolového extraktu na *Escherichia coli* po 48 hodinovej kultivácii

Obr. č. 14: Vplyv čerstvého, bezmethanolového extraktu na *Enterococcus faecalis* po 24 hodinovej kultivácii (vľavo hore riedenie 1:1, vpravo hore riedenie 1:9, dole uprostred koncentrovaný extrakt)

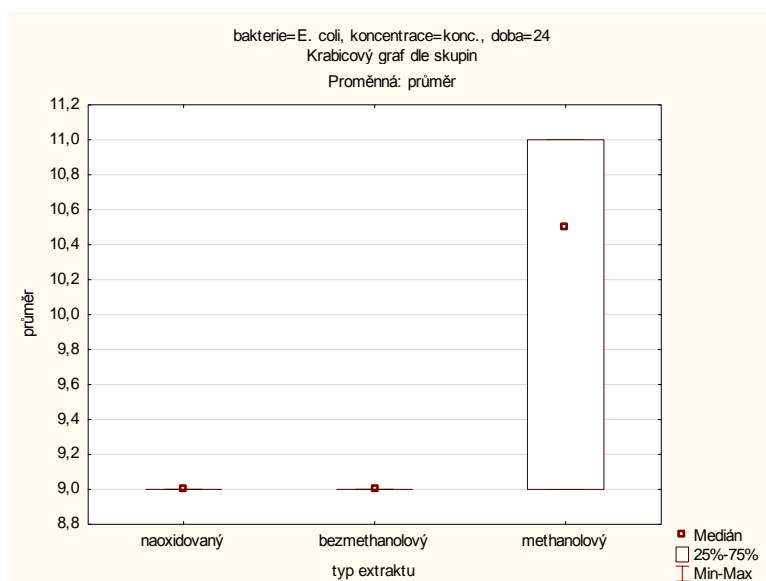
Obr. č. 15: Vplyv methanolového extraktu na *Enterococcus faecalis* po 48 hodinovej kultivácii (dole koncentrovaný extrakt, vľavo hore riedenie 1:1, vpravo hore riedenie 1:9)

## 10 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

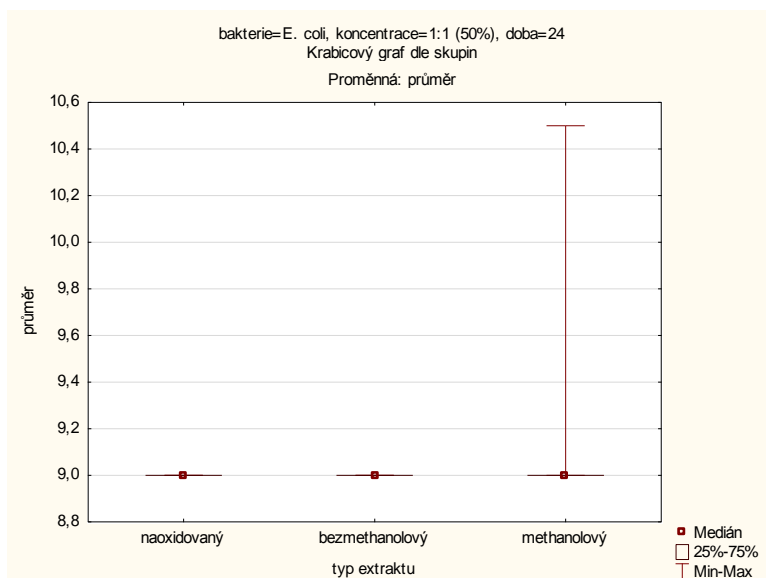
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
LC-DAD/ESI-MS	kvapalinový chromatograf, hmotnostný spektrometer
OPCs	oligoméne proantokyanidínové komplexy
USA	Spojené národy americké
ČR	Česká republika
DPPH	difenylpikrylhydrazyl,(1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl)
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
NAG	N-acetylglukosamin
NAM	N-acetylmuramová kyselina
PCA	Plate count agar
CHL	Chloramphenicol glucose agar

