

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2018

Bc. Mária Ďubašáková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOAKTIVNÍ LÁTKY RŮŽE ŠÍPKOVÉ

BIOACTIVE SUBSTANCES OF ROSE HIP

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Mária Ďubašáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1240/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Mária Ďubašáková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Bioaktivní látky růže šípkové

Zadání diplomové práce:

1. Prostudujte relevantní zdroje o přírodních látkách růže šípkové a spektrofotometrické metody jejich stanovení.
2. Připravte extrakty z oplodí a květů růže šípkové a analyzujte přítomné látky v nich obsažené pomocí UV–VIS spektrometrie.
3. Ověřte antimikrobiální účinky těchto extraktů na vybrané mikroorganismy.
4. Naměřená data vyhodnoťte.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Mária Ďubašáková
student(ka)

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto diplomovej práce bolo stanovenie koncentrácie bioaktívnych látok ako sú celkové polyfenoly a flavonoidy a tiež celkovú antioxidantnú kapacitu v čajových extraktoch z Ruže šípkovej. V druhej časti bolo predmetom experimentu zistenie antimikrobiálnej aktivity a účinnej koncentrácie etanolu voči vybraným baktériám.

Teoretická časť je zameraná na popis prírodných antioxidantných látok a ich účinku proti voľným radikálom, popis čaju, popis Ruže šípkovej a možnosti spektrofotometrického stanovenia prírodných látok, a na záver základné rozdelenie baktérií. V experimentálnej časti boli pripravené etanolové a vodné extrakty v ktorých boli stanovované celkové polyfenoly, flavonoidy a antioxidantná aktivita

Výsledky stanovovania polyfenolov a flavonoidov ukazujú, že pre lúhovanie kvetu je vhodnejšie rozpúšťadlo s etanolom, a pri lúhovaní oplodia šípku je vhodnejšie rozpúšťadlo voda. Pri porovnaní antioxidantnej aktivity macerátov nenastali žiadne významné rozdiely, mierne vyššiu antioxidantnú aktivitu vykazujú maceráty z kvetu šípku.

Extrakty vykazovali antimikrobiálnu aktivitu najmä proti *Micrococcus luteus* a mierne proti *Bacillus cereus*. Najväčšia antimikrobiálna aktivita bola stanovená u etanolových macerátov kvetu proti *Micrococcus luteus*

ABSCTRACT

The aim of this master's thesis was to determine the concentration of bioactive substances such as total polyphenols and flavonoids as well as the total antioxidant capacity in tea extracts from *Rosa canina*. In the second part, an experiment was found to detect antimicrobial activity and an effective concentration of ethanol against selected bacteria.

The theoretical part is focused on description of natural antioxidants and their effect on free radicals, description of tea, description of rose hazel and possibilities of spectrophotometric determination of natural substances and eventually basic distribution of bacteria. In the experimental part, ethanol and aqueous extracts were prepared in which the total number of polyphenols, flavonoids and antioxidant effects.

The results of the determination of polyphenols and flavonoids show that the solvent with ethanol is more suitable for flower fermentation and water is more suitable for dropping the rose. Comparison of the antioxidant activity of macerates showed no significant differences; slightly higher antioxidant activity showed macerates from pink flowers.

The extracts showed antimicrobial activity against *Micrococcus luteus* and slightly against *Bacillus cereus*. The highest antimicrobial activity was determined for the *micrococcus luteus*

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Ruža šípková, bylinné extrakty, bioaktívne látky, čaj, polyfenoly, antioxidantná aktivita, voľné radikály

KEYWORDS

Rosa canina, herbal extracts, bioactive substances, tea, polyphenols, antioxidant activity, free radicals

ĎUBAŠÁKOVÁ, M. *Bioaktivní látky růže šípkové*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 58 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcem sa poďakovať vedúcej mojej práce pani RNDr. Márii Veselej, Ph.D., za všetok poskytnutý čas a cenné rady ktoré mi pri riešení tejto práce venovala. Tiež sa chcem poďakovať pani laborantke Novákovej za čas a pomoc v laboratóriu.

Rada by som sa poďakovala svojej rodine za podporu behom celého štúdia.

OBSAH

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČASŤ | 8 |
| 2.1 | Bioaktívne látky v rastlinách..... | 8 |
| 2.1.1 | Fenolické zlúčeniny | 8 |
| 2.1.2 | Terpenoidy | 14 |
| 2.1.3 | Alkaloidy | 15 |
| 2.1.4 | Vitamíny, minerály a stopové látky..... | 15 |
| 2.2 | Antioxidanty..... | 16 |
| 2.2.1 | Klasifikácia antioxidantov | 16 |
| 2.2.2 | Voľné radikály a oxidačný stres | 17 |
| 2.3 | Čaj | 19 |
| 2.3.1 | Výroba a klasifikácia čaju | 19 |
| 2.4 | Ruža šípková | 20 |
| 2.4.1 | Bioaktívne látky v Ruži šípkovej..... | 21 |
| 2.5 | Metódy spektrofotometrického stanovenia bioaktívnych látok..... | 22 |
| 2.6 | Mikrobiologické metódy stanovenia antimikrobiálnej aktivity..... | 24 |
| 2.7 | Delenie mikroorganizmov podľa bunkovej steny | 25 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 27 |
| 3.1 | Zoznam použitých prístrojov..... | 27 |
| 3.2 | Zoznam použitých chemikálií | 27 |
| 3.3 | Analyzované vzorky čajov | 27 |
| 3.4 | Charakteristika použitých mikroorganizmov | 28 |
| 3.4.1 | Charakteristika použitých gramnegatívnych baktérií..... | 28 |
| 3.4.2 | Charakteristika použitých grampozitívnych baktérií | 28 |
| 3.5 | Príprava kultivačného média | 30 |
| 3.6 | Príprava čajových extraktov | 30 |
| 3.6.1 | Príprava výluhov | 30 |
| 3.6.2 | Príprava macerátov | 30 |
| 3.7 | Stanovenie celkových polyfenolov..... | 31 |
| 3.8 | Stanovenie celkových flavonoidov..... | 32 |
| 3.9 | Stanovenie antioxidačnej aktivity..... | 33 |
| 3.10 | Overenie antimikrobiálnej aktivity..... | 33 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUSIA | 34 |
| 4.1 | Stanovenie celkových polyfenolov..... | 34 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2 | Stanovenie flavonoidov | 37 |
| 4.3 | Stanovenie antioxidačnej aktivity..... | 40 |
| 4.4 | Overenie antimikrobiálnej aktivity..... | 43 |
| 5 | ZÁVER | 49 |
| 6 | ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV | 50 |
| 7 | ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV | 57 |

1 ÚVOD

Už pred 400 miliónmi rokov, keď sa rastliny vyvíjali, pravdepodobne vyrábali sekundárne metabolity ako prostriedok obrany proti byľinožravcom, mikróbom a konkurenčným rastlinám. Sekundárne metabolity sú zvyčajne bioaktívne látky, ktoré môžu interferovať s molekulárnymi cieľmi u zvierat a mikroorganizmov. Preto mnohé rastliny a látky izolované z nich môžu slúžiť ako hodnotné lieky v medicíne a farmácii [1].

Byliny sa používajú v mnohých oblastiach okrem medicíny a farmácie aj v oblasti výživy, dochucovadiel, nápojov, farbív, repelentov, vôní, kozmetiky, fajčenia a iných priemyselných účelov. Od prehistorickej doby boli bylinky základom takmer všetkých liečebných terapií, kým sa v 19. storočí nevytvorili syntetické liečivá [2]

Mnohé liečivé rastliny obsahujú veľké množstvá antioxidantov, ako sú polyfenoly, ktoré môžu hrať dôležitú úlohu pri adsorbovaní a neutralizácii voľných radikálov, pri zahasovaní singletného a tripletného kyslíka alebo pri rozkladaní peroxidov. Mnohé z týchto fytochemikálií majú významné antioxidačné kapacity, ktoré sú spojené s nižším výskytom a nižšou úmrtnosťou niekoľkých ľudských chorôb. Zistilo sa, že tieto zlúčeniny z bylín, korenín a rastlinných extraktov majú antimikrobiálne vlastnosti proti širokému spektru škodlivých mikroorganizmov. [3]

Použitie prírodných antimikrobiálnych látok z potravín získalo veľa pozornosti od spotrebiteľov a potravinárskeho priemyslu. Dôvodom je predovšetkým, zneužívanie a nesprávne používanie antibiotík, čo viedlo k dramatickému vzostupu skupiny mikroorganizmov, vrátane patogénov, ktoré nie sú odolné voči antibiotikám, ale sú tiež tolerantnejšie voči viacerým metódam spracovania a uchovávanía potravín. [4]

Šípky sa používajú na rôzne účely, ako je ochrana zdravia a terapia pri chrípke, infekciách, zápalových ochoreniach a chronických bolestiach. Okrem toho majú priaznivé dôsledky na starostlivosť o pleť a liečbu proti škodcom. Šípky sa používajú aj v potravinách a nápojoch, ako sú čaj, marmelády, želé a džemy, nedávno sa začala používať ako prísada do probiotických nápojov, jogurtov a polievok ako výživový doplnok [5].

Cieľom tejto diplomovej práce je zistenie koncentrácie bioaktívnych látok ako sú polyfenoly a flavonoidy a taktiež zistenie antioxidačnej aktivity v závislosti na čase pôsobenia čaju šípku a použitého rozpúšťadla. Porovnávané boli extrakty z dvoch druhov čajov, šípku oplodia a šípku kvetu. Ďalšou časťou práce je overovanie antimikrobiálnej aktivity extraktov s najvyššou koncentráciou bioaktívnych látok voči vybraným zástupcom grampozitívnych (G^+) a gramnegatívnych (G^-) baktérii.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Bioaktívne látky v rastlinách

Rastliny sú cenným zdrojom chemických zlúčenín, ktoré sa tradične používajú ako zdroj zložiek alebo nápadov pri vývoji nových liekov (napr. steroidy a alkaloidy), funkčných potravín (napr. rastlinné steroly), potravinárskych prídavných látok (napr. prírodná aróma a farba). Majú takmer bezlimitnú schopnosť syntetizovať aromatické látky, najmä polyfenoly alebo ich kyslík-substituované deriváty [6].

Tieto zlúčeniny sa označujú ako bioaktívne zlúčeniny vzhľadom na ich farmakologické alebo toxikologické účinky na ľudí a zvieratá. Tieto typické bioaktívne zlúčeniny v rastlinách sa vyrábajú ako sekundárne metabolity, ktoré sa generujú rôznymi biologickými cestami v procesoch sekundárneho metabolizmu a hrajú dôležitú úlohu pri ochrane rastlín pred biotickým alebo abiotickým stresom. V mnohých prípadoch tieto látky slúžia ako obranné mechanizmy proti napadnutiu mikroorganizmami, hmyzom a bylinožravcami. Niektoré, ako napr. terpenoidy, dávajú rastliny svoje pachy; iné (chinóny a triesloviny) sú zodpovedné za rastlinný pigment [7].

Z biochemického hľadiska môžu byť bioaktívne zlúčeniny rastlinného pôvodu kategorizované do niekoľkých skupín:

- glykozidy (glykozidy srdca, cyanogénne glykozidy, glukozinoláty, saponíny a antrachinónové glykosidy),
- fenolické zlúčeniny (fenolové a hydroxyškoricové kyseliny, stilbény, flavonoidy a antokyany)
- triesloviny,
- terpenoidy,
- lignany,
- alkaloidy,
- kumaríny [7].

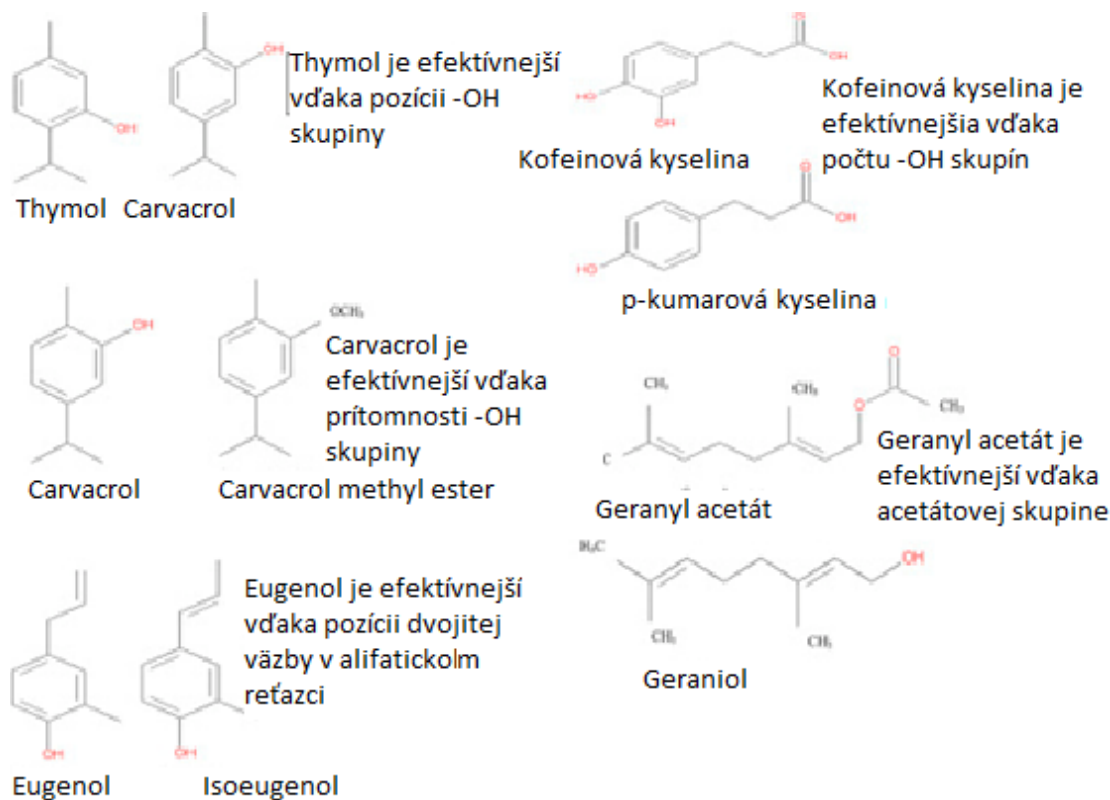
2.1.1 Fenolické zlúčeniny

Sú často uložené na strategicky dôležitých miestach, kde zohrávajú signalizačnú rolu a často i priamu rolu v obrane. Fenolické látky sa obvykle hromadia v centrálnych vakuolách epidermálnych buniek, rovnako ako v subepidermálnych bunkách listov a výhonkov. Okrem toho sú niektoré fenolické látky pripojené kovalentnou väzbou na stenu rastlinnej bunky. Ostatné sa vyskytujú vo voskoch alebo na vonkajšom povrchu rastlinných orgánov [8].

Fenolické zlúčeniny sú najpočetnejšie a všadeprítomné skupiny sekundárnych metabolitov rastlín. Bolo preukázané, že svoje antioxidačné vlastnosti majú práve vďaka aromatickému kruhu, ktorý by mohol stabilizovať a delokalizovať nepárový elektrón vo svojej štruktúre. Všetky polyfenolické látky majú rovnakú základnú aromatickú štruktúru, ktorá nesie jeden alebo viac substituentov hydroxylovej skupiny, čo zabezpečuje ich rozmanitosť [9].

Fenolické zlúčeniny majú veľké štrukturálne zmeny a sú jednou z najrôznejších skupín sekundárnych metabolitov. Predpokladá sa, že hydroxylové (-OH) skupiny v fenolických zlúčeninách spôsobujú inhibičný účinok, pretože tieto skupiny môžu interagovať s bunkovou membránou baktérií, a narušiť membránové štruktúry a spôsobiť únik bunkových zložiek. Aktívna skupina, ako je -OH, podporuje delokalizáciu elektrónov, ktoré potom pôsobia ako protonové výmenníky a redukovávajú gradient cez cytoplazmatickú membránu bakteriálnych buniek. To spôsobí narušenie protónovej hybnej sily a vyčerpanie zásobníka ATP a v konečnom dôsledku povedie k smrti buniek [4].

Ďalšie štúdie uvádzajú, že skupiny -OH môžu ľahko viazať aktívne miesto enzýmov zmenou bunkového metabolizmu mikroorganizmov. Táto činnosť demonštruje význam skupiny -OH v antimikrobiálnej aktivite. Fenolické zlúčeniny tiež pôsobia ako antioxidanty. Prítomnosť voľnej -OH skupiny vo fenolických zlúčeninách vedie k antioxidačným vlastnostiam. Zistilo sa, že táto vlastnosť inhibuje tvorbu reaktívnych druhov kyslíka, ako aj vylučovanie voľných radikálov, čím sa znižuje redox potenciál rastového média. Toto zníženie redoxného potenciálu môže ďalej obmedzovať rast nežiaducich mikroorganizmov [4].



Obrázok č. 1: Štruktúrna variácia funkčných skupín v rastlinných zlúčeninách mení ich antimikrobiálnu aktivitu [4]

Biologická aktivita polyfenolov závisí od úrovne ich aktivity a rozsahu, v akom sú distribuované, metabolizované, absorbované a vylučované z tela. Niektorí vedci skúmali farmakokinetiku polyfenolov u dospelých ľudí meraním koncentrácie plazmy a moču známych metabolitov po jednorazovom podaní príslušných polyfenolov. Ich štúdie preukázali veľké rozdiely v kinetike a biologickej dostupnosti rôznych skúmaných polyfenolov a ako také, informácie o osude týchto zlúčenín autori nepochopili. Okrem toho v dôsledku rozsiahleho metabolizmu v črevách a pečeni sa metabolity nachádzajúce sa v obehu, moči a cieľových orgánoch odlišovali od materskej zlúčeniny, čo komplikuje ich pochopenie [10].

Polyfenoly by sa dali zaradiť do 4 hlavných skupín:

- Fenolové kyseliny,
- Stilbény,
- Lignany,
- Flavonoidy [10].

Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny

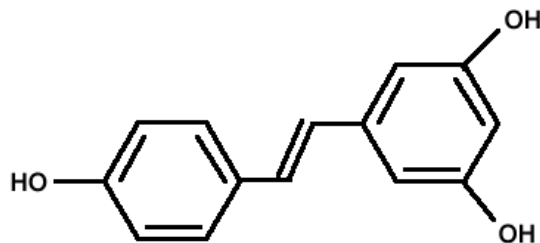
Niektoré najjednoduchšie bioaktívne fytochemikálie pozostávajú z jedného substituovaného fenolového kruhu. Kyselina škoricová a kávové kyseliny sú spoločnými zástupcami širokej skupiny zlúčenín odvodených od fenypropánu, ktoré sú v najvyššom oxidačnom stave [6].

Fenolové kyseliny sú ďalej rozdelené do nasledujúcich kategórií:

- Kyseliny hydroxybenzoové (napríklad kyselina gallová), ktoré sa nachádzajú v čaji.
- Kyseliny hydroxyškoricové. Príkladmi kyselín hydroxyškoricových sú kyselina kávová, ktorá sa nachádza prakticky v každom ovocí; kyselina chlorogénna nachádzajúca sa v jahodách, ananáse a iných; a kyselina p-kumarová, ktorá sa nachádza v zrnách obilnín [9].

Stilbény

Stilbény sú najmenšou skupinou fenolických zlúčenín u ktorých bola preukázaná antioxidačná aktivita aj v nízkych koncentráciách. Stilbény ako napríklad resveratrol, sú schopné zabrániť oxidačnému stresu v ľudskom tele a tiež predchádzať kardiovaskulárnym chorobám [9].



Resveratrol

Obrázok č. 2: vzorec resveratrolu [9]

Chinóny

Chinóny predstavujú skupinu asi 200 žltých, červených, hnedých až takmer čiernych farbív s premenlivou štruktúrou. V prírode sa vyskytujúce farbivá sú najčastejšie odvodené od benzochinónu, naftochinónu a anthrachinónu [6].

Sú to aromatické zlúčeniny s dvomi keto- skupinami v polohe para, formálne odvodené od difenolov oxidáciou príslušných hydroxylových skupín. Chinóny sú veľmi reaktívne látky. Okrem toho, že sú stálym zdrojom voľných radikálov, tak v mikrobiálnej bunke tvoria iverzibilné komplexy s nukleofilnými aminokyselinami v proteínoch, čím spôsobujú inaktiváciu proteínov a stratu ich funkcie. Pravdepodobne tiež reagujú s povrchovými adhezidmi, polypeptidmi bunkovej steny a enzýmami viazanými na membránach [6].

