



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PŘÍRODNÍCH LÁTEK KVĚTU ČERNÉHO BEZU

STUDY OF NATURAL COMPOUNDS OF ELDERBERRY FLOWERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Alžbeta Pončíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2020

Abstrakt

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo stanovenie koncentrácie bioaktívnych látok ako sú polyfenoly a flavonoidy a tiež celkovú antioxidačnú kapacitu v extraktoch z kvetov čiernej bazy. V druhej časti bolo predmetom experimentu zistenie antimikrobiálnej aktivity.

Teoretická časť sa venuje popisu jednotlivých bioaktívnych látok, popisu čiernej bazy a použitých baktérií. V experimentálnej časti boli pripravené vodné extrakty, v ktorých boli stanovované celkové polyfenoly, flavonoidy a antioxidačná aktivita.

Výsledky stanovovania polyfenolov a flavonoidov ukazujú, že pre dosiahnutie vyššieho obsahu flavonoidov aj polyfenolov ja na lúhovanie kvetu bazy je vhodnejšie použiť čo najvyššiu počiatočnú teplotu. Pri porovnaní antioxidačnej aktivity roztokov z priemerných hodnôt neboli zistené žiadne významné rozdiely. Extrakty nevykazovali výraznú antimikrobiálnu aktivitu.

Abstract

The aim of this bachelor thesis was to determine the concentration of bioactive substances such as polyphenols and flavonoids and also the total antioxidant capacity in extracts from flowers of elder. The second part was the subject of an experiment to determine the antimicrobial activity.

The theoretical part deals with the description of individual bioactive substances, the description of the elder and the bacteria used. In the experimental part, aqueous extracts were prepared, in which total polyphenols, flavonoids and oxidizing activity were determined.

The results of the determination of polyphenols and flavonoids show that in order to achieve a higher content of flavonoids and polyphenols, it is more appropriate to use the highest possible initial temperature for leaching the base flower. No significant differences were found when comparing the antioxidant activity of solutions from the average values. The extracts did not show significant antimicrobial activity.

Kľúčové slová

Baza čierna, polyfenoly, flavonoidy, antioxidačná aktivita, mikrobiálna aktivita

Keywords

Elder, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, microbial activity

Alžbeta Pončíková: Štúdium prírodných látok v čiernej baze. Brno, 2020. (27) Bakalárska práca na fakulte chemickej Vysokého učení technického v Brne, ústav chémie potravín a biotechnológii. Vedúci práce: RNDr. Mária Veselá Ph.D.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalárskou prácu vypracovala samostatne, uviedla a úplne citovala všetky literárne zdroje. Prácu som napísala pod vedením RNDr. Márie Veselej Ph.D. Ďalej prehlasujem, že bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej Vysokého učenia technického v Brne. Môže byť teda využitá na komerčné účely len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana Fakulty chemickej VUT v Brne.

.....
Alžbeta Pončíková
Dátum

PodĎakovanie

Ďakujem za trpezlivosť všetkým vyučujúcim a laborantom, ktorý mňa aj spolužiakov podporovali počas celého štúdia a pričínili sa na uskutočnení tejto práce. Menovite ďakujem pani doktorke Márii Veselej, ktorá mala trpezlivosti najviac a mojej rodine, ktorá ma dotlačila až k záveru bakalárskeho štúdia.

Obsah

1	Úvod	6
2	Teoretická časť	7
2.1	Baza čierna (<i>Sambucusnigra</i>).....	7
2.2	Polyfenoly	7
2.2.1	Metódy stanovovania polyfenolov	8
2.3	Flavonoidy.....	9
2.3.1	Chemická štruktúra flavonoidov	9
2.3.2	Metódy stanovenia flavonoidov	10
2.4	Antioxidačná aktivita	11
2.4.1	Metódy stanovenia antioxidačnej aktivity.....	12
2.5	Antimikrobiálna aktivita.....	13
2.5.1	Charakteristika použitých mikroorganizmov	13
3	Cieľ práce	14
4	Metodika.....	Error! Bookmark not defined.
4.1	Použitie chemikálie,prístroje a mikroorganizmy.....	15
4.2	Príprava vzoriek	15
4.2.1	Vodné extrakty bylín.....	15
4.2.2	Stanovenie celkových polyfenolovspektrofotometricky	15
4.2.3	Stanovenie celkových flavonoidovspektrofotometricky	16
4.2.4	Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity pomocou ABTS* ⁺	16
4.2.5	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity.....	16
5	Výsledky a diskusia	18
5.1	Stanovenie celkových polyfenolov.....	18
5.2	Stanovenie celkových flavonoidov.....	20
5.3	Stanovenie antioxidačnej aktivity.....	22
5.4	Stanovenie antimikrobiálnej aktivity	23
6	Záver.....	25
7	Zoznam použitej literatúry.....	26

1 Úvod

Získavanie zdraviu prospešných látok z prírodných zdrojov je v súčasnosti každodennou náplňou ľudstva. Prirodzene sa držíme tradícii a využívame práve to, čo nás naučili naše staré mamy.

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 [31]

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.[32]

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 uchovávaní potravín.[33]

Cieľom tejto bakalárskej práce je zistenie koncentrácie bioaktívnych látok ako sú polyfenoly a flavonoidy a taktiež zistenie antioxidačnej aktivity v závislosti na čase pôsobenia kvetov a listov sušenej čiernej bazy vo vode. Porovnávané boli extrakty vytvorené lúhovaním pri rôznych teplotách a rôzne časové intervaly. Ďalšou časťou práce je overovanie antimikrobiálnej aktivity extraktov snajvyššou koncentráciou bioaktívnych látok voči vybraným zástupcom grampozitívnych (G+) a gramnegatívnych (G-) baktérii.

2 Teoretická časť

2.1 Baza čierna (*Sambucusnigra*)

Baza čierna je ker čeľade pižmovkovitej, ktorý rastie do výšky 1,5 -10 metrov. Vyskytuje sa v Európe ale aj v Ázii na okrajoch lesov, na pasienkoch, v svetlých listnatých a lužných lesoch, pozdĺž ciest, pri ľudských sídlach, na pôdach vlhších, dusíkatých, humózných.[1]

Má protistojné, stopkaté, striedavé listy, ktoré sú kopijovité alebo vajcovito kopijovité. Na okrajoch sú pílkovité, vrchol majú zašpicatený a najmä z rubu sú pokryté jemnými chlpkami. Pohmoždené listy sú páchnuce, čo má byť odradzujúce pre väčšinu hmyzu. Obsahujú živicu, glykozidy, sambunigrín, sambucín a veľké množstvo vápnika. Sú teda jedovaté. Otrava sa prejavuje prudkým zvracaním, nechutenstvom a celkovou slabosťou. Rovnaké príznaky sa môžu objaviť aj pri predávkovaní bazovými plodmi. Listy možno použiť vo forme zábalu napr. pri reumatizme, podľa niektorých autorov pôsobí aj protinádorovo na z vonku prístupné nádory, kašovitý obklad z listov údajne dokáže „vytiahnuť vodu z kolena“.[1]

Po tepelnej úprave sú konzumáciu vhodné aj jej plody- tmavofialové až čierne kôstkovice, ktoré dozrievajú koncom augusta. V minulosti sa používali aj pre ich diuretické účinky. Obsahujú cukry, organické kyseliny napr. kyselinu jablčnú, triesloviny, anthokyanové farbivá, silice, pektín a vitamíny (najmä A a B). Plody bazy pôsobia analgeticky, osvedčili sa najmä pri migrénach, pri bolestiach trojkľaného nervu, chrbtice či kĺbov (to pôsobia aj protizápalovo), priaznivo pôsobia aj pri kŕčoch tráviaceho ústrojenstva a pri plynatosti. Z plodov bazy sa pripravuje bazové víno, zaváraniny, šťavy či likéry, niekedy sapoužívajú aj na dofarbovanie vína a iných potravinárskych výrobkov. V minulosti sapoužívali aj na farbenie látok. Najvhodnejšie je použiť čerstvú šťavu (šťava sa prevarí, zmieša sa v pomere 6:1 so 40% liehovinou (napr. vodka), pridá sa trocha kyseliny citrónovej a 15 minút sa sterilizuje - podáva sa potom 8 až 10 polievkových lyžíc denne po dobu 2 až 3 týždňov), prípadne sa z usušených plodov pripravuje odvar.[1]

Od mája do júla kvitne baza bielymi až bledo žltými kvetmi. Extrakt z kvetov pôsobí potopudne, močopudne, znižuje horúčku a priaznivo pôsobí na steny ciev. Podáva sa preto najmä pri prechladnutí a pri chorobách ciev. Obsahujú silice, slizy, triesloviny, glykozidy (sambunigrin a rutín). [1]

2.2 Polyfenoly

Polyfenoly tvoria jednu z najrozšírenejších a najrozmanitejších skupín látok v rastlinnej ríši, pričom v súčasnosti je známych viac ako 8000 fenolických štruktúr. Môžu byť rozdelené na najmenej 10 rôznych tried na základe ich chemickej štruktúry, od jednoduchých molekúl, ako sú fenolové kyseliny, až po vysoko polymerizované zlúčeniny, ako sú napríklad taníny. Majú vo svojej štruktúre spoločne benzénovým kruh substituovanú hydroxyskupinu.