## 11 PRÍLOHY

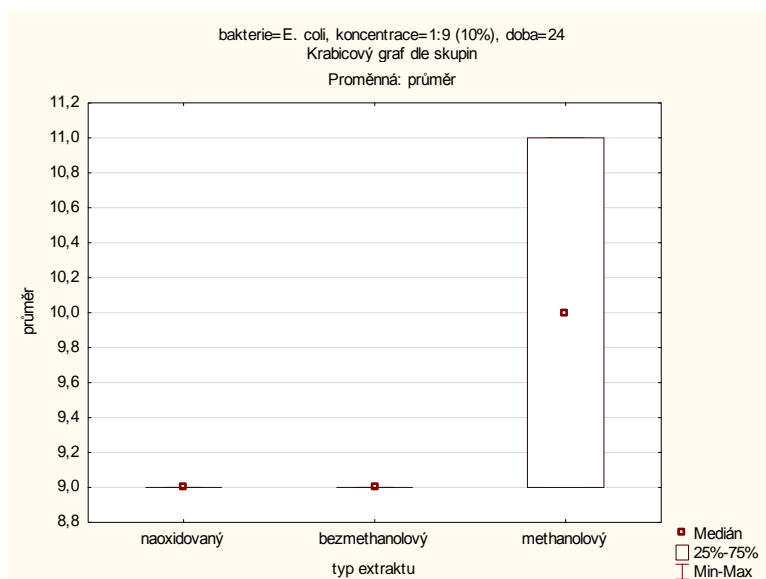
Krabicové grafy znázorňujú porovnanie jednotlivých extraktov v príslušných koncentráciach riedenia, po 24 alebo 48 hodinovej kultivácii voči všetkým mikroorganizmom. V krabicovom grafe možno sledovať na zvislej osi priemery inhibičných zón v mm. Ďalej graf zobrazuje medián, stredný kvartil, minimum a maximum označené v legende.



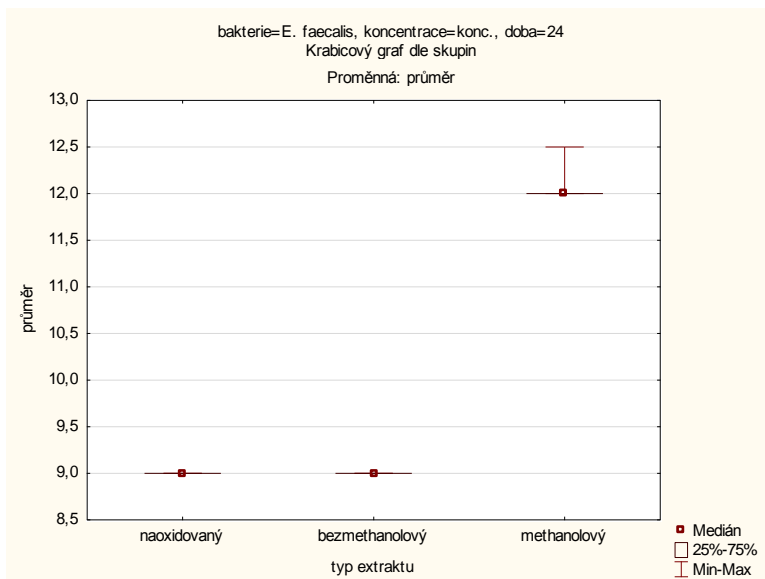
Príloha č. 1: Graf porovnania inhibičného efektu použitých 100 % koncentrovaných extraktov proti *E. coli*, po 24 hodinovej kultivácii (priemery inhibičnej zóny na zvislej osi v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



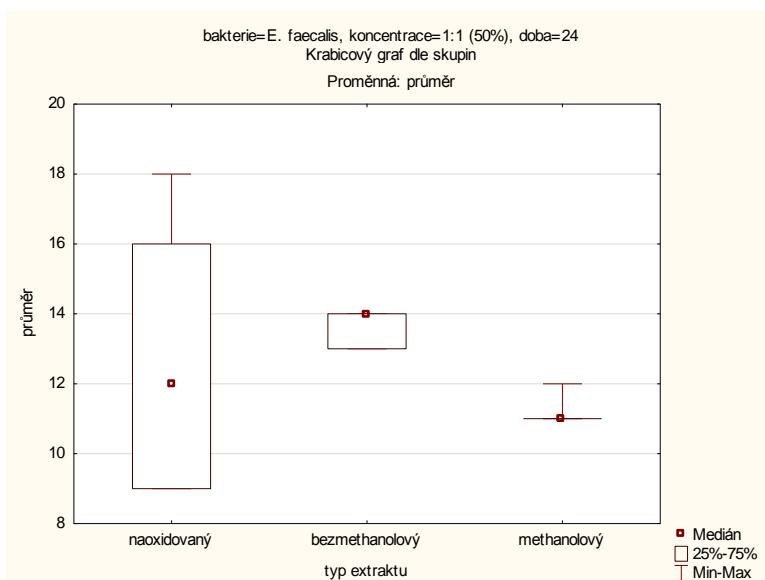
Príloha č. 2: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:1 proti *E. coli*, po 24 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