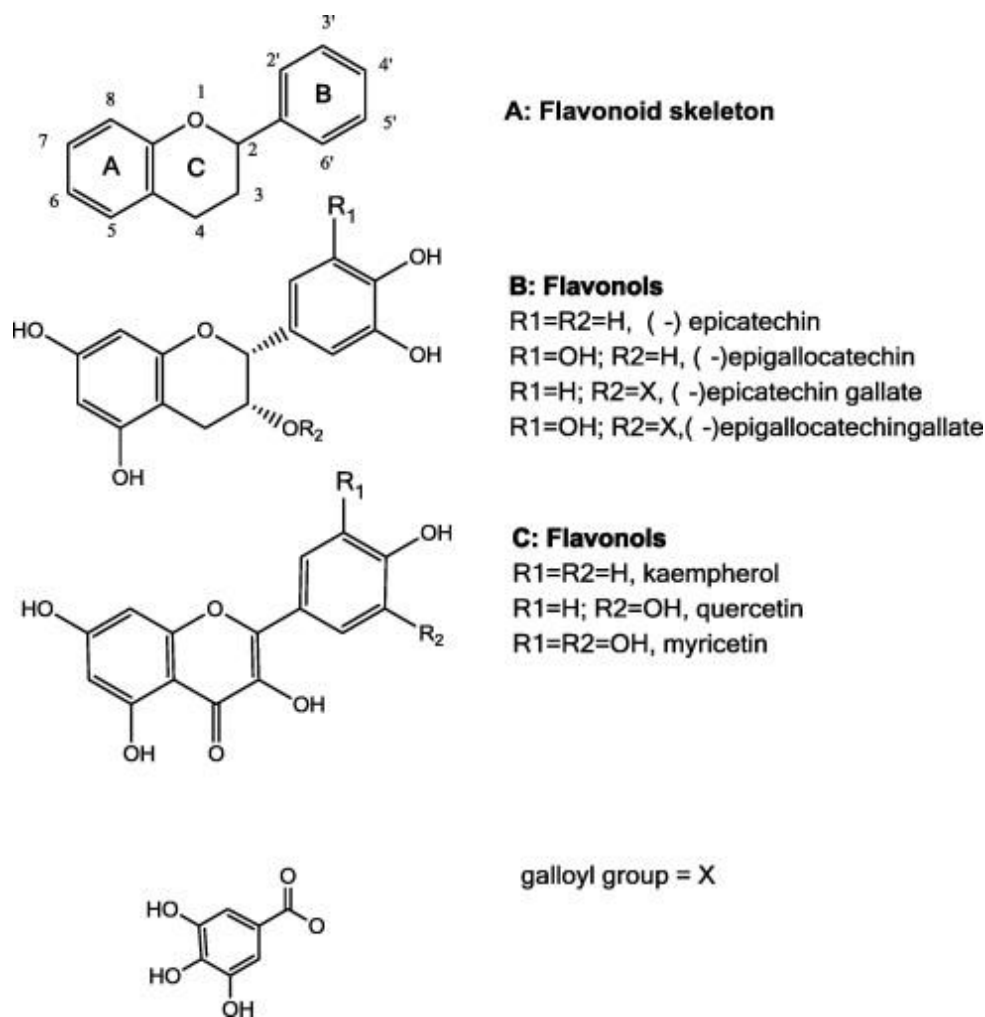
Flavonoidy

Flavonoidné látky sú vo vode rozpustné a nachádzajú sa ako farbivá v zelenine, ovocí, zrninách, v listoch a kôre stromov. Je mnoho typov týchto látok, ktoré sa vyskytujú v rôznych koncentráciách v celej rastlinnej ríši. Niektoré z nich majú až 50-krát väčšiu antioxidačnú aktivitu ako vitamíny C a E [11].

Ďalej sa rozdeľujú do kategórií: flavanoly, flavonoly, flavóny, izoflavony, flavanóny, antokyaniny, proantokyanidíny a chalkóny.

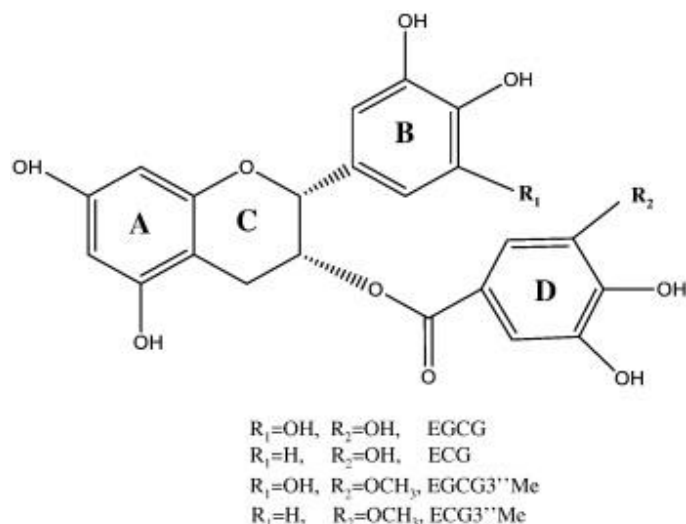
Flavanoly (napríklad epigalokatechín galát) sa nachádzajú v zelenom a čiernom čaji. Flavonoly (príklady sú kaempferol a quercetin) sa nachádzajú v cibulke, brokolici a čučoriedkach. Antokyány (napríklad cyanínový glukozid) sa nachádzajú vo vysoko pigmentovanom ovocí. Flavóny (príklady zahŕňajú: apigenín, chryzín a luteolín) sa nachádzajú v zelery. Isoflavóny (príklady sú daidzeín a genisteín) sa nachádzajú v sóji a jej spracovaných výrobkoch. Flavanóny (napríklad naringenín) sa nachádzajú v grapefruitoch [10].

Najčastejšie podtriedy flavonoidov v čaji sú flavanoly (predovšetkým katechíny) a flavanoly (ako je kvercetin). Presné vymedzenie možného počtu flavónov a flavonoidov nie je jednoznačné. Flavonoidom chýbajú hydroxylové skupiny v B-kruhu a sú aktívnejšie voči mikroorganizmom v porovnaní s tými, ktoré obsahujú dve hydroxylové skupiny, z toho vyplýva, že cieľom je práve mikrobiálna membrána a narušené sú najmä lipofilné zlúčeniny. V iných štúdiách autori tvrdia, že so stupňom hydroxylácie vzrastá antimikrobiálna aktivita. Z týchto tvrdení vyplýva nejednoznačné spojenie stupňa hydroxylácie a toxicity pre mikroorganizmy [6][12].



Obrázok č. 3: Základné skupiny flavonoidov

Flavan-3-oly, bežne nazývané katechíny, tvoria bežne okolo 30 % sušiny čajových lístkov. Flavan-3-oly sú prítomné najmä v zelenom čaji, ako hlavná zložka sa uvádza práve epigalokatechín galát (EGCG). Ostatné typy čaju, obsahujú tieto zložky v oveľa menších množstvách. Flavan-3-oly sa absorbujú v tenkom čreve a podliehajú rozsiahlemu metabolizmu. Po konzumácii zeleného čaju sú flavan-3-oly rýchlo absorbované a dosahujú maximálnu koncentráciu medzi 0,5 až 2 h po konzumácii, potom podliehajú metabolizmu a vylučujú sa ďalších 8 h. Podliehajú enzýmovým reakciám, čo vedie ku konjugácii najmä s metylom, sulfátom a glukuronidovými skupinami. EGCG je však prítomný v ľudskej plazme hlavne v jej pôvodnej forme[28].



Obrázok č. 4: Chemická štruktúra EGCG [68]

Zvýšenie biologickej dostupnosti flavan-3-olov je tiež možné pri podávaní čaju v kombinácii s ovocnými šťavami alebo s piperínom (alkaloid v čiernom korení). Iný spôsob zlepšenia absorpcie flavan-3-olov je podávanie čaju nalačno, niektoré štúdie však preukázali, že vysoké dávky zeleného čaju môžu byť potencionálne toxické [28].

Počas spracovania a pri výrobe čaju, dochádza k epimerizácii niektorých prirodzene sa vyskytujúcich flavan-3-olov, (-)-epikatechín môže byť konvertovaný na (-)-katechín, a (+)-katechín na (+)-epikatechín. Rovnakým spôsobom sa (-) - EGCG môže premeniť na (-) - GCG (gallocatechin galát). Predpokladá sa, že táto premena na epiméry spôsobuje menšiu absorpciu než prirodzene sa vyskytujúce formy, tento účinok však nie je úplne objasnený [28].

Flavonoly sú prítomné v rastlinách ako glykozidové deriváty, napr. quercetin, kaempferol a myricetín pripojený k cukrom, ako je glukóza a galaktóza. Deriváty flavanolu zaberajú iba 3 % sušiny v čajových listoch. Je zrejmé, že v porovnaní s množstvom flavan-3-olov v zelenom čaji sú deriváty flavanolu menej významné zlúčeniny, avšak množstvo týchto zlúčenín sa na rozdiel od flavan-3-olov výrazne nemení počas oxidačného spracovania na čierny čaj [28].

Hoci sú v čajových listoch flavanoly menej prítomné ako flavan-3-oly, pri porovnaní ich biologickej dostupnosti sa dokázalo, že sú oveľa lepšie absorbované ako flavan-3-oly [28].

Triesloviny

Triesloviny sú rôznorodou skupinou polyfenolov, ktoré sa tvoria ako sekundárne metabolity v rastlinách a zahŕňajú širokú škálu oligomérnych a polymérnych polyfenolov. Sú primárnou príčinou trpkkej, zvieravej alebo adstringentnej chuti, ktorá vzniká pri reakcii s proteínmi v slinách. Tieto reakcie vedú k denaturácii proteínu slín, tým k strate ich ochranného vplyvu, v dôsledku ktorého dochádza k interakcii s proteínmi ústnej dutiny.

Triesloviny sa delia na dve veľké skupiny látok:

- hydrolyzované triesloviny,
- kondenzované triesloviny [13][14].

Hydrolizované triesloviny sú odvodené od kyseliny galovej, zvyčajne ako jej viacnásobné estery s D-glukózou. Kondenzované triesloviny sú oligoméry alebo polyméry flavonoidových jednotiek. Vyskytujú sa v mnohých ovocných nápojoch, ako sú čaj, pivo, víno a šťavy, čo je významné pre ľudskú výživu, ale sú tiež široko distribuované v rôznych rastlinách a niekoľkých strukovinách [6][14].

Kondenzované triesloviny sú považované za inhibítory trávenia bielkovín a vlákien u ľudí a neprežívavcov, ktoré pôsobia v zažívacom trakte, aby sa viazali na bielkovinu a tráviace enzýmy. Na rozdiel od tohto antinutričného účinku sa ukázalo, že kondenzované triesloviny vykazujú početné biologické a farmakologické aktivity, ktoré sú zaujímavé v humánnej a veterinárnej medicíne, ako je inhibícia oxidácie lipidov, mutagenita karcinogénov a podpora nádorov [6][14].

V zelenom čaji je identifikovaných asi 5 rôznych poantikyanidínov avšak ich množstvo je v porovnaní s monomérnymi flavan-3-olmi veľmi nízke, pričom niektoré štúdie uvádzajú v čerstvom čaji množstvo až 2 g/kg. Predpokladá sa, že galoylové skupiny sú degradované počas prvej hodiny oxidačného spracovania, vďaka tomu, že sú vystavené oxidačnej polyfenoloxidáze [28].

Počas oxidačného procesu pri produkcii oolong a čierneho čaju je väčšina flavan-3-olov oxidovaných na teaflavíny (dimery) a tearubigíny (oligomery/polymery). Tieto zlúčeniny sú zodpovedné za farbu oolong a čierneho čaju. Teaflavíny majú oranžovo-červenú farbu a vykazujú trpkú chuť. Tearubigíny sú najpočetnejšou skupinou fenolických pigmentov nachádzajúcich sa v čiernom čaji a považujú sa za polymérne zlúčeniny vznikajúce počas oxidačného spracovania. Hoci tieto látky tvoria od 30-60 % rozpustnej sušiny v čiernom čaji, ich štruktúra a mechanizmus ich účinku nie je objasnený [28].

2.1.2 Terpenoidy

V rôznych častiach rastlín (kvety, listy, kôra, plody) sú obsiahnuté prchavé látky, intenzívne zapáchajúce silice. Z chemického hľadiska sú to zmesi obsahujúce rôzne organické zlúčeniny, napr. alkoholy, aldehydy, ketóny a kyseliny. Množstvo silíc v rastlinách nie je konštantné, kolísajú od tisícín percenta až po jednotky. Hlavnou zložkou sú terpény. Keď terpény obsahujú aj iné prvky, zvyčajne kyslík, sú nazývané terpenoidy [15].

Terpenoidy majú významný vplyv na tvorbu kvality čajovej arómy kvôli ich nízkym prahom zápachu a príjemným vôňam. Väčšina identifikovaných terpenoidov obsahuje jedno alebo viac stereogénnych centier, čo vedie k rôznym stereo distribúciám ich enantiomérov a diastereoizomérov v rôznych čajoch. Medzi nimi sú linalool, linaloolové oxidy, citronellol, nerolidol, citronellal, α -ionón, aspirán, α -terpineol, α -pinén, limonén, phelandrén a 4-terpineol, sú považované za známe aromatické zložky s vysokým obsahom vo väčšine čajov [16].

Významnou skupinou tetraterpénov sú farbivá karotenoidy, zložené z ôsmich izoprenových jednotiek, na rozdiel od iných terpénov je v ich molekulách rozsiahly systém konjugovaných dvojných väzieb, čím je podmienená ich farebnosť. Karotenoidy sa vyskytujú v listoch všetkých zelených rastlín, kde v membránach chloroplastov odprevádzajú chlorofyl. Najvýznamnejším je β -karotén. Pôsobí ako prirodzený antioxidant spoločne s tokoferolmi. Vo všeobecnosti rastlinné karotenoidy sú C₄₀ izoprenoidy (tetraterpenoidy), ktoré majú polyénový skelet pozostávajúci z dlhého konjugovaného systému dvojitých väzieb. Voľné a esterifikované karotenoidové zlúčeniny sa nachádzajú v prírodnom svete a voľné karotenoidy sa dajú rozdeliť ako xantofyly a karotény. V dozretom ovocí a zelenine sa určité množstvo xantofylov esterifikuje masnými kyselinami a vytvárajú xantofylové estery. Existuje približne 750 prírodných karotenoidov a ich počet stále rastie [17][32].

Karotenoidy sú veľmi nestabilné, pretože sú vysoko nenasýtené, ľahko sa zhoršujú oxidačnými procesmi a vykazujú tiež izomerizáciu. Antioxidačné vlastnosti karotenoidov sú spojené so svojimi radikálnymi zachytávajúcimi vlastnosťami dvoch reaktívnych druhov kyslíka: singletový molekulárny kyslík a peroxylové radikály. Predpokladá sa, že karotenoidy ako vysoko lipofilné molekuly sú obzvlášť účinné zachytávače reaktívneho kyslíka v hydrofóbných častiach bunkových membrán a lipoproteínov, ich hlavných transportérov, čo znižuje možnosť oxidácie membránových štruktúr a celkové riziko vzniku choroby. Rozpustnosť karotenoidov je ovplyvnená prítomnosťou a povahou polárnych substitučných skupín a izomerizáciou cis/trans [17][32].

2.1.3 Alkaloidy

Alkaloidy sú heterocyklické zlúčeniny dusíka. Prvým medicínsky príkladom alkaloidu bol morfín, izolovaný v roku 1805 z maku *Papaver somniferum*. Známe deriváty morfínu sú odeín a heroín. Diterpenoidné alkaloidy, bežne izolované z rastliny čeľade *Ranunculaceae*, majú silné antimikrobiálne vlastnosti, iné môžu byť účinné napríklad proti HIV [6].

Alkaloidy sú produktom metabolizmu rastlín. Rastliny obsahujúce alkaloidy sa vyskytujú pomerne často. V rastlinách sú alkaloidy takmer vždy v podobe solí s organickými a minerálnymi kyselinami. Medzi alkaloidy patrí kyselina nikotínová a jej amid nikotinamid. Spoločne sa radia do skupiny vitamínov B [17].

Methylxantíny (napríklad kofeín, teofylín a teobromín) sú alkaloidy prítomné v potravinových zdrojoch, ako je káva, kakao a čaj. V čajových výrobkoch predstavuje kofeín hlavný metylxantín nasleduje teobromín v oveľa menších množstvách. Kofeín je najčastejšie užívaným stimulantom na svete a denná spotreba tohto metylxantínu v káve, čaji a nealkoholických nápojoch je približne 200 mg na osobu, čo podľa niektorých autorov poskytuje farmakologicky aktívnu koncentráciu v krvi [28].

Príjem kofeínu má značný účinok na spánok, náladu, krvný tlak a výkon. Hoci má čaj značné množstvo kofeínu, v porovnaní s kávou, sú jeho účinky spojené hlavne s prítomnosťou L-theanínu, ktorý pôsobí ako antagonista účinku kofeínu najmä na krvný tlak [28].

2.1.4 Vitamíny, minerály a stopové látky

Vitamín C

Vitamín C má výrazné antioxidačné vlastnosti, teda zasahuje do oxidačno-redukčných reakcií organizmu, posilňuje imunitný systém a zlepšuje prijímanie a využitie železa a vápnika, pomáha pri strese a je prospešný pre zdravie slizníc a pokožky. Vitamín C je nevyhnutný pre metabolizmus cholesterolu v pečeni. Vitamín C je odolný voči varu, ale je citlivý na vzdušný kyslík. V čiernom čaji je 90 % obsahu vitamínu C zničených fermentáciou [29].

Je vysoko biologicky dostupný a je najdôležitejším vo vode rozpustným antioxidantom v bunkách, ako aj účinným zachytávačom reaktívnych druhov kyslíka s dvoma biologicky aktívnymi formami: kyselina askorbová a kyselina dehydroaskorbová. Antioxidačná funkcia vitamínu C je založená na jeho schopnosti ako donoru vodíka, ktorý umožňuje deaktivovať voľné radikály, ktoré zabraňujú poškodeniu bielkovín, lipidov a DNA. Vitamín C súvisí aj s tvorbou kolagénu ako súčasťou spojivového tkaniva [30].

Ostatné vitamíny

V menšom obsahu sa v čaji vyskytujú tiež vitamíny skupiny B a K. Vitamíny skupiny B sú nevyhnutné pre správne enzymatické reakcie, slúžia ako koenzými významných enzýmov. Vitamín K je dôležitý pri procese zrážania krvi [29].

Minerály a stopové prvky

Niektorí autori uvádzajú že draslík, vápnik, horčík a hliník sú prevládajúce minerály zistené v popole (10-15 %) vo vode rozpustných pevných látok čaju. Okrem toho môžu byť aj zdroj fluóru v dávke 1 mg/porcia, v závislosti od počiatocnej dávky fluoridu prítomného vo vode používanej na varenie. Všeobecne platí, že čaj nezabezpečuje denný príjem vitamínov a minerálov [28].

2.2 Antioxidanty

Antioxidanty zohrávajú dôležitú úlohu v udržiavaní ľudského zdravia, pretože sú schopné vyrovnáť nadprodukcii voľných radikálov, o ktorých sa predpokladá, že sú významnou príčinou starnutia, karcinogenézy a iných civilizačných chorôb. Za dobrý zdroj antioxidantov sa považuje práve čaj, ale aj iné druhy potravín ako ovocie, najmä bobuľové, zelenina, obilniny a iné [18].

2.1.1 Klasifikácia antioxidantov

Antioxidanty interferujú s procesom oxidácie lipidov a iných oxylabilných zlúčenín tak, že:

- reagujú s voľnými radikálmi (primárne antioxidanty) alebo redukujú vzniknuté hydroperoxydy (sekundárne antioxidanty),
- viažu do komplexov katalyticky pôsobiace kovy,
- eliminujú prítomný kyslík [12].

K primárnym antioxidantom patria všetky povolené látky: kyselina askorbová a jej deriváty, tokoferoly, fenolové látky, galáty a iné. K sekundárnym antioxidantom patria napríklad cystein, lipoová kyselina, methionin a iné prirodzene sa vyskytujúce zlúčeniny, ktoré sa však ako antioxidanty nepoužívajú [12].

Ďalšia klasifikácia je podľa pôvodu, kedy sa rozoznávajú antioxidanty:

- prírodné,
- syntetické.

Z prírodných antioxidantov sú ako aditívna povolené iba tokoferoly, ale i dnes sa získavajú prevažne synteticky. Ďalšie prírodné antioxidanty sú prítomné v rade olejov a iných tukov. Nemajú však obvykle konštantné zloženie, bývajú menej účinné a drahšie než syntetické antioxidanty [12].

Tabuľka č.1: Triedy antioxidantov a príklad funkcie [19]

| Trieda antioxidantov | Príklady | Funkcia |
|-----------------------------|--------------------------------|---|
| Primárne antioxidanty | Propyl gallát | Blokujú voľné radikály, poskytujú atóm vodíka. redukcia hyperoxidov |
| | Tokoferoly | |
| | BHA (butylovaný hydroxyanizol) | |
| | BHT (butylovaný hydroxytoluen) | |
| Vychytávače voľného kyslíka | Kyselina askorbová, askorbáty | Rekcia so singletovým kyslíkom |
| | Kyselina erytorbová | |
| Chelační činiteľa | Kyselina citrónová | Viažu kovové ióny, ktoré katalyzujú oxidáciu |
| | EDTA | |
| | Fosfáty | |

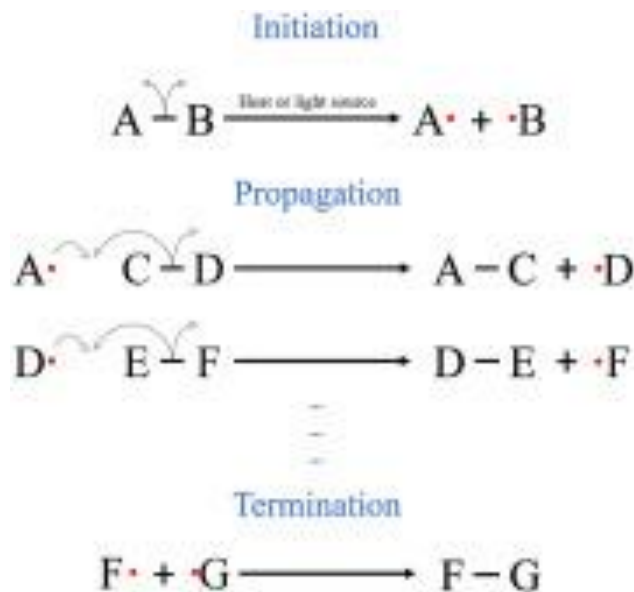
Vo všeobecnosti boli antioxidanty klasifikované ako vitamíny (kyselina askorbová, tokoferoly), karotenoidy (kondenzované triesloviny, xantofyly a karoteny), flavonoidy (flavóny, izoflavíny, flavonoly, flavanoly, flavanóny), fenolové kyseliny (kyselina hydroxybenzoová a kyselina hydroxyškoricová), fenolové alkoholy, stilbény, lignany, taníny, antioxidanty obsahujúce síru aneoformované zlúčeniny (melanoidíny) [19].

2.1.2 Voľné radikály a oxidačný stres

Chémia voľných radikálov a antioxidantov je založená na ich vzájomnej rovnováhe. Voľné radikály sú reaktívne zlúčeniny, ktoré majú tendenciu zachytávať elektróny zo stabilných biologických zlúčenín a tak sa stabilizovať. V patologických podmienkach dochádza k nadprodukcii voľných radikálov a v dôsledku prítomnosti prooxidujúcich zlúčenín alebo rôznych iných rizikových faktorov, ako je fajčenie, nadmerná fyzická únava, stres a iné, vedú práve k oxidačnému stresu [20].