Hlavné skupiny rastlinných polyfenolov zahŕňajú flavonoly, flavóny, flavanóny, izoflavóny, anthokyány, polyanthokyanidíny a flavanoly.[2]

2.2.1 Metódy stanovovania polyfenolov

Postupy stanovovania polyfenolov možno rozdeliť na metódy stanovenia všetkých polyfenolov a metódy pre detekciu a stanovenie určitej skupiny, prípadne jednotlivých fenolických látok. Príkladom postupu pre stanovenie všetkých polyfenolov sú spektrofotometrické metódy s Folin-Ciocalteuovým, Folin-Denisovým činidlom a test s Pruskou modrou. Na stanovenie určitých skupín alebo druhov fenolických látok sa najčastejšie využívajú rôzne varianty chromatografických metód (HPLC, GC/MS) alebo napríklad upravený vanilínový test pre stanovenie katechínu. [8]

Ďalej sa na analýzu polyfenolov používajú titračné a elektrochemické metódy alebo spektrometria nukleárnou magnetickou rezonanciou. [8]

2.2.1.1 Spektrofotometrické metódy

Spektrofotometrickými metódami je možné určiť množstvo všetkých polyfenolov vo vzorke, špecifické fenolické látky ako je sinapin[9]sinapinová kyselina [10] alebo určité skupiny fenolických látok ako sú napríklad fenolové kyseliny a proanthokyanidíny. [8]

Najčastejšie používané spektrofotometrické metódy sú stanovenie Folin-Ciocalteuovým, Folin-Denisovým činidlom, test Pruskou modrou, upravený vanilínový test, spektrálna analýza UV. [8]

Metoda Folin-Denis je založená na redukčnej reakcii fenolických zlúčením s Folin-Denisovým činidlom (fosfomolybdén-fosforečná kyselina), pri ktorej vznikajú v zásaditom prostredí modro sfarbené komplexy. Spektrofotometrické stanovovanie pri vlnovej dĺžke 725 nm používané pri stanovovaní veľkého počtu vzoriek bolo navrhnuté Swainom a Hillisom (1959). [8]

Metóda Folin-Ciocalteu je často používaná pre stanovovanie všetkých polyfenolov v potravinách. (Bruneet al., 1991) a s úpravou podľa Singletona (Singleton et al., 1999) predovšetkým pre víno. Princíp je podobný Folin-Denisovmu postupu. Ako činidlo sa používa Folin-Ciocalteuov roztok. Redukčné reakcie činidla s polyfenolmi vytvárajú modro sfarbené produkty s maximálnou absorpciou pri vlnovej dĺžke 765 nm (Waterhouse, 2002). Činidlo Folin-Ciocalteu je nešpecifické a detekuje všetky fenolové skupiny v skúmaných vzorkách. Činidlo však tiež reaguje s ľahko oxidovateľnými látkami ako je napríklad kyselina askorbová, oxid siričitý alebo aromatické amíny, čo vedie ku skresleniu výsledkov[8][11]

Stanovenie spektrálnou analýzou v UV spektre je založené na rôznych absorpčných maximách v ultrafialovej časti svetelného spektra rôznych skupín fenolických látok. [8]

Maximum jednoduchých fenolov sa pohybuje v intervale vlnových dĺžok od 220 do 280 nm (Owadeset al., 1958b). Hodnoty absorpcie môže ovplyvňovať pH vzorky, a tiež niektoré látky (napr. bielkoviny, nukleové kyseliny a aminokyseliny). [8]

Spektrofotometrické meranie v UV a viditeľnom spektre sa tiež často využíva na stanovenie určitých fenolických látok, ako sú napríklad flavonoidy.[12]

2.2.1.2 Chromatografické metódy

Pre analýzu fenolických látok bolo navrhnutých niekoľko postupov založených na chromatografických metódach. Tieto techniky sa využívajú na prípravu, izoláciu, čistenie a identifikáciu polyfenolov. [8]

Chromatografické metódy sú používané na štúdium interakcií fenolických látok s ďalšími zložkami potravín.

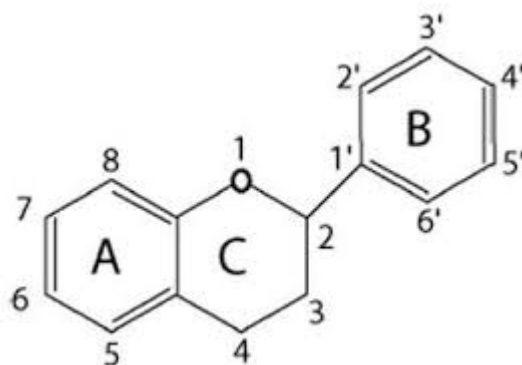
Stále širšie uplatnenie pri separácii, identifikácii a kvantifikácii polyfenolov v potravinách nachádza vysoko výkonná kvapalinová chromatografia, tzv. HPLC (HighPerformanceLiquidChromatography). Je dostupné množstvo stacionárnych a mobilných fáz určených pre analýzu anthokyánov, flavonónov a flavonolov, flavan-3-olov, flavónov a fenolických kyselín.[13] Na detekciu fenolových zlúčenín v potravinách s pomocou HPLC sa najčastejšie využíva meranie v ultrafialovom až viditeľnom spektre žiarenia (UV-Vis), fotodiódové pole (DAD) alebo elektrochemický coulometrický detektor (EC)[13].

2.3 Flavonoidy

Flavonoidy sú triedy fenolických zlúčenín, ktoré sú vo veľkej miere distribuované v rastlinách. Kvercetín a rutín patria medzi najznámejšie flavonoidy vyskytujúce sa vo veľkom množstve ovocia a zeleniny vrátane čaju, kávy a iných zrn. Ako sa pozorovalo pri iných biologicky aktívnych neživých zložkách, flavonoidy môžu podporovať žiaduce a nežiaduce fyziologické účinky u ľudí. Pozitívne vlastnosti flavonoidov môžu byť odvodené od ich antioxidantných vlastností ako neutralizátory voľných radikálov. Boli však zistené niektoré ďalšie účinky ako napríklad prevencia rakoviny, protizápalová a protivírusová aktivita. [3]

2.3.1 Chemická štruktúra flavonoidov

Základom štruktúry flavonoidov je flavanový cyklický skelet skladajúci sa z dvoch substituovaných benzénových kruhov (A a B) a pyranového kruhu C, napojeného na kruh A v polohe C-2 (obrázok 1). Všetky 3 kruhy bývajú obyčajne substituované hydroxyskupinami alebo methoxyskupinami. Hydroxyskupiny môžu ďalej podliehať O-glykozidácii, najčastejšie v polohe C-3 alebo C-7, alebo môže dôjsť k priamej C-glykozylácii atómu uhlíku flavanového skeletu, obvykle C-6 alebo C-8. Najbežnejším cukerným substituentom je glukóza, rhamnóza, galaktóza alebo arabinóza. [4]



Obrázok 1:Flavónový skelet[1]

Podľa stupňa oxidácie pyránového kruhu C sa rozoznávajú nasledujúce skupiny flavonoidov, a to flavóny (napr. apigenin, luteolin), flavonoly (napr. kvercetin, myricetin, kaempferol, rutin), flavanóny (napr. naringenin, hesperidin), isoflavanony (napr. genistein, daidezin), anthokyany (napr. kyanidin, pelargonidin) a katechiny (napr. epikatechin).[4]

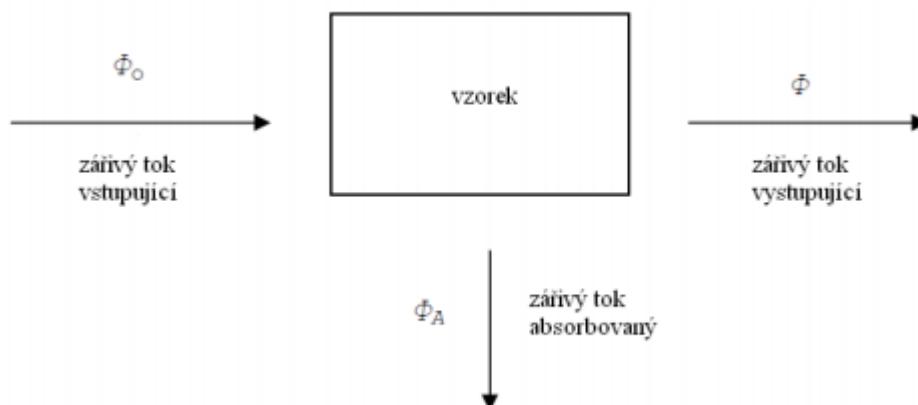
2.3.2 Metódy stanovenia flavonoidov

Fenolické látky v rastlinných materiáloch sa orientačne stanovujú pomocou techniky chromatografia na tenkej vrstve (TLC – ThinLayerChromatography) prípadne na kolónach. Na kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie týchto látok sa používajú predovšetkým metódy chromatografické, a to plynová a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (GC – GasChromatography, HPLC – HighPerformanceLiquidChromatography), elektromigračné metódy – kapilárna elektroforéza (CE – CapillaryElectrophoresis) a spektrofotometrické v UV/VIS oblasti.[14]

2.3.2.1 Molekulárna absorpčná spektrofotometria v UV/VIS oblasti

Jedná sa o jednu z najpoužívanejších analytických metód pre stanovovanie látok v roztokoch. Podstatou je meranie absorpcie vhodného žiarenia molekulami látok v ultrafialovej a viditeľnej oblasti spektra. Látky absorbujúce žiarenie s vlnovou dĺžkou pod 380 nm (ultrafialové žiarenie) sa prejavujú ako bezfarebné, a tie, ktoré absorbujú vlnové dĺžky v rozsahu 380 – 770 nm sa prejavujú ako farebné. [15]

Absorpcia žiarenia súvisí s prechodom elektrónu medzi dvoma a viacerými energetickými hladinami v molekule. Excitovaná molekula savracia späť do základného stavu bez radiácie, žiarivá energia sa mení na tepelnú a zvyšuje sa kinetická energia molekúl.[16] Pri meraní absorpcie je časť zo vstupujúceho toku žiarenia Φ_0 absorbovaná vzorkou ako tzv. absorbovaný žiarivý tok Φ_A . V ideálnom prípade zostatok žiarenia prejde a je zaznamenaný ako vystupujúci žiarivý tok Φ . [17] Táto skutočnosť je schematicky znázornená na obrázku č. 2.