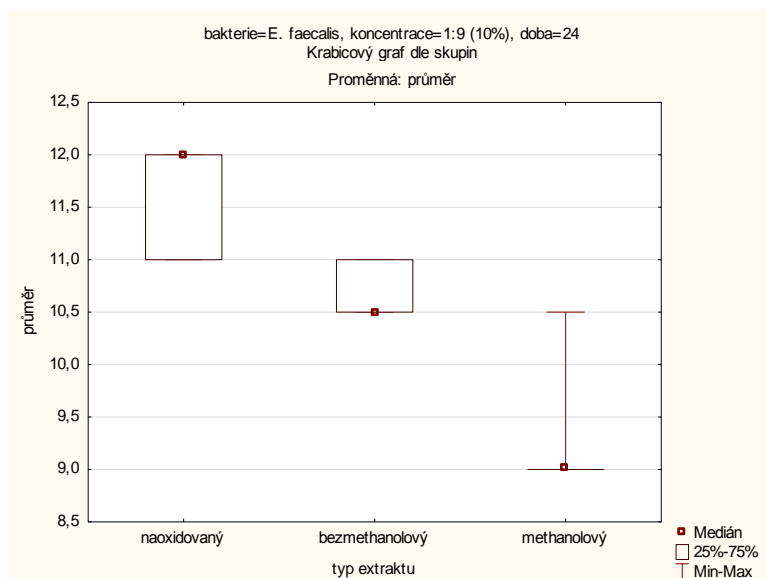
Príloha č. 3: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:9 proti *E. coli*, po 24 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



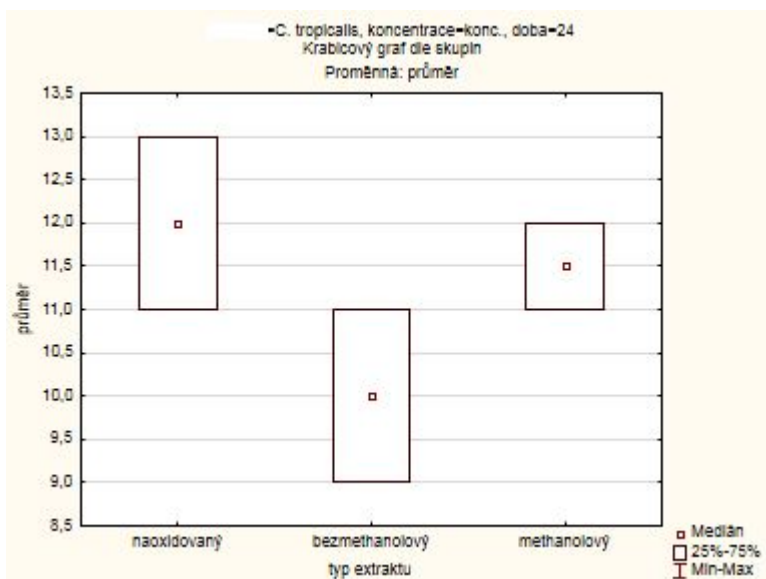
Príloha č. 4: Graf porovnania inhibičného efektu použitých 100 % koncentrovaných extraktov proti *E. faecalis*, po 24 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanový extrakt a napravo čerstvý methanový extrakt).



Príloha č. 5: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:1 proti *E. faecalis*, po 24 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanový extrakt a napravo čerstvý methanový extrakt).