Zlúčeniny, ktoré vznikajú počas procesu oxidácie, sú nielen kontraproduktívne, ale môžu byť škodlivé pre organizmus, pretože zlúčeniny ako peroxidy sú prooxidanty, ktoré vytvárajú oxidačný stres pri vstupe do organizmu. Ak v tele neexistuje dostatok antioxidantov, tieto zlúčeniny spôsobia poškodenie tkanív, ktoré môžu spôsobiť mutácie DNA alebo napadnúť akúkoľvek makromolekulu, čo spôsobí napríklad stratu enzymatickej aktivity alebo ovplyvnenie membránových lipidov ako v štruktúre, tak vo funkcii [20].

Tento proces má tri definované kroky; prvý, iniciácia, v ktorej sa vytvárajú radikály, ktoré sú v druhom kroku rozmnožované, kde reagujú s inými molekulami a nakoniec v treťom kroku ukončenie, keď sa transformujú na iné produkty [21].



Obrázok č.5: Priebeh oxidačnej reakcie [21]

Existujú tri hlavné druhy voľných radikálov:

- i. reaktívny kyslík (ROS)
- ii. reaktívne druhy síry (RSS)
- iii. reaktívne druhy dusíka (RNS)

Oxidačný stres uprednostňuje vznik vysoko reaktívnych radikálov ako je superoxid (O_2^-), hydroxylový radikál (OH), oxid dusný (NO), alkyloxy radikál (RO) a iné druhy ako peroxid vodíka (H_2O_2) a singletový kyslík (O) [21].

Ludské telo má komplexné antioxidačné obranné systémy, ktoré používajú antioxidačné enzýmy (napr. glutatiónpoxidázu, superoxid-dismutázu a katalázu) a neenzymatické antioxidanty (napr. glutatión, vitamíny E a C, tiolové antioxidanty, melatonín a karotenoidy). Takmer všetky organizmy majú antioxidačné a opravné systémy na ochranu pred oxidačným poškodením, ale tieto systémy nemôžu úplne zabrániť poškodeniu. Tento nedostatok môže spôsobiť oxidačný stres [22].

Oxidačný stres spôsobený voľnými radikálmi súvisí s vývojom viacerých ochorení, pri ktorých hrajú významnú úlohu zápaly, ako sú kardiovaskulárne ochorenia, reumatoidná artritída, astma, chronická obštrukčná choroba pľúc, neurodegeneratívne a autoimunitné ochorenia a niektoré druhy rakoviny. Voľné radikály môžu stimulovať alebo udržiavať zápalové procesy a ich neutralizácia antioxidantmi môže zabrániť zápalu. Syntetické antioxidanty, ktoré sú v súčasnosti na trhu, ako napríklad butylovaný hydroxylanizol, butylovaný hydroxyltoluén, terciárny butylovaný hydrochinón a estery kyseliny galovej, údajne spôsobujú niekoľko vedľajších účinkov [22].

2.2 Čaj

Podľa vyhlášky 330/1997 Sb. sa čajom rozumie výrobok rastlinného pôvodu slúžiaci k príprave nápoja určeného k priamej spotrebe alebo nápoj pripravený z toho výrobku [23].

Čajom pravým sa rozumie čaj vyrobený z výhonkov listov, listov alebo lúpeňov alebo jemných častí zdrevnatených častí stonky čajovníku *Camellia sinensis* [24].

Čaj je najviac rozšírený nápoj na svete hneď po vode. Je pestovaný a konzumovaný už viac než 2 000 rokov. Čaj má komplexnú štruktúru, obsahuje polyfenoly, aminokyseliny, proteíny, alkaloidy, minerály, uhľovodíky, prchavé zlúčeniny a stopové prvky. Práve vďaka prítomnosti polyfenolov, mnohé štúdie poukazujú na zdravotné benefity ako sú antikarcinogénne, antioxidačné, antimutagénne, antivirotické, antibakteriálne vlastnosti [25].

Čaj sa používa ako nápoj po celom svete, hoci spotrebiteľia menia preferencie pre stupeň fermentácie, chuť, a farbu. Čaj je všeobecne konzumovaný vo forme zeleného, oolongového, puerhového a čierneho čaju, ktoré pochádzajú z rastliny *Camellia sinensis* L. Oolong čaj je bežný v mnohých krajinách, Čína a Japonsko uprednostňuje zelený čaj. Čierny čaj je bežný najmä v západných krajinách. Pu-erh je konzumovaný najmä v Ázii [26].

2.2.1 Výroba a klasifikácia čaju

Na prípravu bylinných a ovocných čajov sa používajú korene, listy, kôra, kvety, plody, semená i celé rastliny. Na prípravu bylinných a ovocných čajov sa dajú použiť len niektoré časti rastlín, ktoré sú uvedené vo vyhláške. Niektoré časti rastlín sa dajú použiť bez obmedzení, iné do výšky 30 % hmotnosti a niektoré len do výšky 5% hmotnosti. Dôvodom obmedzení používania rastlín sú toxické látky, ktoré sú v niektorých bylinách obsiahnuté v množstvách, ktoré by mohli ohroziť ľudské zdravie [27].

Základom technológie výroby bylinných a ovocných čajov je sušenie a triedenie suroviny za podmienok špecifických pre daný druh, konečná úprava a balenie. Bylinne a ovocné čaje sa vyrábajú buď jednodruhovo alebo zmesi, sypané alebo porciované [27].

V závislosti od výrobného procesu, čaj je rozdelený na tri hlavné typy:

- nefermentovaný zelený čaj (vyrábaný sušením a parením čerstvých listov, tým sa inaktivuje polyfenoloxidáza čím sa zabráni oxidácii);
- polofermentovaný čaj oolong (čerstvé listy sú podrobené čiastočnej fermentácii pred sušením);
- fermentovaný čierny čaj a pu-erh čaj, ktoré sú podrobené fermentácii po zbere pred sušením a parením. Fermentácia čierneho čaju je kvôli oxidácii katalyzovaná polyfenoloxidázou v pu-erh čaji, je to dosiahnuté použitím mikroorganizmov [26].

Rozdiely medzi rôznymi procesmi výroby vedú k rozdielom v polyfenolickom profile medzi zeleným, oolong, čiernym a pu-erh čajom [26].

Ďalšie delenie čaju:

- ochutený čaj: zmes čaju pravého s ochucujúcimi časťami rastlín uvedených vo vyhláške, ktorých obsah nepresahuje 50 % hmotnosti zmesi,
- bylinný čaj: čaj z časti bylín alebo ich zmesí uvedených vo vyhláške alebo bylín s pravým čajom, alebo ich zmesí s ovocím, pričom obsah bylín musí byť najmenej 50 % hmotnosti,
- ovocný čaj: čaj zo sušeného ovocia a časti sušených rastlín uvedených vo vyhláške, kde podiel sušeného ovocia je vyšší než 50 % hmotnosti [23].

2.3 Ruža šípková

Rosa canina je členom rodu *Rosa* a čeľade *Rosaceae*. Rod *Rosa* obsahuje viac ako 100 druhov široko rozšírených v Ázii, Európe, na Strednom východe a v Severnej Amerike. Približne 25 % druhov rastie v Turecku, najmä v regiónoch strednej a severovýchodnej Anatólie a v studených mestách. Plody rôznych druhov sa líšia svojim chemickým zložením, ako aj vzhľadom. Na konci leta a na začiatku jesene rastliny často nesú ovocie a kvety súčasne [31][32].

Ovocie sa skladá z 30-35 % semien a 65-70 % perikarpu. Sú známe, že majú najvyšší obsah vitamínu C medzi záhradníckymi plodinami, ovocím a zeleninou [33]

Tento listnatý trvalý ker má výšku približne 2-3 m. Jeho stonky sú malé, ostré, majú zahnuté ryhy, ktoré pomáhajú rastline vyliezť. Listy sú striedavé, nepárovito zložené. Kvety *Rosa canina* sú svetlo ružové, ale príležitostne sa farba môže pohybovať medzi hlboko ružovou a bielou. Kvetina pozostáva z piatich okvetných lístkov, ktoré pokrývajú priemer 4-6 cm a nakoniec tvoria červeno-oranžové ovocie (šípky). Rastliny vykazujú silnú odolnosť voči nepriaznivým podmienkam prostredia (chudobná pôda, skalnaté miesta a obmedzovanie vody atď.). Kvety sú hermafroditné a môžu byť opelené včelami, muchami, chrobákmi [33][34].



Obrázok č. 4: Kvet (vľavo) a plody (vpravo) Ruže šípkovej vľavo (*R.canina*) [33]

Plody ruže sú už dlho používané ako bylinný čaj a vitamínový doplnok, ako aj zložky v prípravkoch niekoľkých potravinových výrobkov, ako sú polievky, džemy, želé, sirupy, víno, nápoje a nealkoholické nápoje. Plody šípku sú populárne v Európe ako bylinný čaj. V Tokatskej oblasti Anatólie v Turecku sa šípky spotrebúvajú ako džem a ovocná šťava [32][33].

V posledných desaťročiach sa plody šípku čoraz viac skúmali na svoje liečebné vlastnosti. Zistilo sa, že šípky obsahujú niekoľko biologicky aktívnych zlúčenín, ako sú flavonoidy, taníny, karotenoidy, mastné kyseliny a vitamíny (najmä vitamín C, E a provitamín A). Extrakt zo šípku bol schopný zachytávať reaktívne druhy kyslíka (ROS) [32].

2.3.1 Bioaktívne látky v Ruži šípkovej

Rôzne druhy Ruže šípkovej sa v mnohých kultúrach dlhodobo používajú na potravinárske a medicínske účely. Šípky sa používajú v mnohých potravinách a nápojoch vrátane čajov, želé, džemov a alkoholických nápojov. Ako bylinný prostriedok sa šípky používajú pri ošetrovaní pokožky, ako aj pri liečbe rôznych ochorení vrátane nachladnutia, chrípky, zápalu, chronickej bolesti a vredov [36].

Kvety Ruže šípkovej sa používajú v tradičnej čínskej medicíne, sú účinné pri rozširovaní krvných ciev a zlepšovaní mikrocirkulácie a používajú sa ako liečivé a jedlé potraviny po stovky rokov v Číne. Etanolové extrakty z kvetov sú účinné pri regulácii funkcie pečene a zlepšovaní krvného obehu. Prchavé oleje v ružových kvetoch (ružový olej) obsahujú citronellol, geraniol, nerol, eugenol, fenetylalkohol atď. Okrem kvapalných olejov kvety obsahujú aj quercitrín, horkú látku, tanín, mastný olej, organické kyseliny červený pigment, žltý pigment, vosk a β -karotén. [71][37][38].

V plodoch *Rosaceae* sú veľmi hojne zastúpené flavonoidy ako quercetin a kyselina ellagová. Galaktolipidy, menovite monogalaktosyldiaklyglycerol a digalaktosyldiakoylglycerol sa hromadia v rastlinných membránach. Niektoré galaktolipidy sú protizápalové a protinádorové. Plody šípku obsahujú tiež veľké množstvo tokoferolov. Lipofilné antioxidanty ako tokoferoly a celkovo karotenoidy majú obrovské prínosy pre zdravie. Plody ruže obsahujú karotenoidy ako chlorofyl a lykopén. Plody Ruže šípkovej sú bohaté na foláty (vitamín B), ktoré sú nevyhnutné pre ľudské zdravie, slúžia ako kofaktor mnoho enzymatických reakcií. Tilirozid, glykozidový flavonoid je obsiahnutý početne v plodoch Ruže šípkovej, ale aj v malinách alebo jahodách. Proantikyandány, koncové produkty biosynthetickej dráhy flavonoidov, dodávajú rastlinám trpkú chuť. Flavan-3-oly, katechín a epikatechín, sa podliehajú na dôležitých biologických funkciách. Ďalej sú plody Ruže šípkovej bohaté na pektín, vitamín A, vitamín B komplex, vitamín E, tiež minerály ako Ca, Mg, K, S, Si, Fe, Se a Mn [37][38].

Tabuľka č. 2: Základné zložky šípku [35]

| Základné zložky | Voda | Sušina | Bielkoviny | Lipidy | Sacharidy | Popoloviny | Vláknina |
|-----------------|-----------|------------|---------------|--------------|---------------------|----------------------|-------------|
| Obsah [g/kg] | 490 | 510 | 36 | 4,4 | 220 | 30 | 224 |
| Minerálne látky | Ca | Fe | Na | Mg | P | Cl | K |
| Obsah [mg/kg] | 1 800 | 180 | 140 | 550 | 540 | 63 | 3 200 |
| Vitamíny | A-karotén | B1-thiamín | B2-riboflavín | B6-pyridoxín | B9-kyselina listová | C-kyselina askorbová | E-tokoferol |
| Obsah [mg/kg] | 40 | 0,46 | 0,50 | 0,05 | 0,02 | 3 500 | 10 |

2.4 Metódy spektrofotometrického stanovenia bioaktívnych látok

Oxidačný stres môže nastať oslabením antioxidantnej ochrany organizmu a dlho trvajúce a intenzívne oxidačné zaťaženie môže vyčerpať alebo oslabiť antioxidantný systém. Preto je meranie jednotlivých zložiek a testovanie kapacity systému prakticky významné. Pre stanovenie obsahu antimikrobiálnych látok sa používajú najčastejšie spektrofotometrické metódy, pri ktorých sa využíva reakcia látky s niektorými činidlami za vzniku farebných zlúčenín [41][42].

Na kvantifikáciu rastlinných fenolov bolo vyvinutých množstvo spektrofotometrických metód. Tieto testy sú založené na rôznych princípoch a používajú sa na určenie rôznych štruktúrnych skupín prítomných vo fenolických zlúčeninách. Komplexácia fenolických zlúčenín s Al (III) je princíp spektrofotometrických testov používaných na kvantifikáciu celkovej kyseliny kávovej a celkových flavonoidov [39].

Nájsť špecifický štandard pre kvantifikáciu fenolov je náročné. Je to spôsobené zložitou rastlinných fenolov, ako aj existujúcimi rozdielmi v reaktivite fenolov voči činidlám použitým na ich kvantifikáciu. Okrem toho by sa mala zväziť možnosť interferencie látkami absorbujúcimi UV žiarenie, ako sú proteíny, nukleové kyseliny a aminokyseliny [39].

Bežne používané metódy pre stanovenie celkových polyfenolov sú: Metóda s použitím Pruskej modrej (Prussian Blue test), Folin-Denisová metóda, ktorá bola neskôr modifikovaná Folinom a Ciocalteuom. Sú založené na oxidačno-redukčných reakciách, v ktorých fenolátový ión je oxidovaný, zatiaľ čo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ión (Pruská modrá) alebo fosfomolybdén-fosfowolfrámové zlúčeniny (Folin-Denis) sú redukované. Reagencie Folin-Denis a Folin-Ciocalteu nie sú špecifické a detegujú všetky fenolové skupiny nachádzajúce sa v extraktoch, vrátane tých, ktoré sa vyskytujú v extrahovateľných proteínoch [44][45].

Test Folin-Denis (FD) je najrozšírenejším postupom pre kvantifikáciu celkových fenolických látok v rastlinných materiáloch. V prítomnosti fenolových zlúčenín v alkalickom roztoku nastáva redukcia činidla fosfomolybdén-fosfowolfrámovej kyseliny (Folin-Denis) na modro zafarbenú [44].

Kvantitatívne stanovenie fenolových zlúčenín pomocou Folin-Ciocalteu (FC) je rozšírená metóda. Toto stanovenie sa tiež nazýva FC polyfenolový index. Metóda je založená na redukcii činidla FC, pozostávajúceho zo zmesi fosfomolybdénanu a fosfowolfrámanu (6 + valenčného stavu kovu), polyfenolmi a merania absorbancie pri 700-760 nm. Predpokladá sa, že vzniknutá modrá farba je spôsobená redukčnými produktmi wolfrámu a molybdénu (5-valenčný stav kovu). Redukčná reakcia sa zvýši za alkalických podmienok, poskytnutých roztokom uhličitanu sodného. Celkový obsah fenolov sa zvyčajne vyjadruje ako ekvivalenty kyseliny galovej (GAE), aj keď sa na tento účel používa aj kyselina kávová a (+) - katechín. Použitím tejto metodiky sa kvantifikuje celková hmotnosť fenolových zlúčenín vo vzorke. Polymerizácia týchto zlúčenín teda neovplyvňuje celkový fenolický obsah. Naopak, je potrebné vziať do úvahy, že analýza FC neumožňuje len meranie celkových fenolov, ale FC tiež reaguje s inými redukčnými látkami. Medzi možných prispievateľov uvedených v literatúre patria aldehydy, ketóny, amíny, aminokyseliny, nukleotidy proteíny, sacharidy a vitamíny. Z tohto dôvodu by sa analýza nemala považovať za ukazovateľ celkového fenolového obsahu, ale za meradlo celkovej antioxidantnej kapacity. Nedávne štúdie ukázali, že fenolický obsah stanovený metódou FC môže korelovať s antioxidantnou aktivitou určenou niekoľkými spôsobmi [40][43].

Jednou z najpoužívanejších metód stanovenia flavonoidov je Christ-Mullerová metóda. Princípom tejto metódy je spektrofotometrická detekcia farebných komplexov Al^{3+} s hydroxylovou a karbonylovou skupinou v alkalickom prostredí. Výsledný roztok sa v prítomnosti flavonoidov zafarbí nažltlo a stanoví sa spektrofotometricky [8].

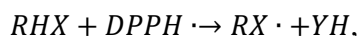
V posledných rokoch bola prijatá široká škála spektrofotometrických testov na meranie antioxidačnej kapacity potravín, z ktorých najpopulárnejšie sú kyselina 2,2'-azino-bis-3-etylbenzotiazolín-6-sulfónová (ABTS) a 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylóvú radikál (DPPH), okrem iného tiež kapacita absorpcie kyslíkových radikálov (ORAC) a redukčná schopnosť plazmy (FRAP) [46].

Väčšina testov využíva rovnaký princíp: generuje sa syntetický farebný radikál alebo redoxaktívna zlúčenina a schopnosť biologického vzorku zachytávať radikál alebo redukovať redox-aktívnu zlúčeninu sa monitoruje spektrofotometrom, pričom sa aplikuje vhodný štandard na kvantifikáciu antioxidačnej kapacity, napr. ako Trolox ekvivalentná antioxidačná kapacita (TEAC) tiež ABTS metóda, alebo vitamín C ekvivalentná antioxidačná kapacita (VCEAC). Okrem toho existujú dva typy testov. Jeden je založený na prenose elektrónov a zahŕňa redukciu farebného oxidačného činidla, napr. v testoch ABTS (TEAC), DPPH a FRAP. Druhý prístup zahŕňa prenos atómov vodíka, ako je ORAC test, pri ktorom antioxidanty a substrát súťažia o tepelne vytvorené peroxylové radikály[46][47].

Vytvorenie ABTS [2,2'-azinobis-(3-etylbenzotiazolín-6-sulfónovej kyselina)] kationu tvorí základ jednej zo spektrofotometrických metód ktoré boli použité na meranie celkovej antioxidačnej aktivity roztokov čistých látok, vodných zmesí a nápojov. Radikál je generovaný v stabilnej forme a pri reakcii s antioxidantom sa odfarbí. Táto technika popisuje priamu produkciu zelenomodrého ABTS• chromofóru medzi ABTS a presulfátom draselným. Bežné absorpčné maximá sú pri 645 nm, 734 nm, 815 nm a 415 nm. Pridaním vzorku s antioxidantmi do vopred pripraveného ABST radikálového kationtu sa obsah ABTS znižuje v závislosti od časového rozsahu, antioxidačnej aktivity vzorku a trvania reakcie. Takže rozsah odfarbenia ABTS sa určuje ako funkcia koncentrácie a času prepočítanú vzhľadom na reaktivitu Troloxu za rovnakých podmienok. Metóda je aplikovateľná na štúdium antioxidantov rozpustných vo vode a v lipidoch [41][46][47][50].

DPPH 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylóvú radikál sa odporúča pre zlúčeniny obsahujúce skupiny SH, NH- a -OH. V literatúre sa opisujú dva známe mechanizmy pôsobenia:

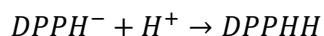
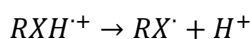
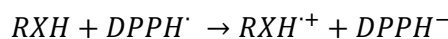
1) Mechanizmus prenosu atómov vodíka (HAT) [48]



kde X je buď atóm O, S, N alebo C a Y je DPPH.

2) Prenos jedného elektrónu s následným mechanizmom prenosu protónov (SET-PT) [48].

Druhý mechanizmus má tri kroky:



Reakcia je najčastejšie sledovaná spektrofotometricky pri 517 nm, buď po uplynutí konštantného času, alebo sa meranie vykonáva v kinetickom režime. Aktivita vzoriek sa vyjadruje v ekvivalentoch kyseliny askorbovej alebo jednotkách štandardu troloxu [49].

2.5 Mikrobiologické metódy stanovenia antimikrobiálnej aktivity

Zvyšujúcu sa odolnosť mikroorganizmov proti dostupným antimikrobiálnym látkam pozorujú vedci a lekári na celom svete. Vo všeobecnosti sa vyzorovalo, že patogénne vírusy, baktérie, huby a prvoky sú čoraz ťažšie liečiteľné existujúcimi liekmi. Testovanie antimikrobiálnej citlivosti anaeróbných baktérií s použitím zriedŕovacích metód, ako je mikrodilúcia pôdy a riedenie agaru bolo a stále je zlatým štandardom. Po mnoho rokov sa tieto metódy používali predovšetkým na výskum a sledovanie národných a lokálnych vzorcov citlivosti s cieľom vybrať vhodné antimikrobiálne látky na empirickú liečbu. Avšak vzhľadom na rastúcu rezistenciu, ktorá sa vyskytuje u mnohých častých anaeróbných baktérií, narástla potreba jednoduchších metód v rutinnom klinickom mikrobiologickom laboratóriu [51][52].

Najčastejšie sa vykonáva testovanie citlivosti na antimikrobiálne látky použitím mikrodilúcie pôdy alebo testovaním difúzie agaru a určenie minimálnej koncentrácie antimikrobiálnej látky, ktorá inhibuje rast organizmu in vitro (minimálna inhibičná koncentrácia alebo MIC). Laboratória používajú hraničné hodnoty MIC, ktoré sa pravidelne stanovujú a revidujú národnými agentúrami pre normalizáciu, aby posúdili náchylnosť organizmu k určitému antimikrobiálnemu lieku [53].