Obrázok 2 Schéma absorpcie[2]

Podiel vystupujúceho žiarivého toku Φ a vstupujúceho žiarivého toku Φ_0 sa označuje ako priepustnosť alebo transmitancia, ktorá je daná vzťahom $\tau = \Phi / \Phi_0$ [17]. Množstvo absorbovaného žiarenia určitej vlnovej dĺžky sa vyjadruje v jednotkách absorpcie, čo je záporný logaritmus transmitancie. Absorpcia je definovaná vzťahom $A = -\log \tau = \log(\Phi_0 / \Phi)$ [15]. Kvantitatívna analýza absorpčných metód je založená na Lambert-Beerovom zákone, podľa ktorého platí, že hodnota absorpcie A pri vlnovej dĺžke λ je priamo úmerná súčinu molárneho absorpčného koeficientu ε ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), hrúbky vrstvy l (cm) a molárnej koncentrácie absorbujúcej látky c ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) [18].

$$A_\lambda = \varepsilon \cdot \lambda \cdot l \cdot c$$

Neznámu koncentráciu absorbujúceho analytu možno vyhodnotiť metódou kalibračnej krivky alebo metódou štandardného prídavku. [19]

Shen Et al. merali spektrofotometricky celkový obsah flavonoidov v bielej, červenej a čiernej ryži použitím kolorimetrickej metódy. Najskôr bola spravená extrakcia 1g vzorky v prostredímethanolu s obsahom 1% HCl po dobu 24h pri teplote 24°C. Tento postup bol dvakrát opakovaný. Získané extrakty boli odstredené pri 4000 otáčkach 15 minút. 0,5 ml vhodne zriedeného extraktu bolo odpipetovaných do 15 ml skúmaviek s 2 ml dvakrát destilovanej vody a 0,15 ml 5% NaNO_2 . Po 5 minútach bolo pridané 0,15 ml 10% $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a za ďalších 5 minút bol pridaný 1 ml 1 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaOH. Reakčná zmes bola dobre premiešaná, nechaná 15 minút stáť a následne bola zmeraná absorpcia pri vlnovej dĺžke 415 nm. Celkový obsah flavonoidov bol vypočítaný s použitím kalibračnej krivky štandardu rutínu a vyjadrený v mg RE na 100g suchej hmotnosti. Obsah flavonoidov sa vo všetkých troch druhoch ryže pohyboval v rozmedzí od 88,6 mg do 286,3 mg $\text{RE}\cdot\text{mg}^{-1}$. Hodnota priemerného obsahu flavonoidov v bielej ryži bola 131,6; v červenej ryži 147,2 a v čiernej ryži 240,6 $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$. [20]

2.4 Antioxidačná aktivita

Antioxidačná aktivita potravín je bezprostredne spojená s ochranou biologických systémov proti škodlivému účinku reakcií zahŕňajúcich reaktívne formy kyslíka a dusíka. Tieto radikály pôsobia na biologicky významné zlúčeniny, predovšetkým lipidy, bielkoviny a

nukleové kyseliny, a menia tým ich štruktúru a funkciu. Ich pôsobením môže dochádzať k zmenám v štruktúre buniek a k poškodeniu celých tkanív a orgánov. Jedna z možností ochrany organizmu proti voľným radikálom je pôsobení antioxidantov. Antioxidanty zabraňujú alebo obmedzujú oxidačnej deštrukcii týchto látok. Mnoho látok prírodného pôvodu, ktoré človek prijíma v potrave, má tieto vlastnosti: najmä to sú antioxidačné vitamíny, polyfenolické látky, karotenoidy a flavonoidy. Prírodné antioxidanty sú prijímané väčšinou ako súčasť zložitých zmesí, ktorých zložky reagujú s radikálmi odlišnými mechanizmami. [5]

2.4.1 Metódy stanovenia antioxidačnej aktivity

Pre charakterizáciu súhrnnej koncentrácie všetkých látok s antioxidačnými účinkami vo vzorke sa používa termín celková antioxidačná kapacita (TAA) [21]. V literatúre je popísaných viacero metód, ktoré sa používajú na stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity. Tieto metódy bývajú rozmanité kvôli pôsobeniu rôznych mechanizmov nízkomolekulárných antioxidantov. Všeobecne môžu byť postupy stanovenia TAA rozdelené do dvoch skupín. Na metódy hodnotiace schopnosť eliminovať radikály a metódy posudzujúce redoxné vlastnosti látok [22]. V tejto práci bola využitá metóda založená na eliminácii radikálov (ABTS).

2.4.1.1 Metódy založené na eliminácii radikálov

Tieto metódy využívajú schopnosť vzorky zastaviť alebo aspoň spomaliť tvorbu voľných radikálov [21]. Z chemického hľadiska sa jedná o kyslíkové radikály (hydroxyl, peroxy, superoxidový anión - radikál) alebo syntetické stabilné radikály (DPPH, •+ ABTS, galvinoxyl), ktoré sú generované priamo v reakčnej zmesi alebo sú do reakčnej zmesi pridávané [22].

Metóda TEAC (metóda využívajúca ABTS) je jednou z najpoužívanejších metód pre stanovenie celkovej antioxidačnej kapacity [22]. ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfónová kyselina)) je peroxidázový substrát, ktorý reakciou s peroxylovými radikálmi alebo inými oxidantmi vytvára v prítomnosti H_2O_2 metastabilný radikál kation •+ ABTS, ktorý je intenzívne modro-zelene zafarbený a môže byť spektrofotometricky sledovaný v rozmedzí vlnových dĺžok 600 – 750 nm [23], najčastejšie pri 734 nm [22]. Antioxidačná aktivita látky, ktorá sa chová ako donor vodíkov, je meraná ako schopnosť znížiť intenzitu zafarbenia priamou reakciou s •+ ABTS [23], [24]. Pre stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity s využitím ABTS sa využíva systém ABTS/ H_2O_2 /peroxidáza, ABTS/methmyoglobín/ H_2O_2 , poprípade sa využíva chemická oxidácia ABTS pomocou poroxidisíranu draselného alebo oxidu manganičitého. Pri vlastnom meraní sa antioxidant pridáva do reakčnej zmesi, v ktorej bol vytvorený radikál kation •+ ABTS, alebo je v reakčnej zmesi obsiahnutý pri generovaní radikál – kation •+ ABTS [22]. Na hodnotenie celkovej antioxidačnej aktivity vzoriek sa využíva parameter TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). TEAC označuje antioxidačnú aktivitu vzorky ekvivalentnou definovanému množstvu syntetického derivátu Troloxu [22]. Trolox je analógom k vitamínu E, ktorý je rozpustný vo vode [25].

2.5 Antimikrobiálna aktivita

Antimikrobiálnou aktivitou sa rozumie, testovanie rôznych prírodných, polosyntetických, či syntetických látok a ich vplyv na mikrobiálne populácie. Testovanie antimikrobiálnej aktivity vieme zabezpečiť v rôznych formách, resp. za pomoci využitia rôznych metodík. K samotnému testovaniu potrebujeme látku, ktorú chcete nechať otestovať. Ak sa nejedná o čistú látku, ale o extrakt (tzn. komplex látok) potrebujeme tento extrakt.[6]

Antimikrobiálne pôsobiace látky eliminujú alebo brzdia rast mikroorganizmov inhibíciou syntézy bunkovej steny, funkcie vonkajšej membrány, syntézy proteínov alebo nukleových kyselín. Podľa toho, či bakteriálnu bunku dokážu usmrtiť alebo len zastaviť jej rast a množenie, sa delia na primárne baktériocídne a primárne baktériostatické. Medzi oboma skupinami však nie je zásadný rozdiel, pretože baktériostatické zlúčeniny môžu vo vysokých koncentráciách bunku usmrtiť a naopak baktériocídne môžu mať pri nižších koncentráciách len účinky baktériostatické. Praktický význam tohto delenia tkvie v tom, že baktériocídne látky, spôsobujúce smrť pôsobia ireverzibilne a pomerne rýchlo, zatiaľ čo baktériostatické účinkujú reverzibilne, preto je potrebné dôkladne dodržiavať intervaly ich aplikácie, aby nedošlo k relapsu.[7]

Hlavným cieľom v klinickej mikrobiológii a pri vývoji antimikrobiálne pôsobiacich látok je určiť citlivosť konkrétneho mikroorganizmu voči antibakteriálnej látke. Každá antibakteriálna látka účinkuje len na niektoré bakteriálne druhy, tzv. antibakteriálne spektrum, ostatné kmene sú rezistentné. Rezistencia je schopnosť mikroorganizmu odolávať účinkom týchto látok a je prirodzená alebo získaná (chromozomálne alebo extrachromozomálne gény rezistencie), pričom sa gény rezistencie môžu šíriť buď vertikálne z materskej bunky na dcérske, alebo horizontálne konjugáciou plazmidom, transdukciou fágom, alebo transformáciou prijatím fragmentu DNA, na ktorom je gén rezistencie [26].