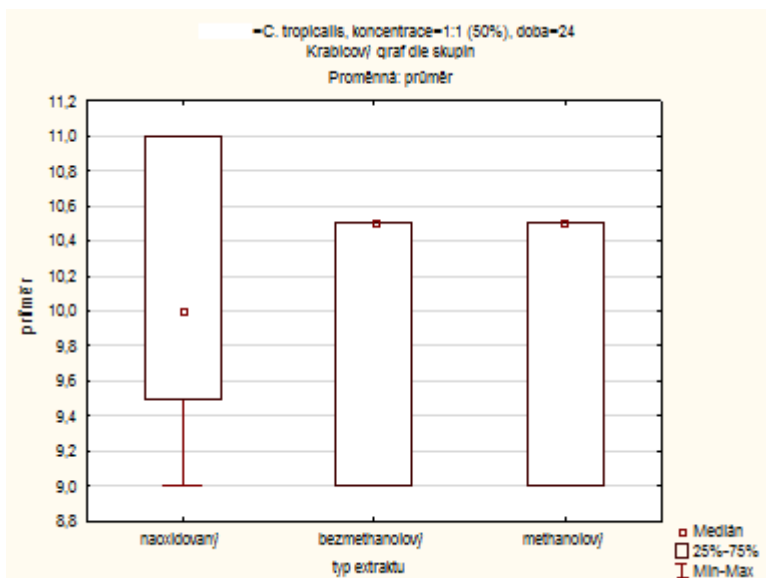


Príloha č. 6: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:9 proti *E. faecalis*, po 24 hodinovej kultivácii (priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).

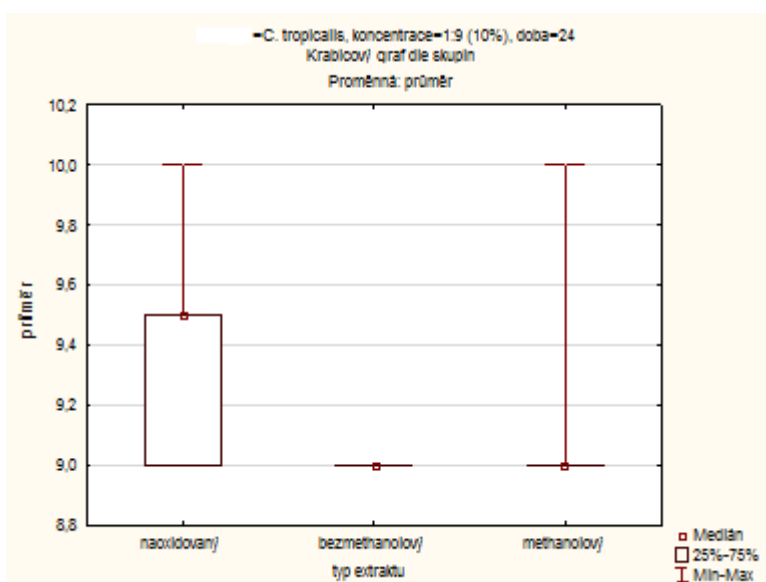


Príloha č. 7: Graf porovnania inhibičného efektu použitých 100 % koncentrovaných extraktov proti *C. tropicalis*, po 24 hodinovej kultivácii (priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).