MIC pre každé antimikrobiálne liečivo testované proti organizmu je hlásené. Ide o najnižšiu koncentráciu antibiotika (zvyčajne v $\mu\text{g/ml}$), ktorá inhibuje rast organizmu in vitro. Čím je MIC nižšia, tým silnejšia je antimikrobiálna látka pri inhibícii rastu baktérií [53].

Alternatívnou metódou na stanovenie MIC je použitie metódy Etest. Použije sa prúžok, impregnovaný antibiotikom v rôznych koncentráciách, ktorý je umiestnený na doposiaľ naočkovanú agarovú platňu, čo vedie k okamžitému uvoľneniu antibiotika do média. Po inkubácii cez noc sa určuje MIC, kde elipsa prechádza pásom. Toto je veľmi užitočná metóda na testovanie jednotlivých kmeňov, ale je tiež užitočná na potvrdenie MIC stanovených metódou riedenia agaru [54].

Metódy stanovenia antimikrobiálnej aktivity:

- Zriedŕovacia – v rade riedení skúmanej látky sa stanovuje minimálna koncentrácia účinnej látky pre daný organizmus,
- nefelometrická – hodnotí sa odpoveď testovacieho organizmu na radu koncentrácií účinnej látky meraním intenzity rastu v tekutom prostredí,
- titrimetrické – hodnotí sa intenzita rastu pomocou fyzikálne-chemických zmien prostredia,
- difúzna – vyžadujú tuhé agarové médium, v ktorom je naočkovaný citlivý mikro-organizmus a testovacia látka difunduje médiom, čím spôsobuje vznik inhibičných zón. Veľkosť zón je závislá na koncentrácii testovacej látky, na zložení pôdy, vlhkosti pôdy, hrúbky vrstvy kultivačnej pôdy, pH pôdy a doby inkubácie [56].

Podľa spôsobu nanášania testovacej látky rozlišujeme metódu:

- kvapkovú – testovacia látka sa kvapne na povrch naočkovaného tuhého agarového média,
- diskovú – testovacou látkou sú nasýtené disky z filtračného papiera o priemere 6 mm, ktoré sa kladú na povrch naočkovanej agarovej platne,
- komínkovú – do naočkovanej agarovej vrstvy sa vtláčajú komínky zo skla, porcelánu alebo nehrdzavejúcej ocele s vnútorným priemerom 5 mm a do nich sa pipetujú testovacie roztoky,
- jamkovú – testovacie látky sa pipetujú do jamiek vyhlbených korkovitým priamo do naočkovanej agarovej platne [56].

Zried'ovacia (dilučná) metóda sa javí ako vhodnejšia pri skúmaní aktivity rastlinných látok. V skutočnosti má táto metóda niekoľko výhod v porovnaní s metódou difúzie agaru. Metóda riedenia je kvantitatívna, umožňuje použitie malých množstiev zlúčenín alebo rastlinných extraktov, ako aj kultivačných médií a je dobre prispôbená na liečivo určené na systémové použitie [55].

Difúzne metódy sú atraktívne kvôli ich jednoduchosti a nízkym nákladom, ale sú rovnako ako všetky agarové metódy náročné na prácu a čas. Môžu byť tiež prispôbené na stanovenie MIC pomocou zriedenia vzorky. Vyššie hodnoty MIC sa však dosiahnu pri použití metódy difúzie disku, čo nie je spoľahlivé na skrining antimikrobiálnej aktivity rastlinných extraktov [55].

Pri agarovej diskovitej alebo difúznej metóde absencia neprítomnosti inhibičnej zóny nevyhnutne neznamena, že zlúčenina je neaktívna, najmä pre menej polárne zlúčeniny, ktoré difundujú pomalšie do kultivačného média. Z tohto dôvodu difúzny test nie je vhodný pre prírodné antimikrobiálne zlúčeniny, ktoré sú ťažko rozpustné alebo nerozpustné vo vode, a preto ich hydrofóbnosť zabraňuje rovnomernej difúzii cez agarové médium [55].

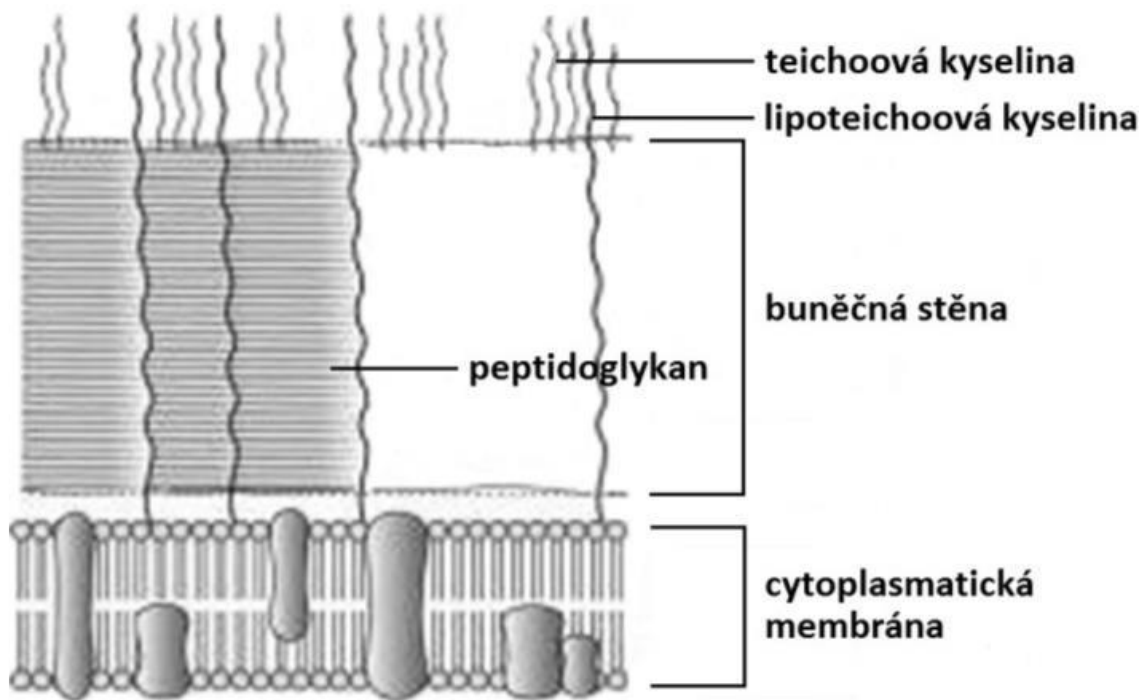
2.6 Delenie mikroorganizmov podľa bunkovej steny

Typickým znakom domény *Bacteria* je esterová väzba medzi glycerolom a masnými kyselinami a prítomnosť kyseliny muramovej v mureine. Z praktických dôvodov je doména *Bacteria* bežne členená podľa charakteru bunkovej steny do troch fenotypových oddelení:

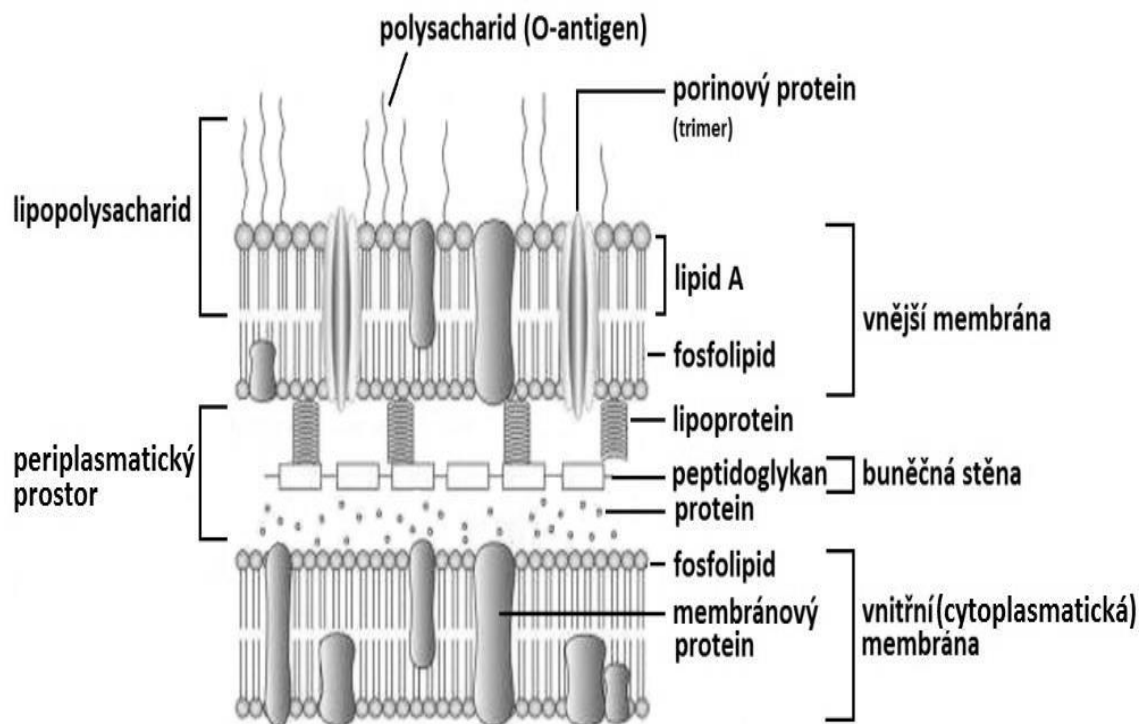
1. *Gramnegatívne baktérie* (G^-) majú bunkovú stenu zloženú z vonkajšej liposacharidovej membrány a vnútornej tenkej vrstvy peptidoglykánu. Ich bunky sú guľaté, oválne, tyčkovité, môžu tvoriť šrobovice či vlákna. Niektoré druhy tvoria pošvy či puzdrá. Reprodukujú sa priečnym delením, vzácnou pučaním, mnohonásobným delením alebo tvorbou myxospór a plodíc. G^- môžu byť fototrofné či nefototrofné, litotrofné alebo heterotrofné; aeróbne, anaeróbne, fakultatívne anaeróbne či mikroaerofilné [57].

2. *Grampozitívne baktérie* (G^+) majú bunkovú stenu, ktorá nemá vnútornú membránu a obsahuje pomerne silnú vrstvu peptidoglykánu s reťazcom teichoových kyselín. Tvar buniek je guľatý, tyčovitý či vláknitý, tyčky aj vlákna sa môžu vetviť. Reprodukujú sa obvykle priečnym delením, môžu tvoriť spóry. Niektoré gram-pozitívne baktérie tvoria endospóry. G^+ baktérie sú obvykle heterotrofné; aeróbne, anaeróbne, fakultatívne anaeróbne či mikroaerofilné [57].

3. *Mykoplazmaty* sú baktérie bez bunkovej steny, nie sú schopné syntetizovať prekursor peptidoglykánu a sú preto rezistentné k inhibítorom syntézy bunkovej steny. Bunka mykoplazmatov je obklopená iba cytoplazmatickou membránou a preto sú morfológicky pleomorfné. Rozmnožujú sa pučaním, fragmentáciou alebo priečnym delením. Až na výnimky sú nepohyblivé a netvoria kľudové štádia [57].



Obrázok č.5: Bunková stena grampozitívnych baktérií [58]



Obrázok č.5: štruktúra gramnegatívnych baktérií [58]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Zoznam použitých prístrojov

Spektrofotometer – UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic, Anglicko

Vortex – Reax Top, Heidolph, Nemecko

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

Mikropipety Biohit Proline

Autokláv – Vaposteri BMT, Brno

Biologický inkubátor P 100-U, Biotech Praha

3.2 Zoznam použitých chemikálii

Destilovaná voda

Ethanol 96% (VWR)

Folin-Ciocalteho činidlo (Sigma–Aldrich Chemie GmbH)

Uhličitan sodný (LACHEMA)

Kyselina gallová (PENTA)

Dusitan sodný (PENTA)

Katechín (LACHEMA)

Chlorid hlinitý (PENTA)

Hydroxid sodný (LACHEMA)

3.3 Analyzované vzorky čajov

V tejto diplomovej práci boli použité dve vzorky čajov Ruža kvet, BIO od Firmy Sonnentor a Šípok oplodie, zbavený semien od firmy Valdemar Grešík-Natura s.r.o. Obe čajové vzorky boli pripravené podľa tradičných metód na meranie antioxidačnej aktivity, celkovej koncentrácie polyfenolov a flavonoidov a stanovenie inhibičného účinku.



Obrázok č. 6 Analyzované vzorky čajov Použitý čaj z kvetu firmy Sonnentor [69] Použitý Šípkový čaj firmy Valdemar Grešík –Natura s. r. o. [70]

3.4 Charakteristika použitých mikroorganizmov

V tejto diplomovej práci boli testované 4 mikroorganizmy. Jedna gramnegatívna baktéria *Serratia marcescens*, a tri grampozitívne baktérie *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*. Baktérie pochádzali z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne. Baktérie boli kultivované na univerzálnom agare Nutrient Agar No. 2 (HIMEDIA) 24 hodín pri 27 °C.

3.4.1 Charakteristika použitých gramnegatívnych baktérii

Bunkové steny gramnegatívnych baktérií (G) sú komplexnejšie, obsahujú relatívne malé množstvá peptidoglykán a veľké množstvo proteínov, lipidov a lipopolysacharidov [59].

Vo všeobecnosti sú gramnegatívne baktérie menej citlivé na antimikrobiálne látky z dôvodu lipopolysacharidovej vonkajšej membrány tejto skupiny, ktorá obmedzuje difúziu hydrofóbných zlúčenín. To však neznamená, že grampozitívne baktérie sú vždy náchylnejšie. Gram-negatívne baktérie sú zvyčajne odolnejšie voči antimikrobiálnym látkam rastlinného pôvodu a dokonca nemajú takmer žiadny účinok v porovnaní s grampozitívnymi baktériami [72].

Serratia marcescens

Serratia marcescens patrí do čeľade *Enterobacteriaceae*, zahrňujúca gramnegatívne črevné tyčinky, má veľký význam z hygienického hľadiska. Jedná sa o nesporetné tyčinky, peritrichné alebo bez bičíkov, ktoré majú respiračný aj kvasný metabolizmus [60].

Môže byť súčasťou ľudskej mikrofóry, ale nachádza sa aj v neživých nádržiach s nízkym obsahom živín, v nemocniciach, ako sú umývadlá, intravenózne tekutiny a detský šampón. Tieto zásobníky môžu byť niekedy zdrojom nosokomiálneho prepuknutia. Rod *Serratia* je podmienenne patogénny, čo znamená že môže spôsobiť ochorenie iba vo vyšších koncentráciách [61][62].

Bunky *Serratia marcescens*, podobne ako všetky ostatné bunky rodu *Serratia*, majú tvar veľmi krátkych tyčínok, niekedy až kokovitého tvaru, s priemerom ani nie 1 µm. Vyskytujú sa jednotlivito alebo v krátkych reťazkách [60].

Bunky sa rozmnožujú delením. Optimálna teplota ich rastu je okolo 25°C pri 37°C prestanú rásť. Sú fakultatívne aeróbne. Z glukózy a z iných cukrov tvoria CO₂ a H₂, takisto kyselinu octovú, mravčiu, jantárovú, acetylmetylkarbinol a 2,3-butylénglykol. Z dusičnanov tvoria dusitany. Ich významnou vlastnosťou je tvorba červeného pigmentu – prodigizínu. Vyznačujú sa aj amylolytickou a proteolytickou enzýmovou činnosťou [60].

Serratia marcescens dobre rastie na všetkých základných bežných pôdach a veľmi dobre, ak pridáme k týmto pôdam škrob. Na agare tvorí okrúhle kolónie s priemerom 1 až 3 mm, riedke, hladké a červeno sfarbené. Kolónie na mäsovepeptidovej želatíne sú riedke, červeno sfarbené, s vlnivým okrajom. Pri vpichu do želatíny skvapalňuje želatínu a povrchový prírast je červený. Bujón kalí difúzne s červeným okrajom a usadeninou [60].

3.4.2 Charakteristika použitých grampozitívnych baktérii

Grampozitívne baktérie nemajú vonkajšiu membránu, ale proteíny, lipoproteíny a ďalšie makromolekuly sú spojené s cytoplazmovou membránou a peptidoglykánom. Teichoové a lipoteichoové kyseliny sú kyslé polyméry glycerolu alebo ribitolu a viažu sa na peptidoglykán a cytoplazmatickú membránu [63].

Bacillus subtilis

Rod *Bacillus* je veľmi rozsiahly a v prírode veľmi rozšírený. Jeho druhy tvoria väčšinou peritrichné tyčinky, ktoré majú bohaté enzýmové vybavenie, takže môžu rozkladať najrôznejšie organické zlúčeniny [60].

Grampozitívne baktérie (G^+) vo všeobecnosti majú komplexné obaly obsahujúce jednu dvojvrstvovú lipidovú membránu, ktorá oddeľuje cytoplazmu od vonkajšej časti bunky. Membrána je súčasťou veľmi komplexnej štruktúry, ktorá obsahuje mnoho vrstiev (až 40 v prípade *B. subtilis*) mureínu alebo peptidoglykánu, komplex peptidov obsahujúcich D-aminokyseliny (najmä mezodiaminopimelovú kyselinu) a aminokyseliny cukru. Obal buniek má tiež niekoľko vrstiev kyseliny teikovej [64].

Bacillus subtilis (BS) je baktéria tvoriaca endospóry. Tvorba biofilmu je rysom *Bacillus subtilis*, ktorý vytvára rezistenciu tejto baktérie proti antimikrobiálnym činidlám a environmentálnym rozdielom [65].

Bacillus cereus

Bacillus cereus (BC) je grampozitívna, tyčinková, sporotvorná baktéria, ktorá má schopnosť rásť pri rôznych teplotách a pH. Z dôvodu konzumácie potravín kontaminovaných baktériou *B. cereus*, hnačky vznikajú dva typy chorôb. Emetický syndróm je zvyčajne spojený so škrobovitými potravinami, ako je vyprášaná ryža, cestoviny atď. Ochorenie je spôsobené požitím vopred vytvoreného toxínu v potravinách (t.j. intoxikácia). Hnačkový syndróm je na druhej strane spojený s inými typmi potravín, ako je mlieko, šaláty a mäso. Na rozdiel od emetického syndrómu je hnačkové ochorenie spôsobené požitím veľkého množstva bakteriálnych buniek (t.j. toxikologických infekcií). Zdraví jedinci sa zvyčajne zotavia z choroby *Bacillus cereus* počas jedného alebo dvoch dní, ale pacienti, ktorí majú iné zdravotné problémy, môžu utrpieť vážne komplikácie. Na kontrolu tejto baktérie v potravinách je potrebné správne varenie a rýchle ochladenie, aby sa zabránilo klíčeniu spór. [60][66].

Micrococcus luteus

Micrococcus luteus (ML) je aeróbný, žltopigmentovaný, aeróbný mikrokok, ktorý patrí do rodu *Micrococcus*. Všetky sledované kmene sú grampozitívne koky veľkosti 0,9 až 1,8 μm , usporiadané do nepravidelných zhlukov tetradov. Kolónie sú kruhové a hladké s lesklým alebo matným povrchom. Všetky kmene tvoria žltý alebo žltkastý vo vode nerozpustný pigment. Všetky kmene hydrolyzujú želatínu a sú citlivé na lysozým [67].

Bunková stena tejto baktérie pozostáva z peptidoglykánu s aniónovým mukopolysacharidom, ktorý sa nazýva kyselina teichurónová. Teichurónová kyselina je tvorená opakujúcimi sa jednotkami D-glukózy a N-acetyl-d-mannosaminurónovej kyseliny, ktorá sa kovalentne viaže na peptidoglykán baktérie cez fosfodiesterovú väzbu [67].

3.5 Príprava kultivačného média

Na prípravu kultivačného média bol použitý Nutrient agar No.2 od firmy HIMEDIA. Na 1000 ml destilovanej vody bolo použitých 40 g prípravku, následne bol roztok sterilizovaný v autokláve pri 121 °C po dobu 15 minút.

Tabuľka č.3: Zloženie kultivačného média

| zložka | Obsah (g/l) |
|-----------------|-------------|
| Mäsovy peptón | 10,0 |
| Hovädzí extrakt | 10,0 |
| Chlorid sodný | 5,0 |
| agar | 15,0 |
| Mäsovy peptón | 10,0 |
| Hovädzí extrakt | 10,0 |

3.6 Príprava čajových extraktov

3.6.1 Príprava výluhov

Príprava vodného výluhu

Do sterilnej fľašky so skrutkovacím uzáverom bola navážaná vzorka čaju o hmotnosti 10 g. Obsah bol zaliaty 100 ml destilovanej vody o teplote 100 °C. Z takto pripraveného výluhu boli odoberané vzorky v čase 0, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minút minút, ktoré boli podrobené meraniu.

Príprava etanolového výluhu

Do sterilnej fľašky so skrutkovacím uzáverom bola navážaná vzorka čaju o hmotnosti 10g. Obsah bol zaliaty 100 ml 96% etanolu. Z takto pripraveného výluhu boli odoberané vzorky v čase 0, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minút, ktoré boli podrobené meraniu.

