



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

IZOLACE AKTÍVNÍCH LÁTEK S ANTIOXIDAČNÍMI VLASTNOSTMI Z LIGNOCELULOZOVÝCH ODPADŮ

ISOLATION OF ACTIVE SUBSTANCES WITH ANTIOXIDATIVE PROPERTIES FROM LIGNOCELLULOSIC
WASTE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Karolína Jurová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1886/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Karolína Jurová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Izolace aktivních látek s antioxidačními vlastnostmi z lignocelulózových odpadů

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše zaměřená na přírodní látky s antioxidační aktivitou i a možnosti jejich izolaces lignocelulózových odpadů.
2. Příprava extraktů z různých druhů matolin se zaměřením na antioxidační aktivitu.
3. Stanovení antioxidačních vlastností u připravených extraktů.
4. Modifikace nosiče na bázi bakteriální celulózy pomocí získaných extraktů.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Karolína Jurová
studentka

prof. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na izolaci účinných látek s antioxidačními vlastnostmi z lignocelulózových odpadů. Cílem této práce bylo modifikovat bakteriální celulózu (BC) extrakty z hroznových výlisků, které vykazují vysokou antioxidační aktivitu. Hroznové výlisky patří do skupiny lignocelulózových odpadů s vysokým obsahem bioaktivních látek např. polyfenolů, které významně přispívají k antioxidační účinnosti.

V této práci byla testována hypotéza, že extrakty z matolin mohou poskytnout antioxidační účinnost bakteriální celulóze. Extrakty z hroznových výlisků byly připraveny ze zmrazených a lyofilizovaných matolin pomocí 70% acetonového, 70% etanolového nebo 50% etanolového rozpouštědla. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly stanoveny pro lyofilizovaný extrakt připravený extrakcí matolin 70% acetonem. Připravené extrakty byly dále použity k modifikaci bakteriální celulózy ve formě filmů (suchá BC) a hydrogelů (vlhká BC). Ukázalo se, že obě formy BC lze účinně modifikovat pomocí extraktů z matolin, přičemž ale hydrogel BC dosáhl vyšší antioxidační aktivity ve srovnání se suchým filmem BC. Takto modifikovanou bakteriální celulózu s antioxidační aktivitou lze využít v různých aplikacích v oboru potravin, kosmetiky a medicíny.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lignocelulózové odpady, vinné matoliny, extrakce, antioxidační aktivita, bakteriální celulóza

ABSTRACT

This thesis focuses on isolating active substances with antioxidant properties from lignocellulosic wastes. This work aimed to modify bacterial cellulose (BC) with extracts from grape pomace, which show high antioxidant activity. Grape pomace belongs to the group of lignocellulosic wastes with high content of bioactive compounds such as polyphenols, which contribute significantly to antioxidant efficacy.

This work tested the hypothesis that grape extracts can provide antioxidative efficiency to BC. Grape pomace extracts were prepared from grape pomace frozen and lyophilized using a 70% acetone, a 70% ethanol or a 50% ethanol solvent. The highest values of antioxidant activity were determined for the lyophilized extract prepared by extracting grape pomace with 70% acetone. The extracts were further used to modify bacterial cellulose in the form of films (dry BC) and hydrogels (wet BC). It was shown that both forms of BC could be effectively modified using grape pomace extracts, but BC hydrogel achieved higher antioxidant activity compared to BC film. Furthermore, BC with antioxidant activity can be used in various food, cosmetics, and medicine applications.

KEY WORDS

Lignocellulosic wastes, grape pomace, extraction, antioxidative activity, bacterial cellulose

JUROVÁ, Karolína. *Izolace aktivních látek s antioxidačními vlastnostmi z lignocelulozových odpadů* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147625>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své práce prof. Ing. Adriáně Kovalčík, PhD. za odborné vedení mé diplomové práce a za cenné rady, které mi v průběhu jejího zpracování poskytla. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Martinu Chovancovi za pomoc s přípravou extraktů a Ing. Markétě Sobkové za pomoc při modifikaci BC.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Lignocelulózové odpady.....	8
2.1.1	Složení lignocelulózových materiálů	10
2.2	Hrozny	10
2.2.1	Vinné matoliny.....	11
2.3	Antioxidanty	12
2.3.1	Fenolické sloučeniny	12
2.3.2	Typy extrakčních metod	17
2.3.3	Využití antioxidantů	19
2.4	Bakteriální celulóza	19
2.4.1	Modifikace bakteriální celulózy.....	20
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	Použité chemikálie	23
4.2	Použité přístroje	24
4.3	Příprava vzorků	24
4.4	Charakterizace vzorků	26
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
5.1	Charakterizace vzorků	32
5.2	Modifikace BC vybranými extrakty.....	42
6	ZÁVĚR	49
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	51
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	59

1 ÚVOD

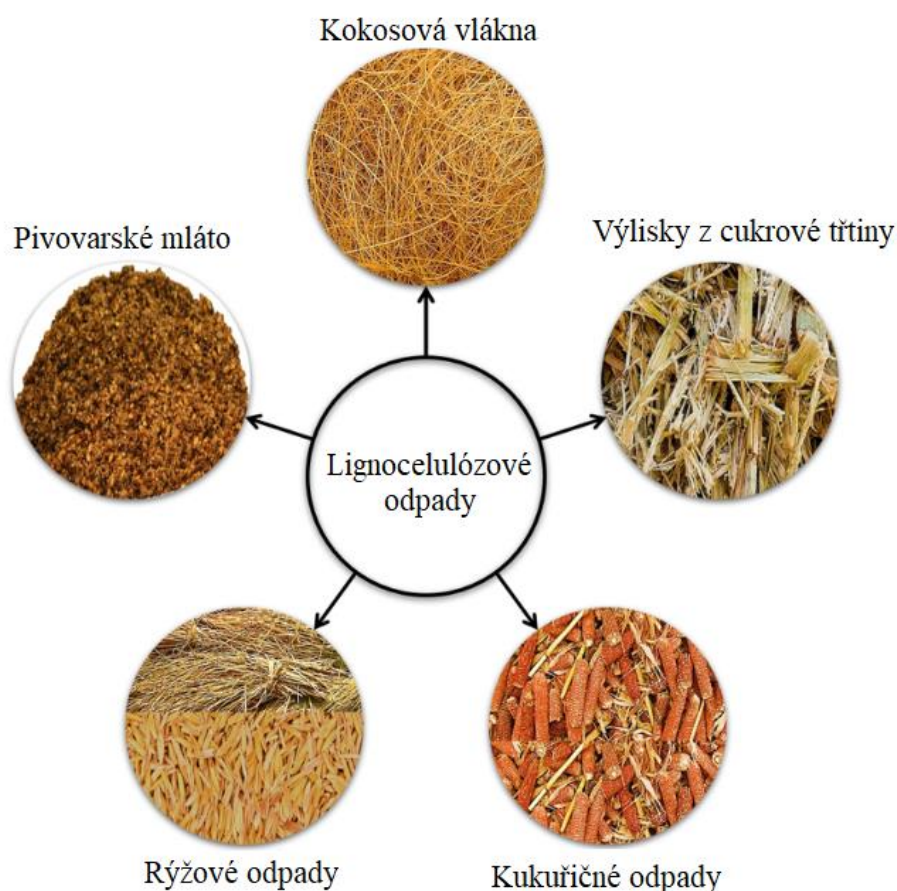
Celosvětová produkce odpadů se každoročně zvyšuje, a proto se hledají možné alternativy jejich recyklace a opětovného využití. Nejrozšířenější biomasou jsou v současné době lignocelulózy (LCO). Lignocelulózy jsou obnovitelné, potenciálně perspektivní materiály, které by mohly v budoucnosti najít široké uplatnění v papírenském, chemickém či petrochemickém průmyslu. Neustále se vyvíjející koncepce biorafinerie se snaží najít vhodné řešení, jak využít i meziprodukty a vedlejší produkty při zpracování lignocelulózy tak, aby bylo co nejméně zatěžováno životní prostředí [1; 2].

Z lignocelulózy je možné izolovat fenolické sloučeniny, které mají pozitivní vliv na lidský organismus. Inhibují oxidaci lipoproteinů o nízké hustotě, čímž dochází ke snížení rizika kardiovaskulárních chorob. Mají také antimikrobiální, protizánětlivé nebo antioxidační účinky. Antioxidační účinky jsou způsobeny inhibicí oxidačních procesů, kdy dochází k vychytávání volných radikálů a reaktivních forem kyslíku. Díky tomuto mechanismu lze předcházet mnoha onemocněním včetně diabetu mellitu nebo rakoviny. Fenolické sloučeniny jsou z LCO extrahovány pomocí různých organických rozpouštědel. Mezi nepoužívanější rozpouštědla patří etanol, metanol, etyléter a etylacetát. Připravené extrakty je dále možné využít k modifikaci bakteriální celulózy (BC). BC je stabilní, nezánnětlivý biomateriál, který je využíván v lékařském, kosmetickém, potravinářském či farmaceutickém průmyslu [3; 4; 5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lignocelulózové odpady

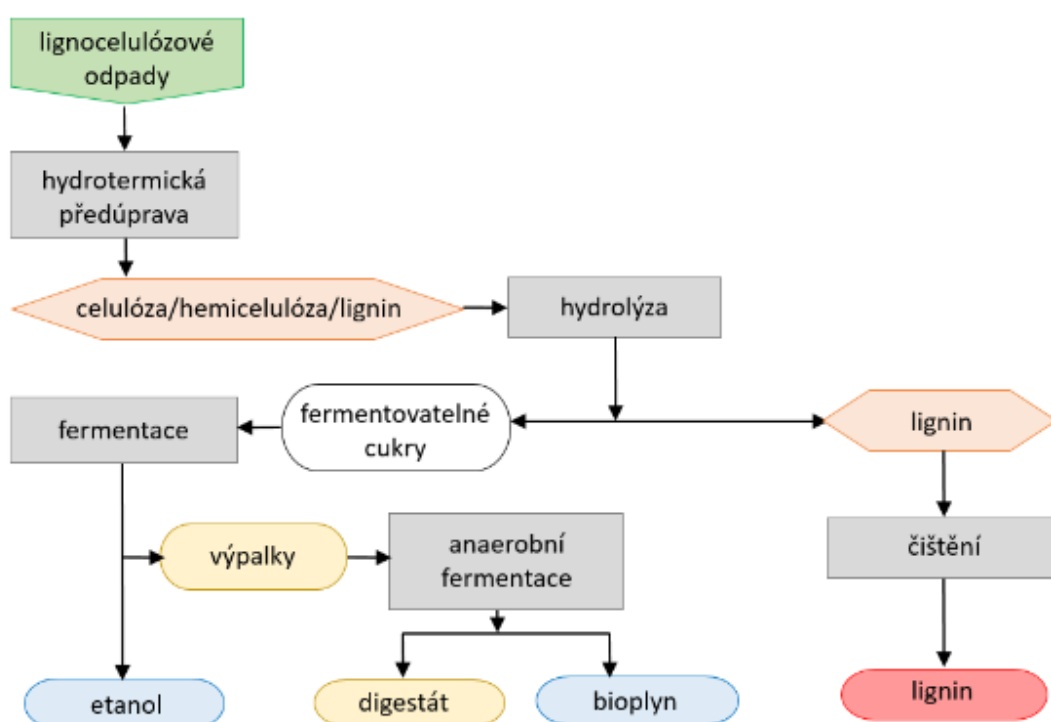
Lignocelulózové odpady (LCO) pocházejí z rostlinných zdrojů a jsou to vedlejší produkty potravinářského průmyslu, zemědělství a lesnictví. Vyskytují se ve velkém množství na celém světě, kdy (Periyasamy a kol., 2022) uvádí, že roční produkce LCO je odhadována na 10–50 miliard tun. Mezi lignocelulózové odpady patří například kávová sedlina, vinné matoliny, obilné klasy, kukuřičná sláma, banánové slupky nebo kokosová vlákna (Obr. 1) [2; 6].



Obr. 1: Příklady lignocelulózových odpadů [7]

V současné době nachází využití jen malá část LCO, ale vzhledem ke zvyšujícímu se trendu aplikace cirkulární ekonomiky se hledají další možnosti jejich využití. Hlavním cílem je najít finančně dostupné a ekologicky šetrné možnosti zpracování těchto odpadů tak, aby nedocházelo k uvolňování vedlejších toxických produktů, které by znečišťovaly planetu. Lignocelulózové odpady nacházejí uplatnění jako zdroj pro výrobu bioenergie, chemikálií,

kompozitů a jsou považovány za dostupnou alternativní formu pro výrobu paliv. Při nevhodném zpracování LCO však vzniká riziko znečištění životního prostředí oxidem uhličitým, oxidem siřičitým a dalšími toxickými plyny. Problémem při zpracování LCO je rezistence vůči rozkladu na jednotlivé podjednotky např. lignin, celulózu a hemicelulózy. To souvisí s vysokými finančními náklady a ekologickou zátěží. Řešením by mohlo být využití pokročilých moderních technologií za účelem výroby produktů. (Periyasamy a kol., 2022) uvádí, že po oddělení hlavních složek (celulóza, hemicelulózy, lignin), může dojít k rozložení těchto složek pomocí kyselé nebo enzymatické hydrolyzy na monomerní jednotky sacharidů [2; 6; 8; 9; 10; 11].

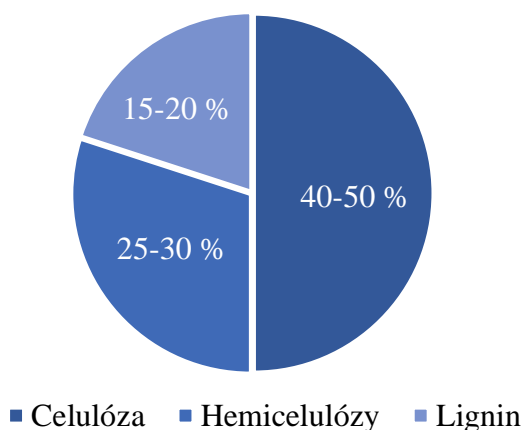


Obr. 2: Příklad uspořádání lignocelulózové biorafinerie [12]

Nejvhodnějšími metodami pro zpracování lignocelulózových odpadů jsou aktuálně pyrolýza a zplyňování. Pyrolýza je tepelný rozklad organického materiálu na plynné (plyn), kapalné (olej) nebo pevné produkty (dřevěné uhlí). Olej získaný pyrolýzou je možné dále zpracovávat. Využívá se jako palivo nebo může být přeměněn na tepelnou či elektrickou energii. Zplyňování je termochemické proces, kdy do dochází k přeměně organického materiálu na syntézní plyn. Plyn je dále využíván jako zdroj energie nebo je přeměněn na biopalivo v kapalné formě [9; 12].

2.1.1 Složení lignocelulózových materiálů

Lignocelulózové materiály (LCM) se skládají ze tří základních složek, a to celulózy, hemicelulózy a ligninu (Obr. 3). Spolu vytváří komplex, díky němuž jsou vylepšeny mechanické vlastnosti (tuhost, pružnost) buněčných stěn. Minoritně jsou zastoupeny proteiny, lipidy nebo minerální látky [6].



Obr. 3: Procentuální zastoupení celulózy, hemicelulózy a ligninu v lignocelulózových materiálech [13]

2.2 Hrozny

Hrozny mají dlouhou a bohatou historii, kdy byly již po staletí využívány především pro výrobu vína. Vinařství je hojně rozšířené po celém světě. Mezi vinařské velmoci patří Itálie, Španělsko či Francie. V 80. letech 20. století byl formulován takzvaný francouzský paradox, jež vychází z faktu, že u Francouzů je pozorována nízká míra úmrtnosti na ischemickou chorobu srdeční (ICHS) i přesto, že jejich jídelníček obsahuje nadměrné množství potravin bohatých na nasycené tuky. Tento paradox je pravděpodobně způsoben pitím vína, kdy jeho mírná a pravidelná konzumace poskytuje ochranný účinek proti ICHS. Vlivem konzumace vína dochází ke zvýšení koncentrace lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL), které jsou pro tělo prospěšné, což v konečném důsledku vede až k 50% snížení rizika ICHS. Zatím není přesně objasněno, proč tento fenomén vzniká, avšak nejvíce se připisuje vysokému obsahu polyfenolů ve víně [14; 15; 16; 17; 18].

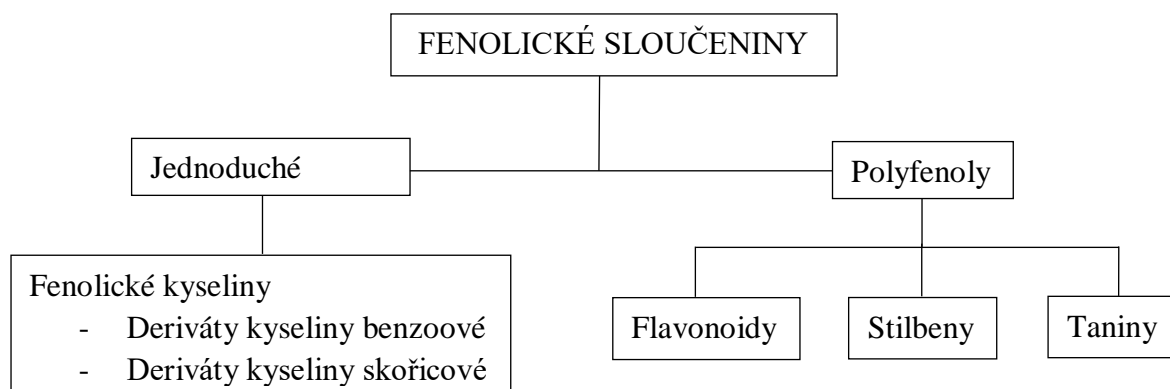
Pěstování vinné révy a následná výroba vína má velmi bohatou historii i v České republice. V současné době jsou vína z Čech a Moravy považována za jedny z nejkvalitnějších v Evropě. V roce 2021 bylo dle dat Českého statistického úřadu sklizeno 90 000 tun hroznů vinné révy. V České republice se nacházejí dvě vinařské oblasti, a to Čechy a Morava. Na Moravě se nachází 96 % všech českých vinic a na Čechy tak připadají

zbylá 4 %. Tyto dvě oblasti se dále dělí na menší podoblasti, jež jsou specifické výrobou různých druhů vína. Na Moravě jsou to Znojemská, Mikulovská, Velkopavlovická a Slovácká oblast. V Čechách to je Mělnická a Litoměřická oblast. Vína z jednotlivých oblastí jsou charakteristická svou specifickou chutí a vůní. Ročně je v ČR vyprodukováno okolo 550 000 hl vína. S produkcí vína je však spjata i tvorba biologického odpadu, který tvoří asi 22 %. Tento odpad nachází využití při kompostování nebo krmení zvířete. Pěstují se tři základní druhy hroznových odrůd, a to černé, červené a bílé. Lidé je mohou konzumovat v různých formách, a to nejen ve formě vína, ale také jako rozinky, džus či čerstvé ovoce [14; 15; 19; 20; 21].