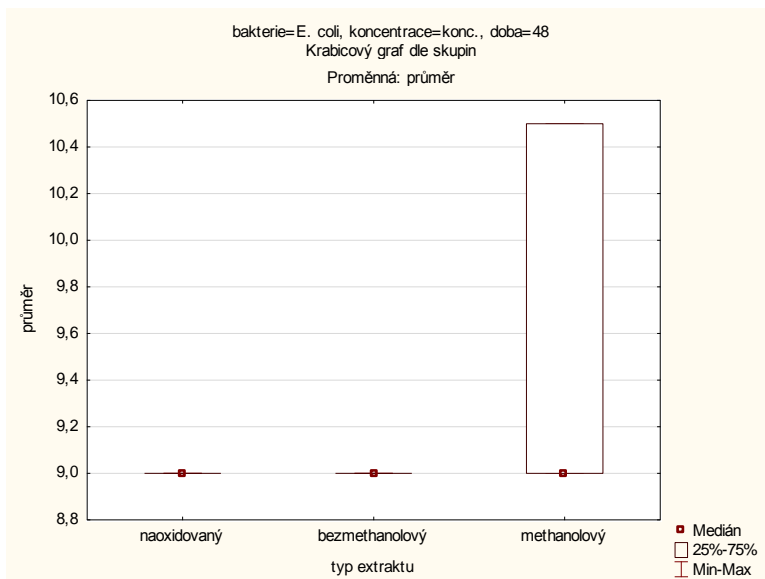




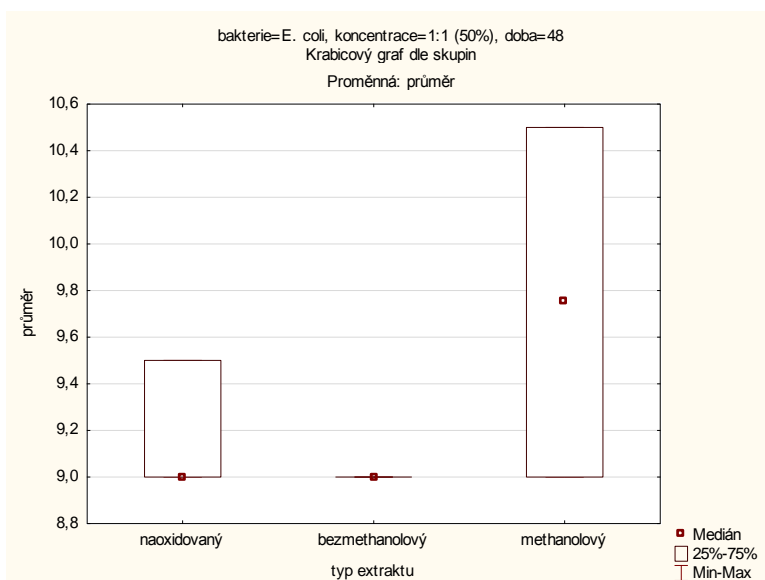
Príloha č. 8: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:1 proti *C. tropicalis*, po 24 hodinovej kultivácii (priemery inhibičnej zóny na zvislej osi v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



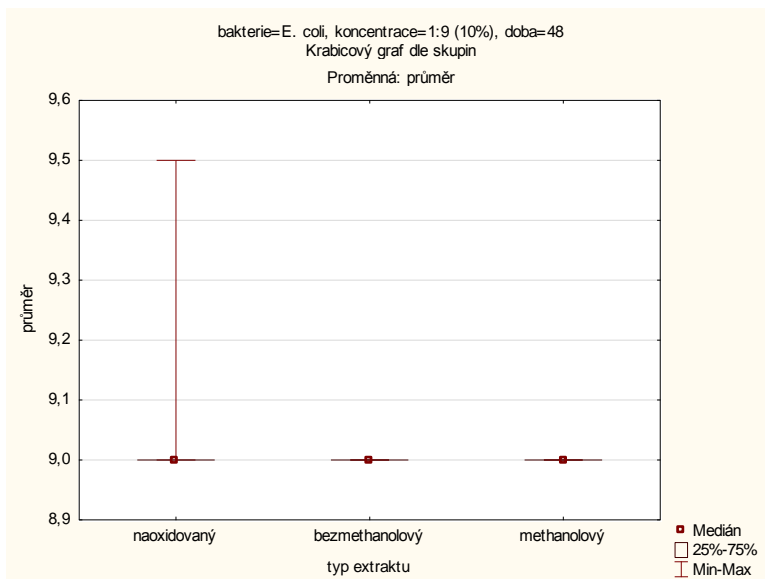
Príloha č. 9: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:9 proti *C. tropicalis*, po 24 hodinovej kultivácii (priemery inhibičnej zóny na zvislej osi v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



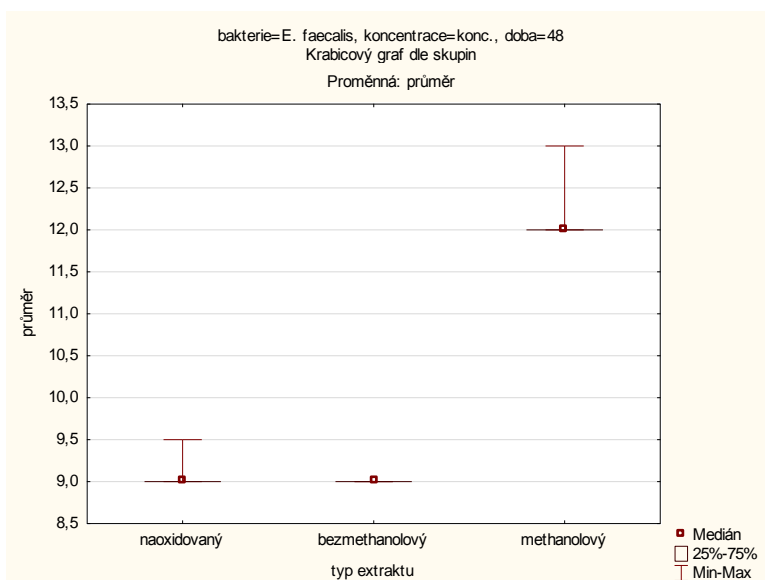
Príloha č. 10: Graf porovnania inhibičného efektu použitých 100 % koncentrovaných extraktov proti *E. coli*, po 48 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