3.6.2 Príprava macerátov

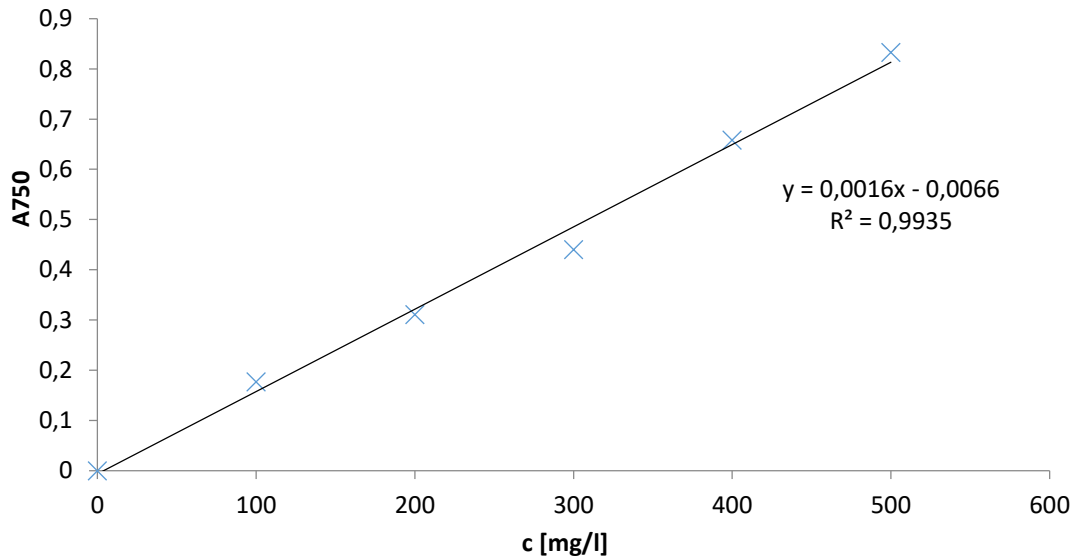
Príprava etanolového macerátu

V sterilných fľašiach so skrutkovacím uzáverom boli pripravené etanolové maceráty o koncentracii 0, 20, 60, 80 a 96 %. Navážka 10 g vzorku bola zaliata 100 ml roztoku etanolu o rôznej koncentracii, a vzorky boli macerované 5 dní bez prístupu svetla a pri laboratórnej teplote. Vzorky na analýzu boli odoberané v 24 hodinových intervaloch 0, 24, 48, 72, 98 a 120 hodín uchované v mrazničke pri - 4°C

3.7 Stanovenie celkových polyfenolov

Príprava kalibračnej krivky:

Kalibračná krivka bola zostrojená pre roztok kyseliny gallovej v rozmedzí 100 až 500 mg/ml. Absorbancia získaných roztokov bola meraná pri 750 nm.



Obrázok č. 7: Kalibračná krivka kyseliny gallovej

Tabuľka č.4: Objem použitých roztokov

| roztok | Objem V [ml] |
|--------------------|--------------|
| Folin-Ciocaltauovo | 1 |
| Vzorka čaju | 0,1 |
| Uhličitan sodný | 1 |
| Destilovaná voda | 1 |

Príprava vzoriek:

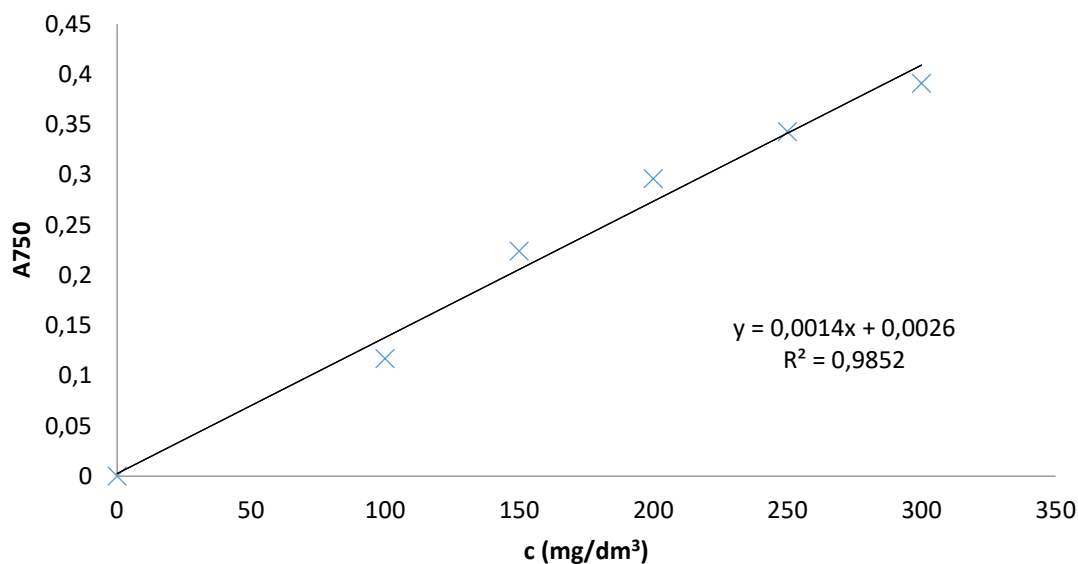
Stanovenie obsahu celkových polyfenolov sa prevádza spektrofotometrickou metódou s Folin-Ciocaltauovým činidlom. Najskôr bol prípravný roztok nasýteného uhličitanu sodného (29,4 g uhličitanu sodného v 100 ml vody) a zriedený roztok Folin-Ciocaltauovo činidla v pomere 1:9.

Do skúmaviek bolo napipetovaných vždy 1 ml zriedeného Folin-Ciocaltauovo činidla, 1ml destilovanej vody a 100 µl extraktu vzorky. Každá vzorka bola analyzovaná v troch paralelných stanoveniach. Roztok v skúmavkách bol premiešaný a nechaný stáť. Po piatich minútach bolo do každej skúmavky k roztoku pridané po 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného a opäť bolo všetko premiešané. Po 15 minútach bola zmeraná absorbancia pomocou UV/VIS spektrofotomeru pri $\lambda = 750$ nm proti slepej vzorke, kde bolo miesto 100 µl extraktu vzorky použitých 100 µl destilovanej vody. Pre výpočet obsahu celkových polyfenolov vo vzorke bola zostrojená kalibrácia pre roztok kyseliny gallovej o koncentráciách 0,1 až 0,5 mg/ml

3.8 Stanovenie celkových flavonoidov

Chemikálie: dusičnan sodný 5%, chlorid hlinitý 10%, hydroxid sodný 1 mol/dm³, 1 mol katechín
Príprava kalibračnej krivky

Kalibračná krivka bola zostrojená pre roztok katechínu o koncentráciách 100, 150, 200, 250, 300 mg/ml. Absorbancia získaných roztokov bola meraná pri 510 nm.



Obrázok č. 8: Kalibračná krivka katechínu

Tabuľka č. 5: Objem použitých roztokov pre stanovenie flavonoidov

| roztok | Objem V [ml] |
|---------------------|--------------|
| Vzorka čaju | 0,5 |
| Destilovaná voda | 2,5 |
| Dusičnan sodný 5% | 0,2 |
| Chlorid hlinitý 10% | 0,2 |
| Hydroxid sodný | 1,5 |

Príprava vzoriek:

Do skúmavky bolo vždy napipetované 0,5 ml extraktu, 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Roztok v skúmavkách bol dôkladne premiešaný a nechaný stať 5 minút. Potom sa do skúmaviek pridal 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, opäť sa premiešal a ponechal stať 5 minút. Nakoniec sa pridalo 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilovanej vody. Po 15 minútach boli vzorky analyzované pomocou UV/VIS spektrofotometru pri vlnovej dĺžke =510 nm.

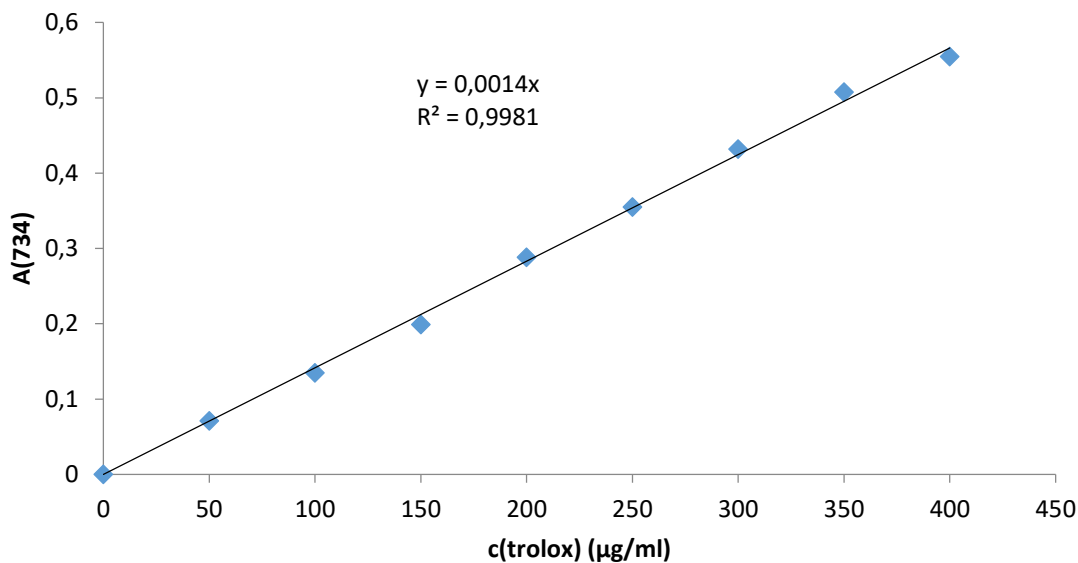
Slepá vzorka bola pripravená z 0,5 ml extraktu a 4,4 ml destilovanej vody. Pomocou zostavenej kalibračnej krivky katechínu bolo vypočítané množstvo celkových flavonoidov vo vzorke.

3.9 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Radikál katiónu ABTS bol pripravený reakciou ABTS diamónnej soli s peroxidisíranom draselným. Bol pripravený roztok ABTS o koncentracii 7 mM, rozpustením ABTS v destilovanej vode. Radikálový katión z ABTS bol potom získaný reakciou s 2,45 mM peroxidisíranom draselným. Vzniknutý roztok bol ponechaný stáť v tme pri laboratórnej teplote 12 hodín.

Pred použitím bol ABTS•+ zriedený etanolom na absorbanciu 0,70 pri 734 nm oproti etanolu. Do zúženej kyvety bol napipetovaný 1 ml ABTS•+ a 10 µl použitého extrakčného rozpúšťadla (destilovaná voda alebo etanol) a bola zmeraná absorbancia A_0 v čase $t = 0$. Potom bol do ďalšej kyvety napipetovaný 1 ml ABTS•+ a 10 µl extraktu vzorky. Kyveta bola na 10 minút uložená do tmy a potom bol zmeraný pokles absorbancie A_{10} .

Kalibračná rovnica troloxu bola pripravená v rozmedzí koncentrácií 50–400 µg/ml.



Obrázok č. 9: Kalibračná krivka troloxu

3.10 Overenie antimikrobiálnej aktivity

Pre overenie antimikrobiálnej aktivity extraktov bola použitá jamková difúzna metóda. Do 150 ml sterilizovaného kultivačného média bol pridaný 1 ml bujónu s 24 hodinovou kultúrou baktérie. Toto inokulum bolo vnesené do sterilných petriho misiek do požadovanej výšky. Po stuhnutí agaru boli korkovrtom o priemere 1 cm vytvorené 4 jamky v každej miske. Do jamiek bolo napipetovaných 100 µl sledovaného extraktu, pričom jedna jamka bola zvolená ako kontrolná, naplnená daným rozpúšťadlom. Vzorky boli kultivované 72 hodín pri 27 °C. Po dokončení kultivácie boli sledované inhibičné zóny v okolí jamiek.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto diplomovej práce bolo, stanovenie koncentrácie biologicky aktívnych látok ako sú polyfenoly a flavonoidy a posúdiť celkovú antioxidačnú kapacitu v extraktoch čajov s obsahom šípky. A za druhé, pozorovať vplyv rôznych faktorov ako sú druh čaju, spôsob prípravy extraktu, rozpúšťadlo, koncentrácia na G⁺ a G⁻ baktérie.

Pripravených bolo 16 extraktov, z ktorých boli postupne v určenom čase odoberané vzorky na analýzu. Celkovo bolo analyzovaných 88 vzoriek, vodné a etanolové výluhy s časom lúhovania 0, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 minút, a etanolové maceráty s koncentráciou 0, 20, 40, 60, 80 a 96 % etanolu, vzorky macerátov boli odoberané každých 24 hodín po dobu 5 dní. Analyzované boli dve vzorky čajov: Šípok oplodie od firmy Vlademar Grešík Natura s.r.o a Růže poupata, od firmy Sonnentor.

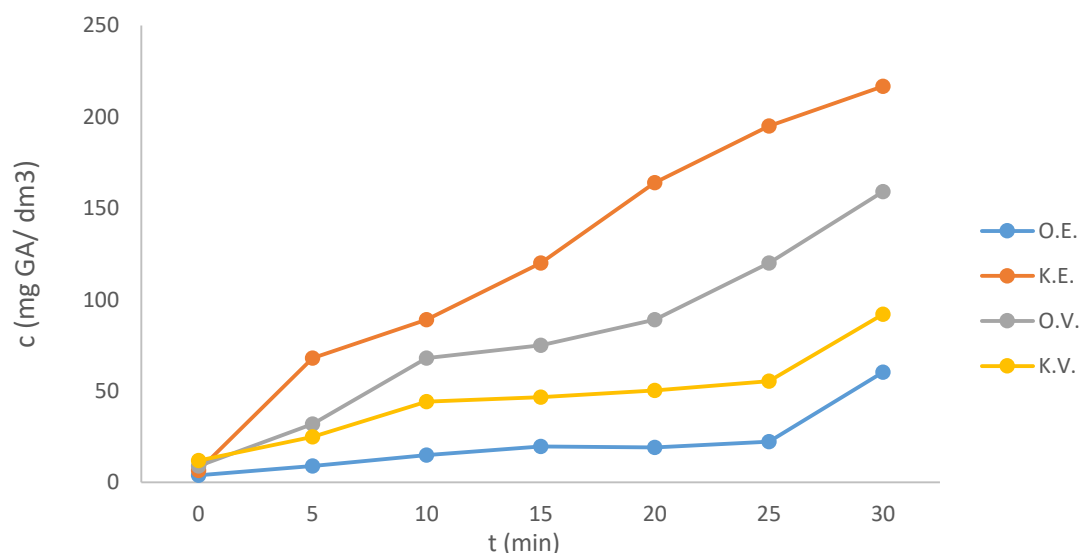
4.1 Stanovenie celkových polyfenolov

Celkový obsah polyfenolov v čajových extraktoch bol stanovený spetrofotometricky pomocou Follin-Ciocaltauo činidla pri vlnovej dĺžke 750 nm. Táto metóda je založená na redukcii fenolických látok obsiahnutých v extraktoch za pozorovania farebných zmien. Každá vzorka bola premeraná trikrát a z priemernej hodnoty absorbancie bol pomocou kalibračnej regresnej rovnice kyseliny gallovej vypočítaný celkový obsah polyfenolov (obrázok č.7). Regresná rovnica kyseliny gallovej bola stanovená na: $A = 0,0016 \cdot c - 0,0066$.

Vypočítaná koncentrácia je vzťahnutá na mg kyseliny gallovej v dm³ vzorku (mg GA/dm³).

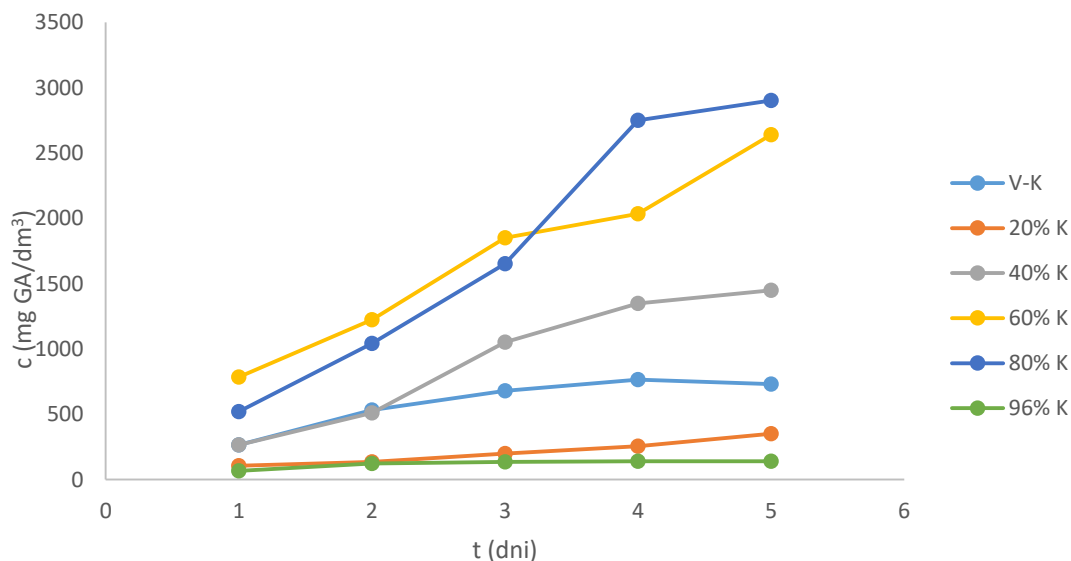
Celkový obsah polyfenolov v jednotlivých testovaných vzorkách je zobrazený na obrázkoch č. 10 až č. 12, Obrázok č. 13 zobrazuje porovnanie obsahu celkových polyfenolov vo všetkých testovaných vzorkách.

Z obrázku č. 10 vyplýva, že najväčší obsah polyfenolov vo vodných a etanolových výluhov mal práve etanolový výluh z kvetu, najnižší obsah mal etanolový výluh z oplodia.



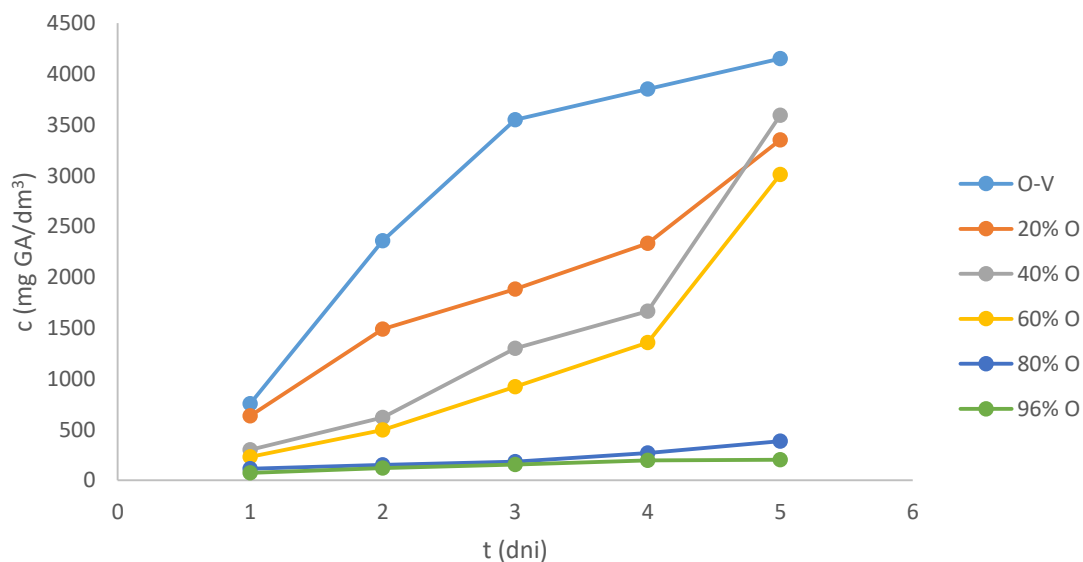
Obrázok č. 10: Graf závislosti nárastu koncentrácie polyfenolov vo výluhoch na čase

Na obrázku č. 11 je vyobrazený priebeh macerácie jednotlivých extraktov z kvetu šípku o rôznej koncentrácii v rôznom čase. Z tohto obrázku je zjavné, že polyfenoly obsiahnuté v kvete šípku sa najlepšie vylučujú do etanolu o koncentrácii 60 a 80 % etanolu, najhoršie do 96% etanolu.



Obrázok č. 11: Graf závislosti nárastu koncentrácie polyfenolov v etanových macerátov kvetov na čase

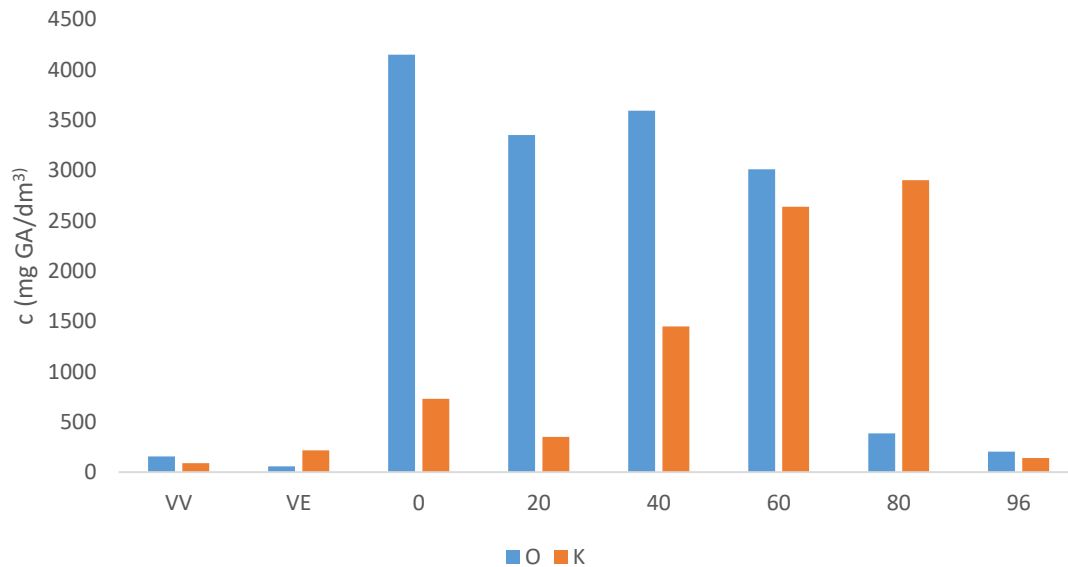
Na obrázku č. 12 je vyobrazený priebeh macerácie jednotlivých extraktov z oplodia šípku o rôznej koncentrácii v rôznom čase. Z tohto obrázku je zjavné, že polyfenoly obsiahnuté v oplodí šípku sa najlepšie vylučujú do vody a najhoršie do etanolu so stúpajúcou koncentráciou. Do 96% etanolu sa polyfenoly vylúčili len vo veľmi malom množstve po celú dobu macerácie. Môžeme si povšimnúť, že vysoká koncentrácia etanolu nie je vhodná na maceráciu šípku, a polyfenoly sa najlepšie extrahujú práve do nižších koncentrácií etanolu alebo vody.