Hrozny jsou bohaté na důležité živiny, zejména vitamíny, minerální látky, vlákninu či fytochemikálie. Nachází se v nich významné množství bioaktivních sloučenin, ze kterých nejdůležitější jsou polyfenoly. Tyto látky mohou mít příznivé účinky na lidský organismus při léčbě kardiovaskulárních chorob a některých typů rakovin [14; 15; 22].

2.2.1 Vinné matoliny

Vinné matoliny jsou vedlejším produktem vinařského průmyslu, získané po vylisování hroznů. Jsou složeny ze slupky, semena a stopek. Celkově tvoří asi 20–25 % hmotnosti hroznů. Vinné matoliny se využívají na výrobu matolinové pálenky, vína či vinného oleje. Je známo, že jsou bohatým zdrojem přírodních antioxidantů. Jejich chemické složení závisí na mnoha faktorech (výsadba, sklizeň, typ odrůdy). Obsahují fenolické sloučeniny, zejména antokyany, flavanoly, stilbeny (resveratrol), fenolické kyseliny a lignin (Obr. 4). Hroznové slupky obsahují především barevné pigmenty antokyany. Zatímco ve stopkách a semenech se nachází velkým množstvím flavonoidů. Mimo fenolických sloučenin obsahují vinné matoliny lipidy, bílkoviny, vlákninu a minerální látky [14; 15; 23; 24].



Obr. 4: Nejzastoupenější fenolické sloučeniny ve vinných matolinách [24]

2.3 Antioxidanty

Fyziologické oxidanty vznikají při běžných procesech buněčného metabolismu, přičemž se vyskytují ve formě volných radikálů. Oxidační stres je způsoben zvýšenou hladinou reaktivního kyslíku či poklesem antioxidační obranyschopnosti organismu. Důsledkem je poškození životně důležitých biomolekul (proteinů, lipidů, DNA). Oxidační stres je spjatý s celou řadou onemocnění např. diabetes, kardiovaskulární a degenerativní choroby. Z tohoto důvodu je velmi důležité studovat potenciální antioxidační molekuly, které by působily proti škodlivému účinku stresu. Antioxidanty jsou molekuly, které zpomalují či inhibují oxidační stres na buněčné úrovni, a proto jsou užitečné při léčbě výše zmíněných onemocnění [10; 25].

Za jeden z důležitých zdrojů přírodních antioxidantů jsou považovány rostliny. Rostliny mají účinný obranný systém, který eliminuje toxický účinek volných radikálů. Mezi hlavní rostlinné antioxidanty patří terpenoidy, kyselina skořicová, kyselina benzoová, kyselina listová, kyselina askorbová, α -tokoferoly a tokotrienily. Kromě rostlin jsou charakteristické vynikajícími antioxidačními účinky také ovoce a zelenina, které obsahují betakaroten, antokyany, tokoferoly a další antioxidační látky. (Rimm a kol., 1996) uvádí, že lidé konzumující velké množství ovoce a zeleniny trpí méně chronickými onemocněními. (Conde a kol., 2011) stanovovali antioxidační aktivitu v LCM. Stanovené hodnoty antioxidační aktivity ve vybraných LCM jsou uvedeny v Tab. 1 [7; 25; 26; 27].

Tab. 1: Antioxidační aktivita stanovená ve vybraných lignocelulózových materiálech v g Troloxu/g extraktu pomocí ABTS [27]

Lignocelulózový materiál (LCM)	Antioxidační aktivita LCM (g Troloxu/g extraktu)
Kukuřičný klas	0,53
Eukalyptové dřevo	0,79
Mandlové skořápky	0,72
Kaštanové ořepky	0,85
Hroznové výlisky	0,70

Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity rostlin, které obsahují aromatický kruh s jednou či více hydroxylovými skupinami. Díky těmto hydroxylovým skupinám získávají antioxidační vlastnosti. Vyznačují se také dobrými protizánětlivými, antimikrobiálními, antitrombotickými, kardioprotektivními a vazodilatačními účinky. Bohatými zdroji

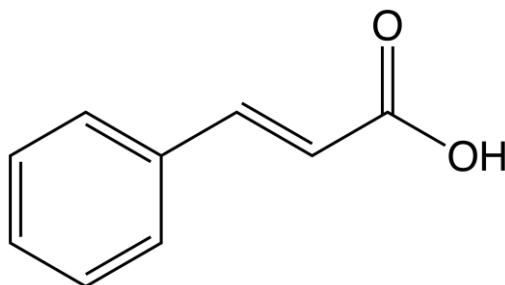
fenolických sloučenin jsou ovoce, zelenina, obiloviny, čokoláda či víno. (Conde a kol., 2011) stanovovali koncentrace fenolických sloučenin v LCM. Stanovené koncentrace fenolických sloučenin ve vybraných LCM jsou uvedeny v Tab. 2. Fenolické sloučeniny se dělí do dvou základních skupin na jednoduché fenoly (fenolické kyseliny) a polyfenoly (flavonoidy, karotenoidy, stilbeny, kumariny, lignany, taniny) [10; 23; 28; 29].

Tab. 2: Stanovené koncentrace fenolických sloučenin ve vybraných lignocelulózových materiálech v g kyseliny gallové (GAE)/g extraktu pomocí Folin-Ciocalteuova činidla [27]

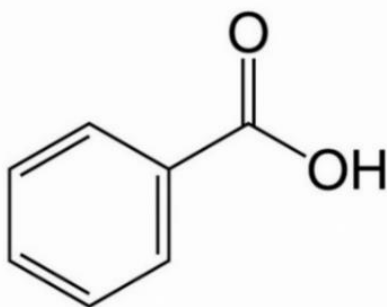
Lignocelulózový materiál (LCM)	Koncentrace fenolických sloučenin LCM (g GAE/g extraktu)
Kukuřičný klas	0,32
Eukalyptové dřevo	0,38
Mandlové skořápky	0,36
Kaštanové ořepky	0,43
Hroznové výlisky	0,38

Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny se vyskytují zejména v semenech, ovocných slupkách, listech zeleniny a houbách. Dělí se do dvou podtříd na deriváty kyseliny skořicové (Obr. 5) a deriváty kyseliny benzoové (Obr. 6). Hydroxyskořicové kyseliny (především kyselina ferulová, kávová, *p*-kumarová a sinapová) se vyskytují hojně v potravinách vázané ve formě jednoduchých esterů společně s kyselinou chinovou nebo glukózou. V porovnání s hydroxyskořicovými kyselinami je obsah hydroxybenzoových kyselin v potravinách velmi nízký s výjimkou některých druhů červeného ovoce a cibule [30; 31].



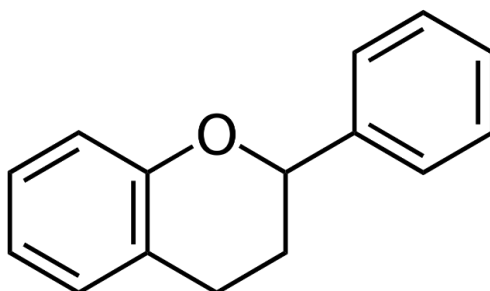
Obr. 5: Vzorec kyseliny skořicové [32]



Obr. 6: Vzorec kyseliny benzoové [33]

Flavonoidy

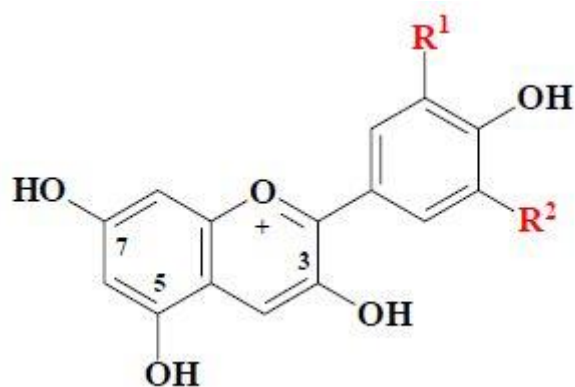
Flavonoidy jsou nejzastoupenější skupinou polyfenolických sloučenin. Jejich struktura se skládá ze dvou aromatických kruhů spojených tříuhlíkatým řetězcem a atomem kyslíku (Obr. 7). V přírodě se vyskytují ve volné i vázané formě. Dělí se do sedmi podtříd na flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, antokyanidiny, dihydroflavonoly a chalkony. Mají antioxidační, antibakteriální a protizánětlivé účinky, posilují imunitní systém a chrání kůži před škodlivým UV zářením, a i proto je dále zkoumáno jejich potenciální využití ve farmaceutické a lékařském průmyslu [26; 31; 34]



Obr. 7: Vzorec flavanu [35]

Antokyany

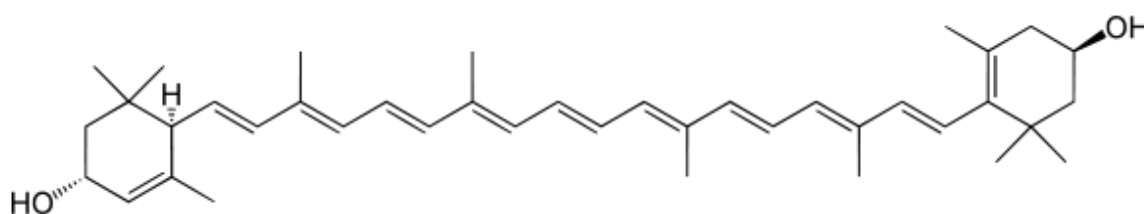
Antokyany jsou barviva, která patří do skupiny polyfenolických flavonoidů. Ve velké míře se vyskytují v ovoci, zelenině a květech a přispívají k jejich červenému až fialovému zbarvení. Vzhledem ke své netoxické povaze a biokompatibilitě s lidským tělem, jsou antokyany předmětem stále většího zájmu výrobců potravin a doplňků stravy jako zdroj pigmentů a antioxidantů. Chemická struktura antokyanů je tvořena glykosidovým derivátem obsahující antokyanidin (např. delfinidin, kyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin nebo malvidin), cukernou část a acylační skupiny (Obr. 8) [36; 37; 38].



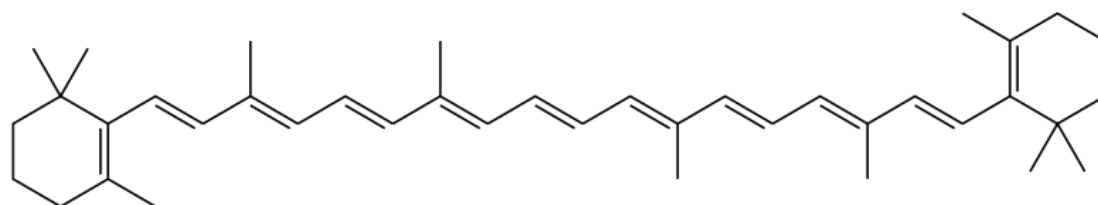
Obr. 8: Obecný vzorec antokyanů [39]

Karotenoidy

Karotenoidy jsou skupina terpenoidních žlutých až oranžovočervených pigmentů syntetizovaných fotosyntetickými organismy, bakteriemi a plísněmi. Dělí se do dvou podtříd na xantofyly (obsahují kyslík, Obr. 9) a karoteny (neobsahují kyslík, Obr. 10). Nacházejí se v rostlinách, ovoci, zelenině, houbách, řasách či rybách. Přestože jsou v přírodě velmi rozšířené, v lidské stravě se nachází jen malá část z nich. Mezi nejvíce zastoupené karotenoidy v potravinách patří především lutein, zeaxanthin, mezoxanthin a xantofyl. (Bungau a kol., 2019) uvádí, že lidé, kteří konzumují potraviny s vysokým obsahem karotenoidů trpí méně očními onemocněními [40; 41; 42].



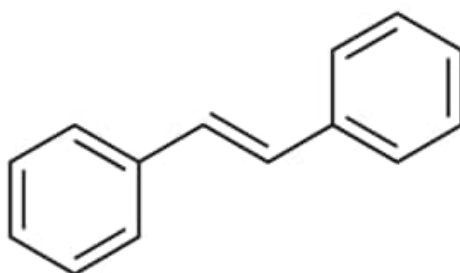
Obr. 9: Vzorec luteinu (xantofyl) [43]



Obr. 10: Vzorec betakarotenu (karoten) [44]

Stilbeny

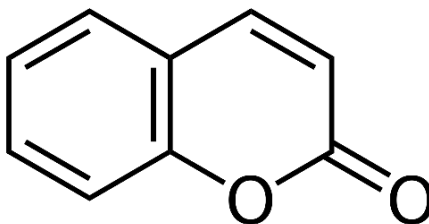
Stilbeny jsou substituované sloučeniny se dvěma aromatickými kruhy spojenými alifatickým řetězcem (Obr. 11). Většina stilbenů v rostlinách působí jako antimykotické fytoalexiny. Jedná se o sloučeniny, které jsou syntetizovány pouze v reakci na infekci nebo poranění. Stilbeny se v posledních letech stávají středem pozornosti ve vědě, jelikož mají velmi příznivé účinky na lidský organismus. Mají protizánětlivé, antikarcinogenní, antidiabetické a antidyslipidemické účinky. Nejznámějším zástupcem této skupiny je resveratrol, který má příznivý vliv na kardiovaskulární systém. Vyskytuje se v červeném víně, hroznech, arašídech a bobulích [31; 45; 46].



Obr. 11: Vzorec stilbenu [47]

Kumariny

Kumariny (Obr. 12) jsou sekundární metabolity obsažené v semenech, kořenech a listech rostlin. Tyto sloučeniny vykazují antikoagulační, protizánětlivé, protinádorové, hepatoprotektivní, ulcerogenní a antioxidační účinky. Využití nacházejí v kosmetickém průmyslu při výrobě esencí a parfémů, potravinářském průmyslu a zemědělství [48].



Obr. 12: Vzorec kumarinu [49]

Lignany

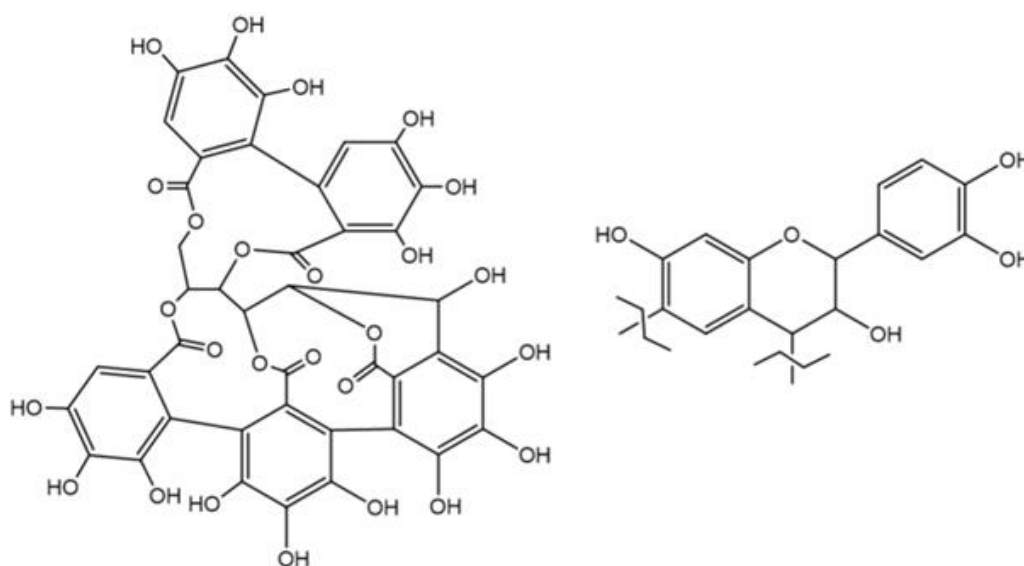
Lignany jsou difenolové sloučeniny, které obsahují strukturu 2,3-dibenzylbutanu, která vzniká dimerizací dvou zbytků kyseliny skořicové. Vyskytují se v poměrně nízkých koncentracích v různých semenech, zrnech, ovoci a zelenině. Nejbohatším zdrojem lignanů jsou lněné

semínko, sezam, česnek, olivový olej nebo pivo. Příjem lignanů ve stravě slouží jako prevence proti chronickým, kardiovaskulárním onemocněním a také některým typům rakoviny [31; 45; 50].

Taniny (Třísloviny)

Taniny jsou přírodní, ve vodě rozpustné polyfenoly, které se nacházejí v ovoci, bylinách a ve dřevě a kůře stromů. Jedná se o světle hnědé až tmavě hnědé prášky. Mají příznivý vliv na lidské zdraví a využívají se k léčbě bakteriálních infekcí, jelikož dokáží tvořit komplexy s bílkovinami [51; 52].