Mechanizmus rezistencie voči antimikrobiálnej látke môže prebiehať rôznymi spôsobmi ako napr. zmenou povrchových štruktúr bakteriálnej bunky, brániacich väzbe antibiotika na mikróba a jeho prieniku dovnútra, nahradenie niektorej životne dôležitej metabolickej reakcie inou, ktorá nie je citlivá voči účinkom antibakteriálnej látky (tzv. nevnímavý metabolizmus), prípadne produkciou enzýmov, ktoré inaktivujú antibiotikum ešte skôr ako dokáže zaučinkovať na mikroorganizmus [26][27].

2.5.1 Charakteristika použitých mikroorganizmov

Serratia marcescens (Kmeň: *Proteobacteria*; Trieda: *Gammaproteobacteria*; Rad: *Enterobacteriales*; Čelaď: *Enterobacteriaceae*; Rod: *Serratia*)

Baktérie rodu *Serratia* sú gramnegatívne pohyblivé, peritrichálneobrvené rovné tyčinky (Obrázok 3), chemoorganotrofné s fermentatívnym i respiračným typom metabolizmu. Bežne sa vyskytujú v pôde, vo vode, na rastlinách a v zažívacom trakte živočíchov (najmä hlodavcov a hmyzu). *Serratia marcescens* vyvoláva u človeka meningitídu a infekcie dýchacích a močových ciest. Prítomné pigmentujúce kmene môžu vizuálne pôsobiť ako krvácanie (pigment prodigiozín je červený). Niektoré kmene vyvolávajú mastitidy[28]. Napriek tomu, že táto baktéria patrí ku enterobaktériam, významne sa od nich líši najmä

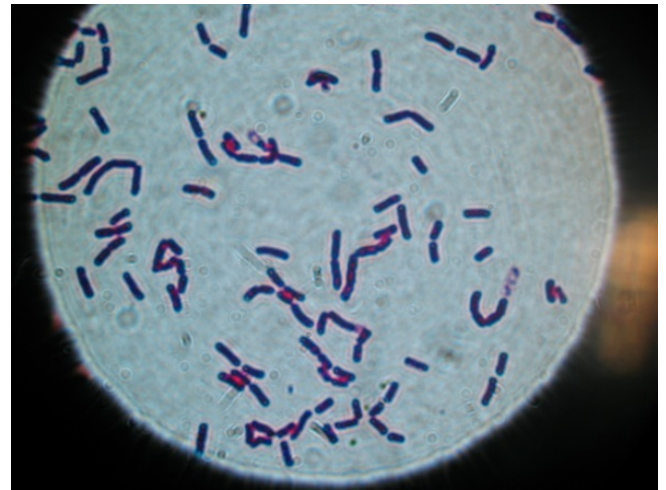
sekréciou extracelulárnejchitinázy, niekoľkých druhov proteáz, nukleázy, lipázy a DNAázy[29].

Bacillus cereus(Kmeň: *Firmicutes*; Trieda: *Bacilli*; Rad: *Bacillales*; Čľaď: *Bacillaceae*; Rod: *Bacillus*)

Grampozitívne opúzdrená pohyblivá spórotvorná tyčinka (Obrázok 4). Je to fakultatívny anaerób s pomerne veľkými vegetatívnymi bunkami (1 x 3 až 5). Patrí medzi saprofytické baktérie. Rastie v teplotnom rozmedzí 8 – 55°C, optimálne pri 28 – 35°C. Rozpätie hodnôt pH, ktoré ešte umožňujú rast je približne 4,9 – 9,3. Môže spôsobovať ochorenia z potravín. Ochorenie vzniká po požití kontaminovaných potravín enterotoxinogénnym kmeňom a z kontaminovaných kozmetických prípravkov, či očných kvapiek [30].



Obrázok 3 *Bacillus cereus*[4]



Obrázok 4 *Serratia marcescens*[3]

3 Cieľ práce

Cieľom experimentálnej časti tejto práce bolo stanoviť množstvo polyfenolov a flavonoidov pomocou UV-VIS spektrofotometrie. Pre tento účel boli pripravené vodné bylinné extrakty pri rôznych teplotách a vzorky boli odoberané v rôznych časových intervaloch. Následne bola stanovená antioxidačná aktivita všetkých odobraných vzoriek a antimikrobiálna aktivita pre vzorky s najvyššou koncentráciou polyfenolov a flavonoidov.

4 Experimentálna časť

4.1 Použité chemikálie, prístroje a mikroorganizmy

Kyselina gallová, Folin-Ciocalteuovo činidlo, Na_2CO_3 , katechín, 5% NaNO_2 , 10% AlCl_3 , $7\text{mmol/dm}^3\text{ABTS}^{\bullet+}$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, NaOH , univerzálny agar, ethanol pre UV/VIS, UV/VIS Helios, autokláv, vortex, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* (získané z českej zbierky mikroorganizmov PřFMU v Brne)

4.2 Príprava vzoriek

Celkovo bolo pripravených 42 vzoriek vodnou extrakciou polyfenolov a flavonoidov z kvetu čiernej bazy. Bol použitý sušený kvet čiernej bazy zakúpený od firmy ROSA CANINA.

4.2.1 Vodné extrakty bylín

Pre experiment bolo pripravených 6 typov vodných extraktov, z ktorých každý obsahoval 10 g sušeného kvetu bazy a 100 ml destilovanej vody. Prvý extrakt bol temperovaný pri 80°C . Druhý extrakt bol temperovaný pri 100°C . Z prvého a druhého výluhu boli po 1,5,10,15,20 a 25 minútach boli odoberané vzorky.

Tretí extrakt bol zahriaty na 80°C a štvrtý na 100°C . Tieto dva extrakty boli uchovávané pri laboratórnej teplote a po 1,5,10,15,20 a 25 minútach boli z nich odoberané vzorky.

Piaty výluh bol zahriaty na 80°C , šiesty na 100°C a oba boli uchovávané pri laboratórnej teplote. Vzorky z týchto výluhov boli odoberané po dosiahnutí teplôt: 100° , 90°C , 80°C , 70°C , 60°C , 50°C , 40°C a 30°C .

4.2.2 Stanovenie celkových polyfenolovspektrofotometricky

Meranie kalibračnej závislosti

Bolo pripravených 5 kalibračných roztokov kyseliny gallovej s koncentraciami 0,1-0,5mg/ml. Každý z týchto roztokov bol pripravený do suchej skúmavky, ktorá obsahovala 1ml Folin-Ciocalteuovoho činidla predom zriedeného destilovanou vodou v pomere 1: 9, 1ml destilovanej vody 0,1 ml kalibračného roztoku. Takto pripravené roztoky boli nechané stáť. Po 5 minútach bol pridaný 1 ml predom pripraveného nasýteného roztoku Na_2CO_3 . Roztoky boli premiešané a nechané stáť. Po 15 minútach bolo pridaných ešte 12 ml destilovanej vody pre dostatočné nariadenie roztoku a pre každý roztok bola trikrát spektrofotometricky zmeraná absorbancia pomocou UV/VIS spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 750 nm proti slepej vzorke, ktorá bola pripravená rovnakým spôsobom ako kalibračné roztoky a namiesto 0,1 ml kyseliny gallovej bola použitá destilovaná voda.

Vlastné stanovenie

Roztoky pre vlastné stanovenie boli pripravované analogicky ku kalibračným roztokom, kde boli namiesto kyseliny gallovej použité odoberané vzorky vodných bylenných

extraktov. Absorbancia bola pre každú vzorku zmeraná trikrát pre minimalizovanie chýb merania. Obsah celkových polyfenolov bol vypočítaný zo zostrojenej kalibračnej závislosti.

4.2.3 Stanovenie celkových flavonoidov spektrofotometricky

Meranie kalibračnej závislosti

Bolo pripravených 6 kalibračných roztokov katechínu s rozmedzím koncentrácií 0,05-0,3 mg/ml. Do 6 skúmaviek bolo napipetovaných 1,5 ml destilovanej vody, 0,5 ml roztoku katechínu a 0,2 ml 5% NaNO₂. Takto pripravený roztok bol premiešaný a nechal sa stáť. Po 5 minútach bolo pridaných 0,2 ml 10% roztoku AlCl₃. Skúmavky boli opäť premiešané a nechali sa stáť ďalších 5 minút. Následne bolo pridaných 1,5 ml NaOH a pre dostatočné nariadenie roztoku bolo pridaných 13ml destilovanej vody. Obsah skúmaviek bol dôkladne premiešaný, ponechaný stáť a po 15 minútach bola spektrofotometricky trikrát zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 510 nm. Ako slepá vzorka bol použitý roztok katechínu s destilovanou vodou.