Obrázok č. 12: Graf závislosti nárastu koncentrácie polyfenolov v etanových macerátov oplodia na čase

Pri porovnaní obrázku č. 11 a č. 12 je vidieť, že obsah polyfenolov je značne vyšší v macerátoch oplodia šípku. Pri porovnaní metódy získavania polyfenolov si môžeme povšimnúť, že pri krátkom lúhovaní sme namerali najvyššiu hodnotu polyfenolov práve v kvete šípku etanole, no pri dlhšom macerovaní bola hodnota v 96 % etanole najnižšie, obsah polyfenolov sa po prvotnom vylúčení zvyšoval len veľmi málo.

Z obrázku č. 13 vidíme, že najvyšší obsah polyfenolov v oplodí bol stanovený v macerátoch oplodia s koncentráciou 40, 60, a 80 % etanolu. Najmenší obsah bol stanovený vo vodných a etanolových výluhov, aj keď čas lúhovania (30 minút) a macerácie (5 dní) bol značne odlišný.



Obrázok č. 13: Porovnanie obsahu celkových polyfenolov v sledovaných extraktoch oplodia a kvetu

Najvyššia koncentrácia polyfenolov bola stanovená vo vodnom maceráte oplodia. Celkovo boli koncentrácie polyfenolov v oplodí väčšie ako v kvete šípky. Najvyššia koncentrácia polyfenolov v kvete bola stanovená v 80 % maceráte, o niečo nižšia v 60 % maceráte. Z toho vyplýva, že pri získavaní polyfenolov z oplodia je vhodnejšia voda, pri získavaní polyfenolov z kvetu šípku, etanol.

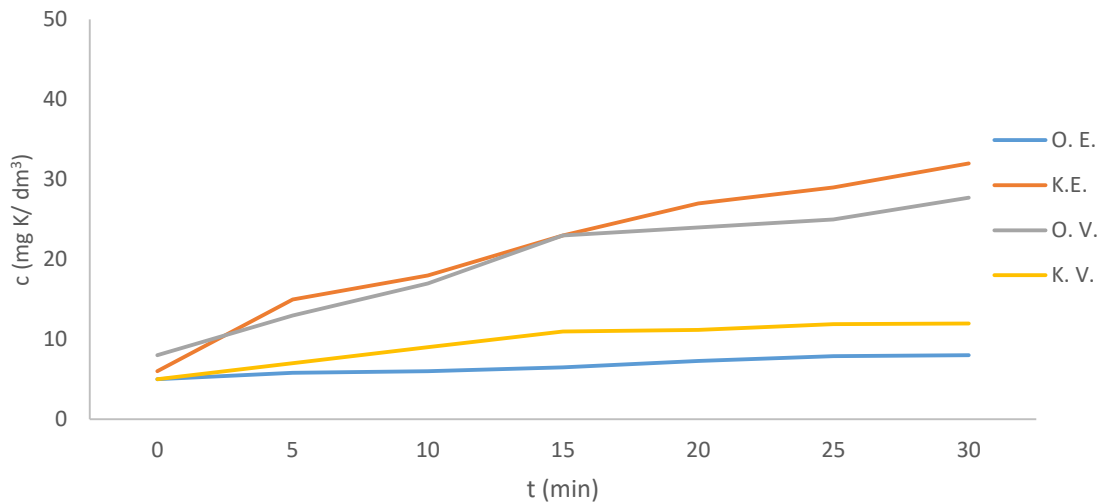
4.2 Stanovenie flavonoidov

Obsah flavonoidov v čajových extraktoch bol stanovený spektrofotometricky pomocou reakcie hlinitej soli s dusitanom za vzniku farebných komplexov a meraní pri vlnovej dĺžke 510 nm. Každá vzorka bola premeraná trikrát a z priemernej hodnoty absorbancie sa za pomoci kalibračnej regresnej rovnice katechínu vypočítal obsah flavonoidov.

Regresná rovnica katechínu bola stanovená na $A = 0,0014 \cdot c - 0,0026$ (obrázok č. 8). Vypočítaná koncentrácia je vzťahnutá na mg katechínu v dm^3 vzorky ($\text{mg K}/\text{dm}^3$).

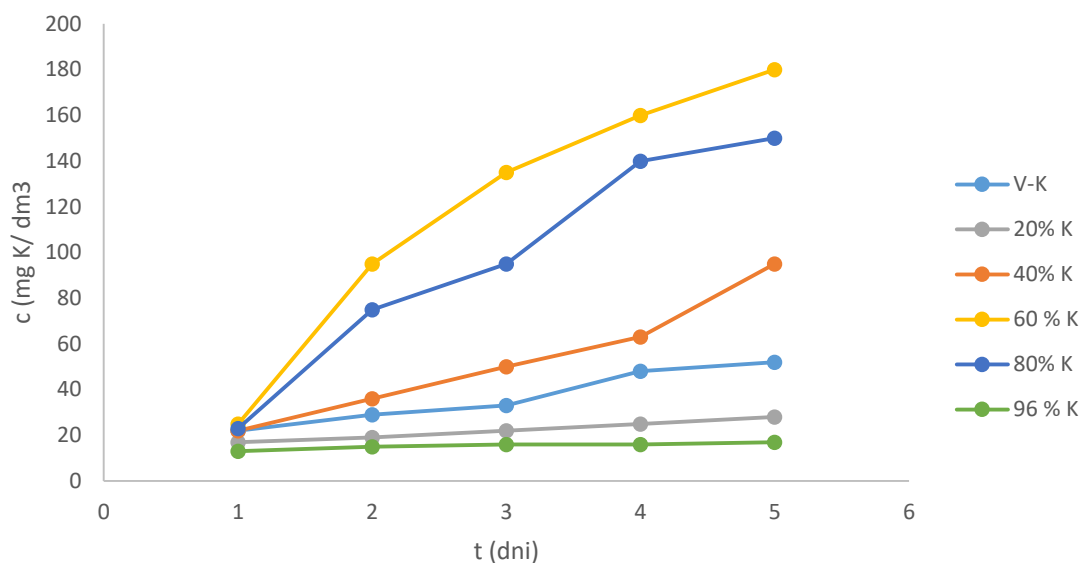
Celkový obsah flavonoidov v jednotlivých testovaných vzorkách je zobrazený na obrázkoch č. 14 až č. 16, obrázok č. 17 zobrazuje porovnanie obsahu celkových flavonoidov vo všetkých vzorkách.

Z obrázku č. 14 vyplýva, že najväčší obsah flavonoidov vo vodných a etanolových výluhov mal podobne ako pri stanovení polyfenolov, etanolový výluh z kvetu, najmenší etanolový výluh z oplodia.



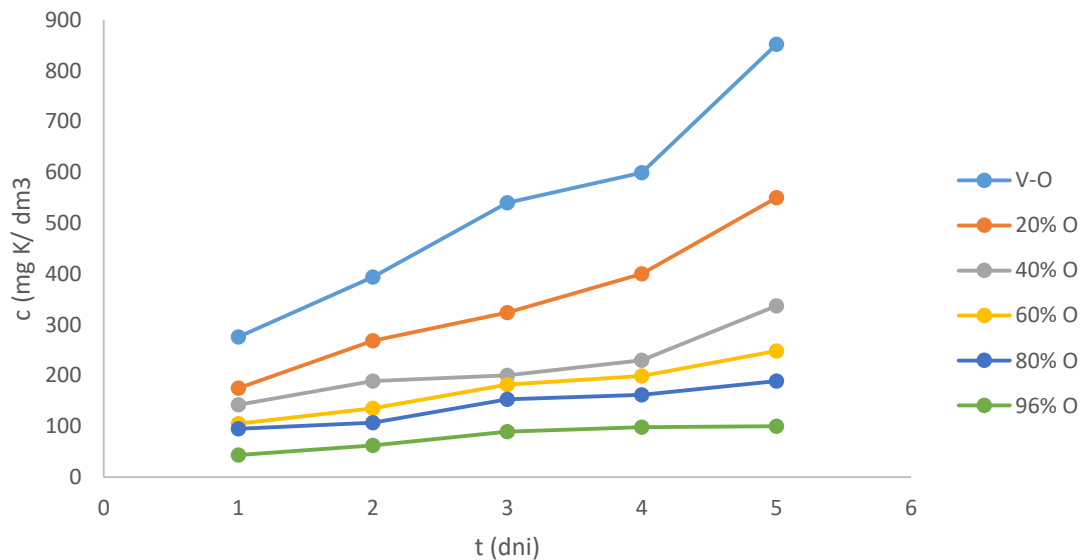
Obrázok č. 14: Graf závislosti nárastu koncentrácie flavonoidov vo výluhoch na čase

Pri sledovaní obsahu flavonoidov v maceráte kvetu, obrázok č. 15, vidíme, že situácia je práve opačná, väčšie množstvo flavonoidov sa vylúčilo do vyšších koncentrácií etanolu, 96 % etanol však už na macerovanie kvetov šípku nieje vhodný. Najväčšia koncentrácia flavonoidov bola stanovená v 60% etanole a v 80 % etanole, najmenšia v 20% etanole a v 96% etanole.



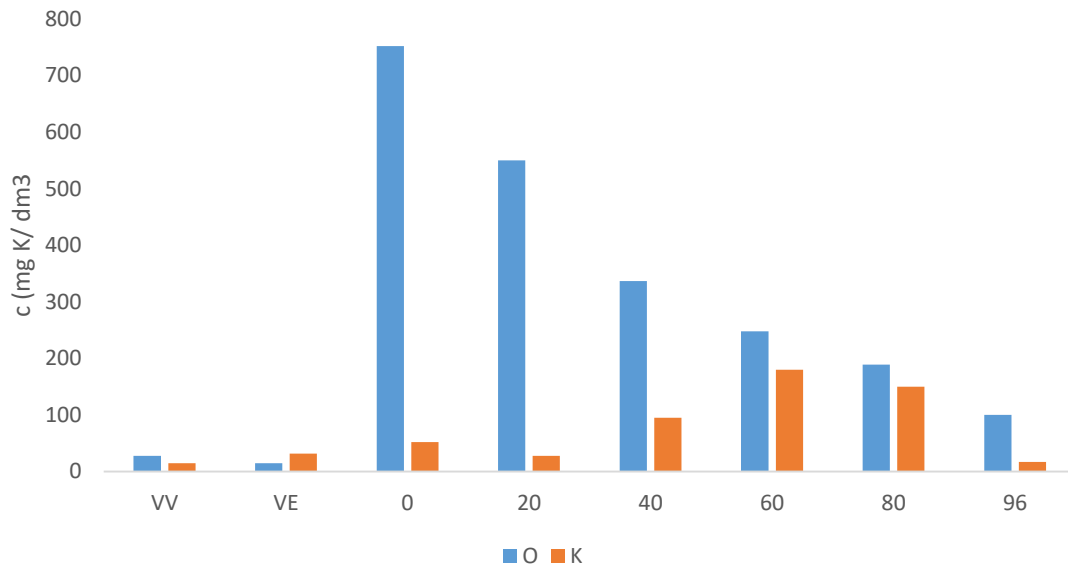
Obrázok č. 15: Graf závislosti nárastu koncentrácie flavonoidov v etanových macerátov kvetu na čase

Na obrázku č. 16 je zobrazený priebeh macerácie šípku oplodia v rôznych koncentráciách etanolu. Z tohto obrázku vyplýva, že najviac flavonoidov obsahoval vodný macerát, hneď za ním 20% etanový macerát, najmenej flavonoidov obsahoval 96% a 80% etanový macerát. Obsah flavonoidov v maceráte klesá so stúpajúcou koncentráciou etanolu.



Obrázok č. 16: Graf závislosti nárastu koncentrácie flavonoidov v etanových macerátov oplodia na čase

Porovnanie koncentrácií flavonoidov vo všetkých testovaných vzorkách je vyobrazené na obrázku č. 17. Na tomto obrázku je dobre pozorovateľný rozdiel medzi obsahom flavonoidov v oplodí a kvete v závislosti na koncentrácii rozpúšťadla, koncentrácia flavonoidov v oplodí klesá so stúpajúcou koncentráciou etanolu a koncentrácia flavonoidov v kvete macerátu stúpa so stúpajúcou koncentráciou etanolu, až na menšie výchyľky.



Obrázok č. 17: Porovnanie obsahu flavonoidov v sledovaných extraktoch oplodia a kvetu

4.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Pre stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity čajových extraktov bola použitá metóda ABTS, ktorej princíp spočíva v meraní schopnosti vzorky zahasovať radikál ABTS•+. Výsledná antiradikálová aktivita vzorky bola porovnávaná s antimikrobiálnou aktivitou syntetickej štandardnej látky-derivátu vitamínu E s názvom trolox. Zahasenie radikálu ABTS•+ antioxidantami, ktoré sa správajú ako donory vodíka, bolo sledované spektrofotometricky na základe zmien absorpčného spektra ABTS•+.

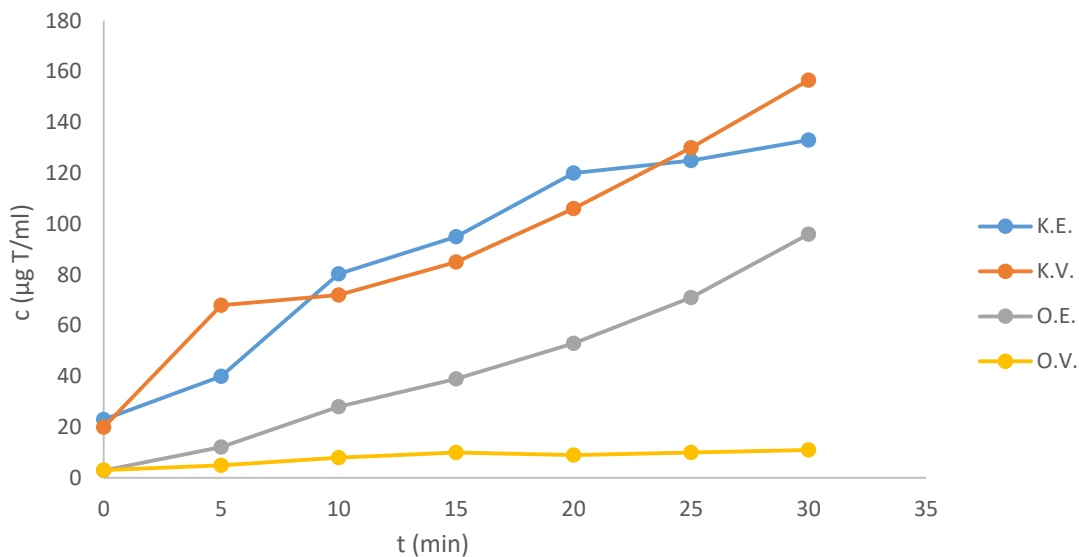
Výsledná absorbancia vzorky bola vypočítaná podľa vzťahu:

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

kde A_0 je absorbancia ABTS•+ v čase t_0 , A_{10} je absorbancia vzorky s roztokom ABTS•+ zmeraná 10 minút po pridaní vzorky. Každá vzorka bola premeraná trikrát a z priemernej hodnoty absorbancie bola vypočítaná celková antioxidačná aktivita vzorky pomocou regresnej rovnice kalibračnej krivky troloxu. Regresná rovnica troloxu bola stanovená na $A = 0,0014 \cdot c$. Vypočítaná koncentrácia je vzťahnutá na μg troloxu v ml vzorky ($\mu\text{g T/ml}$).

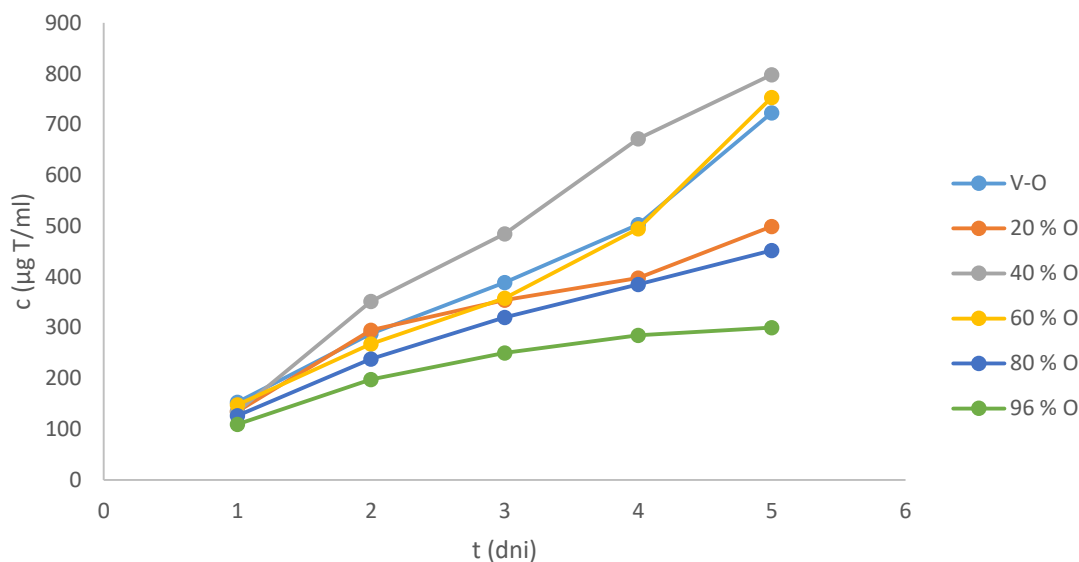
Výsledné namerané hodnoty antioxidačnej aktivity extraktov sú zobrazené na obrázkoch č. 18 až 20, obrázok č. 21 zobrazuje porovnanie antioxidačnej aktivity u všetkých stanovovaných extraktov.

Obrázok č. 18 zobrazuje antioxidačnú aktivitu výluhov, najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazuje výluh kvetu vo vode v 30 minútach, porovnateľný s antioxidačnou aktivitou kvetu v etanole v 30 minútach. Najnižšiu antioxidačnú aktivitu vykazoval etanolový výluh oplodia.



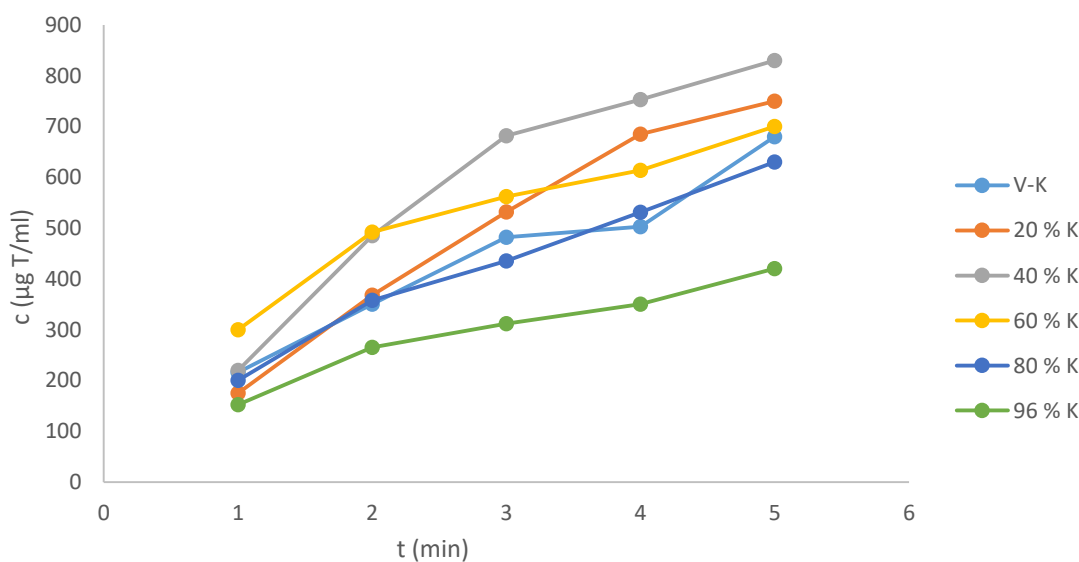
Obrázok č. 18: Graf závislosti nárastu antioxidačnej aktivity vo výluhoch na čase

Priebeh macerácie oplodia šípku v etanole zobrazuje obrázok č. 19. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykázal 40% macerát z oplodia, o niečo menšiu 60% a vodný macerát. Najnižšiu antioxidačnú aktivitu vykázal 96% etanolový macerát.



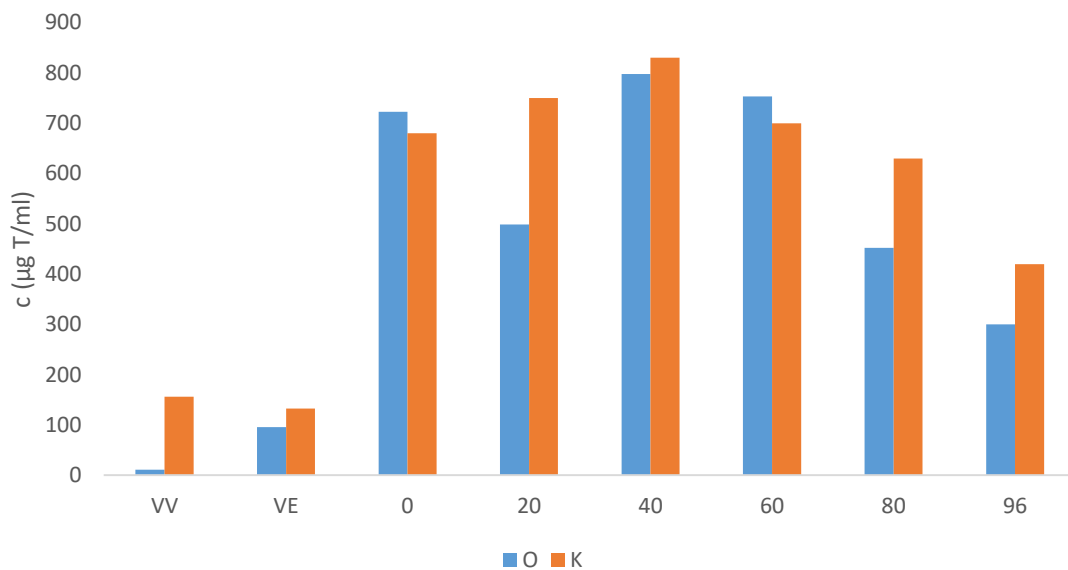
Obrázok č. 19: Graf závislosti nárastu antioxidačnej aktivity v etanolových macerátov oplodia na čase

Pri porovnaní priebehu macerácie kvetu šípku, obrázok č. 20 je výsledok podobný výsledkom oplodia. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazuje 40% macerát kvetu, najnižšiu 96% etanolový macerát.