Největší průmyslové uplatnění nacházejí taniny, které jsou obsaženy ve tvrdém dřevě kaštanu (*Castanea sativa*) a kebračovníku (*Shinopsis lorentzii*). Dělí se do dvou skupin, a to na hydrolyzovatelné a kondenzované. V kaštanu jsou hojně zastoupeny především hydrolyzovatelné ellagitaniny (castalagin, izomer vescalagin, (Obr. 13)). Naopak v dřevě kebračovníku se nachází převážně taniny kondenzované (profisetinidiny, (Obr. 13)). Využití nacházejí v potravinářském průmyslu jako aditiva pro zvýraznění vůni a chuti vína. Zároveň slouží také jako lepidla, inhibitory koroze nebo síťovadla v pěnách [52].



Obr. 13: Struktura taninů-castalagin/ vescalagin (vlevo), profisetinidiny (vpravo) [52]

2.3.1 Typy extrakčních metod

Konvenční extrakce rozpouštědlem (CE)

Mezi CE patří macerace a hydrodestilace, které se využívají k extrakci fenolických sloučenin [53].

Macerace je extrakční metoda, kdy je tuhý vzorek louhován v organickém rozpouštědle či vodě. Nejpoužívanějšími rozpouštědly při extrakci fenolických sloučenin jsou metanol, etanol, aceton, voda nebo směs těchto rozpouštědel. Macerace probíhá nejméně tři dny, kdy obsah nádoby je pravidelně míchán a protřepáván, aby bylo dosaženo maximálního výtěžku. Nevýhodou této metody je spotřeba velkého množství rozpouštědla a také dlouhá doba extrakce [37; 54].

Hydrodestilace se využívá především pro extrakci silic z rostlin. Zahrnuje tři fyzikálně-chemické procesy: hydrodifuzi, hydrolyzu a rozklad teplem. Při hydrodestilaci je rostlinný materiál po nějakou dobu namočen ve vodě a následně je směs zahřívána. Alternativně je do rostlinného materiálu vstřikována pára. Horká voda nebo pára má hlavní vliv na uvolňování fenolických sloučenin. Jelikož se hydrodestilace často provádí při teplotě vyšší, než je teplota varu vody může dojít ke ztrátám těkavých složek, přírodních pigmentů a tepelně labilních sloučenin. Existují tři druhy hydrodestilace: destilace vodou, destilace vodou a párou a přímá destilace párou [55; 56].

Ultrazvukové extrakce (UE)

Metoda je založena na kavitaci vyvolané pomocí kompresních a expanzních cyklů spojených s průchodem ultrazvuku vzorkem o frekvenci 20 kHz až 100 MHz. Imploze kavitačních bublin vyvolá kolizi mezi částicemi, které mají za následek narušení částic a zvýšenou difuzi extrahovaných sloučenin do rozpouštědla. Použitím metody UE lze snížit celkovou dobu extrakce, spotřebu rozpouštědla. Zároveň extrakce probíhá při nízké teplotě a dochází ke zvýšení efektivity procesu [37; 57].

Enzymatická extrakce (EA)

Vhodnou alternativou k získávání bioaktivních sloučenin z rostlinného odpadu se jeví enzymatická extrakce. Její obrovskou výhodou oproti konvenčním technikám je, že biokatalytické procesy probíhají při nižších teplotách za použití menšího množství rozpouštědla. Enzymy jako celulózy, pektinázy a hemicelulóza jsou využívány zejména pro úpravu rostlinného materiálu, kdy dochází k narušení strukturální integrity buněčné stěny rostlin. Aby byla metoda co nejefektivnější je potřeba znát katalytické vlastnosti, způsob účinku a optimální provozní podmínky enzymu. Enzymatická předúprava suroviny má za následek zkrácení doby extrakce, minimalizaci využití rozpouštědel a zajištění vyššího výtěžku a kvality vyextrahovaných bioaktivních sloučenin. Limitací EA je cena enzymů při použití metody ve větším průmyslovém měřítku [10; 58; 59].

Mikrovlnná extrakce (ME)

Mikrovlnná extrakce (ME) je proces, kdy je využívána mikrovlnné energie k ohřevu rozpouštědla, které je v kontaktu se vzorkem. Účelem této metody je extrakce fenolických sloučenin z matrice vzorku do rozpouštědla. Při použití uzavřených nádob lze extrakci provádět i při zvýšených teplotách, přičemž je celý proces extrakce urychlen. ME běžně trvá 15–30 minut za použití malých objemů rozpouštědel v rozsahu 10–30 ml. (Sun a kol., 2019) uvádí, že ME je vhodnou extrakční technikou pro získání ligninu z rostlinných odpadů [60].

2.3.2 Využití antioxidantů

Uplatnění nacházejí v potravinářském průmyslu jako konzervanty za účelem prodloužení trvanlivosti potravin. Dále v kosmetickém průmyslu, kdy mohou být součástí krémů, tinktur, odličovacích vod, šamponů či masek. Aplikace antioxidantů v kosmetice snižuje oxidační poškození, což představuje dobrou alternativu v prevenci předčasného stárnutí. Mají také fotoprotektivní účinek a napomáhají při léčbě kožních onemocnění [26; 61].

Pro postupné uvolňování antioxidantů je možné využít enkapsulaci nebo inkorporaci na pevný nosič, např. bakteriální celulózu (BC). BC je díky své netoxické povaze, fyzikálně-chemickým vlastnostem a strukturní morfologii zkoumána jako potenciální materiál pro různé biomedicínské aplikace [62; 63].

2.4 Bakteriální celulóza

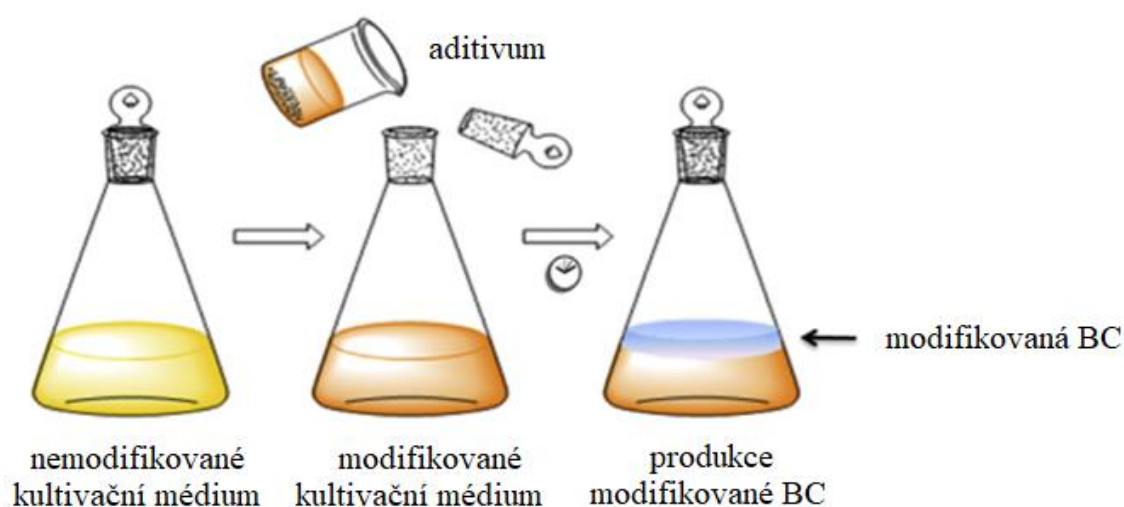
Bakteriální celulózu (BC) dokáže syntetizovat jen malé množství rodů bakterií. Nejznámější bakterií, produkující BC je gramnegativní bakterie *Komagataeibacter xylinus*. Dalšími rody, které mohou BC produkovat jsou *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Alcaligenes* a *Pseudomonas*. Bakteriální celulóza má řadu výhod: je netoxická, biokompatibilní, vyznačuje se vysokou čistotou a vysokou kapacitou zadržování vody. Díky hydroxylovým skupinám dochází ke zvětšení měrného povrchu, díky čemuž dochází ke zvýšení kapacity adsorbentu. Z tohoto důvodu je bakteriální celulóza výborným adsorbentem. Na rozdíl od jiných anorganických adsorbentů jsou materiály na bázi bakteriální celulózy zcela biologicky rozložitelné. Degradace BC může být iniciována vnějšími nebo vnitřními vlivy, kdy rychlost odbourávání je ovlivněna několika faktory (molekulová hmotnost, krystalinita, pH...). Využití nachází v mnoho různých odvětvích průmyslu ať už je to v potravinářském průmyslu (obalové materiály), v medicíně (hojení ran) anebo v chemickém průmyslu (výroba biopolymerů a nanokompozitů) [64; 65; 66; 67].

2.4.1 Modifikace bakteriální celulózy

Pro specifické požadavky jednotlivých aplikací je potřeba upravovat fyzikálně-chemické vlastnosti BC (např. pórovitost, krystalinitu nebo chemickou strukturu) různými modifikacemi. Vylepšení funkcionality bakteriální celulózy je možno dosáhnout implementací syntetických či přírodních polymerů nebo materiálů na bázi uhlíku (nanotrubičky, grafen). Proces modifikace je dělen do dvou hlavních skupin. Do skupiny modifikace *in situ* jsou řazeny metody modifikace v kultivačním médiu během syntézy bakteriální celulózy, zatímco do skupiny *ex situ* jsou řazeny metody modifikace po ukončení syntézy bakteriální celulózy [68].

IN SITU

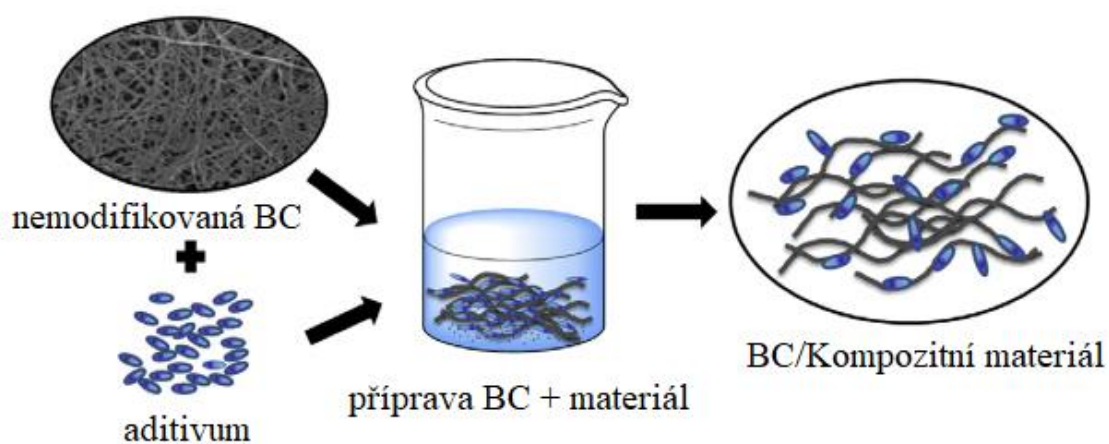
Proces modifikace *in situ* je označován jako přímý způsob úpravy funkcionality bakteriální celulózy vlivem přidavku vyztužujícího materiálu, tzv. aditiva (Obr. 14). Průběh kultivace a následně i fyzikálně-chemické vlastnosti BC je možno ovlivnit například přidávkem chitosanu, methylcelulózy, karboxymethylcelulózy, poly-3-hydroxybutyrátu či siliky. Tato aditiva jsou přidávána přímo do kultivačního média, zpravidla na začátku procesu tvorby bakteriální celulózy, přičemž neovlivňují růst bakterií a samotnou syntézu celulózy. Výhoda tohoto procesu tkví v přímém zabudování vyztužujících materiálů do fibril BC, což se projeví ve změně jejich fyzikálně-mechanických vlastností. K implementaci aditiv do strukturní sítě během krystalizace fibril dochází interakcí s $-OH$ skupinami přítomnými v řetězcích bakteriální celulózy, přičemž se tvoří nové vodíkové vazby [64; 68; 69].



Obr. 14: Modifikace bakteriální celulózy *in situ* [70]

EX SITU

Modifikace *ex situ* jsou buď chemické nebo fyzikální povahy. Principem metody bývá velmi často jednoduché ponoření BC do lázně s rozpuštěným změkčovadlem, polymerem v roztoku nebo jiným činidlem (Obr. 15). Díky pórovité struktuře BC přídatný materiál může snadno pronikat napříč celou maticí, což může mít za následek snížení pórovitosti BC. Dochází však také k ovlivnění dalších fyzikálně-chemických vlastností. Výhodou této metody je, že struktura BC zůstává po celou dobu zachována a neporušena. (Wahid a kol., 2021) uvádí, že za účelem získání materiálů s vylepšenými vlastnostmi byly testovány různé přírodní (chitosanu, kolagen, želatina...) či syntetické polymery (polyakrylamid, polyanilin, polyakrylová kyselina) [68; 69; 71].



Obr. 15: Modifikace bakteriální celulózy *ex situ* [70]

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Fenolické sloučeniny jsou obsaženy v rostlinách volně nebo vázaně. Nejčastěji se vyskytují v ovoci, zelenině, čaji, víně nebo kávě. Mohou být extrahovány pomocí různých extrakčních technik jako jsou ultrazvuková extrakce, konvenční extrakce, mikrovlnná extrakce nebo enzymatická extrakce. Zvolená extrakční technika závisí na stabilitě fenolických sloučenin nacházejících se v dané rostlině. Fenolické sloučeniny mají velký vliv na lidské zdraví, protože mají antiseptické a diuretické účinky. Využití nenacházejí jen v medicíně, ale také ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu. Díky svým antioxidačním vlastnostem jsou součástí tinktur, hydratačních krémů, pleťových masek, šamponů či sprchových gelů [72].

Pomocí fenolických extraktů může být modifikována BC, která narozdíl od rostlinné celulózy neobsahuje hemicelulózy, pektin nebo lignin. Oproti rostlinné celulóze se vyznačuje lepšími mechanickými, fyzikálními a biologickými vlastnostmi. Využití nachází převážně v biomedicíně nebo kosmetickém průmyslu při výrobě pleťových masek [63; 73].

(Kamal a kol., 2022) se zabývali modifikací BC ve formě hydrogelu pro potenciální využití v biomedicínských aplikacích. Hlavním cílem byla modifikace BC pomocí rostlinného extraktu, který byl připraven z listů rostliny *Dracaena serrulata* pomocí Soxhletova extraktoru. BC byla modifikována *ex-situ*, kdy byl extrakt navázán do matrice pomocí vodíkových interakcí. Pomocí MIC (minimální inhibiční koncentrace) a MBC (minimální bakteriocidní koncentrace) testů bylo zjištěno, že extrakt vykazoval antibakteriální aktivitu. I díky vysoké schopnosti zadržovat vodu je BC vhodná jako nosič léčiv či obvazový materiál při poranění [73].

(Amorin a kol., 2021) se věnovali modifikaci BC ve formě hydrogelu za účelem vytvořit prototyp pleťové masky. Cílem této studie byla modifikace BC *in situ* a *ex situ* pomocí propolisového extraktu, který byl získán zředěním komerčně dostupného vodného roztoku extraktu vyrobeného společností Bee PropolisBrazil™. Propolisový extrakt je často součástí kosmetiky (krémy, pleťové masky), jelikož má protizánětlivé účinky a slouží jako prevence proti vzniku akné. Z výsledků bylo zjištěno, že modifikace BC *in-situ* nebude možná, jelikož dochází k inhibici růstu bakterie *Gluconacetobacter Hansenii*. Tento fakt může být způsoben vysokou antimikrobiální aktivitou propolisového extraktu. Naopak u modifikace *ex-situ* bylo dosaženo přijatelných výsledků, jelikož byla zachována antioxidační aktivita [63].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Prvním krokem experimentální části této diplomové práce byla příprava etanolových a acetonových extraktů z hroznových výlisků. Následně byl v připravených extraktech stanoven obsah celkových polyfenolů, flavonoidů, antokyanů a antioxidační aktivita. Dalším krokem experimentální části bylo stanovení stupně bobtnání a modifikace BC vybranými extrakty vykazující nejvyšší antioxidační aktivitu. Nakonec byl stanoven obsah celkových polyfenolů a antioxidační aktivita modifikované BC.

4.1 Použité chemikálie

ABTS (Sigma Aldrich)

Acetát sodný trihydrát, č. (Lachema)

Aceton, p.a. (Lach:Ner)

Celluclast (Novozymes A/S)

Citronan sodný dihydrát, p.a. (LaChema)

Dusitan sodný, p.a. (Lach:Ner)

Etanol absolutní, p.a. (Penta)

Etanol UV-VIS (Penta)

Folin-Ciocalteuovo činidlo (Penta)

Hydroxid sodný, p.a. (Lach:Ner)

Chlorid draselný, p. a. (Lach:Ner)

Chlorid hlinitý bezvodý, č. (Penta)

Katechin (Sigma Aldrich)

Kyselina citronová bezvodá, p.a. (Lach:Ner)

Kyselina gallová (Loba Chemie)

Kyselina chlorovodíková 37% (VWR Chemicals)

Kyselina octová 99,8%, p.a. (Lach:Ner)

Peroxodisíran draselný nejčistší (Spolchemie)

Trolox (Sigma Aldrich)

Uhlíčan sodný bezvodý, p.a. (Lach:Ner)

4.2 Použité přístroje

Analytické váhy (Pioneer)

Elektronické váhy (Kern 440)

Inkubátor 1000 (Heidolph)

Lyofilizátor (Labconco Freezone 4.5)

Rotační vakuová odparka (IKA, RV06-ML)

UV-VIS spektrofotometr (SPEKOL 1300)

Ultrazvuková lázeň S 30 (Elma)

Vortex (Heidolph)

4.3 Příprava vzorků

V experimentální části této diplomové práce byly k přípravě etanolových a acetonových extraktů použity vzorky zmrazených a lyofilizovaných hroznových výlisků odrůdy Rulandské šedé z vinařství Vavříček Březí u Mikulova. Hroznové výlisky byly sklizeny na přelomu srpna a září v roce 2018. Výchozími metodami přípravy extraktů byla extrakce pomocí ultrazvuku (UE) a konvenční extrakce (CE) pomocí inkubátoru za podmínek uvedených v Tab. 3 a Tab. 4. Extrakty byly zhotoveny ve dvou paralelních opakováních. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce a vzorky byly naředěny demineralizovanou vodou na výsledný objem 25 ml.