Vlastné stanovenie

Roztoky pre vlastné stanovenie boli pripravené analogicky ku kalibračným roztokom, pričom namiesto katechínu boli použité odobrané vzorky z pripravených extraktov. Absorbancia bola pre každú vzorku zmeraná trikrát pre minimalizovanie chýb. Obsah celkových flavonoidov bol vypočítaný zo zostrojenej kalibračnej závislosti.

4.2.4 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity pomocou ABTS^{•+}

Roztok ABTS^{•+} bol pripravený rozpustením ABTS^{•+} v destilovanej vode na koncentráciu 7mmol/dm³. Následne bol pridávaný K₂S₂O₈ do výslednej koncentrácie 2,45 mmol/dm³. Roztok bol nechaný stáť pri izbovej teplote a v tme po dobu minimálne 12 hodín. Pred použitím bolo nutné ABTS^{•+} ešte zriediť ethanolom na UV/VIS absorbanciu A=0,70±0,02 pri vlnovej dĺžke 734 nm. Roztok bol meraný oproti ethanolu.

Vlastné stanovenie

Najskôr bol do zúženej kyvety napipetovaný 1 ml čistého ABTS^{•+} a bola zmeraná jeho absorbancia A₀. Do ABTS^{•+} bolo napipetovaných 10 μl vzorky extraktu. Takto pripravený roztok bol nechaný 10 minút stáť a následne bola zmeraná pokles absorbancie A₁₀ pri vlnovej dĺžke 734 nm. Pre výpočet celkovej antioxidačnej aktivity bola použitá kalibračná krivka A=0,00137. c.

4.2.5 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Oba použité organizmy *Serratia marcescens* aj *Bacillus cereus* boli očkovacou kľučkou naočkované zo šikmého agaru do 4 skúmaviek s predom pripraveným sterilným tekutým kultivačným médiom. Inkubácia prebiehala v termostate po dobu 4 dní.

Následne bolo pripravené tuhé kultivačné médium podľa návodu od výrobcu. Do Erlenmeyerovej banky boli navážené 4 g resp. 8g agaru a zaliate 100 ml resp. 200 ml destilovanej vody. Takto pripravené tuhé kultivačné médium bolo sterilované v autokláve po dobu 20 minút. Banka s médiom bola mierne ochladená a do jej objemu bolo napipetované 1,5

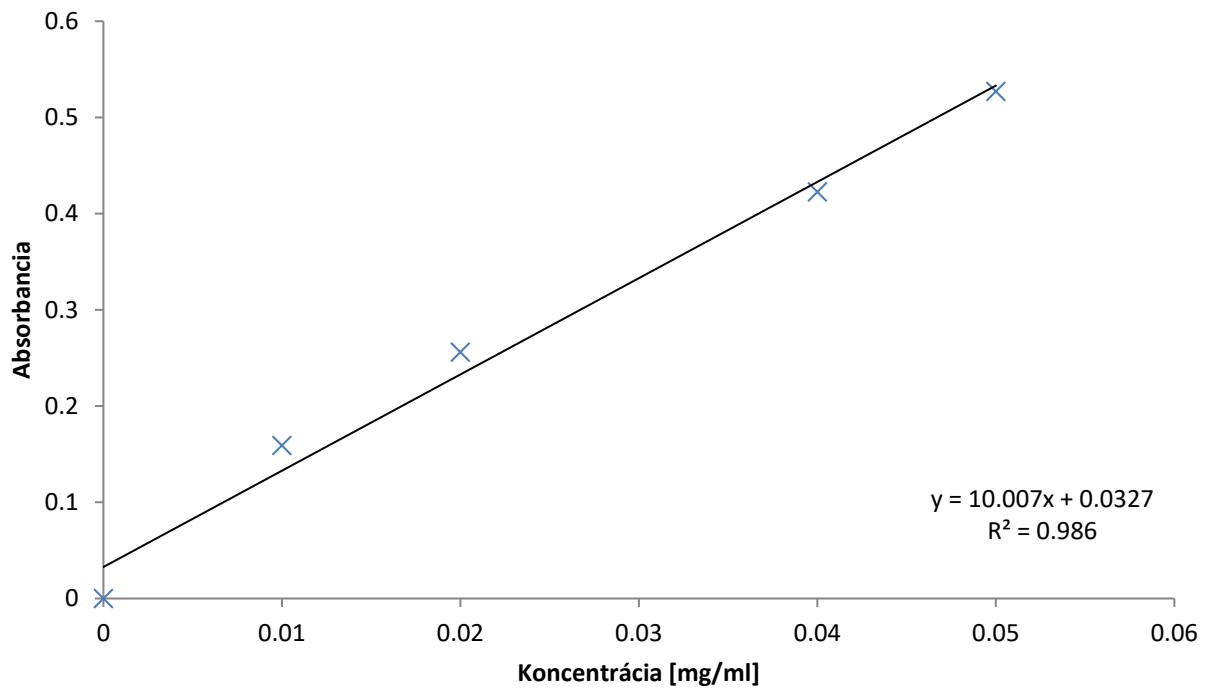
ml resp. 3 ml tekutého média s inokulom. Obsah skúmaviek s mikroorganizmami bol tesne pred odpipetovaním premiešaný na vortexe.

Pripravený agar s mikroorganizmami bol sterilne rozliaty do 12 Petriho misiek, pričom 6 misiek obsahovalo *Serratia marcescens* zvyšných 6 misiek obsahovalo *Bacillus cereus*. Médium sa ponechalo stáť pri laboratórnej teplote do doby, kým nebolo úplne tuhé. Do stuhnutého agaru v Petriho miskách boli korkovitou spravené 4 otvory s priemerom 1 cm. Do otvorov boli pomocou mikropipety napipetované vzorky. Každá Petriho miska obsahovala v jednom otvore destilovanú vodu ako referenčnú vzorku a vo zvyšných troch jednu z odobraných vzoriek bylinného extraktu. Pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity boli použité len vzorky s najvyšším obsahom polyfenolov a flavonoidov.

5 Výsledky a diskusia

5.1 Stanovenie celkových polyfenolov

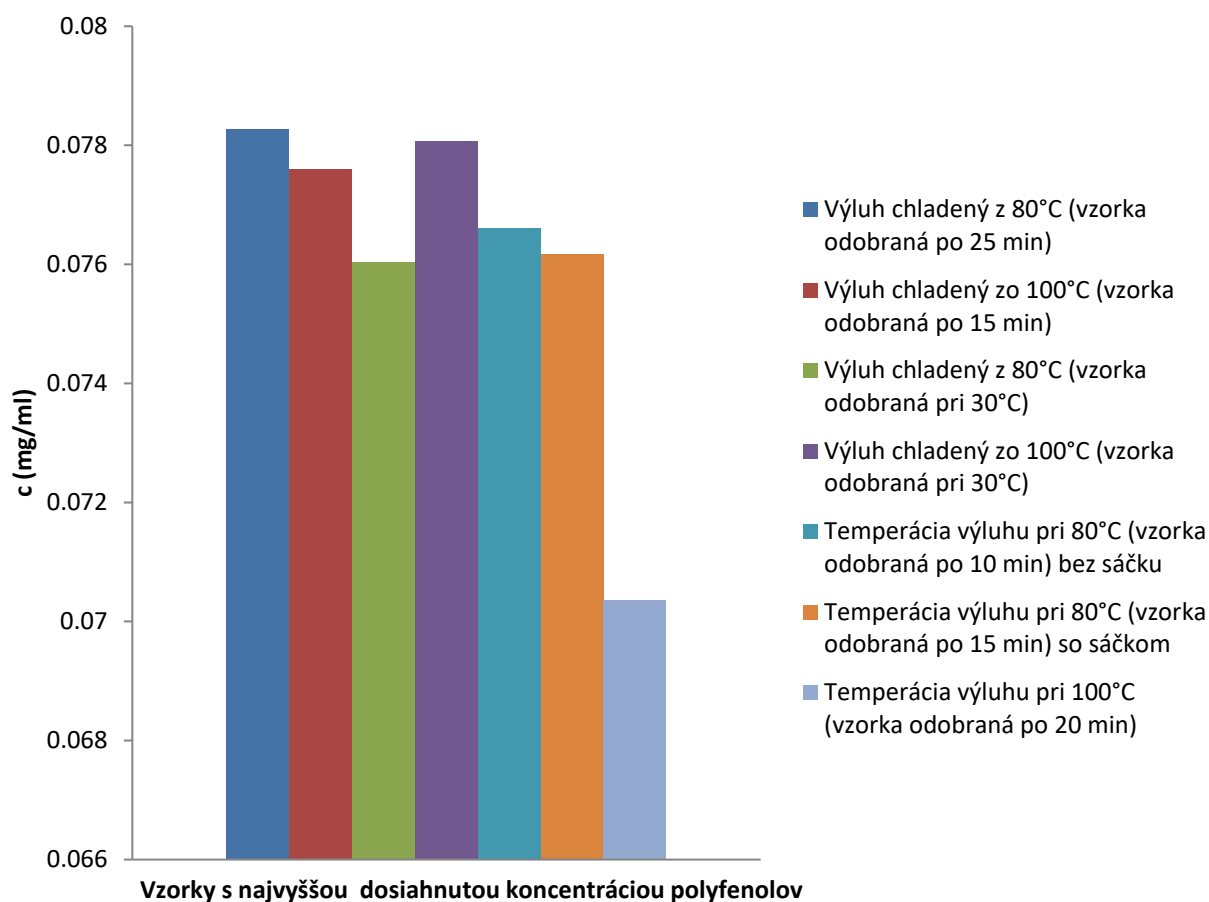
Koncentrácia celkových polyfenolov bola stanovená pomocou lineárnej regresnej priamky, ktorá vyjadruje kalibračnú závislosť kalibračných roztokov kyseliny gallovej. (Graf č.1) Absorbancia každého roztoku bola zmeraná trikrát a z nameraných hodnôt bol použitý ich aritmetický priemer.