Obrázok č. 20: Graf závislosti nárastu antioxidačnej aktivity v etanolových macerátov kvetu na čase

Obrázok č. 21 zobrazuje všetky výsledky antioxidačnej aktivity extraktov. Z týchto výsledkov vyplýva, že v šípku a kvete nie sú výrazné odchýlky v antioxidačnej aktivite, o niečo vyššiu aktivitu má kvet šípku. Najväčšia antioxidačná aktivita oplodia a kvetu bola stanovená v 40% etanole. Najnižšia, keď neberieme do úvahy výluhy, ktorých čas lúhovania bol podstatne nižší ako macerácie, bola stanovená v 96% etanole.



Obrázok č. 21: Porovnanie antioxidačnej aktivity v sledovaných extraktoch oplodia a kvetu

4.4 Overenie antimikrobiálnej aktivity

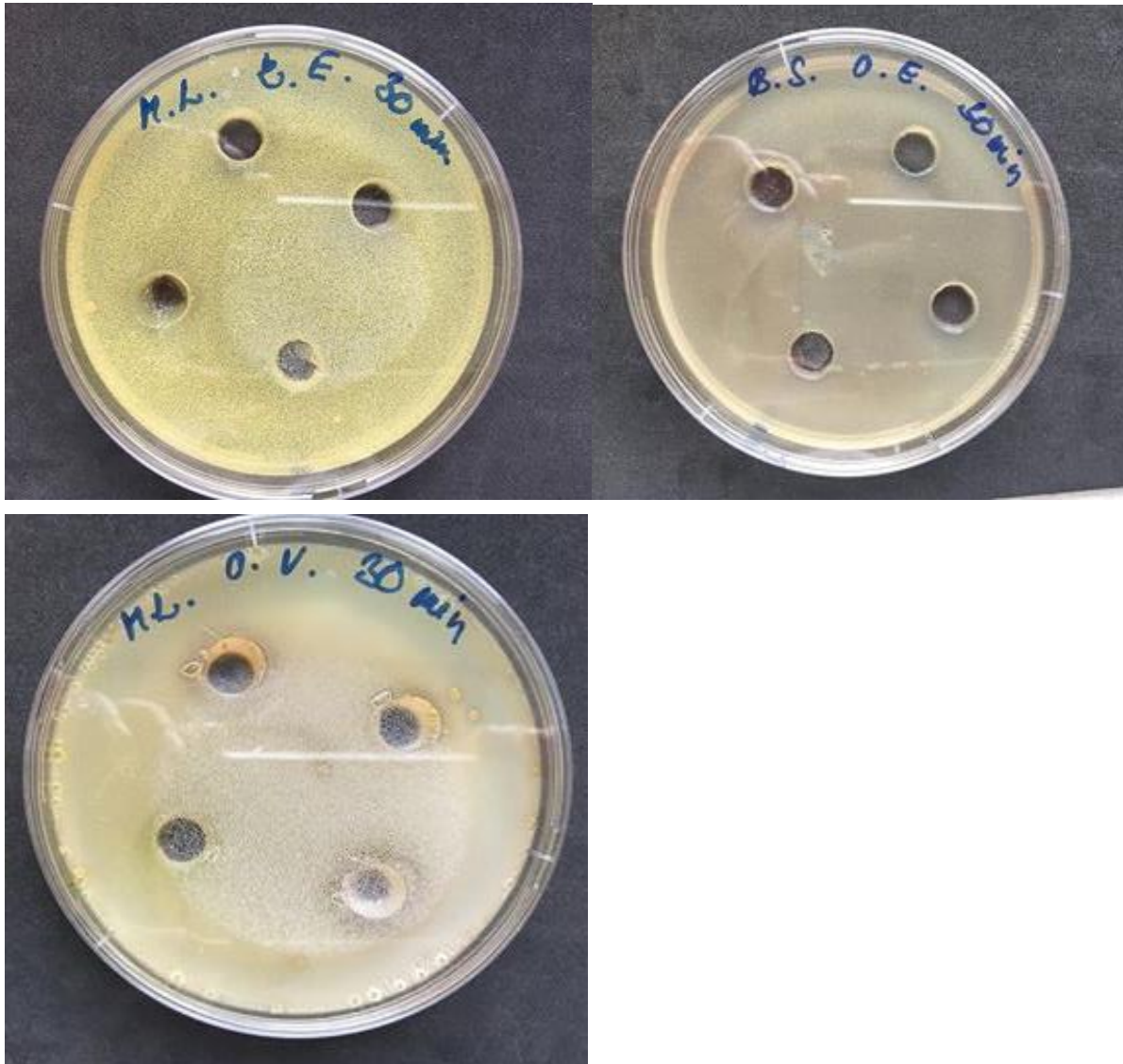
Antimikrobiálna aktivita testovaných vzoriek bola prevádzaná difúznou jamkovou metódou. Vybraná bola jedna gramnegatívna baktéria *Serratia marcescens*, a tri grampozitívne baktérie *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*. Tieto baktérie boli kultivované na univerzálnom agare 24 hodín pri 27°C a potom prenesené do bujónu na 24 hodín pri 27°C. Testované boli vzorky s najvyšším antioxidantným účinkom: 30 minútové výluhy oplodia a kvetu, odber z macerátu v 5. dni šípku a oplodia.

V tabuľke č. 6 sú vyobrazené veľkosti inhibičných zón účinných extraktov.

Tabuľka č.6: Prehľad veľkosti inhibičných zón účinných macerátov šípku kvetu a oplodia proti vybraným mikroorganizmom

| Extrakty | Maceráty | | | | | | Výluhy | | | |
|----------|------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|------------|---|---------------|---|
| | Šípok kvet | | | Šípok oplodie | | | Šípok kvet | | Šípok oplodie | |
| MO | 20 | 40 | 60 | 0 | 20 | 40 | V | E | V | E |
| BC | x | 0,7 ± 0,1 | x | x | x | x | x | x | x | x |
| ML | 1,9 ± 0,1 | 2,2 ± 0,3 | 2,0 ± 0,2 | 1,1 ± 0,1 | 0,6 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1 | x | x | 0,6 ± 0,1 | x |

Na obrázku č. 22 sú zobrazené vybrané výsledky z testovania antimikrobiálnej aktivity výluhov. Okrem vodného výluhu šípku oplodia proti *ML*, výluhy nevykazovali žiadny pozorovateľný antimikrobiálny účinok proti testovaným mikroorganizmom.

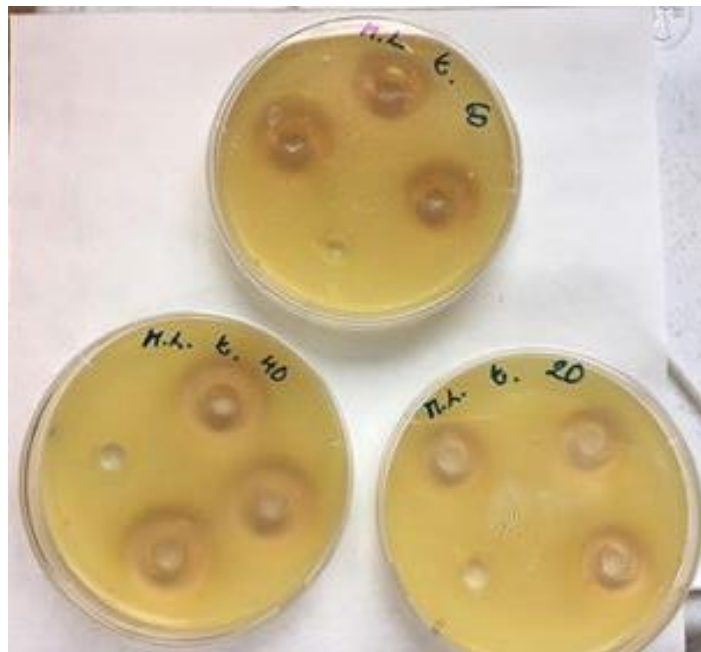


Obrázok č. 22 Porovnanie inhibičných zón etanolových výluhov kvetu 30 minút (vľavo) proti *ML*, oplodia (vpravo) proti *BC*, a vodného výluhu oplodia voči (30 minút) *ML* (vľavo dole)

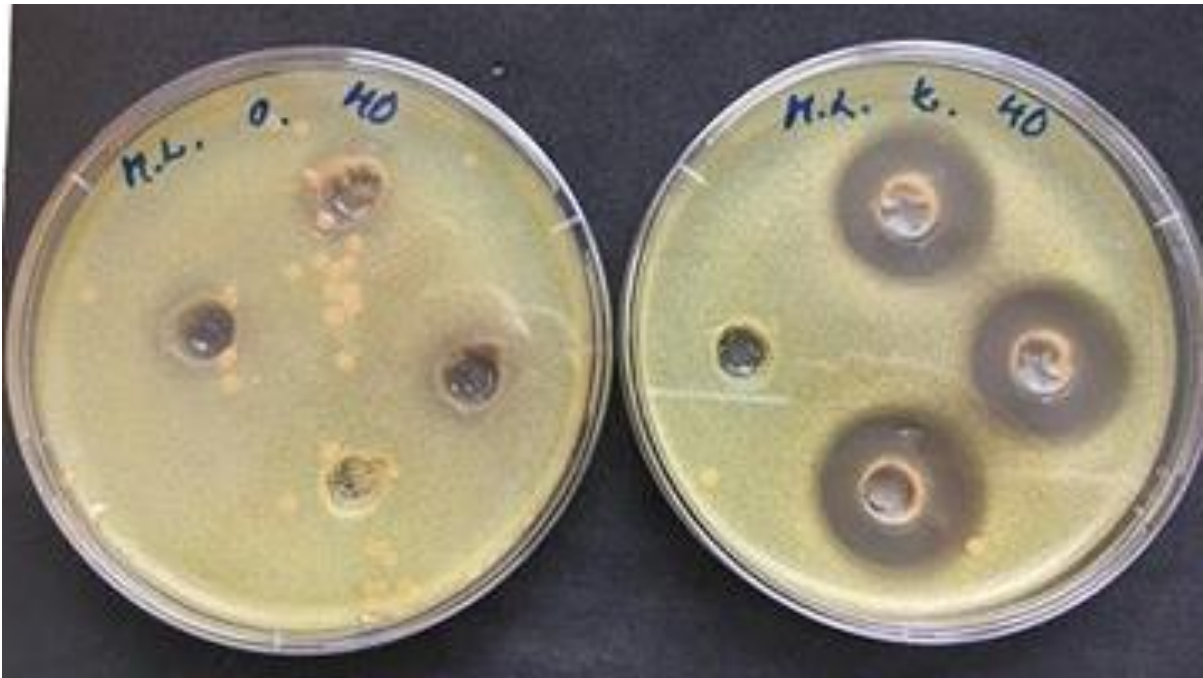
Na obrázkoch č. 23 až 29 sú pozorovateľné inhibičné zóny macerátov. Z toho vyplýva, že tieto maceráty majú určitý inhibičný účinok na testované mikroorganizmy. Z výsledkov testovania vybraných macerátov vyplýva, že účinné boli maceráty z šípku kvetu proti *Micrococcus luteus*, v koncentráciách 20, 40 a 60 % etanolu. Taktiež je pozorovateľný mierny účinok macerátu z šípku kvetu pri 40 % etanole voči *Bacillus cereus*. Z testovaných extraktov oplodia boli účinné 0, 20 a 40 % etanolové maceráty.

Proti *Serratia marcescens* a *Bacillus subtilis* neboli účinné žiadne z testovaných macerátov, naopak, z obrázkov č. vyplýva, že mierne podporujú rast *Bacillus subtilis*.

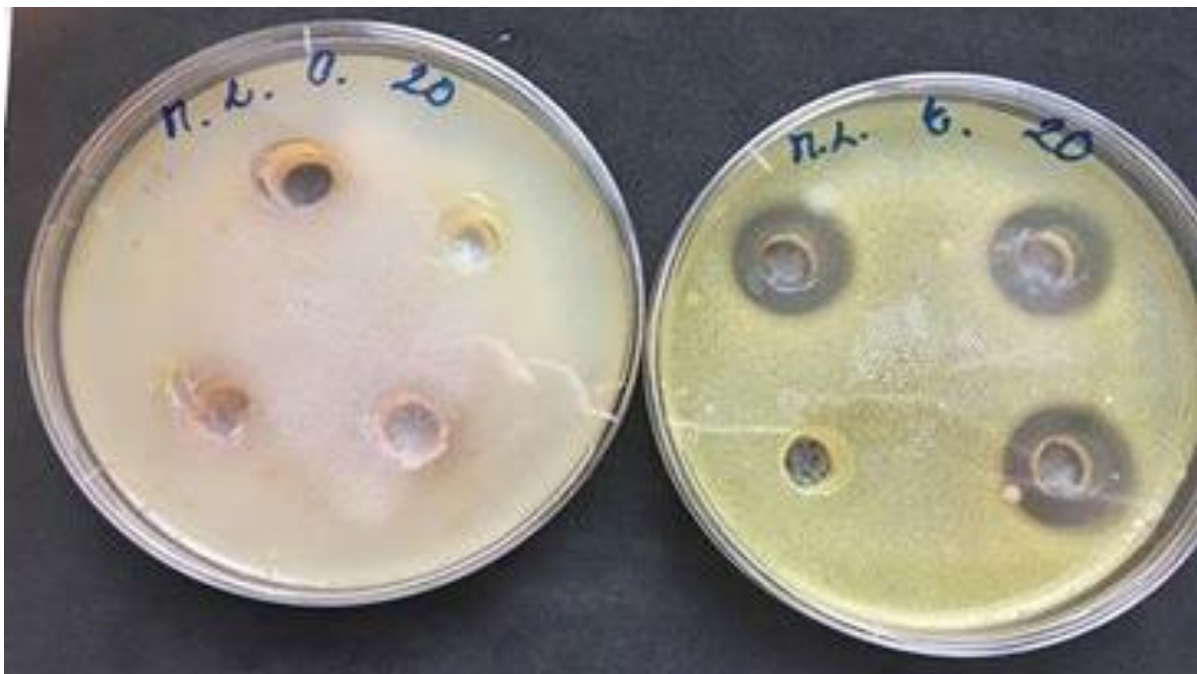
Najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu vykazujú teda maceráty šípku kvetu pri koncentrácii 40 % etanolu pri veľkosti inhibičnej zóny $2,2 \pm 0,3$ cm.



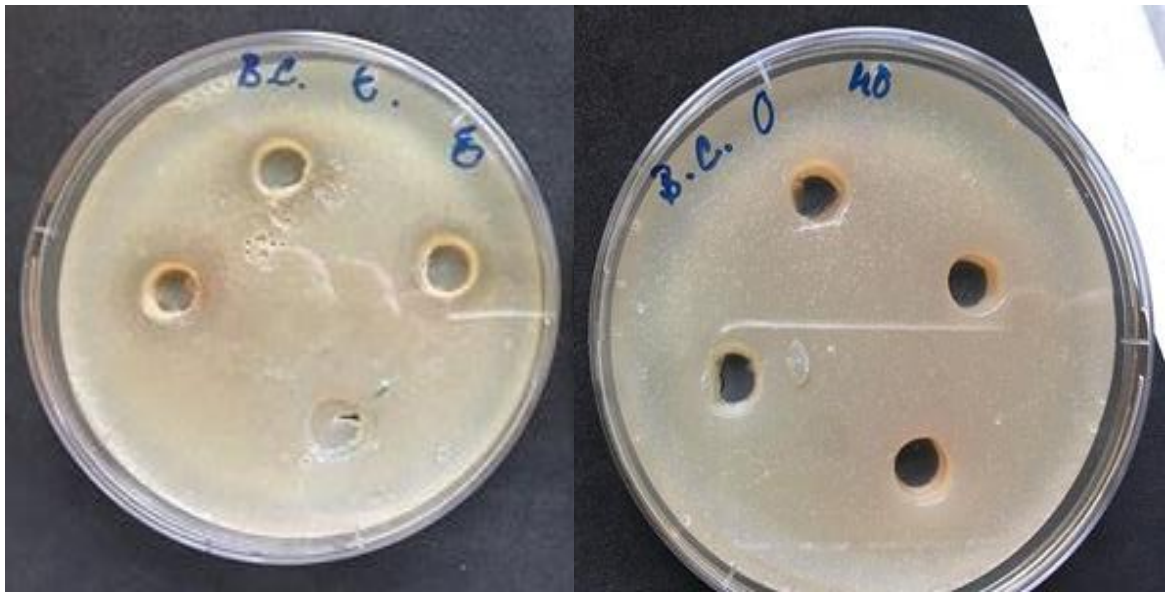
Obrázok č. 23 Porovnanie inhibičných zón 20, 40 a 60% macerátov šípku kvetu proti ML



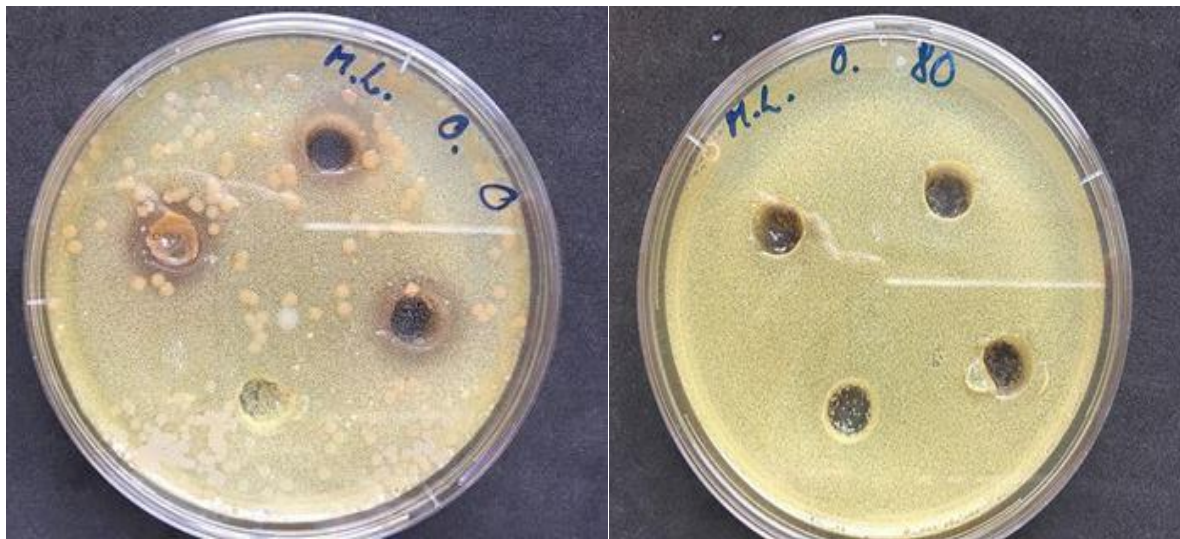
Obrázok č. 24 Porovnanie inhibičných zón macerátov oplodia 40% etanolu (vľavo) a kvetu 40% etanolu (vpravo) proti ML



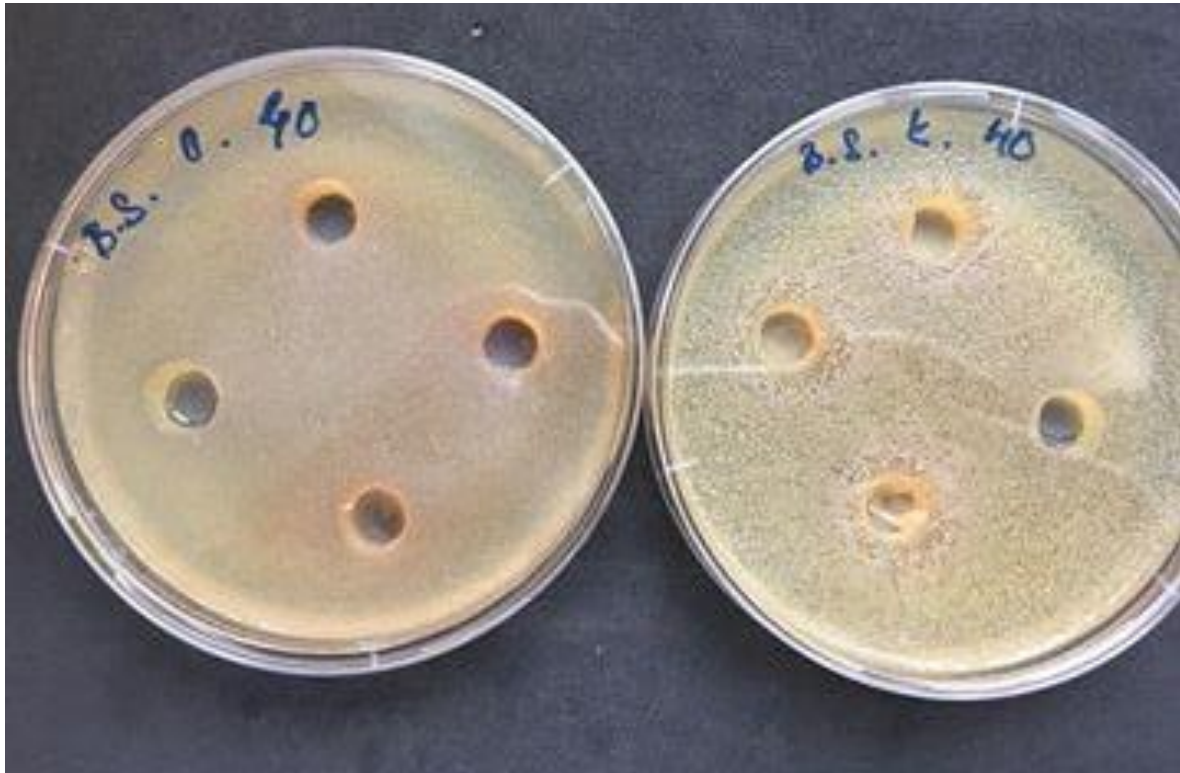
Obrázok č. 25 Porovnanie inhibičných zón 20% macerátov oplodia (vľavo) a kvetu (vpravo) proti ML



Obrázok č. 26 Porovnanie inhibičných zón 40% macerátov kvetu (vľavo) a oplodia (vpravo) proti BC



Obrázok č. 27 Porovnanie inhibičných zón macerátov oplodia 0 % etanolu (vľavo) a oplodia 80% etanolu (vpravo) proti ML



Obrázok č. 28 Porovnanie inhibičných zón 40% macerátov oplodia (vpravo) a kvetu (vľavo) proti BS



Obrázok č. 29 Porovnanie inhibičných zón macerátov kvetu 60% etanolu (vľavo) a kvetu 80% etanolu (vpravo) proti SM

5 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo stanovenie koncentrácie celkových polyfenolov, flavonoidov, antioxidačnej aktivity a antimikrobiálneho účinku vybraných druhov čajov Ruže šípkovej. Ako testované vzory čajov boli vybrané dva druhy: šípkok oplodie a šípkok kvet. Testovaných bolo 88 vzoriek s rozličnou koncentráciou etanolu a rozličným časom lúhovania alebo macerácie. Boli pripravené vodné a etanolové výluhy s časom lúhovania od 0 do 30 minút, pričom odber vzorky bol každých 5 minút. Maceráty boli pripravené o rôznej koncentrácii etanolu: 0, 20, 40, 60, 80 a 96 %. Macerácia prebiehala 5 dní, pričom vzorky boli odoberané každých 24 hodín.