Tab. 3: Extrakty připravené z hroznových výlisků – první sada

Název vzorku extraktu	Metoda přípravy	Typ hroznových výlisků	Navážka (g)	Rozpouštědlo	Množství rozpouštědla (ml)
Extrakt_1	UE	Zmrazené	5	70% etanol	60
Extrakt_2	UE	Lyofilizované	5	70% etanol	60
Extrakt_3	UE	Zmrazené	5	70% aceton	60
Extrakt_4	UE	Lyofilizované	5	70% aceton	60

Tab. 4: Extraktů připravené z hroznových výlisků – druhá sada

Název vzorku extraktu	Metoda přípravy	Typ hroznových výlisků	Navážka (g)	Rozpouštědlo	Množství rozpouštědla (ml)
Extrakt_5	CE	Zmrazené	6	50% etanol	60
Extrakt_6	CE	Lyofilizované	6	50% etanol	60
Extrakt_7	UE	Zmrazené	6	50% etanol	60
Extrakt_8	UE	Lyofilizované	6	50% etanol	60

Ultrazvuková extrakce (UE)

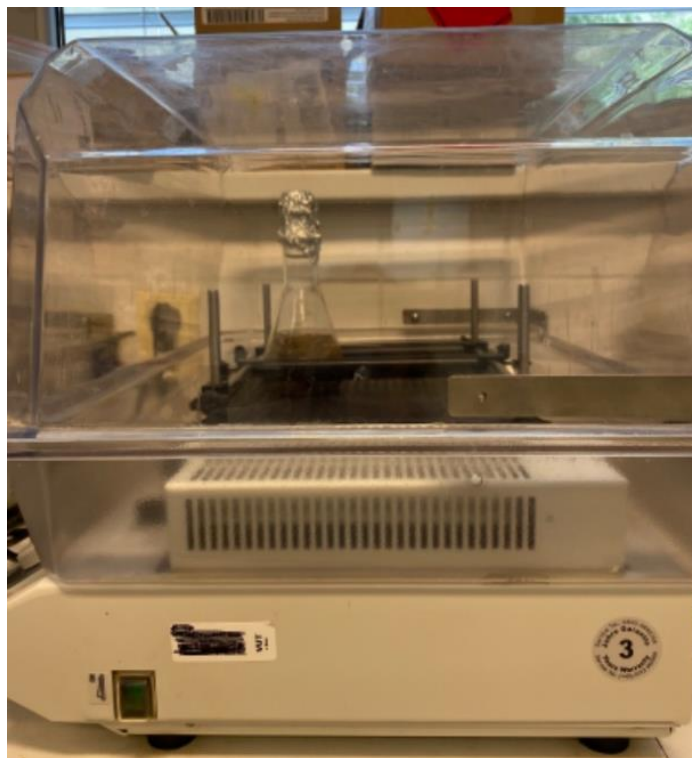
Do Erlenmayerovy baňky byl navážen vzorek hroznových výlisků, ke kterému bylo přidáno příslušné rozpouštědlo. Vzorky byly sonifikovány při teplotě 30 °C, frekvenci 37 kHz, výkonu 80 W po dobu 1 hodiny. Konkrétní metodika přípravy extraktů je uvedena v Tab. 3 a Tab. 4 [37].



Obr. 16: Příprava extraktů pomocí UE

Konvenční extrakce (CE) pomocí inkubátoru

Do Erlenmayerovy baňky byl navážen vzorek hroznových výlisků, ke kterému bylo přidáno příslušné rozpouštědlo. Extrakce probíhala při 30 °C a 200 rpm po dobu 1 hodiny. Konkrétní metodika přípravy extraktů je uvedena v Tab. 4 [74].



Obr. 17: Příprava extraktů konvenční extrakcí (CE) pomocí inkubátoru

4.4 Charakterizace vzorků

Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení celkových polyfenolů bylo provedeno pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Principem této metody stanovení je redukce směsi fosfowolframanu a fosfomolybdenanu fenolickými sloučeninami za vzniku komplexu modrého zbarvení. Intenzita modrého komplexu je stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm [75].

Pro stanovení celkových polyfenolů byl využit postup, který uvádí (Márová a kol., 2016). Do skleněné zkumavky bylo napipetováno 100 μ l vhodně naředěného analyzovaného vzorku. Folin-Ciocalteuovo činidlo bylo naředěno demineralizovanou vodou v poměru 1:9. K analyzovanému vzorku byl napipetován 1 ml demineralizované vody a 1 ml zředěného Folin-Ciocalteuova činidla. Roztok byl promíchán na vortexu a ponechán stát 5 minut při laboratorní teplotě. Následně byl k roztoku přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Roztok byl opět promíchán na vortexu a poté ponechán stát 15 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byla změřena absorbance analyzovaného roztoku při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku, který byl připraven stejným způsobem jako analyzovaný roztok, avšak

namísto 100 µl analyzovaného vzorku bylo použito 100 µl demineralizované vody. Pro každý analyzovaný vzorek byla absorbance změřena ve třech paralelních stanoveních [76].

Pro stanovení kalibrační závislosti byl jako standard zvolen roztok kyseliny gallové (GAE) o koncentraci 18,5–200,0 mg/l.

Koncentrace celkových polyfenolů v extraktu byly vypočítány z regresní rovnice kalibrační závislosti uvedené na Obr. 21. Výsledky byly vyjádřeny jako mg GAE na l vzorku. Tato hodnota byla přepočtena na množství celkových polyfenolů, které bylo vyjádřeno jako mg GAE na 100 g vzorku dle vzorce:

$$c = \left(\frac{V \cdot x}{m} \right) \cdot 100 \text{ (mg GAE/100 g vzorku)}, \quad (4.4.1)$$

kde V je objem extraktu (l), x je koncentrace celkových polyfenolů (mg GAE/l vzorku) a m je navážka vzorku (g).

Stanovení flavonoidů

Principem této metody stanovení je nitrace aromatického kruhu, kdy po přidání roztoku chloridu hlinitého vzniká žlutý komplex. Následně po přidání roztoku hydroxidu sodného vzniká výsledný červený komplex, který je měřen spektrofotometricky při vlnové délce 510 nm [76; 77].

Pro stanovení flavonoidů byl zvolen postup popsany (Márová a kol., 2016). Do skleněné zkumavky bylo napipetováno 500 µl vhodně naředěného analyzovaného vzorku. Následně bylo přidáno 1,5 ml demineralizované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Výsledný roztok byl promíchán na vortexu a ponechán stát 5 minut. Po 5 minutách bylo přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Roztok byl opět promíchán na vortexu a ponechán stát dalších 5 minut. Dále bylo přidáno 1,5 ml 1M hydroxidu sodného a 1 ml demineralizované vody. Roztok byl promíchán na vortexu a ponechán stát 15 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance při vlnové délce 510 nm proti slepému vzorku, který byl připraven stejným způsobem jako analyzovaný roztok, avšak namísto 500 µl analyzovaného vzorku bylo použito 500 µl demineralizované vody. Pro každý analyzovaný vzorek byla absorbance změřena ve třech paralelních stanoveních.

Pro stanovení kalibrační závislosti byl jako standard zvolen roztok katechinu (CAE) o koncentraci 38,0–246,4 mg/l.

Koncentrace flavonoidů v extraktu byly vypočítány z regresní rovnice kalibrační závislosti uvedené Obr. 22. Výsledky byly vyjádřeny jako mg CAE na l vzorku.

Množství flavonoidů v extraktu bylo vypočítáno dle vzorce (4.4.1) s tím rozdílem, že koncentrace celkových polyfenolů byla nahrazena koncentrací flavonoidů (mg CAE/l vzorku). Výsledky byly vyjádřeny jako mg CAE na 100 g vzorku.

Stanovení antokyanů

Stanovení antokyanů bylo provedeno spektrofotometricky za použití pH-diferenciální metody. Principem této metody je změna absorpčního spektra antokyanů v závislosti na pH [78].

Do odměrných baněk o objemu 250 ml byl připraven acetátový (pH = 4,5) a KCl (pH = 1) pufr. Acetátový pufr byl připraven smícháním trihydrátu acetátu sodného (6,670 g) a kyseliny octové (4,370 ml). KCl pufr byl připraven smícháním 36% kyseliny chlorovodíkové (0,164 ml) a chloridu draselného (1,863 g). Následně byly odměrné baňky doplněny demineralizovanou vodou po rysku a pH bylo upraveno pomocí 36% kyseliny chlorovodíkové.

Do skleněné zkumavky bylo napipetováno 100 μ l vzorku a 3 ml příslušného pufru. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 520 nm a 700 nm proti slepému vzorku (demineralizovaná voda). Pro každý analyzovaný vzorek byla absorbance změřena ve třech paralelních stanoveních.

Pomocí naměřených absorbancí byla vypočítána výsledná absorbance dle vzorce:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{KCl}} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{ac.pufr}} (-), \quad (4.4.2)$$

kde A je absorbance vzorku při dané vlnové délce a pH roztoku (-).

Koncentrace antokyanů byla vypočítána dle vzorce:

$$c_A = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot 1000}{\varepsilon \cdot l} \left(\frac{\text{mg kyanidinu 3 - glukosidu}}{l \text{ vzorku}} \right), \quad (4.4.3)$$

kde A je výsledná absorbance extraktu (-), M je molekulová hmotnost kyanidinu 3-glukosidu (M = 449,2 g/mol), F je faktor zředění, ε je molární absorpční koeficient pro kyanidin ($\varepsilon = 26\,900$ l/cm/mol) a l je délka optické dráhy kyvety (cm).

Množství antokyanů bylo vypočítáno dle vzorce (4.4.1) s tím rozdílem, že koncentrace celkových polyfenolů byla nahrazena koncentrací antokyanů (mg kyanidinu-3-glukosidu/l vzorku). Výsledky byly vyjádřeny jako mg kyanidinu 3-glukosidu na 100 g vzorku.

Stanovení antioxidační aktivity

Stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS je jednou z nejvíce využívaných metod. Metoda je založena na schopnosti vzorku zhaset kationový radikál $ABTS^{*+}$. Tento jev je sledován spektrofotometricky při vlnové délce 734 nm. [76; 79]

Antioxidační aktivita byla stanovena postupem dle (Márová a kol., 2016). Navážka ABTS byla rozpuštěna v demineralizované vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kation $ABTS^{*+}$ byl získán reakcí s 2,45mM roztokem peroxidisíranu draselného. Připravený roztok byl ponechán stát ve tmě při pokojové teplotě nejméně 12 hodin. Před použitím byl roztok $ABTS^{*+}$ zředěn ethanolem UV-VIS na absorbanci $0,7 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm. Do zkumavky bylo napipetováno 10 μ l vhodně naředěného vzorku a následně byl přidán 1 ml $ABTS^{*+}$. Roztok byl ponechán stát 10 minut ve tmě a následně byla změřena absorbance (A_1) proti slepému vzorku při vlnové délce 734 nm. Slepým vzorkem byl 60% UV-VIS etanol. Absorbance substrátu (A_0) byla měřena ihned po namíchání roztoku (10 μ l demineralizované vody a 1 ml $ABTS^{*+}$) proti blanku (UV-VIS etanol). Pro každý analyzovaný vzorek byla absorbance změřena ve třech paralelních stanoveních.

Výsledná absorbance byla vypočítána dle vzorce:

$$A = A_0 - A_1 (-) \quad (4.4.4)$$

Pro stanovení kalibrační křivky byl jako standard zvolen roztok Troloxu (TE) o koncentraci 0,2–1,6 mmol/l (50–400 mg/l).

Antioxidační aktivita byla vypočítána z regresní rovnice kalibrační závislosti uvedené na Obr. 23 a Obr. 27. Výsledky byly vyjádřeny jako mmol TE na l vzorku (mg TE na l vzorku).

Stupeň bobtnání bakteriální celulózy (BC)

Z bakteriální celulózy ve formě hydrogelu byl vykrojen vzorek o průměru 10,25 mm, který byl vysušen a následně zvážen. Vzorek byl vložen do čisté demineralizované vody a byl inkubován při pokojové teplotě (23 °C) po dobu 24 hodin. V průběhu experimentu byl vzorek opakovaně vážen a následně byla sestavena rostoucí křivka závislosti stupně bobtnání na čase [80].

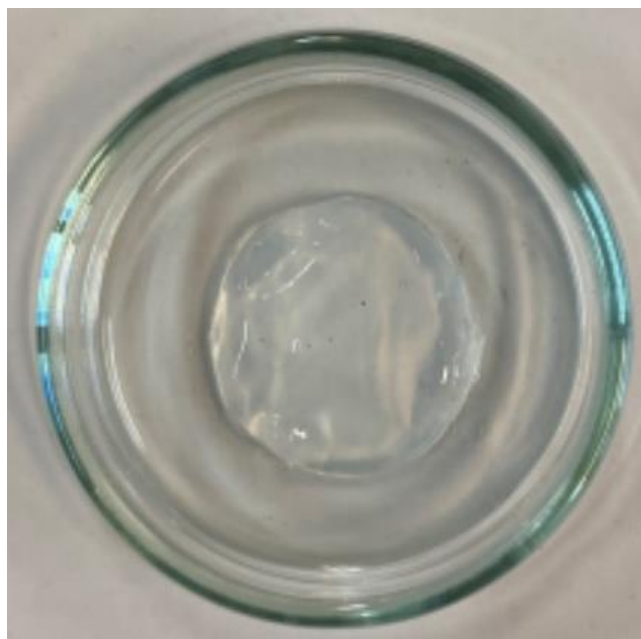
Stupeň bobtnání byl vypočítán dle vzorce:

$$Q = \frac{m_{\text{vlhká BC}} - m_{\text{suchá BC}}}{m_{\text{suchá BC}}} \cdot 100 (\%), \quad (4.4.5)$$

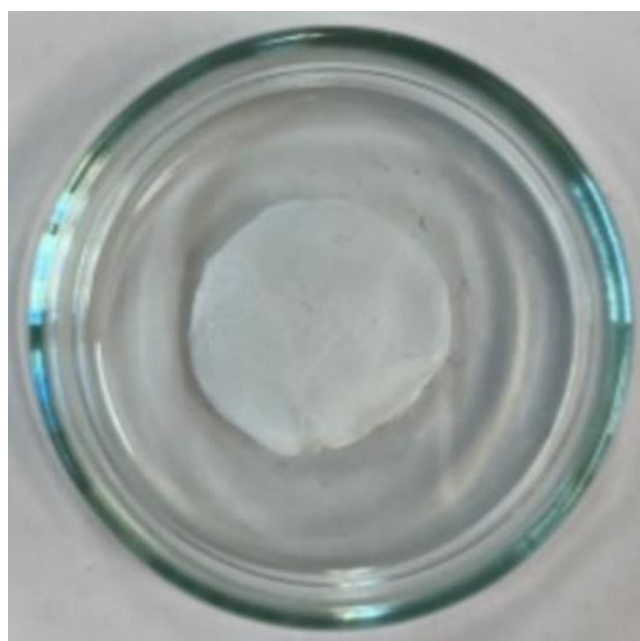
kde m je hmotnost suché BC ve formě filmu či vlhké BC ve formě hydrogelu (g).

Modifikace BC vybranými fenolickými extrakty

Pro modifikaci bakteriální celulózy byly vybrány tři extrakty, které vykazovaly nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity. Vzorek bakteriální celulózy (vlhká ve formě hydrogelu (Obr. 18) nebo suchá ve formě filmu (Obr. 19)) o průměru 10,25 mm byl vložen do skleněné lahvičky. Následně bylo přidáno 5 ml extraktu a směs byla inkubována při laboratorní teplotě (23 °C) po dobu 24 hodin.



Obr. 18: Vzorek vlhké BC ve formě hydrogelu



Obr. 19: Vzorek suché BC ve formě filmu

Enzymatická hydrolýza

Do baňky bylo připraveno 400 ml citrátového pufru (pH = 3,88). Citrátový pufr byl připraven smícháním 2,4 g kyseliny citronové a 2,21 g dihydrátu citronanu sodného. Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno 10 ml citátového pufru a 0,2 ml enzymu (celuláza). Vzorky byly ponechány na třepačce při 30 °C a 150 rpm přes noc.

Stanovení celkových polyfenolů modifikované BC

Stanovení celkových polyfenolů proběhlo spektrofotometricky pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Množství celkových polyfenolů bylo vypočítáno dle vzorce:

$$q = \frac{V \cdot c}{m} \text{ (mg GAE/g BC),} \quad (4.4.6)$$

kde V je objem roztoku (l), c je koncentrace celkových polyfenolů (mg GAE/l vzorku) a m je váha adsorbentu (BC) (g).