Graf č. 1 Kalibračná krivka kyseliny gallovej

Z každého typu merania bol vybraný výsledok s najvyššou hodnotou koncentrácie polyfenolov, ktorý bol vypočítaný pomocou absorbancie. Výsledky sú zapísané v tabuľke č.1 a porovnané v grafe č. 1

Extrakt	Koncentrácia polyfenolov [mg/ml]
Vzorka ochladená z 80°C (po 25 min)	0,078275
Vzorka ochladená zo 100°C (po 10 min)	0,077609
Vzorka ochladená z 80°C (30°C)	0,076043
Vzorka ochladená zo 100°C (30°C)	0,078075
Vzorka temperovaná na 80°C (po 10 min) – bez lúhovaného sáčku	0,07661
Vzorka temperovaná na 100°C (po 20 min)	0,070353
Vzorka temperovaná na 80°C (po 15 min) – s lúhovacím sáčkom	0,076177

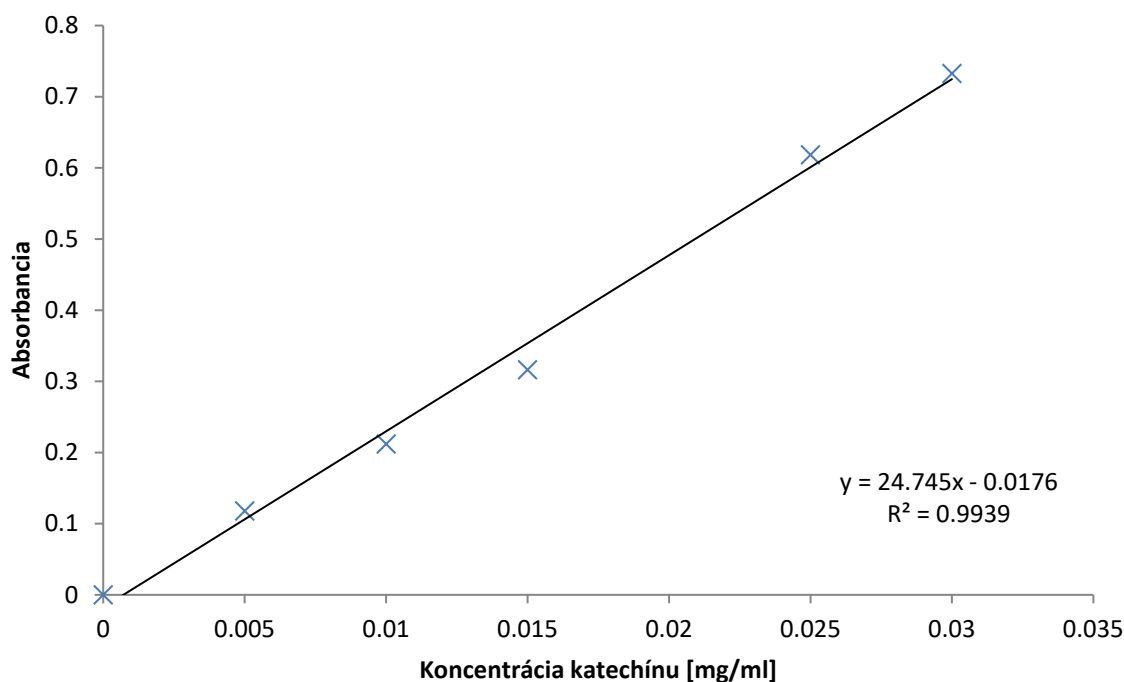


Graf č. 2: Grafické porovnanie najvyšších koncentrácií polyfenolov

Z grafu č. 2 vyplýva, že najvyššiu koncentráciu polyfenolov dosiahla vzorka z výluhu chladeného z 80°C odobraná po 25 minútach a vzorka z výluhu chladená zo 100°C odobraná po dosiahnutí teploty 30°C. Naopak najnižšiu koncentráciu polyfenolov dosiahla vzorka z výluhu temperovaného pri 100°C odobraná po 20 minútach. Touto metódou prípravy výluhu sa nepodarilo dosiahnuť vyššiu koncentráciu polyfenolov.

5.2 Stanovenie celkových flavonoidov

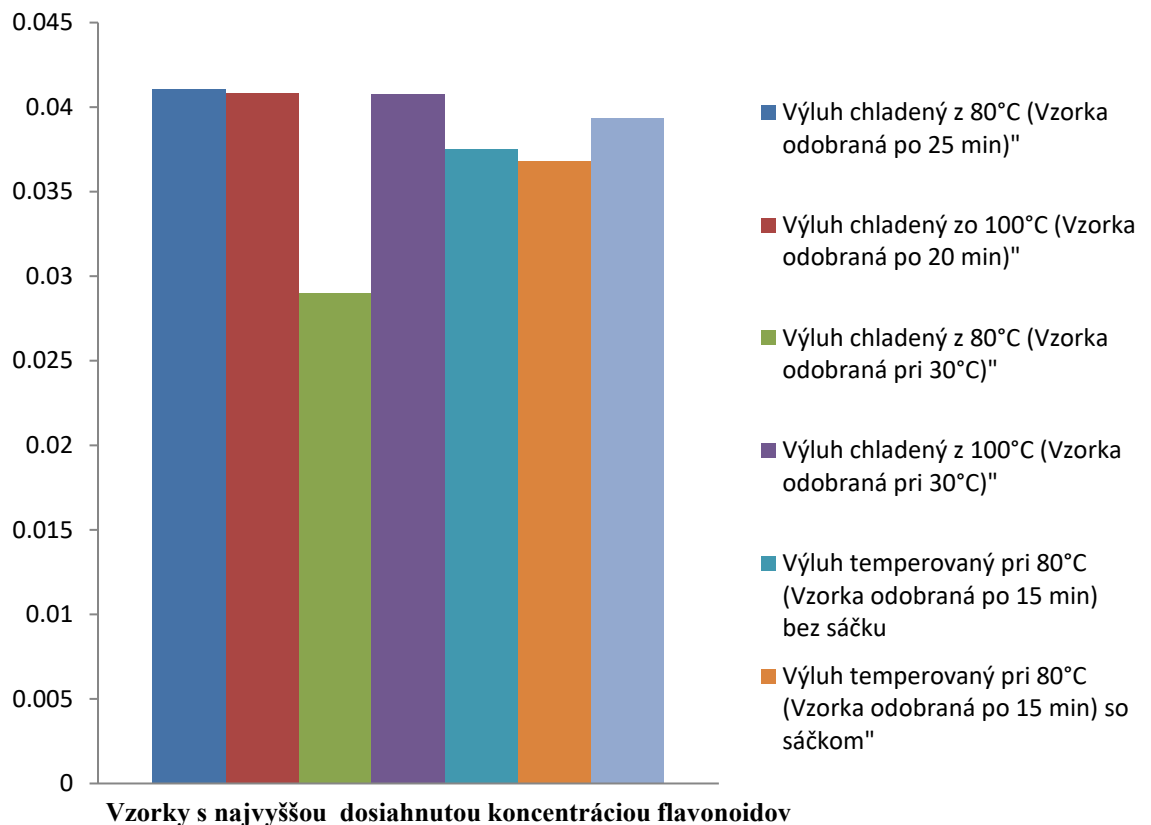
Koncentrácia celkových flavonoidov bola stanovená pomocou lineárnej regresnej priamky, ktorá vyjadruje kalibračnú závislosť kalibračných roztokov katechínu. (Graf č. 2) Absorbancia každého roztoku bola zmeraná trikrát a z nameraných hodnôt bol použitý aritmetický priemer.



Graf č. 3 : Kalibračná krivka katechínu

Stanovenie prebiehalo kolorimetrickou metódou pomocou katechínu, ktoré obsahuje rôzne zastúpenie molybdenánov a wolfrámov, ktorých redukciou znikajú modro sfarbené oxidy spôsobujúce farebnosť roztokov. Intenzita zafarbenia roztoku odpovedá množstvu oxidovaných polyfenolov vo vzorke, ktoré bolo ďalej stanovené spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 750 nm. $A = 1,3679 \cdot c$.