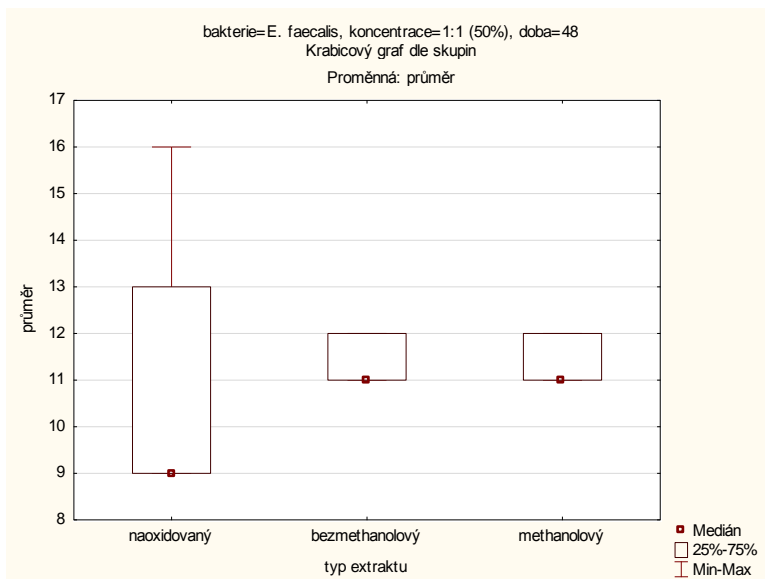
Príloha č. 11: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:1 proti *E. coli*, po 48 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



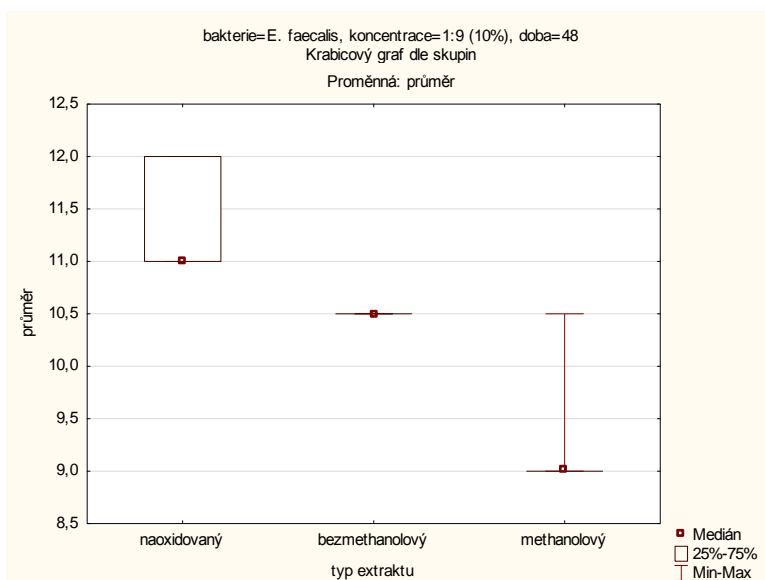
Príloha č. 12: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:9 proti *E. coli*, po 48 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



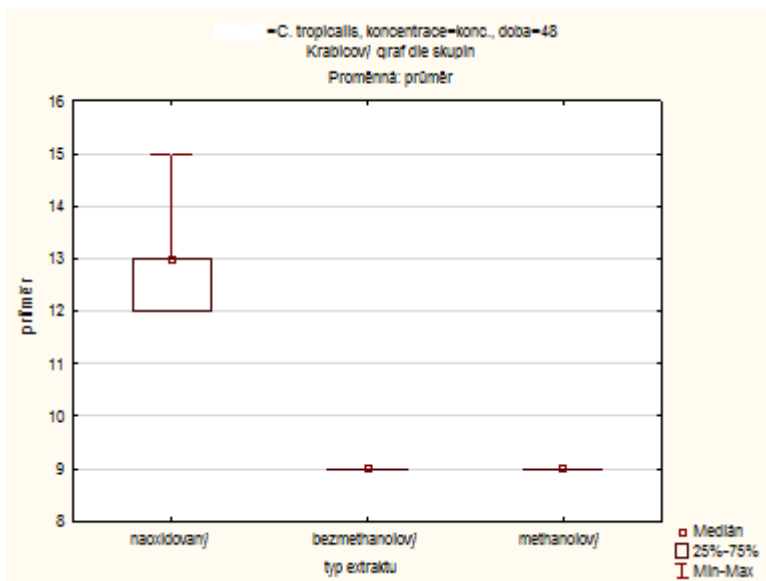
Príloha č. 13: Graf porovnania inhibičného efektu použitých 100 % koncentrovaných extraktov proti *E. faecalis*, po 48 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