Stanovení antioxidační aktivity modifikované BC

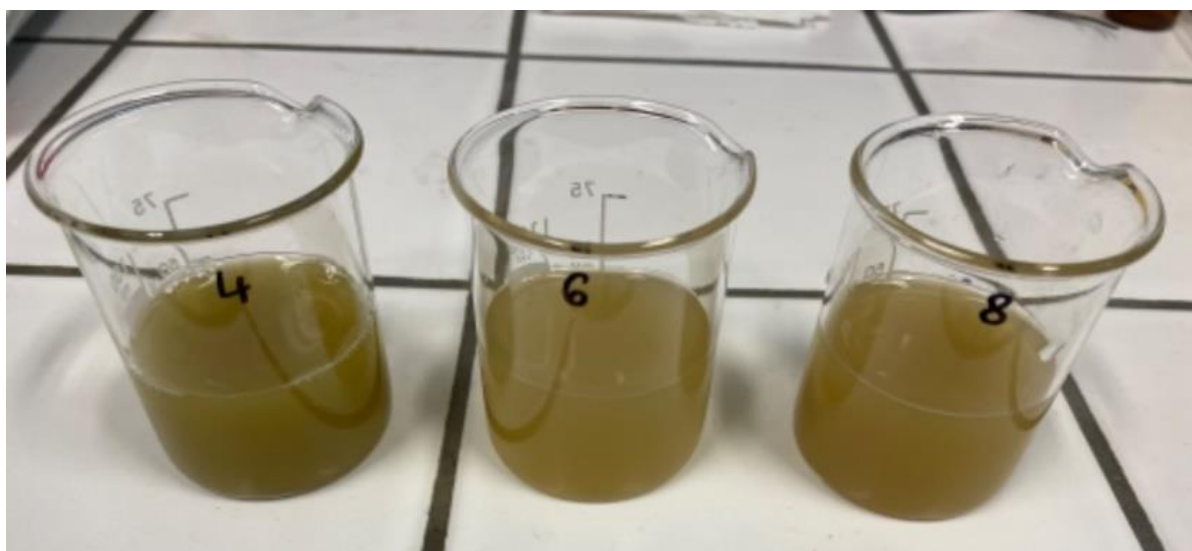
Stanovení antioxidační aktivity bylo provedeno spektrofotometricky pomocí metody ABTS. Výsledné hodnoty antioxidační aktivity byly vypočítány dle vzorce (4.4.6) s tím rozdílem, že koncentrace celkových polyfenolů byly nahrazeny hodnotami antioxidační aktivity (mg TE/l vzorku). Výsledky byly vyjádřeny jako mg TE na g BC.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Charakterizace vzorků

Ze vzorků hroznových výlisků bylo prostřednictvím UE a CE připraveno celkem osm druhů extraktů ve dvou paralelních provedeních. Metodika a podmínky přípravy extraktů jsou uvedeny v Tab. 3 a Tab. 4. U všech připravených extraktů byla stanovena koncentrace celkových polyfenolů, flavonoidů, antokyanů a antioxidační aktivita.

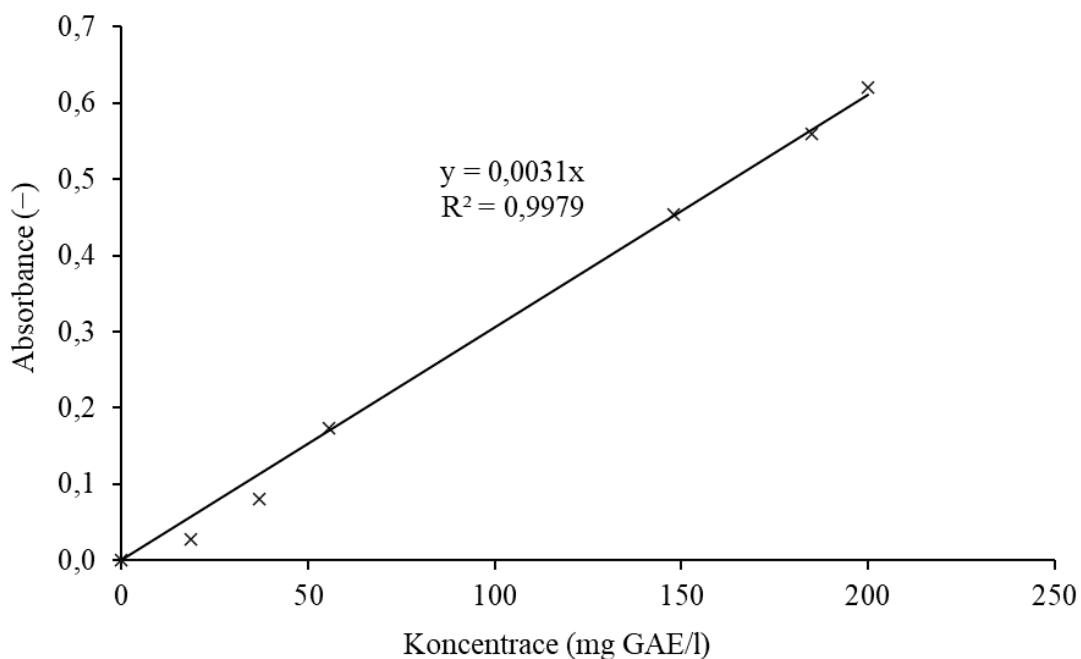
Připravené extrakty měly žluté až zelenohnědé zbarvení (Obr. 20). Toto zbarvení bylo způsobeno přítomností fenolických látek. V hroznových výliscích jsou zastoupeny převážně flavanoly, flavonoly, antokyany a resveratrol. Tyto fenolické sloučeniny působí jako antioxidanty, ale vyznačují se také protirakovinnými, protizánětlivými, protistárnoucími a antimikrobiálními účinky [14].



Obr. 20: Ukázka připravených extraktů z hroznových výlisků

Stanovení celkových polyfenolů

Obsah celkových polyfenolů v extraktech připravených z hroznových výlisků byl stanoven spektrofotometricky za použití Folin-Ciocalteuova činidla. Postup stanovení celkových polyfenolů je popsán v kapitole 4.4. Z regresní rovnice kalibrační závislosti uvedené na Obr. 21 byly vypočítány koncentrace celkových polyfenolů pro jednotlivé vzorky. Výsledky jsou uvedeny jako mg kyseliny gallové (GAE) na l vzorku. Množství celkových polyfenolů bylo vypočítáno dle vzorce (4.4.1) a je vyjádřeno jako mg GAE na 100 g vzorku. Výsledky všech stanovení včetně směrodatných odchylek jsou zaznamenány v Tab. 5 a Tab. 6.



Obr. 21: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci GAE v mg/l pro stanovení celkových polyfenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla

Tab. 5: Stanovené koncentrace (v mg GAE/l vzorku) a množství (v mg GAE/100 g vzorku) celkových polyfenolů včetně směrodatných odchylek získané metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem v etanolových a acetonových extraktech hroznových výlisků

Název vzorku extraktu	Specifikace přípravy extraktu	Koncentrace celkových polyfenolů v extraktu (mg GAE/l vzorku)	Množství celkových polyfenolů v extraktu (mg GAE/100 g vzorku)
Extrakt_1	70% etanol, zmrazené hroznové výlisky, UE	102,90 ± 5,28	51,46 ± 3,70
Extrakt_2	70% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, UE	267,26 ± 7,13	133,63 ± 5,72
Extrakt_3	70% aceton, zmrazené hroznové výlisky, UE	257,31 ± 2,86	130,29 ± 6,59
Extrakt_4	70% aceton, lyofilizované hroznové výlisky, UE	810,22 ± 11,15	405,11 ± 71,74

V první sadě stanovení se množství celkových polyfenolů u extraktů připravených z hroznových výlisků pohybovalo v rozmezí 51,46–405,11 mg GAE/100 g vzorku. Ze získaných výsledků uvedených v Tab. 5 je patrné, že nejvyšší množství celkových polyfenolů vykazoval extrakt_4 ($405,11 \pm 71,74$ mg GAE/100 g vzorku). Naopak nejnižší množství celkových polyfenolů bylo stanoveno u extraktu_1 ($46,68 \pm 3,51$ mg GAE/100 g vzorku). Z naměřených výsledků vyplývá, že vyšší obsah celkových polyfenolů byl detekován v etanolových a acetonových extraktech připravených z lyofilizovaných hroznových výlisků.

Tab. 6: Stanovené koncentrace (v mg GAE/l vzorku) a množství (v mg GAE/100 g vzorku) celkových polyfenolů včetně směrodatných odchylek získané metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem v etanolových extraktech hroznových výlisků

Název vzorku extraktu	Specifikace přípravy extraktu	Koncentrace celkových polyfenolů v extraktu (mg GAE/l vzorku)	Množství celkových polyfenolů v extraktu (mg GAE/100 g vzorku)
Extrakt_5	50% etanol, zmrazené hroznové výlisky, CE	$140,11 \pm 4,14$	$58,38 \pm 1,76$
Extrakt_6	50% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, CE	$414,52 \pm 18,45$	$172,72 \pm 9,95$
Extrakt_7	50% etanol, zmrazené hroznové výlisky, UE	$151,83 \pm 2,87$	$63,26 \pm 3,24$
Extrakt_8	50% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, UE	$348,66 \pm 27,78$	$145,27 \pm 15,09$

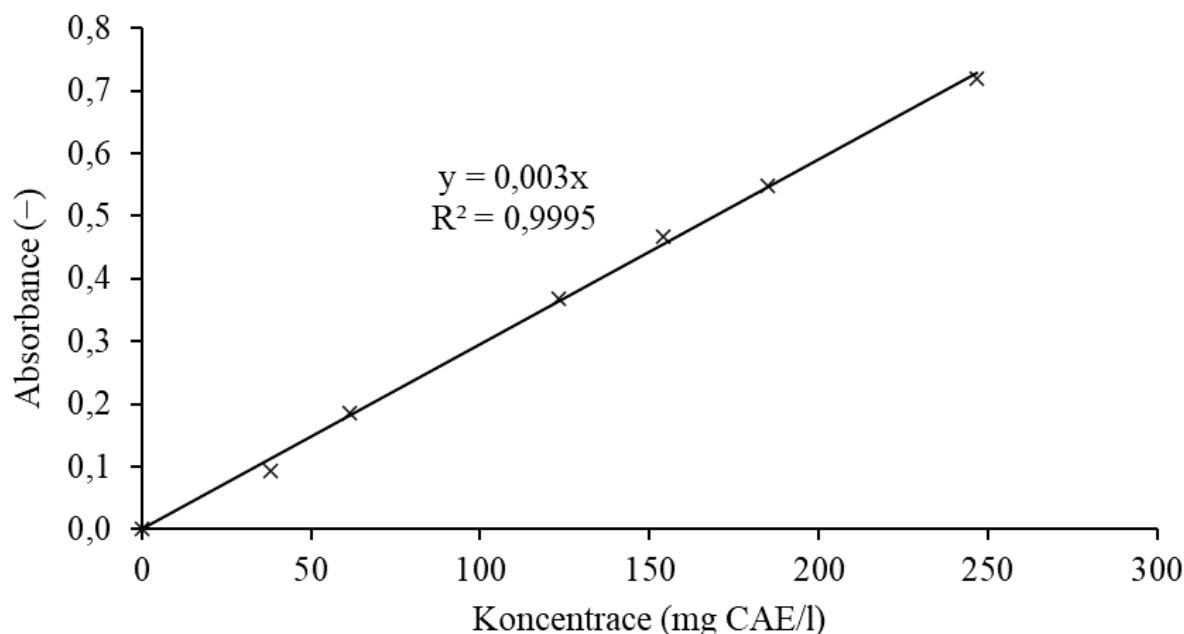
V druhé sadě stanovení byla naměřena množství celkových polyfenolů v rozmezí 58,38–172,72 mg GAE/100 g vzorku. Nejvyšší obsah celkových polyfenolů byl stanoven u extraktu_6 ($172,72 \pm 9,95$ mg GAE/100 g vzorku) a u extraktu_8 ($145,27 \pm 15,09$ mg GAE/100 g vzorku). Tyto extrakty byly připraveny z lyofilizovaných hroznových výlisků. Nejnižší obsah celkových polyfenolů byl detekován u extraktu_5 ($58,38 \pm 1,76$ mg GAE/100 g vzorku).

Stanovení obsahu celkových polyfenolů v extraktech připravených z hroznových výlisků bylo již v minulosti předmětem několika studií. K izolaci bioaktivních fenolických

sloučenin bylo využito různých extrakčních technik či typů rozpouštědel. (Caldas a kol., 2018) stanovovali obsah celkových polyfenolů v etanolových extraktech z červených sušených hroznových slupek. Extrakty byly připraveny konvenční extrakcí mechanickým mícháním, kdy jako extrakční činidlo byl použit etanol v různých koncentracích a poměrech vůči navážce vzorku. Obsah celkových polyfenolů byl stanoven pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Kalibračním standardem byl zvolen roztok kyseliny gallové. Dle naměřených dat (Caldas a kol., 2018) se stanovený obsah celkových polyfenolů pohyboval v rozmezí 5,7–48,6 mg GAE/g vzorku. Nejvyšší množství polyfenolů bylo stanoveno v 50% etanolovém extraktu ($48 \pm 2,2$ mg GAE/g vzorku), kdy poměr navážky vůči rozpouštědлу byl 1:10. Za totožných podmínek CE (200 rpm, 30 °C, 1 h) byl připraven extrakt_5 a extrakt_6. U extraktu_5 bylo detekováno množství celkových polyfenolů $58,38 \pm 1,76$ mg GAE/100 g tj. $0,58 \pm 0,02$ mg GAE/g vzorku a u extraktu_6 $172,72 \pm 9,95$ mg GAE/100 g vzorku tj. $1,73 \pm 0,01$ mg GAE/g vzorku. Z výsledků je patrné, že stanovené množství celkových polyfenolů, které uvádí (Caldas a kol., 2018) je vyšší. Rozdílné hodnoty obsahu celkových polyfenolů mohou být zapříčiněny způsobem skladování (vliv teploty na stabilitu fenolických sloučenin), termínem sklizně nebo typem vzorku, přičemž v našem případě byly použity vzorky bílých hroznů, kdežto (Caldas a kol., 2018) využívali vzorky z hroznů červených [74].

Stanovení flavonoidů

Obsah flavonoidů v extraktech připravených z hroznových výlisků byl stanoven spektrofotometricky pomocí chloridu hlinitého. Princip stanovení je detailně popsán v kapitole 4.4. Z regresní rovnice kalibrační závislosti uvedené na Obr. 22 byly vypočítány koncentrace flavonoidů pro jednotlivé vzorky a jsou uvedeny jako mg katechinu (CAE) na 1 vzorku. Množství flavonoidů bylo vypočítáno dle vzorce (4.4.1) a je vyjádřeno jako mg CAE na 100 g vzorku. Výsledky všech stanovení včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v Tab. 7 a Tab. 8.



Obr. 22: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci CAE v mg/l pro stanovení flavonoidů pomocí chloridu hlinitého

Tab. 7: Stanovené koncentrace (v mg CAE/l vzorku) a množství (v mg CAE/100 g vzorku) flavonoidů včetně směrodatných odchylek získané metodou s chloridem hlinitým v etanolových a acetonových extraktech hroznových výlisků

Název vzorku extraktu	Specifikace přípravy extraktu	Koncentrace flavonoidů v extraktu (mg CAE /l vzorku)	Množství flavonoidů v extraktu (mg CAE/100 g vzorku)
Extrakt_1	70% etanol, zmrazené hroznové výlisky, UE	61,94 ± 0,60	30,97 ± 2,48
Extrakt_2	70% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, UE	131,22 ± 2,37	65,61 ± 2,22
Extrakt_3	70% aceton, zmrazené hroznové výlisky, UE	143,50 ± 3,47	71,75 ± 5,38
Extrakt_4	70% aceton, lyofilizované hroznové výlisky, UE	444,28 ± 10,28	222,14 ± 78,80

V první sadě měření byla stanovena množství flavonoidů v rozmezí 30,97–222,14 mg CAE/100 g vzorku. Nejvyšší množství flavonoidů bylo kvantifikováno dle očekávání

u extraktu_4 ($222,14 \pm 78,80$ mg CAE/100 g vzorku). Naopak nejnižší množství flavonoidů bylo detekováno u extraktu_1 ($30,97 \pm 2,48$ mg CAE/100 g vzorku). V porovnání s ostatními analyzovanými vzorky je stanovené množství flavonoidů v extraktu_4 podstatně vyšší než u ostatních analyzovaných vzorků.

Tab. 8: Stanovené koncentrace (v mg CAE/l vzorku) a množství (v mg CAE/100 g vzorku) flavonoidů včetně směrodatných odchylek získané metodou s chloridem hlinitým v etanolových extraktech hroznových výlisků

Název vzorku extraktu	Specifikace přípravy extraktu	Koncentrace flavonoidů v extraktu (mg CAE/l vzorku)	Množství flavonoidů v extraktu (mg CAE/100 g vzorku)
Extrakt_5	50% etanol, zmrazené hroznové výlisky, CE	$51,39 \pm 1,79$	$21,41 \pm 1,22$
Extrakt_6	50% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, CE	$180,56 \pm 3,68$	$75,23 \pm 5,27$
Extrakt_7	50% etanol, zmrazené hroznové výlisky, UE	$60,06 \pm 1,35$	$25,02 \pm 0,81$
Extrakt_8	50% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, UE	$220,28 \pm 8,17$	$91,78 \pm 15,58$

V druhé sadě měření byla stanovena množství flavonoidů v rozmezí 21,41–91,78 mg CAE/100 g vzorku. Ze získaných výsledků uvedených v Tab. 8 vyplývá, že nejvyšší množství flavonoidů bylo stanoveno u extraktu_8 ($91,78 \pm 15,58$ mg CAE/100 g vzorku). Naproti tomu nejnižší množství flavonoidů obsahoval extrakt_5 ($21,41 \pm 1,22$ mg CAE/100 g vzorku).

Hroznové výlisky jsou bohatým zdrojem polyfenolických sloučenin (zejména flavonoidů). (Negro a kol., 2003) detekovali obsah flavonoidů v extraktech připravených z hroznových výlisků z odrůd červených a bílých hroznů (ve formě prášku), za použití 80% etanolu jako extrakčního rozpouštědla okyseleného 1% kyselinou mravenčí. Výchozí metodou přípravy extraktů byla UE. Kalibračním standardem byl zvolen rutin. Z uvedených výsledků (Negro a kol., 2003) vyplývá, že u extraktu připraveného z prášku červených hroznů byl obsah flavonoidů vyšší ($43,89 \pm 1,22$ mg RE/g vzorku) než

u extraktu z prášku z bílých hroznů ($14,32 \pm 1,67$ mg RE/g vzorku). Tento rozdíl byl pravděpodobně způsoben použitím jiného typu odrůd hroznů. Vzhledem k použití rozpouštědla o jiné koncentraci a jiného standardu, je obtížné porovnat výsledky stanovení flavonoidů, které uvádí (Negro a kol., 2003) s výsledky uvedenými v této diplomové práci. [81].