Porovnávanie koncentrácií bioaktívnych látok a antioxidačnej aktivity výluhov a macerátov nie je relevantné vzhľadom k rozdielnym časom pôsobenia čaju v rozpúšťadle. Výsledky stanovovania výluhov potvrdzujú tvrdenie, že pre lúhovanie kvetu je vhodnejšie rozpúšťadlo s etanolom, a pri lúhovaní oplodia šípku je vhodnejšie rozpúšťadlo voda. Najväčší obsah polyfenolov a flavonoidov vo výluhoch bol stanovený v etanolovom výluhu kvetu, najmenší v etanolovom výluhu oplodia. Väčšia antioxidačná aktivita výluhov bola stanovená práve v kvete šípku.

Výsledky stanovovania polyfenolov a flavonoidov macerátov kvetu a oplodia vykazujú rovnaký charakter. Obsah polyfenolov a flavonoidov v maceráte kvetu je najvyšší v etanolových macerátoch o koncentrácii 60 a 80 % etanolu a najmenší vo vodných, 20% a 96% macerátoch. V macerátoch oplodia je situácia opačná, najvyšší obsah polyfenolov a flavonoidov je vo vodných macerátoch a v macerátoch s nižšou koncentráciou etanolu: 20, 40 a 60 %, najnižší obsah bol stanovený v 80 a 96% macerátoch. Pri porovnaní antioxidačnej aktivity nenastali žiadne významné rozdiely, mierne vyššiu antioxidačnú aktivitu vykazujú maceráty z kvetu šípku. Najvhodnejšia koncentrácia pre macerovanie šípku kvetu aj oplodia bola stanovená na 40 % etanolu.

Antimikrobiálna aktivita bola testovaná voči *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*. Mikroorganizmy boli vybrané tak, aby testovanie prebehlo aj voči grampozitívnej aj gramnegatívnej baktérii. Testované boli iba vzorky s najvyššími koncentraciami predošlých testovaných látok teda 30 minútové výluhy a maceráty z 5. dňa.

Z testovaných výluhov vykazoval antimikrobiálnu aktivitu iba vodný výluh oplodia voči *Micrococcus luteus*. Ostatné výluhy nemali žiadny pozorovateľný účinok proti vybraným mikroorganizmom. Najväčšia antimikrobiálna aktivita bola stanovená u 20, 40, a 60 % macerátov kvetu proti *Micrococcus luteus*, miera tiež u 40% macerátu kvetu proti *Bacillus cereus*. Maceráty oplodia boli taktiež účinné proti *Micrococcus luteus*, ale v koncentráciách 0, 20 a 40 % etanolu, inhibičné zóny boli podstatne menšie ako u macerátok kvetu.

Proti *Bacillus subtilis* a *Serratia marcescens* neboli pozorované žiadne inhibičné zóny, z čoho vyplýva, že šípkový čaj nie je účinný proti týmto mikroorganizmom.

6 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] WINK, M, Fanyana MTUNZI, Michael PILLAY, A.A. HAYALOGLU, P. STOCKER a N. VIDAL. *Secondary Metabolites, the Role in Plant Diversification of* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/B978-0-12-800049-6.00263-8. ISBN 10.1016/B978-0-12-800049-6.00263-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128000496002638>
- [2] BOR, Tarik, Sulaiman O. ALJALOU, Rabin GYAWALI a Salam A. IBRAHIM. *Antimicrobials from herbs, spices, and plants* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/B978-0-12-802972-5.00026-3. ISBN 10.1016/B978-0-12-802972-5.00026-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128029725000263>
- [3] DJERIDANE, A., M. YOUSFI, B. NADJEMI, D. BOUTASSOUNA, P. STOCKER a N. VIDAL. *Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.028. ISBN 10.1016/j.foodchem.2005.04.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460500422X>
- [4] GYAWALI, Rabin a Salam A. IBRAHIM. *Natural products as antimicrobial agents* [online]. [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047. ISBN 10.1016/j.foodcont.2014.05.047. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351400320X>
- [5] DEMIR, N., O. YILDIZ, M. ALPASLAN, A.A. HAYALOGLU, P. STOCKER a N. VIDAL. *Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (Rosa L.) fruits in Turkey* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.12.038. ISBN 10.1016/j.lwt.2013.12.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813005094>
- [6] COWAN, M. M.: Plant products as microbial agents, *Clin. Microbiol. Reviews*, 1999, vol. 12, no. 4, s. 564 – 582
- [7] CVJETKO BUBALO, Marina, Senka VIDOVIĆ, Ivana RADOJČIĆ REDOVNIKOVIC a Stela JOKIĆ. *New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents*. DOI: 10.1016/j.fbp.2018.03.001. ISBN 10.1016/j.fbp.2018.03.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308518300658>
- [8] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 978-80-214-4788-2.
- [9] CÖMERT, Ezgi Doğan, Vural GÖKMEN, Manu SHARMA, Suthar Sharad KUMAR, Sandeep LOHAN, Varun BHARDWAJ, Navneet SYAN a Saras JYOTI. *Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century: the origin, evolution, and impact of doi moi*. 2000. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.056. ISBN 10.1016/j.foodres.2017.10.056. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399691730741X>
- [10] ELEAZU, Chinedum, Nwite OBIANUJU, Kate ELEAZU a Winner KALU. *The role of dietary polyphenols in the management of erectile dysfunction–Mechanisms of action* [online]. [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.125. ISBN 10.1016/j.biopha.2017.01.125. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332217300604>

- [11] MINDELL, Earl a Hester MUNDIS. *Nová vitaminová bible: nejnovější informace o vitamínech, minerálních látkách, antioxidantech, léčivých rostlinách, o doplňcích stravy, léčebných účincích potravin i lécích používaných v homeopatii*. Vyd. 2., (dopl., přeprac.). V Praze: Ikar, 2006. ISBN 80-249-0744-5.
- [12] Velíšek, J., *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. 368S. ISBN 80-86659-02-X
- [13] HODGSON, Jonathan M., Kevin D. CROFT, Michael PILLAY, A.A. HAYALOGLU, P. STOCKER a N. VIDAL. *Tea flavonoids and cardiovascular health* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.mam.2010.09.004. ISBN 10.1016/j.mam.2010.09.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299710000737>
- [14] FRAZIER, Richard A., Eddie R. DEAVILLE, Rebecca J. GREEN, Elisabetta STRINGANO, Ian WILLOUGHBY, John PLANT a Irene MUELLER-HARVEY. *Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.05.035. ISBN 10.1016/j.jpba.2009.05.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708509003483>
- [15] SENOV, Petr Leonidovič. *Farmaceutická chemie: (učebnice)*. 1. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1954.
- [16] ZHU, Yin, Chen-Yang SHAO, Hai-Peng LV, et al. *Enantiomeric and quantitative analysis of volatile terpenoids in different teas (Camellia sinensis)* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.02.013. ISBN 10.1016/j.chroma.2017.02.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967317302194>
- [17] TOMANDL, Josef. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. Černčice: Tiskárna KNOPP, 2014. ISBN 978-80-210-6973-2.
- [18] BOOTHROYD, Peter., Xuân Nam. PHẠM, Manu SHARMA, Suthar Sharad KUMAR, Sandeep LOHAN, Varun BHARDWAJ, Navneet SYAN a Saras JYOTI. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. 2000. DOI: doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.044. ISBN 10.1016/j.foodres.2013.01.032. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913000598>
- [19] EMBUSCADO, Milda E., L. MACEIRAS, I. JACHMANIÁN a S. ALBORÉS. *Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review*. DOI: 10.1016/j.jff.2015.03.005. ISBN 10.1016/j.jff.2015.03.005. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615001127>
- [20] VIEITEZ, I., L. MACEIRAS, I. JACHMANIÁN a S. ALBORÉS. *Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology*. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.09.025. ISBN 10.1016/j.supflu.2017.09.025. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844617305430>
- [21] CAROCHO, Márcio, Patricia MORALES a Isabel C.F.R. FERREIRA. *Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives*. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.11.008. ISBN 10.1016/j.tifs.2017.11.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417306568>

- [22] TAKAIDZA, Samkeliso, Fanyana MTUNZI, Michael PILLAY, A.A. HAYALOGU, P. STOCKER a N. VIDAL. *Analysis of the phytochemical contents and antioxidant activities of crude extracts from Tulbaghia species* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.jtcm.2018.04.005. ISBN 10.1016/j.jtcm.2018.04.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254627218302929>
- [23] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2014. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2
- [24] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie. ISBN 978-80-7418-051-4. Dostupné také z: <http://kramerius.mzk.cz/search/handle/uuid:b366ae60-43da-11e4-aded-005056827e51>
- [25] Omar, U. , Shorbaji, A. , Arrait, E. , Agha, T. , Al-Marzouki, H. , Doghaither, H. and Al-Ghafari, A. (2016) Comparative Study of the Antioxidant Activity of Two Popular Green Tea Beverages Available in the Local Market of Saudi Arabia. *Natural Science*, 8, 227-234. doi: 10.4236/ns.2016.86027.
- [26] BANSAL, Sumit, Shivani CHOUDHARY, Manu SHARMA, Suthar Sharad KUMAR, Sandeep LOHAN, Varun BHARDWAJ, Navneet SYAN a Saras JYOTI. *Tea: A native source of antimicrobial agents*. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.032. ISBN 10.1016/j.foodres.2013.01.032. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913000598>
- [27] *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1.
- [28] DA SILVA PINTO, Marcia. *Tea: A new perspective on health benefits* [online]. [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.038. ISBN 10.1016/j.foodres.2013.01.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996913000653>
- [29] RECMAN T., 2002: *Zelený čaj*. Svojtka & Co, Praha, 133s., ISBN 80-7237-651-9
- [30] GONZÁLEZ-MOLINA, E., R. DOMÍNGUEZ-PERLES, D.A. MORENO, C. GARCÍA-VIGUERA, Ian WILLOUGHBY, John PLANT a Irene MUELLER-HARVEY. *Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health* [online]. 2016 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.07.027. ISBN 10.1016/j.jpba.2009.07.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708509004816>
- [31] TURAN, Ibrahim, Selim DEMIR, Kagan KILINC, et al. *Cytotoxic Effect of Rosa canina Extract on Human Colon Cancer Cells through Repression of Telomerase Expression* [online]. [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.jpha.2017.12.005. ISBN 10.1016/j.jpha.2017.12.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177917301387>
- [32] AL-YAFEAI, Ahlam, Angelika MALARSKI, Volker BÖHM, et al. *Characterization of carotenoids and vitamin E in R. rugosa and R. canina: Comparative analysis* [online]. 2016 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.070. ISBN 10.1016/j.foodchem.2017.09.070. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617315364>

- [33] AHMAD, Naveed, Farooq ANWAR, Anwar-ul-Hassan GILANI, et al. *Rose Hip (Rosa canina L.) Oils* [online]. 2016 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00076-6. ISBN 10.1016/B978-0-12-416641-7.00076-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166417000766>
- [34] VOLÁK, J., J. STODOLA a F. SEVERA. *Velká kniha léčivých rostlin*. 1. Bratislava: Priroda. ISBN 064-029-87.
- [35] KOPEC, Karel. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Vyd. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN 80-861-5364-9.
- [36] CZYZOWSKA, A., E. KLEWICKA, E. POGORZELSKI, et al. *Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from Rosa canina L. and Rosa rugosa Thunb: Comparative analysis* [online]. 2016 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.11.009. ISBN 10.1016/j.jfca.2014.11.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157514002099>
- [37] PATEL, Seema, E. KLEWICKA, E. POGORZELSKI, et al. *Rose hip as an underutilized functional food: Evidence-based review* [online]. 2016 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.03.001. ISBN 10.1016/j.tifs.2017.03.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224416304277>
- [38] ANDERSSON, Staffan C., Kimmo RUMPUNEN, Eva JOHANSSON, et al. *Carotenoid content and composition in rose hips (Rosa spp.) during ripening, determination of suitable maturity marker and implications for health promoting food products: Evidence-based review* [online]. 2016 [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.03.088. ISBN 10.1016/j.foodchem.2011.03.088. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611004894>
- [39] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis* [online]. [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.04.002. ISBN 10.1016/j.jpba.2006.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708506003062>
- [40] CICCIO, Nunzia, Maria T. LANORTE, Margherita PARAGGIO, Mariassunta VIGGIANO a Vincenzo LATTANZIO. *A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts: Occurrence, extraction and analysis* [online]. [cit. 2018-04-21]. DOI: 10.1016/j.microc.2008.08.011. ISBN 10.1016/j.microc.2008.08.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X08001070>
- [41] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-716-9704-4
- [42] DUŠEK, Jaroslav. *Praktická cvičení z farmakognosie*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2663-5.
- [43] FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M.L. a A. Ruiz MEDINA. *Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Beer* [online]. 2014 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/B978-0-12-404738-9.00029-5. ISBN 10.1016/B978-0-12-404738-9.00029-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124047389000295>
- [44] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. *Extraction and analysis of phenolics in food* [online]. 2014 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.08.059. ISBN 10.1016/j.chroma.2004.08.059. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304014098>
- [45] SCHOFIELD, P, D.M MBUGUA a A.N PELL. *Analysis of condensed tannins: a review* [online]. 2014 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/S0377-8401(01)00228-0. ISBN 10.1016/S0377-8401(01)00228-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840101002280>

- [46] FLOEGEL, Anna, Dae-Ok KIM, Sang-Jin CHUNG, Sung I. KOO a Ock K. CHUN. *Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods: a review* [online]. 2014 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.jfca.2011.01.008. ISBN 10.1016/j.jfca.2011.01.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088915751100038X>
- [47] RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay: a review* [online]. 2014 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3. ISBN 10.1016/S0891-5849(98)00315-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584998003153>
- [48] HAMLAOUI, Ikram, Reguia BENCHERAIET, Rafik BENSEGUENI, Mustapha BENCHARIF, Min YANG a Catherine RICE-EVANS. *Experimental and theoretical study on DPPH radical scavenging mechanism of some chalcone quinoline derivatives: a review* [online]. 2014 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.molstruc.2017.11.118. ISBN 10.1016/j.molstruc.2017.11.118. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002228601731606X>
- [49] HARA, Kotaro, Takao SOMEYA, Katsura SANO, Yoshimasa SAGANE, Toshihiro WATANABE a R.G.S. WIJESEKARA. *Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay: a review* [online]. 2014 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.dib.2018.02.013. ISBN 10.1016/j.dib.2018.02.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235234091830129X>
- [50] BANCIROVA, Martina, Takao SOMEYA, Katsura SANO, Yoshimasa SAGANE, Toshihiro WATANABE a R.G.S. WIJESEKARA. *Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea: a review* [online]. 2014 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.04.020. ISBN 10.1016/j.foodres.2010.04.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996910001237>
- [51] ORHAN, Didem Deliorman, Berrin ÖZÇELİK, Selda ÖZGEN a Fatma ERGUN. *Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids* [online]. [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/j.micres.2009.09.002. ISBN 10.1016/j.micres.2009.09.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944501309000743>
- [52] ORHAN, Didem Deliorman, Berrin ÖZÇELİK, Selda ÖZGEN a Fatma ERGUN. *Symposia and Oral Presentations* [online]. [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03801.x. ISBN 10.1111/j.1469-0691.2012.03801.x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15600775>
- [53] SYKES, Jane E., Shelley C. RANKIN, Selda ÖZGEN a Fatma ERGUN. *Isolation and Identification of Aerobic and Anaerobic Bacteria* [online]. 2014 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/B978-1-4377-0795-3.00003-X. ISBN 10.1016/B978-1-4377-0795-3.00003-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978143770795300003X>
- [54] ISON, C.A., D.A. LEWIS, Selda ÖZGEN a Fatma ERGUN. *Gonorrhoea* [online]. 2010 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/B978-0-7020-4060-3.00002-8. ISBN 10.1016/B978-0-7020-4060-3.00002-8. Dostupné z: http://www.crossref.org/deleted_DOI.html
- [55] TAMOKOU, J.D.D., A.T. MBAVENG, V. KUETE a Fatma ERGUN. *Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables* [online]. 2017 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/B978-0-12-809286-6.00008-X. ISBN 10.1016/B978-0-12-809286-6.00008-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012809286600008X>

- [56] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
- [57] KAPRÁLEK, František. *Fyziologie bakterií*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. ISBN 14-600-86.
- [58] TVRDOŇ, Milan. *Školský atlas mikroorganizmov*. Bratislava: ALFA, 1979. ISBN 63-359-79.
- [59] RAZAFINTSALAMA, V.E., S.T. RALAMBONIRINA RASOARIVÉLO, F. RANDRIAMIALINORO, L. RANARIVÉLO, S.R. RAKOTONANDRASANA, T. PETIT a S. SARTER. *Antibacterial activities of fourteen medicinal plants from the endemic plant diversity of Madagascar* [online]. 1998 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/j.sajb.2017.06.006. ISBN 10.1016/j.sajb.2017.06.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629916340121>
- [60] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0571-6.
- [61] DE FRUTOS, Mónica, Luis LÓPEZ-URRUTIA, Marta DOMÍNGUEZ-GIL, Marta ARIAS, Juan Luis MUÑOZ-BELLIDO, José María EIROS a Carmen RAMOS. *Serratia marcescens outbreak due to contaminated 2% aqueous chlorhexidine* [online]. 2017 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/j.eimce.2017.11.006. ISBN 10.1016/j.eimce.2017.11.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2529993X17302654>
- [62] BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Marta DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-741-1.
- [63] COCKAYNE, Alan. *Bacterial Cell Walls* [online]. 1998 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1006/rwei.1999.0082. ISBN 10.1006/rwei.1999.0082. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122267656000839>
- [64] DANCHIN, A. *Bacillus Subtilis* [online]. 2001 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1006/rwgn.2001.0099. ISBN 10.1006/rwgn.2001.0099. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122270800000999>
- [65] SARIKHANI, Maliheh, Rouha Kasra KERMANSHAHI, Parinaz GHADAM, Sara GHARAVI, Juan Luis MUÑOZ-BELLIDO, José María EIROS a Carmen RAMOS. *The role of probiotic Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 bacteriocin on effect of HBSu on planktonic cells and biofilm formation of Bacillus subtilis* [online]. 2017 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.087. ISBN 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.087. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017316033>
- [66] EL-ARABI, Tarek F. a Mansel W. GRIFFITHS. *Bacillus cereus*. 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-416041-5.00029-9. ISBN 10.1016/B978-0-12-416041-5.00029-9. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124160415000299>
- [67] ARUNKUMAR, Pichaimani, Muthukrishnan THANALAKSHMI, Priyadarsini KUMAR a Kumpati PREMKUMAR. *Micrococcus luteus mediated dual mode synthesis of gold nanoparticles: Involvement of extracellular α -amylase and cell wall teichuronic acid* [online]. 1968 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.10.051. ISBN 10.1016/j.colsurfb.2012.10.051. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777651200608X>.

- [68] YANG, Yang, Longliang QIAO, Xin ZHANG, Zufang WU, Peifang WENG, José María EIROS a Carmen RAMOS. *Effect of methylated tea catechins from Chinese oolong tea on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocyte* [online]. 2017 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/j.fitote.2015.05.007. ISBN 10.1016/j.fitote.2015.05.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X15300034>
- [69] http://www.sonnentor.cz/sonnentor_cz/e_shop/caje/jednodruhove/node_27949
- [70] <http://www.gresik.cz/caje/caje-4-svetadilu/caje-necaje/586-sipek-oplodi/>
- [71] XIE, Yajing, Wei ZHANG, Xin ZHANG, Zufang WU, Peifang WENG, José María EIROS a Carmen RAMOS. *Antihypertensive activity of Rosa rugosa Thunb. flowers: Angiotensin I converting enzyme inhibitor* [online]. 2017 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1016/j.jep.2012.09.038. ISBN 10.1016/j.jep.2012.09.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874112006460>
- [72] TAJKARIMI, M.M., S.A. IBRAHIM a D.O. CLIVER. *Antimicrobial herb and spice compounds in food* [online]. [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003. ISBN 10.1016/j.foodcont.2010.02.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713510000459>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

EGCG — epigalokatechín galát

ABTS — 2,2-azinobis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

GA — kyselina galova

K — katechin

T — trolox

FD — Folin-Denis

FC — Folin-Ciocalteu

GAE — ekvivalenty kyseliny galovej

DPPH — 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyllový radikál

TEAC — Trolox ekvivalentná antioxidačná kapacita

ORAC — kapacita absorpcie kyslíkových radikálov

FRAP — redukčná schopnosť plazmy

MIC — minimálna inhibičná koncentrácia

G- — gramnegatívna baktéria

G+ — grampozitívna baktéria

BC — *Bacillus cereus*

SM — *Serratia marcescens*

ML — *Micrococcus luteus*

BS — *Bacillus subtilis*

V-O — vodný výluh oblodie šípku

V-K — vodný výluh kvetu šípku

20 % O — 20% etanolový výluh oplodia

40 % O — 40% etanolový výluh oplodia

60 % O — 60% etanolový výluh oplodia

80 % O — 80% etanolový výluh oplodia

96 % O — 96% etanolový výluh oplodia

20 % O — 20% etanolový výluh kvetu

40 % O — 40% etanolový výluh kvetu

60 % O — 60% etanolový výluh kvetu

80 % O — 80% etanolový výluh kvetu

96 % O — 96% etanolový výluh kvetu