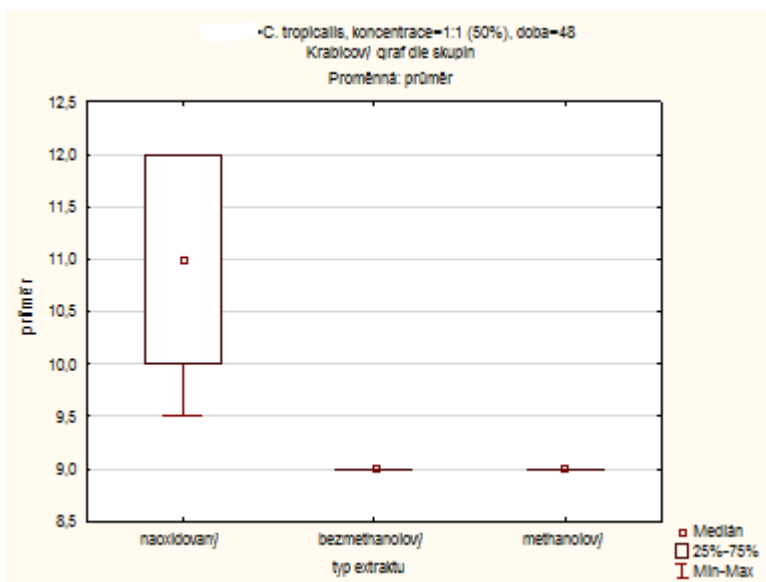
Príloha č. 14: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:1 proti *E. faecalis*, po 48 hodinovej kultivácii (priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



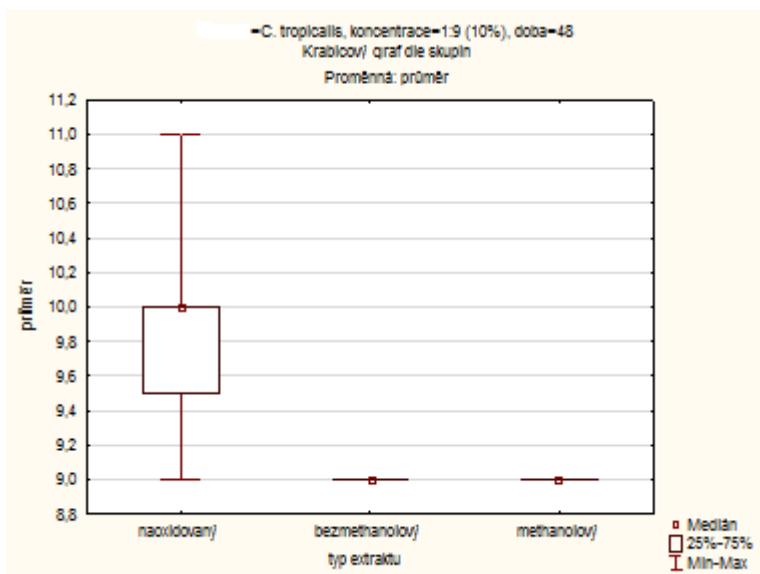
Príloha č. 15: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:9 proti *E. faecalis*, po 48 hodinovej kultivácii (priemery inhibičnej zóny na zvislej osy v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



Príloha č. 16: Graf porovnania inhibičného efektu použitých 100 % koncentrovaných extraktov proti *C. tropicalis*, po 48 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osi v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



Príloha č. 17: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:1 proti *C. tropicalis*, po 48 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osi v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).



Príloha č. 18: Graf porovnania inhibičného efektu použitých riedených extraktov v pomere 1:9 proti *C. tropicalis*, po 48 hodinovej kultivácii ( priemery inhibičnej zóny na zvislej osi v mm, naľavo naoxidovaný extrakt, uprostred čerstvý bezmethanolový extrakt a napravo čerstvý methanolový extrakt).