Stanovení antokyanů

Stanovení antokyanů bylo provedeno pomocí pH-diferenciální metody spektrofotometricky za použití acetátového a KCl pufru. Postup stanovení antokyanů je popsán v kapitole 4.4. Koncentrace a celkové množství antokyanů bylo vypočítáno dle vzorců (4.4.1) a (4.4.2). Koncentrace antokyanů jsou uvedeny jako mg kyanidinu 3-glukosidu na l vzorku. Množství antokyanů je vyjádřeno jako mg kyanidinu 3-glukosidu na 100 g vzorku. Výsledky všech stanovení včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v Tab. 9 a Tab. 10.

Tab. 9: Stanovené koncentrace (v mg kyanidinu 3-glukosidu/l vzorku) a množství antokyanů (v mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku včetně směrodatných odchylek získané pH-diferenciální metodou v etanolových a acetonových extraktech hroznových výlisků

Název vzorku extraktu	Specifikace přípravy extraktu	Koncentrace antokyanů v extraktu (mg kyanidinu 3-glukosidu/l vzorku)	Množství antokyanů v extraktu (mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku)
Extrakt_1	70% etanol, zmrazené hroznové výlisky, UE	$0,08 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,05$
Extrakt_2	70% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, UE	$0,05 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,04$
Extrakt_3	70% aceton, zmrazené hroznové výlisky, UE	$0,39 \pm 0,43$	$0,20 \pm 0,21$
Extrakt_4	70% aceton, lyofilizované hroznové výlisky, UE	$0,02 \pm 0,21$	$0,01 \pm 0,10$

Tab. 10: Stanovené koncentrace (v mg kyanidinu 3-glukosidu/l vzorku) a množství antokyanů (v mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku včetně směrodatných odchylek získané pH-diferenciální metodou v etanolových extraktech hroznových výlisků

Název vzorku extraktu	Specifikace přípravy extraktu	Koncentrace antokyanů v extraktu (mg kyanidinu 3-glukosidu/l vzorku)	Množství antokyanů v extraktu (mg kyanidinu 3-glukosidu /100 g vzorku)
Extrakt_5	50% etanol, zmrazené hroznové výlisky, CE	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,01
Extrakt_6	50% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, CE	0,04 ± 0,07	0,02 ± 0,03
Extrakt_7	50% etanol, zmrazené hroznové výlisky, UE	0,05 ± 0,03	0,02 ± 0,01
Extrakt_8	50% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, UE	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,01

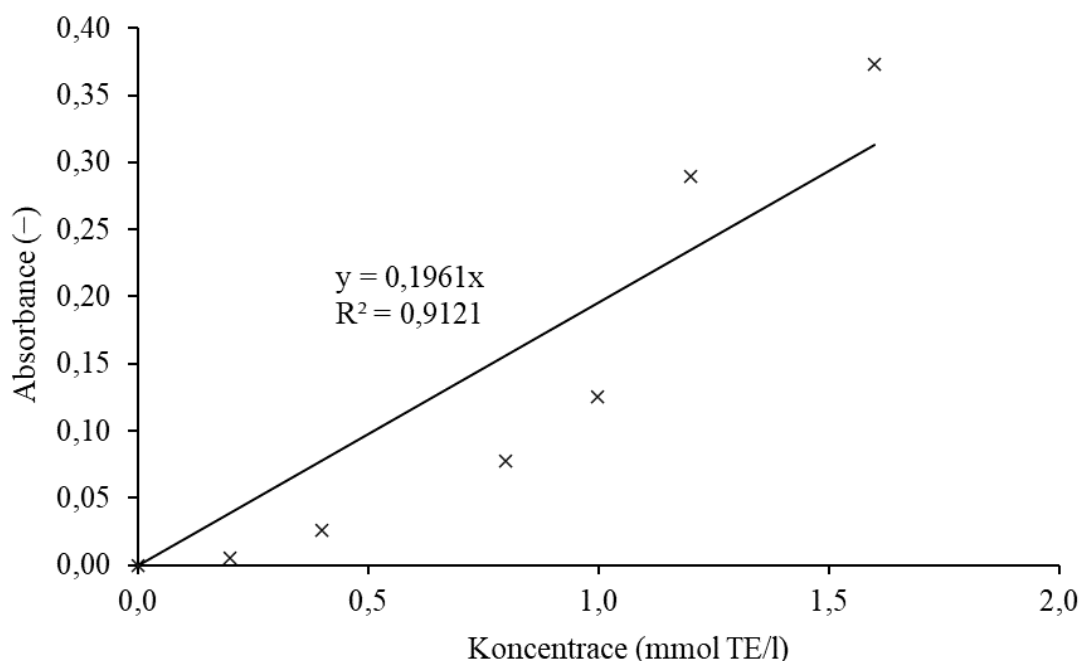
Z naměřených hodnot vyplývá, že obsah antokyanů v hroznových výliscích je velmi nízký. Tento fakt může být způsoben tím, že antokyaniny jsou červená až modrá barviva rostlin a analyzované vzorky (hroznové výlisky) byly odrůda bílých hroznů. Všechny výsledky stanovení se pohybovaly v rozmezí 0,01–0,20 mg kyanidinu 3-glukosidu /100 g vzorku. Nejvyšší množství antokyanů bylo naměřeno u extraktu_3 (0,20 ± 0,21 mg kyanidinu 3-glukosidu /100 g vzorku). Naopak nejnižší množství antokyanů bylo naměřeno u extraktu_5 (0,01 ± 0,01 mg kyanidinu 3-glukosidu /100 g vzorku.) a u extraktu_4 (0,01 ± 0,10 mg kyanidinu 3-glukosidu /100 g vzorku).

Antokyaniny jsou bioaktivní látky, které jsou charakteristické velmi dobrou antioxidační aktivitou. V současné době jsou antokyaniny stále častějším předmětem zájmu vědců ve výzkumech zaměřených na prevenci chronických onemocnění. (Wang a kol., 2016) studovali obsah antokyanů v extraktech připravených z čerstvých borůvek, třešní a hrušek. Byly porovnávány dvě metody extrakce, a to UE a CE. Jako extrakční rozpouštědlo byl zvolen etanol, aceton a metanol v různých koncentracích. Množství antokyanů bylo stanoveno pH diferenciální metodou. Z uvedených výsledků (Wang a kol., 2016) vyplývá, že pro každý

typ ovoce je vhodné jiné rozpouštědlo o jiné koncentraci. Jednou z použitých metod, kterou (Wang a kol., 2016) uvádí je UE, kdy jako rozpouštědlo byl použit 70% aceton a 70% etanol. Tento postup přípravy byl zvolen i u námi připravených extraktů 1–4. Při použití 70% acetonu bylo stanoveno množství antokyanů u borůvek 48,70 mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku, u třešní 5,4 mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku a u hrušek 0,79 mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku. Při použití 70% etanolu bylo kvantifikováno množství antokyanů u borůvek 45,83 mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku, u třešní 5,18 mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku a u hrušek 0,78 mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku. Rozdíl od (Wang a kol., 2016) bylo v rámci této diplomové práce stanoveno množství antokyanů v extraktech připravených z lyofilizovaných a zmrazených hroznových výlisků. Nejvyšší množství antokyanů bylo stanoveno v extraktu_3 ($0,20 \pm 0,21$ mg kyanidinu 3-glukosidu /100 g vzorku). Rozdíl stanoveného množství antokyanů je v porovnání z výše zmíněnou literaturou značný. (Wang a kol., 2016) naměřili podstatně vyšší obsah antokyanů u testovaných extraktů. Tento fakt je pravděpodobně způsoben použitím jiného druhu vzorku [37].

Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla stanovena spektrofotometricky pomocí ABTS. Podrobný popis stanovení je popsán v kapitole 4.4. Z regresní rovnice kalibrační závislosti uvedené na Obr. 23 byla stanovena antioxidační aktivita pro jednotlivé vzorky. Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků je vyjádřena jako mmol Troloxu (TE) na 1 vzorku. Výsledky všech stanovení jsou uvedeny v Tab. 11 a Tab. 12.



Obr. 23: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci TE v mmol/l pro stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Tab. 11: Stanovené hodnoty antioxidační aktivity v mmol TE na l vzorku včetně směrodatných odchylek získané metodou s kation-radikálem ABTS v etanolových a acetonových extraktech hroznových výlisků

Název vzorku extraktu	Specifikace přípravy extraktu	Antioxidační aktivita extraktu (mmol TE/l vzorku)
Extrakt_1	70% etanol, zmrazené hroznové výlisky, UE	0,67 ± 0,12
Extrakt_2	70% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, UE	1,41 ± 0,74
Extrakt_3	70% aceton, zmrazené hroznové výlisky, UE	2,94 ± 0,62
Extrakt_4	70% aceton, lyofilizované hroznové výlisky, UE	6,12 ± 0,70

V první sérii měření se celková antioxidační aktivita pohybovala v rozmezí 0,67–6,12 mmol TE/l vzorku. Z naměřených výsledků uvedených v Tab. 11 vyplývá, že nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena u extraktu_4 (6,12 ± 0,70 mmol TE/l vzorku). Z naměřených výsledků lze vypočítat, že u extraktu_4 byly naměřeny signifikantně vyšší hodnoty antioxidační aktivity než u zbylých extraktů. Nejnižší antioxidační aktivita byla

detekována u extraktu_1 ($0,67 \pm 0,12$ mmol TE/l vzorku). Z uvedených výsledků vyplývá, že vyšší hodnoty antioxidační aktivity vykazují extrakty vyrobené z lyofilizovaných hroznových výlisků.

Tab. 12: Stanovené hodnoty antioxidační aktivity v mmol TE na l vzorku včetně směrodatných odchylek získané metodou s kation-radikálem ABTS v etanolových extraktech hroznových výlisků

Název vzorku extraktu	Specifikace přípravy extraktu	Antioxidační aktivita extraktu (mmol TE/l vzorku)
Extrakt_5	50% etanol, zmrazené hroznové výlisky, CE	$1,33 \pm 0,10$
Extrakt_6	50% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, CE	$3,18 \pm 0,53$
Extrakt_7	50% etanol, zmrazené hroznové výlisky, UE	$1,50 \pm 0,08$
Extrakt_8	50% etanol, lyofilizované hroznové výlisky, UE	$4,23 \pm 0,15$

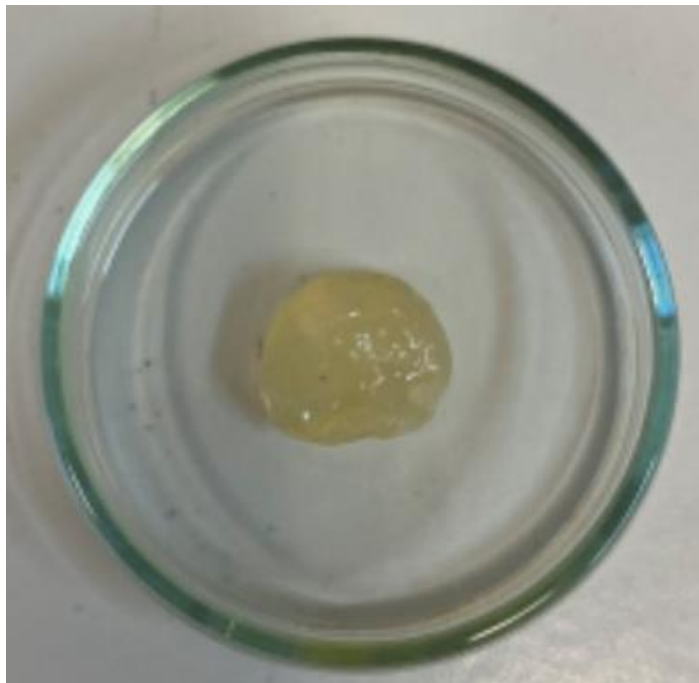
Při druhé sérii měření se celková antioxidační aktivita u všech analyzovaných vzorků pohybovala v rozmezí 1,33–4,23 mmol TE/l vzorku. Z výsledků uvedených v Tab. 12 je patrné, že nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly naměřeny u extraktu_6 ($3,18 \pm 0,53$ mmol TE/l vzorku) a u extraktu_8 ($4,23 \pm 0,15$ mmol TE/l vzorku). Naopak nejnižší antioxidační vlastnosti vykazoval extrakt_5 ($1,33 \pm 0,10$ mmol TE/l vzorku). Výsledky stanovení antioxidační aktivity extraktů připravených z hroznových výlisků odpovídají trendu, který byl pozorován již u stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů.

5.2 Modifikace BC vybranými extrakty

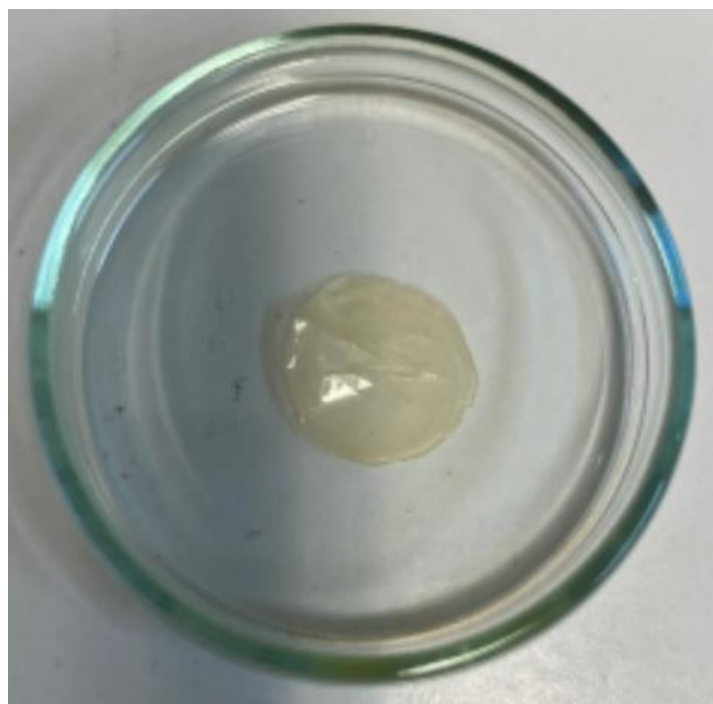
BC nesoucí antioxidační vlastnosti nachází uplatnění v kosmetickém průmyslu (pleťové masky), v biomedicíně (obvazy na rány) a v potravinářském průmyslu (aktivní balení). V této diplomové práci bylo cílem ověřit, je-li možné modifikovat BC extrakty z hroznových výlisků a získat tak BC s antioxidačními vlastnostmi. Modifikace BC byla realizována ve vzorcích suché BC ve formě filmu a vlhké BC ve formě hydrogelu [82].

Suchá BC ve formě filmu a vlhká BC ve formě hydrogelu byla modifikována zvolenými extrakty vykazující nejvyšší antioxidační aktivitu (extrakt_4, extrakt_6, extrakt_8) po dobu 24 hodin. Podrobná metodika modifikace BC je popsána v kapitole 4.4.

U modifikované BC byla pozorována vizuální barevná změna (Obr. 24 a Obr. 25). BC, jak suchá ve formě filmu, tak vlhká BC ve formě hydrogelu se zabarvila dožluta. Toto zbarvení je způsobeno přítomností fenolických sloučenin v použitých extraktech.



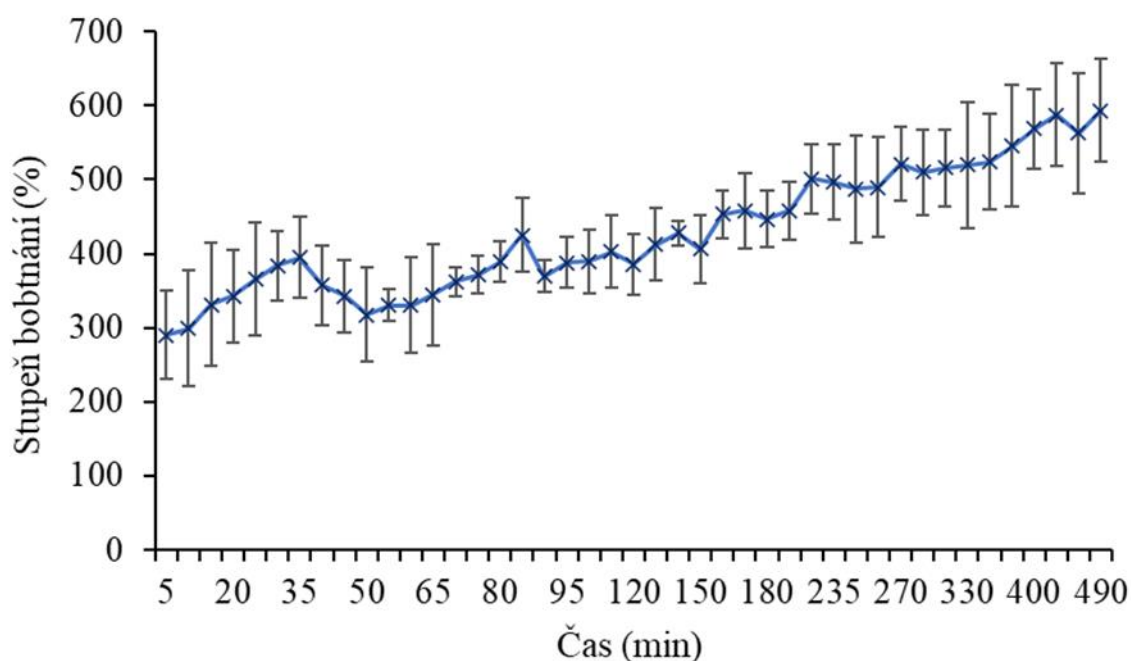
Obr. 24: Vzorek modifikované vlhké BC ve formě hydrogelu



Obr. 25: Vzorek modifikované suché BC ve formě

Stupeň bobtnání bakteriální celulózy (BC)

Stupeň bobtnání BC byl stanoven ve čtyřech opakováních. Z BC ve formě hydrogelu byly vykrojeny vzorky o průměru 10,25 mm, které byly vysušeny a zváženy. Tyto vzorky BC byly následně ponořeny do čisté demineralizované vody a ve stanovených časových intervalech po dobu 8 hodin průběžně váženy. Ze získaných hodnot byla stanovena závislost stupně bobtnání BC na čase, která je znázorněna na Obr. 26 včetně směrodatných odchylek, které jsou znázorněny jako chybové úsečky. Stupeň bobtnání byl vypočítán dle vzorce (4.4.5).