Extrakt	Koncentrácia flavonoidov [mg/ml]
Vzorka ochladená z 80°C (po 25 min)	0,041083
Vzorka ochladená zo 100°C (po 20 min)	0,040814
Vzorka ochladená z 80°C (30°C)	0,028986
Vzorka ochladená zo 100°C (30°C)	0,040787
Vzorka temperovaná na 80°C (po 15 min) – bez lúhovaného sáčku	0,037523
Vzorka temperovaná na 100°C (po 10 min)	0,039357
Vzorka temperovaná na 80°C (po 15 min) – s lúhovacím sáčkom	0,036826

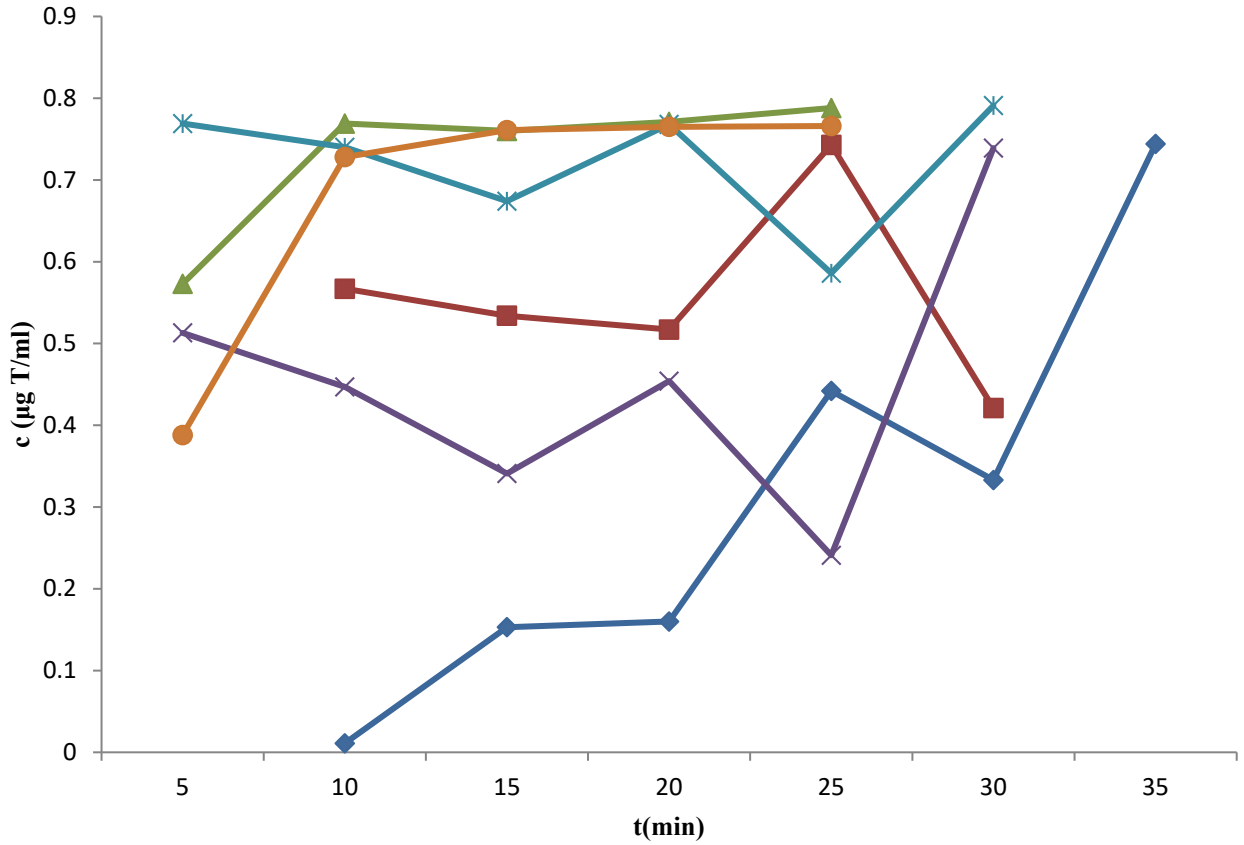


Graf č.4 : Grafické porovnanie najvyšších koncentrácií flavonoidov

Z grafu č. 4 vyplýva, že vzorka z výluhu chladeného z 80°C odobraná pri 30°C dosiahla najnižšiu koncentráciu flavonoidov. Uvedená koncentrácia bola zároveň najvyššia, akú sa podarilo touto metódou dosiahnúť. Ostatné vzorky nedosiahli výrazné rozdiely v koncentracii flavonoidov.

5.3 Stanovenie antioxidantnej aktivity

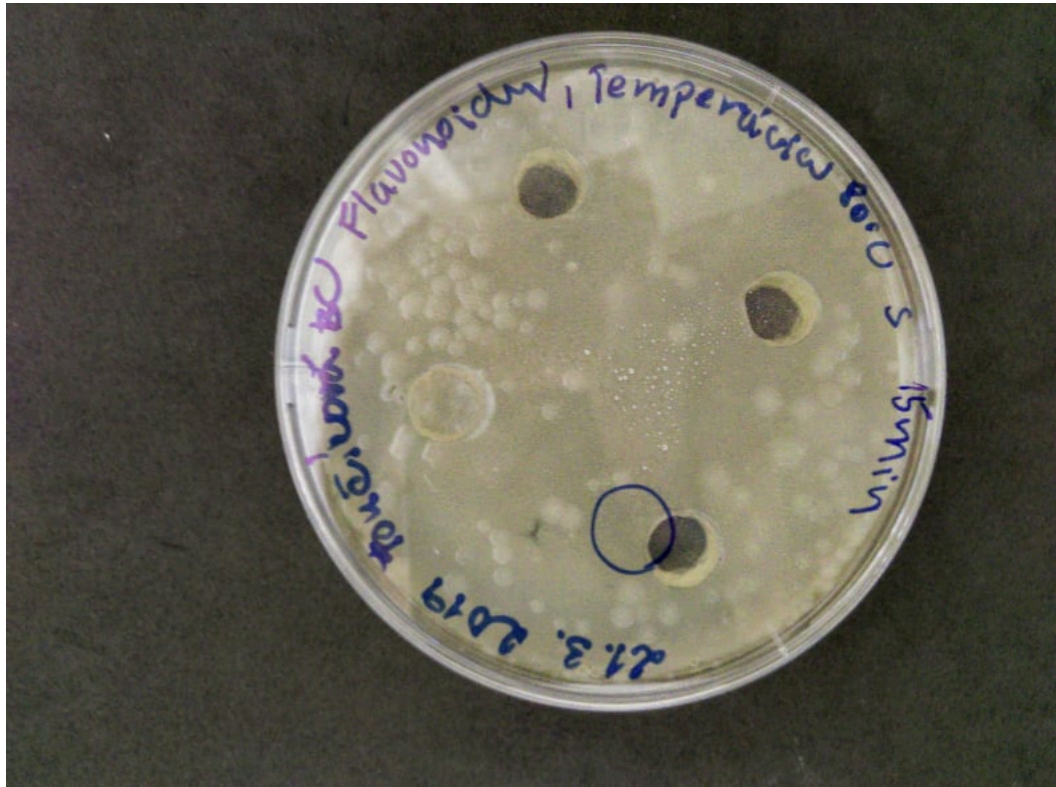
Antioxidantná aktivita bola stanovená podľa vyššie uvedeného postupu. Výsledné namerané hodnoty antioxidantnej aktivity extraktov sú zobrazené v grafoch č. 5. Väčšina roztokov má konečnú antioxidantnú aktivitu v bizkej hodnote.



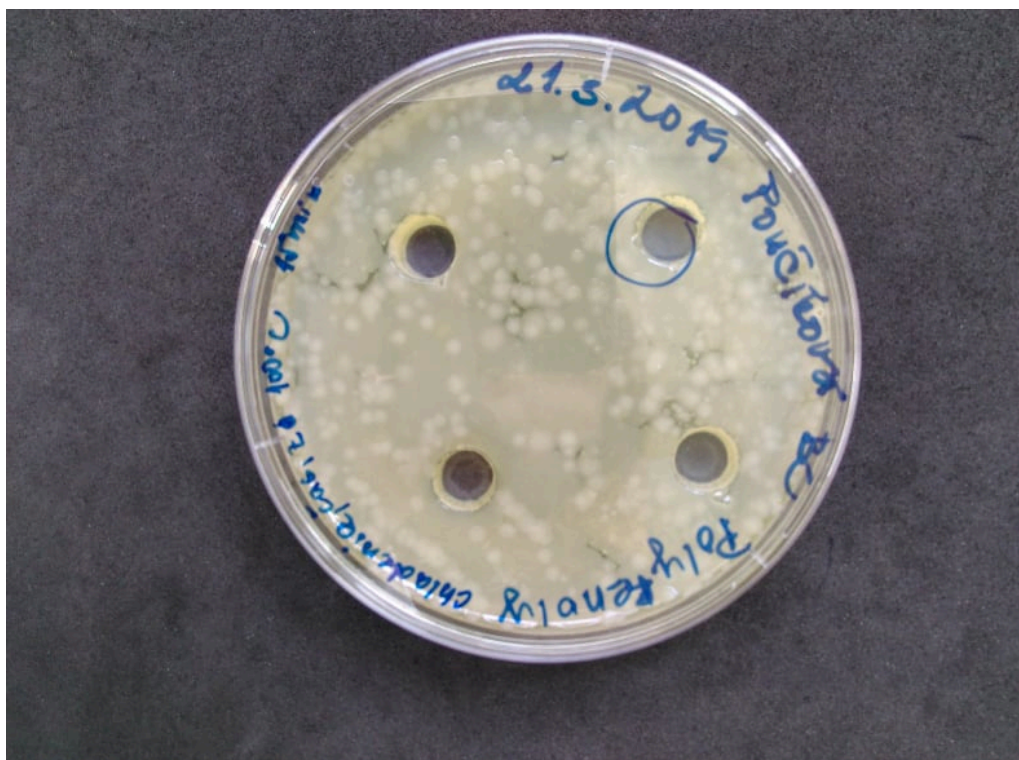
Graf č.5 : Príbeh antioxidantnej aktivity v závislosti na čase

5.4 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Antimikrobiálna aktivita testovaných vzoriek bola prevádzaná difúznou jamkovou metódou. Vybraná bola jedna gramnegatívna baktéria *Serratia marcescens* a jedna grampozitívna baktéria *Bacillus cereus*. Tieto baktérie boli kultivované na univerzálnom agare 72 hodín pri 27°C. Analyzované výluhy nemali žiaden zjavný antimikrobiálny účinok.