Obr. 26: Závislost stupně bobtnání BC na čase

Stanovení celkových polyfenolů modifikované BC

Obsah celkových polyfenolů modifikované BC byl stanoven pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Postup stanovení celkových polyfenolů je podrobněji popsán v kapitole 4.4. Z regresní rovnice kalibrační závislosti uvedené na Obr. 21 byl stanoven obsah celkových polyfenolů včetně směrodatných odchylek pro jednotlivé vzorky vyjádřený jako mg kyseliny gallové (GAE) na 1 vzorku. Množství celkových polyfenolů včetně směrodatných odchylek bylo vypočítáno pro modifikovanou BC dle vzorce (4.4.6) a je vyjádřeno jako mg GAE na g BC. Stanovené výsledky jsou uvedeny v Tab. 13 a Tab. 14.

Tab. 13: Stanovené množství celkových polyfenolů v mg GAE/g suché BC včetně směrodatných odchylek získané metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem v etanolových a acetonových extraktech hroznových výlisků (suchá BC ve formě filmu)

Vzorek BC	Modifikace BC	Množství celkových polyfenolů (mg GAE/g suché BC)
Nemodifikovaná BC film	-	0
BC film extrakt_4	Adsorpce extraktu_4, 24 h, 23°C	392,52 ± 68,21
BC film extrakt_6	Adsorpce extraktu_6, 24 h, 23°C	464,43 ± 64,52
BC film extrakt_8	Adsorpce extraktu_8, 24 h, 23°C	420,74 ± 72,27

U modifikované suché BC ve formě filmu se obsah celkových polyfenolů pohyboval v rozmezí 392,52–464,43 mg GAE/g suché BC. Nejvyšší množství celkových polyfenolů bylo naměřeno u suché BC modifikované extraktem_6 (464,43 ± 64,52 mg GEA/g suché BC). Naopak nejnižší množství celkových polyfenolů bylo stanoveno u suché BC modifikované extraktem_4 (392,52 ± 68,21 mg GAE/g suché BC).

Tab. 14: Stanovené množství celkových polyfenolů v mg GAE/g vlhké BC včetně směrodatných odchylek získané metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem v etanolových a acetonových extraktech hroznových výlisků (vlhká BC ve formě hydrogelu)

Vzorek BC	Modifikace BC	Množství celkových polyfenolů (mg GAE/g vlhké BC)
Nemodifikovaná BC hydrogel	-	0
BC hydrogel extrakt_4	Adsorpce extraktu_4, 24 h, 23°C	755,82 ± 100,71
BC hydrogel extrakt_6	Adsorpce extraktu _6, 24 h, 23°C	618,61 ± 87,41
BC hydrogel extrakt_8	Adsorpce extraktu_8, 24 h, 23°C	743,40 ± 91,88

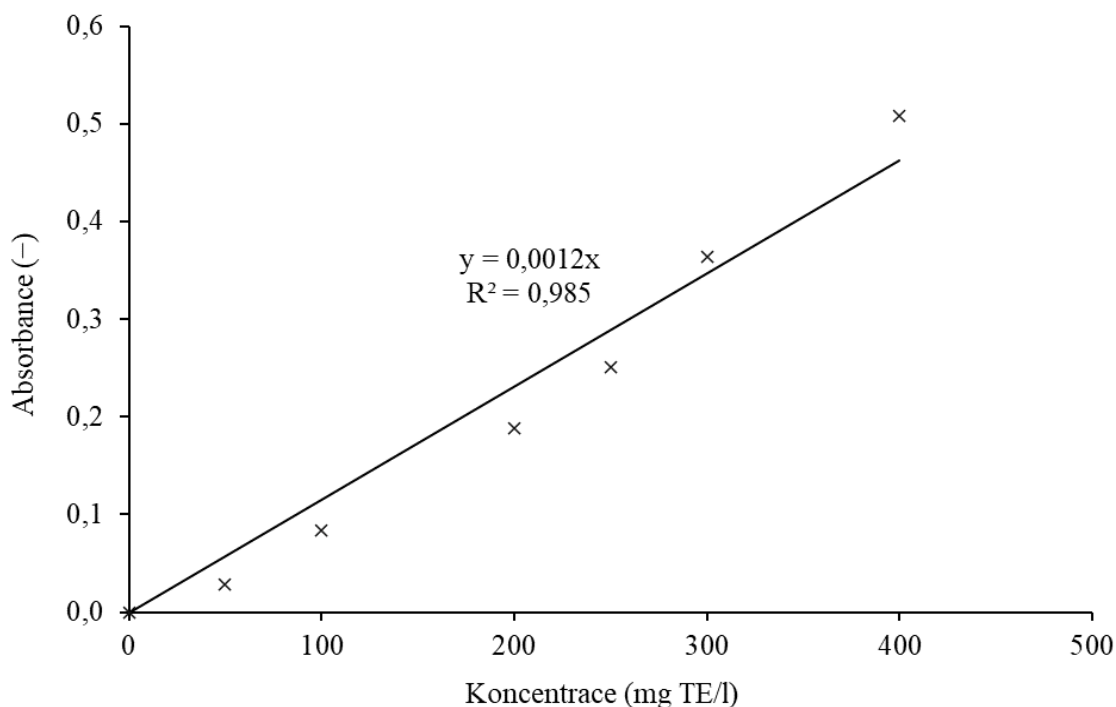
U modifikované vlhké BC ve formě hydrogelu byl detekován obsah celkových polyfenolů v rozmezí 618,61–755,82 mg GAE/g vlhké BC. Po modifikaci vlhké BC bylo nejvyšší množství celkových polyfenolů detekováno u vlhké BC modifikované extraktem_4

(755,82 ± 100,71 mg GAE/g vlhké BC). Naopak nejnižší množství celkových polyfenolů bylo stanoveno u vlhké BC modifikované extraktem_6 (618,61 ± 87,41 mg GAE/g vlhké BC).

Při porovnání stanoveného množství celkových polyfenolů bylo zjištěno, že po modifikaci BC bylo vyšší množství celkových polyfenolů naměřeno u vlhké BC ve formě hydrogelu.

Stanovení antioxidační aktivity modifikované BC

Antioxidační aktivita byla stanovena spektrofotometricky pomocí ABTS. Postup stanovení antioxidační aktivity je uveden v kapitole 4.4. Z regresní rovnice kalibrační závislosti uvedené na Obr. 27 byly stanoveny antioxidační aktivity pro jednotlivé vzorky v mg Troloxu (TE) na l vzorku. Následně byly hodnoty antioxidační aktivity přepočítány dle vzorce (4.4.6) a jsou uvedeny jako mg TE na g BC. Výsledky všech stanovení jsou zaznamenány v Tab. 15 a Tab. 16.



Obr. 27: Kalibrační závislost absorbance na TE v mg/l pro stanovení antioxidační aktivity pomocí ABTS

Tab. 15: Stanovené hodnoty antioxidační aktivity v mg TE/g suché BC včetně směrodatných odchylek získané pomocí ABTS v etanolových a acetonových extraktech hroznových výlisků (suchá BC ve formě filmu)

Vzorek BC	Modifikace BC	Antioxidační aktivita (mg TE/g suché BC)
Nemodifikovaná BC film	-	0
BC film extrakt_4	Adsorpce extraktu_4, 24 h, 23°C	1690,75 ± 1115,85
BC film extrakt_6	Adsorpce extraktu_6, 24 h, 23°C	2025,28 ± 537,96
BC film extrakt_8	Adsorpce extraktu_8, 24 h, 23°C	1665,61 ± 969,36

Stanovené hodnoty antioxidační aktivity se u modifikované suché BC pohybovaly v rozmezí 1665,61–2025,28 mg TE/g suché BC. Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity byla naměřena po modifikaci suché BC extraktem_6 (2025,28 ± 537,96 mg TE/g suché BC) a nejnižší po modifikaci BC extraktem_8 (1665,61 ± 969,36 mg TE/g suché BC).

Tab. 16: Stanovené hodnoty antioxidační aktivity v mg TE/g vlhké BC včetně směrodatných odchylek získané pomocí ABTS v etanolových a acetonových extraktech hroznových výlisků (vlhká BC ve formě hydrogelu)

Vzorek BC	Modifikace BC	Antioxidační aktivita (mg TE/g vlhké BC)
Nemodifikovaná BC hydrogel	-	0
BC hydrogel extrakt_4	Adsorpce extraktu_4, 24 h, 23°C	2941,50 ± 822,06
BC hydrogel extrakt_6	Adsorpce extraktu_6, 24 h, 23°C	2542,52 ± 533,00
BC hydrogel extrakt_8	Adsorpce extraktu_8, 24 h, 23°C	1660,81 ± 893,53

Celková antioxidační aktivita se po modifikaci vlhké BC ve formě hydrogelu pohybovala v rozmezí 1660,81–2941,50 mg TE/g vlhké BC. Ze získaných výsledků uvedených v Tab. 16 je možné pozorovat, že nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena po modifikaci vlhké BC extraktem 4 (2941,50 ± 822,06 mg TE/g vlhké BC). Naproti tomu

nejnižší antioxidační aktivita byla kvantifikována po modifikaci BC extraktem_8 ($1660,81 \pm 893,53$ mg TE/g vlhké BC).

Při porovnání stanovených hodnot antioxidační aktivity, bylo zjištěno, že vyšší hodnoty antioxidační aktivity byly naměřeny u modifikované vlhké BC ve formě hydrogelu oproti suché BC ve formě filmu.

Modifikovaná BC je v současné době stále častěji předmětem vědeckého zkoumání. Vzhledem ke své netoxické povaze a biokompatibilitě je hojně využívána v kosmetickém, potravinářském a biomedicínském průmyslu. (Hodel a kol., 2022) se zabývali vývojem obvazů pro podporu léčby kožních onemocnění. Výchozím zkoumaným materiálem byla zvolena BC ve formě hydrogelu, která byla modifikována etanolovými extrakty obsahujícími výtažky ze zeleného a červeného propolisu. Propolis je bohatým zdrojem fenolických látek (především kyseliny *p*-kumarové a biochaninu). Antioxidační aktivita byla stanovena spektrofotometricky metodou využívající radikál DPPH ((1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Principem této metody je redukce DPPH za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Dle uvedených výsledků (Hodel a kol., 2022) bylo prokázáno, že vzorky modifikované BC vykazují antioxidační aktivitu, přičemž hodnoty antioxidační aktivity se pohybovaly v rozmezí 21,23–86,76 $\mu\text{g/ml}$. Nicméně vzhledem k rozdílné metodě stanovení je obtížné porovnat výsledné hodnoty antioxidační aktivity s hodnotami stanovenými v této diplomové práci. Lze však předpokládat, že námi připravené extrakty z hroznových výlisků by bylo možné taktéž použít pro modifikaci BC při výrobě obvazů, neboť obsahují celou řadu fenolických sloučenin, které vykazují vysoké hodnoty antioxidační aktivity [79; 83].

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla příprava etanolových a acetonových extraktů z lyofilizovaných a zmrazených hroznových výlisků. Extrakty byly připraveny pomocí ultrazvukové extrakce (UE) a konvenční extrakce (CE) pomocí inkubátoru. U takto připravených extraktů byl stanoven celkový obsah polyfenolů, flavonoidů, antokyanů a antioxidační aktivita. Pomocí extraktů, které vykazovaly nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byla modifikována suchá BC ve formě filmu a vlhká BC ve formě hydrogelu. Posledním krokem bylo stanovení stupně bobtnání BC, množství celkových polyfenolů a antioxidační aktivita modifikované BC.

Obsah celkových polyfenolů byl stanoven spektrofotometricky pomocí Folin-Ciocalteuova činidla. Množství celkových polyfenolů se pohybovalo v rozmezí 51,46–405,11 mg GAE/100 g vzorku. Nejvyšší množství celkových polyfenolů bylo stanoveno u acetonového extraktu_4 ($405,11 \pm 71,74$ mg GAE/100 g vzorku), který byl připraven z lyofilizovaných hroznových výlisků pomocí UE.

Pomocí metody s chloridem hlinitým byly v extraktech kvantifikovány flavonoidy. Stanovené množství flavonoidů se pohybovalo v rozmezí 21,41–222,14 mg CAE/100 g vzorku. Nejvyšší množství flavonoidů bylo zjištěno u extraktu_4 ($222,14 \pm 78,80$ mg CAE/100 g vzorku).

Množství celkových antokyanů bylo stanoveno pH-diferenciální metodou. Stanovené množství antokyanů bylo v připravených extraktech zanedbatelné a pohybovalo se v rozmezí 0,01–0,20 mg kyanidinu 3-glukosidu /100 g vzorku. Nejvyšší obsah antokyanů byl stanoven u acetonového extraktu_3 ($0,20 \pm 0,21$ mg kyanidinu 3-glukosidu/100 g vzorku) připraveného ze zmrazených hroznových výlisků pomocí UE.

Polyfenoly, antokyany i flavonidy patří mezi látky s dobrými antioxidačními vlastnostmi. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí ABTS, kdy dochází ke zhášení kation-radikálu ABTS. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly stanoveny u acetonového extraktu_4 ($6,12 \pm 0,70$ mmol TE/l vzorku) a etanolového extraktu_6 ($3,18 \pm 0,53$ mmol TE/l vzorku) a etanolového extraktu_8 ($4,23 \pm 0,15$ mmol TE/l vzorku), kdy všechny tyto extrakty byly připraveny z lyofilizovaných hroznových výlisků. Z uvedených výsledků vyplývá, že vyšší hodnoty, jak polyfenolů, flavonoidů, tak antioxidační aktivity byly kvantifikovány u extraktů připravených z lyofilizovaných hroznových výlisků. Vhodnějším způsobem přípravy extraktů byla stanovena UE pomocí, které byl připraven extrakt_4 a extrakt_8.

BC má vysokou schopnost zadržování vody, což bylo prokázáno stanovením stupně bobtnání. Díky této její vlastnosti je možné BC modifikovat. Suchá BC ve formě filmu a vlhká BC ve formě hydrogelu byla modifikována pomocí extraktu_4, extraktu_6 a extraktu_8. U modifikované BC bylo stanoveno celkové množství polyfenolů a antioxidační aktivita. Vyšší hodnoty, jak celkových polyfenolů, tak antioxidační aktivity byly stanoveny u modifikované vlhké BC ve formě hydrogelu. Nejvyšší obsah polyfenolů byl stanoven u modifikované vlhké BC extraktem_4 ($755,82 \pm 100,71$ mg GAE/g vlhké BC). Nejvyšší hodnota antioxidační aktivity byla kvantifikována u modifikované vlhké BC extraktem_6 ($2\,941,50 \pm 822,06$ mg TE/g vlhké BC).

Tato diplomová práce potvrdila, že z hroznových výlisků je možné pomocí UE a CE připravit etanolové a acetonové extrakty s vysokým obsahem bioaktivních fenolických sloučenin s vysokou antioxidační aktivitou. Dále se podařilo úspěšně modifikovat BC ve formě suchých filmů a hydrogelů a dokázat tak její vysokou antioxidační účinnost. Možnosti aplikace takto modifikované BC jsou stále předmětem zkoumání. V současné době modifikovaná BC nachází využití především v potravinářském průmyslu, v kosmetickém průmyslu při výrobě pleťových hydratačních masek nebo v medicíně při léčbě popálenin.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products* [online]. [cit. 2022-12-31]. Dostupné z: doi:10.1016/C2017-0-00901-1
- [2] PERIYASAMY, Selvakumar, V. KARTHIK, P. SENTHIL KUMAR et al. Chemical, physical and biological methods to convert lignocellulosic waste into value-added products. A review. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2022, **20**(2), 1129-1152 [cit. 2022-11-08]. ISSN 1610-3653. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-021-01374-w
- [3] BONILLA, F. Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry* [online]. **66**(2), 209-215 [cit. 2023-04-13]. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/S0308-8146(99)00046-1
- [4] SHI, Linghong, Wanrong ZHAO, Zihong YANG, Vigasini SUBBIAH a Hafiz Ansar Rasul SULERIA. Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2022, **29**(54), 81112-81129 [cit. 2023-04-13]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-022-23337-6
- [5] LEE, Hyun-Jung, Seung Mook LIM, Hee Yeon JANG, Young Ran KIM, Joon-Seok HONG a Gi Jin KIM. MiR-373-3p Regulates Invasion and Migration Abilities of Trophoblast Cells via Targeted CD44 and Radixin. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(12) [cit. 2023-04-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22126260
- [6] TIŠMA, Marina, Ana BUCIĆ-KOJIĆ a Mirela PLANINIĆ. *Bio-based Products from Lignocellulosic Waste Biomass* [online]. 2021, **35**(2), 139-156 [cit. 2022-11-05]. ISSN 18465153. Dostupné z: doi:10.15255/CABEQ.2021.1931
- [7] BILAL, Muhammad, Zhaoyu WANG, Jiandong CUI, Luiz Fernando Romanholo FERREIRA, Ram Naresh BHARAGAVA a Hafiz M.N. IQBAL. Environmental impact of lignocellulosic wastes and their effective exploitation as smart carriers – A drive towards greener and eco-friendlier biocatalytic systems. *Science of The Total Environment* [online]. 2020, **722** [cit. 2023-04-12]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137903
- [8] K.N, Yogalakshmi, Mohamed Usman T.M, Kavitha S, Saloni SACHDEVA, Shivani THAKUR, Adish Kumar S a Rajesh Banu J. Lignocellulosic Biorefinery Technologies: A Perception into Recent Advances in Biomass Fractionation, Biorefineries, Economic Hurdles and Market Outlook. *Fermentation* [online]. 2023, **9**(3) [cit. 2023-04-06]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation9030238
- [9] POSKART, Anna, Magdalena SKRZYNIARZ, Marcin SAJDAK, Monika ZAJEMSKA a Andrzej SKIBIŃSKI. Management of Lignocellulosic Waste towards Energy Recovery by Pyrolysis in the Framework of Circular Economy Strategy. *Energies* [online]. 2021, **14**(18) [cit. 2023-04-06]. ISSN 1996-1073. Dostupné z: doi:10.3390/en14185864
- [10] LIZÁRRAGA-VELÁZQUEZ, Cynthia, Nayely LEYVA-LÓPEZ, Crisantema HERNÁNDEZ et al. Antioxidant Molecules from Plant Waste: Extraction Techniques and Biological Properties. *Processes* [online]. 2020, **8**(12) [cit. 2022-11-22]. ISSN 2227-