Obrázok 5 *Bacillus cereus* (Flavonoidy- Teperácia 80°C, vzorka po 15 min)



Obrázok 6 *Bacillus cereus* (Polyfenoly- chladenie zo 100°C, vzorka po 15 min)



Obrázok 7 *Serratia marcescens* (Polyfenoly- Chladenie z 80°C, vzorka po 20 min)



Obrázok 8 *Serratia marcescens* (Flavonoidy- chladenie z 80°C, vzorka po 25 min)

6 Záver

Porovnaním rôznych metód prípravy výluhov bolo zistené, že:

Relevantné je porovnávanie vzoriek odoberaných v rovnakých časových intervaloch. Nie je relevantné porovnávanie časových a teplotných intervalov. Po dosiahnutí najvyššieho bodu koncentrácie polyfenolov a flavonoidov boli tieto koncentrácie pri všetkých použitých metódach približne rovnaké. Za najkratší čas sa však podarilo dosiahnuť najvyššiu koncentráciu teplotou pri 80°C. Pri porovnaní antioxidačnej aktivity pri väčšine vzoriek nenastali významné rozdiely. Najvyššiu antioxidačnú aktivitu vykazovali však vzorky temperované pri 100°C a 80°C.

Antimikrobiálna aktivita bola testovaná voči *Bacillus cereus* a *Serratia marcescens*. Mikroorganizmy boli vybrané tak, aby testovanie prebehlo voči grampozitívnej aj gramnegatívnej baktérii. Testované boli iba vzorky najvyššími koncentraciami polyfenolov a flavonoidov. Žiadny z testovaných výluhov nevykazoval pozorovateľnú antimikrobiálnu aktivitu. Výluh z bazového kvetu teda nie je účinný proti mikroorganizmom *Bacillus cereus* a *Serratia marcescens*.

- [1] WENDYS, 2015. HerbářWendys. *Botanika.wendys.cz: Sambucusnigra - bez černý* [online]. [cit. 2019-03-03]. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/index.php/14-herbar-rostlin/501-sambucus-nigra-bez-cerny>
- [2] PIETTA Piergiorgio, MINOGGIO Markus a BRAMATI Lorenzo, 2003. Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry* [online]. 28. Elsevier Science, s. 257-312 [cit. 2019-03-03]. ISBN 9780080542058. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572599503801436#!>
- [3] GROTEWOLD E. The Science of Flavonoids. New York: Springer Science+Business Media, Inc., 2006. 274 p. ISBN-13: 978-0387-28821-5.
- [4] VELÍŠEK, J., Chemie potravin 3. 2. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. 368s. ISBN 80-86659-02-X.
- [5] KOPŘIVA, Vladimír. Antioxidační kapacita potravin [online]. 2009 [cit. 13-2-2013].
- [6] Scicell(2018) Antimikrobiálna aktivita. *SciCell.org*. <http://www.scicell.org/produkt/antimikrobialna-aktivita/>
- [7] SHAN, Bin, Yizhong Z. CAI, Mei SUN a Harold CORKE. 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents: a precious spice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* online. 53(20), 7749-7759 cit. 2016-05-02. DOI: 10.1021/jf051513y. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf051513y>
- [8] Naczek, M. and Shahidi, F. (2004) Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography*, 1054, 95-111. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01409-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01409-8)
- [9] Tzagoloff, Alexander. (1963). Metabolism of Sinapine in Mustard Plants. I. Degradation of Sinapine into Sinapic Acid & Choline. *Plant physiology*. 38. 202-6. 10.1104/pp.38.2.202.
- [10] Shahidi, Fereidoon & Naczek, Marian. (1992). An overview of the phenolic compounds of canola and rapeseed: Chemical, sensory and nutritional significance. *Journal of Oil & Fat Industries*. 69. 917-924. 10.1007/BF02636344.
- [11] Zoecklein, Bruce & C. Fugelsang, Kenneth & H. Gump, Barry & S. Nury, Fred. (1995). *Production Wine Analysis*. 10.1007/978-1-4615-8146-8.
- [12] J. Mabry, Tom & Markham, K.R. & Thomas, M.B.. (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. 41-164. 10.1007/978-3-642-88458-0_5.
- [13] D. SENTER, S & A. ROBERTSON, J & I. MEREDITH, F. (2006). Phenolic Compounds of the Mesocarp of Cresthaven Peaches during Storage and Ripening. *Journal of Food Science*. 54. 1259 - 1268. 10.1111/j.1365-2621.1989.tb05968.x.
- [14] KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Rostlinné fenoly v allelopatii. *Chemické listy*, 1999, vol. 93, s. 243 – 248.

- [15] OPEKAR, F., JELÍNEK, I., RYCHLOVSKÝ, P., PLZÁK, Z. Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem, 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. 201 s. ISBN 80-2460-553-8.
- [16] SOMMER, L. a kol. Základy analytické chemie II., 1. vyd. Brno: Vutium, 2000. 347 s. ISBN 80-2141-742-0.
- [17] SINICA, Alla. Ústav analytické chemie VŠCHT Praha [online]. 2006. [cit. 2013-02-19]. Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra.
- [18] PĚNČÍKOVÁ, Hana. Analytická chemie a chemická laboratorní cvičení (učební text pro 4. ročník), 1. vyd. Brno: Střední průmyslová škola chemická, 2006.
- [19] BARTUŠEK, M., PAZOUREK, J. Chemistry Department at FS MU BRNO [online]. 2003. [cit. 2013-02-19]. Základy metod analytické chemie.
- [20] SHEN, Y., JIN, L., XIAO, P., LU, Y., BAO, J. Totalphenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science*, 2009, vol. 49, pp. 106 – 111.
- [21] ŠTÍPEK, Stanislav. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
- [22] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179.
- [23] KARADAG, Ayse, Beraat OZCELIK a Samim SANER. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*. 2009, č. 2, s. 41-60
- [24] ARTS, Mariken J.T.J, Guido R.M.M HAENEN, Hans-Peter VOSS a Aalt BAST. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and chemical Toxicology*. 2004, č. 42, s. 45-49.
- [25] MACDONALD-WICKS, Lesley K, Lisa G WOOD a Manohar L GARG. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, č. 86, s. 2046-2056.
- [26] BEDNÁŘ, Marek 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
- [27] VOTAVA, Miroslav. c2010. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-04-7.
- [28] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. Základy obecné mikrobiologie. Ilustrace Magdalena Martínková. Brno: Masarykova univerzita, 2015, 255 stran. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [29] HEJAZI, A., AUCKEN, H.M. a FALKINER, F.R.. 2000. Epidemiology and susceptibility of *Serratia marcescens* in a large general hospital over an 8-year period. *Journal of Hospital Infection* online. 45(1), 42-46 cit. 2016-05-03. DOI: 10.1053/jhin.1999.0722. ISSN 01956701. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670199907223>
- [30] OMEMU A. M, OBADINA O. A, TAIVO G. J, OBUOTOR T.M.. Microbiological Assessment and Prevalence of Food Borne Pathogens in Street Vended *Wara* - Nigerian White Cheese. *American Journal of Food and Nutrition*. 2014; 2(4):59-62. doi: 10.12691/ajfn-2-4-2.
- [31] 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>
- [32] 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>
- [33] 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>

Zoznam obrázkov

- [1] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin* 3. 2. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. 368s. ISBN 80-86659-02-X.
- [2] SINICA, Alla. Ústav analytické chemie VŠCHT Praha [online]. 2006. [cit. 2013- 02-19]. Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra
- [3] LIU J, KWON YH. Seton Infection: Serratia Marcescens: 57-year-old white female with 1 day history of redness, swelling, and pain in her right eye. EyeRounds.org. March 5, 2005; Available from: <http://www.EyeRounds.org/cases/34-setoninfection.htm>.
- [4] Bacillus cereus, 2019. *BC Centre for Disease Control* [online]. [cit. 2019-04-13]. Dostupné z: <http://www.bccdc.ca/health-info/diseases-conditions/bacillus-cereus>