9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr8121566

- [11] MÜLLER, B. a N. LAIBACH. Chapter 5. Extraction of valuable components from waste biomass. *Waste to Food* [online]. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2022, 147-168 [cit. 2022-11-22]. ISBN 978-90-8686-377-8. Dostupné z: doi:10.3920/978-90-8686-929-9_5
- [12] KRÁTKÝ, Lukáš, Tomáš JIROUT a Andrey KUTSAY. *Perspektivita zpracování odpadů v biorafineriích* [online]. [cit. 2023-04-12]. Dostupné z: <https://www.odpadoveforum.cz/TVIP2017/prispevky/142.pdf>
- [13] TAYYAB, M. BIOETHANOL PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC BIOMASS BY ENVIRONMENT-FRIENDLY PRETREATMENT METHODS: A REVIEW. *Applied Ecology and Environmental Research* [online]. 2018, **16**(1), 225-249 [cit. 2022-11-22]. ISSN 15891623. Dostupné z: doi:10.15666/aeer/1601_225249
- [14] XIA, En-Qin, Gui-Fang DENG, Ya-Jun GUO a Hua-Bin LI. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2010, **11**(2), 622-646 [cit. 2022-11-08]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms11020622
- [15] SRIDHAR, Kandi a Albert CHARLES. *Fortification using grape extract polyphenols – a review on functional food regulations* [online]. 2021, **56**(8), 3742-3751 [cit. 2022-11-08]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.15001
- [16] FERRIERES, J. The French paradox: lessons for other countries. *Heart* [online]. 2004, **90**(1), 107-111 [cit. 2022-11-22]. ISSN 0007-0769. Dostupné z: doi:10.1136/heart.90.1.107
- [17] RENAUD, S. a R. GUEGUEN. The French Paradox and Wine Drinking. *Novartis Foundation Symposium 216 - Alcohol and Cardiovascular Diseases* [online]. Chichester, UK, 2007, 208-222 [cit. 2022-11-22]. Novartis Foundation Symposia. ISBN 9780470515549. Dostupné z: doi:10.1002/9780470515549.ch13
- [18] BURR, Michael L. Explaining the French paradox. *Journal of the Royal Society of Health* [online]. 1995, **115**(4), 217-219 [cit. 2022-11-22]. ISSN 0264-0325. Dostupné z: doi:10.1177/146642409511500404
- [19] Vinařské regiony v ČR. In: *Národní vinařské centrum* [online]. [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: www.vinarskecentrum.cz/o-vine/vinarske-regiony-v-cr
- [20] PÁDROVÁ, KAROLÍNA, IRENA KOLOUCHOVÁ a PETR CVINER. MODERNÍ MOŽNOSTI VYUŽITÍ ODPADNÍCH SUROVIN ZE ZPRACOVÁNÍ VINNÝCH HROZNŮ. *Chemické listy* [online]. 2017, 103-108 [cit. 2023-03-25]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2017_02_103-108.pdf
- [21] *SITUAČNÍ A VÝHLEDOVÁ ZPRÁVA RÉVA VINNÁ A VÍNO* [online]. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: https://eagri.cz/public/web/file/714380/Vino_2022_web.pdf
- [22] LEIFERT, Wayne a Mahinda ABEYWARDENA. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research* [online]. 2008, **28**(11), 729-737 [cit. 2022-11-08]. ISSN 02715317. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2008.08.007
- [23] BERES, Carolina, Gislaine COSTA, Ignacio CABEZUDO et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*

- [online]. 2017, **68**, 581-594 [cit. 2022-12-17]. ISSN 0956053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.wasman.2017.07.017
- [24] YU, Jianmei a Mohamed AHMEDNA. *Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications* [online]. 2013, **48**(2), 221-237 [cit. 2022-12-17]. ISSN 09505423. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x
- [25] MUNIR, Adil, Bushra SULTANA, Asad BASHIR, Abdul GHAFFAR, Bushra MUNIR, Ghulam SHAR, Arif NAZIR a Munawar IQBAL. Evaluation of Antioxidant Potential of Vegetables Waste. *Polish Journal of Environmental Studies* [online]. 2018, **27**(2), 947-952 [cit. 2022-12-06]. ISSN 1230-1485. Dostupné z: doi:10.15244/pjoes/69944
- [26] GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* [online]. 2020, **94**(3), 651-715 [cit. 2022-12-06]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-020-02689-3
- [27] CONDE, Enma, Andrés MOURE, Herminia DOMÍNGUEZ a Juan Carlos PARAJÓ. Production of antioxidants by non-isothermal autohydrolysis of lignocellulosic wastes. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2011, **44**(2), 436-442 [cit. 2023-03-26]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2010.08.006
- [28] H. AL MAMARI, Hamad. Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis. *Phenolic Compounds - Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications* [online]. IntechOpen, 2022 [cit. 2022-12-26]. Biochemistry. ISBN 978-1-83969-346-5. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.98958
- [29] ZEB, Alam. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry* [online]. 2020, **44**(9) [cit. 2022-12-16]. ISSN 0145-8884. Dostupné z: doi:10.1111/jfbc.13394
- [30] KUMAR, Naresh a Nidhi GOEL. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* [online]. 2019, **24** [cit. 2022-12-23]. ISSN 2215017X. Dostupné z: doi:10.1016/j.btre.2019.e00370
- [31] PANDEY, Kanti a Syed RIZVI. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2009, **2**(5), 270-278 [cit. 2022-12-23]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.4161/oxim.2.5.9498
- [32] Kyselina skořicová. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_sko%C5%99icov%C3%A1
- [33] KYSELINA BENZOOVÁ. In: *P-lab* [online]. [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/kyselina-benzoova>
- [34] TUNGMUNNITHUM, Duangjai, Areeya THONGBOONYOU, Apinan PHOLBOON a Aujana YANGSABAI. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* [online]. 2018, **5**(3) [cit. 2022-12-16]. ISSN 2305-6320. Dostupné z: doi:10.3390/medicines5030093
- [35] Flavan. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2023-01-01]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Flavan>
- [36] SABINO, Luiz, Elenilson FILHO, Fabiano FERNANDES, Edy DE BRITO a Ivanildo

- JÚNIOR. Optimization of pressurized liquid extraction and ultrasound methods for recovery of anthocyanins present in jambolan fruit (*Syzygium cumini* L.). *Food and Bioproducts Processing* [online]. 2021, **127**, 77-89 [cit. 2022-11-22]. ISSN 09603085. Dostupné z: doi:10.1016/j.fbp.2021.02.012
- [37] WANG, Wenjie, Jooyeoun JUNG, Elizabeth TOMASINO a Yanyun ZHAO. Optimization of solvent and ultrasound-assisted extraction for different anthocyanin rich fruit and their effects on anthocyanin compositions. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2016, **72**, 229-238 [cit. 2022-11-22]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2016.04.041
- [38] MATTIOLI, Roberto, Antonio FRANCIOSO, Luciana MOSCA a Paula SILVA. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. In: *Molecules* [online]. 2020, [cit. 2022-11-22]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25173809
- [39] Anthokyany. In: *Wikiskripta* [online]. [cit. 2022-11-22]. Dostupné z: www.wikiskripta.eu/w/Anthokyany
- [40] SAFAFAR, Hamed, Jonathan VAN WAGENEN, Per MØLLER a Charlotte JACOBSEN. Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine Drugs* [online]. 2015, **13**(12), 7339-7356 [cit. 2022-12-31]. ISSN 1660-3397. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24224037
- [41] HAOUJAR, Imane, Francesco CACCIOLA, Jamal ABRINI et al. The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules* [online]. 2019, **24**(22) [cit. 2022-12-31]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24224037
- [42] BUNGAU, Simona, Mohamed ABDEL-DAIM, Delia TIT, Esraa GHANEM, Shimpei SATO, Maiko MARUYAMA-INOUE, Shin YAMANE a Kazuaki KADONOSONO. Health Benefits of Polyphenols and Carotenoids in Age-Related Eye Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2019, **2019**, 1-22 [cit. 2022-12-31]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2019/9783429
- [43] Lutein. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Lutein
- [44] Betakaroten. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001 [cit. 2023-04-13]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Betakaroten
- [45] ZHANG, Yuanyuan, Ping CAI, Guanghui CHENG a Yongqiang ZHANG. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications* [online]. 2022, **17**(1) [cit. 2023-04-12]. ISSN 1934-578X. Dostupné z: doi:10.1177/1934578X211069721
- [46] OLUWOLE, Oluwatoyin, WMAD FERNANDO, Jane LUMANLAN, Oluwaseun ADEMUYIWA a Vijay JAYASENA. *Role of phenolic acid, tannins, stilbenes, lignans and flavonoids in human health – a review* [online]. 2022, **57**(10), 6326-6335 [cit. 2022-12-22]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.15936

- [47] Trans-STILBEN. In: *P-lab* [online]. [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://www.p-lab.cz/itransi-stilben>
- [48] PÉREZ-CRUZ, Karina, Mauricio MONCADA-BASUALTO, Javier MORALES-VALENZUELA, Germán BARRIGA-GONZÁLEZ, Patricio NAVARRETE-ENCINA, Luis NÚÑEZ-VERGARA, J.A. SQUELLA a Claudio OLEA-AZAR. Synthesis and antioxidant study of new polyphenolic hybrid-coumarins. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2018, **11**(4), 525-537 [cit. 2022-12-26]. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.007
- [49] Kumarin. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Kumarin>
- [50] RODRÍGUEZ-GARCÍA, Carmen, Cristina SÁNCHEZ-QUESADA, Estefanía TOLEDO, Miguel DELGADO-RODRÍGUEZ a José GAFORIO. Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion?. *Molecules* [online]. 2019, **24**(5) [cit. 2022-12-23]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24050917
- [51] PIZZI, A. Tannins medical / pharmacological and related applications: A critical review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* [online]. 2021, **22** [cit. 2022-12-27]. ISSN 23525541. Dostupné z: doi:10.1016/j.scp.2021.100481
- [52] MOCCIA, Federica, Alessandra PISCITELLI, Samuele GIOVANDO, Paola GIARDINA, Lucia PANZELLA, Marco D'ISCHIA a Alessandra NAPOLITANO. Hydrolyzable vs. Condensed Wood Tannins for Bio-based Antioxidant Coatings: Superior Properties of Quebracho Tannins. *Antioxidants* [online]. 2020, **9**(9) [cit. 2023-04-12]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox9090804
- [53] ABUBAKAR, AbdullahiR a Mainul HAQUE. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* [online]. 2020, **12**(1) [cit. 2022-12-20]. ISSN 0975-7406. Dostupné z: doi:10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- [54] CACIQUE, Ane, Érica BARBOSA, Gevany PINHO a Flaviano SILVÉRIO. Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Ciência e Agrotecnologia* [online]. 2020, **44** [cit. 2022-12-20]. ISSN 1981-1829. Dostupné z: doi:10.1590/1413-7054202044017420
- [55] PAN, Zhongli, Ruihong ZHANG a Steven ZICARI, ed. *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products* [online]. Academic Press, 2019 [cit. 2022-12-31]. ISBN 978-0-12-814138-0.
- [56] WATSON, Ronald Ross, ed. *Polyphenols in Plants* [online]. Academic Press, 2019 [cit. 2022-12-31]. ISBN 978-0-12-813768-0.
- [57] KUMAR, Kshitiz, Shivmurti SRIVASTAV a Vijay SHARANAGAT. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2021, **70** [cit. 2022-12-27]. ISSN 13504177. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultsonch.2020.105325
- [58] PURI, Munish, Deepika SHARMA a Colin BARROW. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, **30**(1), 37-44 [cit. 2022-12-18]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2011.06.014

- [59] STREIMIKYTE, Paulina, Pranas VISKELIS a Jonas VISKELIS. Enzymes-Assisted Extraction of Plants for Sustainable and Functional Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(4) [cit. 2022-12-18]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23042359
- [60] SUN, Yong-Chang, Xiao-Nan LIU, Ting-Ting WANG, Bai-Liang XUE a Run-Cang SUN. *Green Process for Extraction of Lignin by the Microwave-Assisted Ionic Liquid Approach: Toward Biomass Biorefinery and Lignin Characterization* [online]. 2019, **7**(15), 13062-13072 [cit. 2022-12-29]. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.9b02166
- [61] CHERUBIM, Débora, Cleide MARTINS, Luciana FARIÑA a Rosemeire LUCCA. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. *Journal of Cosmetic Dermatology* [online]. 2020, **19**(1), 33-37 [cit. 2022-12-06]. ISSN 1473-2130. Dostupné z: doi:10.1111/jocd.13093
- [62] FATIMA, Atiya, Sumayia YASIR, Mohd. KHAN, Sehrish MANAN, Muhammad ULLAH a Mazhar UL-ISLAM. Plant extract-loaded bacterial cellulose composite membrane for potential biomedical applications. *Journal of Bioresources and Bioproducts* [online]. 2021, **6**(1), 26-32 [cit. 2022-12-06]. ISSN 23699698. Dostupné z: doi:10.1016/j.jobab.2020.11.002
- [63] AMORIM, Júlia, Helenise NASCIMENTO, Cláudio SILVA JUNIOR, Alexandre MEDEIROS, Ivo SILVA, Andréa COSTA, Glória VINHAS a Leonie SARUBBO. *Obtainment of bacterial cellulose with added propolis extract for cosmetic applications* [online]. 2022, **62**(2) [cit. 2022-12-06]. ISSN 0032-3888. Dostupné z: doi:10.1002/pen.25868
- [64] LAHIRI, Dibyajit, Moupriya NAG, Bandita DUTTA et al. Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(23) [cit. 2022-11-13]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms222312984
- [65] SWINGLER, Sam, Abhishek GUPTA, Hazel GIBSON, Marek KOWALCZUK, Wayne HEASELGRAVE a Iza RADECKA. Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine. *Polymers* [online]. 2021, **13**(3) [cit. 2022-11-13]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13030412
- [66] REVIN, Viktor, Alexander DOLGANOV, Elena LIYASKINA, Natalia NAZAROVA, Anastasia BALANDINA, Anna DEVYATAEVA a Vadim REVIN. Characterizing Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter sucrofermentans* H-110 on Molasses Medium and Obtaining a Biocomposite Based on It for the Adsorption of Fluoride. *Polymers* [online]. 2021, **13**(9) [cit. 2022-11-13]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13091422
- [67] TORGBO, Selorm a Prakrit SUKYAI. Biodegradation and thermal stability of bacterial cellulose as biomaterial: The relevance in biomedical applications. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2020, **179** [cit. 2022-11-29]. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109232
- [68] WAHID, Fazli, Long-Hui HUANG, Xue-Qing ZHAO, Wen-Chao LI, Yun-Ya WANG,

- Shi-Ru JIA a Cheng ZHONG. Bacterial cellulose and its potential for biomedical applications. *Biotechnology Advances* [online]. 2021, **53** [cit. 2022-11-22]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106514
- [69] CAZÓN, Patricia a Manuel VÁZQUEZ. Improving bacterial cellulose films by ex-situ and in-situ modifications: A review. *Food Hydrocolloids* [online]. 2021, **113** [cit. 2022-11-22]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106514
- [70] STUMPF, Taisa Regina, Xiuying YANG, Jingchang ZHANG a Xudong CAO. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, **82**, 372-383 [cit. 2022-11-22]. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2016.11.121
- [71] FERNANDES, Isabela de Andrade Arruda, Alessandra Cristina PEDRO, Valéria Rampazzo RIBEIRO, Débora Gonçalves BORTOLINI, Mellany Sarah Cabral OZAKI, Giselle Maria MACIEL a Charles Windson Isidoro HAMINIUK. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **164**, 2598-2611 [cit. 2022-11-23]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.255
- [72] ALARA, Oluwaseun Ruth, Nour Hamid ABDURAHMAN a Chinonso Ishamel UKAEGBU. Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science* [online]. 2021, **4**, 200-214 [cit. 2023-04-16]. ISSN 26659271. Dostupné z: doi:10.1016/j.crfs.2021.03.011
- [73] KAMAL, Tahseen, Mazhar UL-ISLAM, Sher Bahadar KHAN, Esraa M. BAKHSH a Muhammad Tariq Saeed CHANI. Development of plant extract impregnated bacterial cellulose as a green antimicrobial composite for potential biomedical applications. *Industrial Crops and Products* [online]. 2022, **187** [cit. 2023-04-15]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2022.115337
- [74] CALDAS, Thais, Karen MAZZA, Aline TELES et al. Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products* [online]. 2018, **111**, 86-91 [cit. 2023-02-19]. ISSN 09266690. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2017.10.012
- [75] STRATIL, Pavel, Vlastimil KUBÁŇ a Jitka FOJTOVÁ. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2008, **26**(4), 242-253 [cit. 2023-02-18]. ISSN 12121800. Dostupné z: doi:10.17221/1119-CJFS
- [76] MÁROVÁ, Ivana a Dana VRÁNOVÁ. *Praktikum z biochemie: pracovní sešit 2*. Brno, 2016. Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně.
- [77] PęKAL, Anna a Krystyna PYRZYNSKA. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* [online]. 2014, **7**(9), 1776-1782 [cit. 2023-02-18]. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-014-9814-x
- [78] HOLASOVÁ, MARIE a VLASTA FIEDLEROVÁ. POROVNÁNÍ METOD STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY V OVOCNÝCH A ZELENINOVÝCH ŠŤÁVÁCH. *Chemické listy* [online]. 2011, 766-772 [cit. 2023-02-18]. Dostupné z:

http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_10_766-772.pdf

- [79] PAULOVÁ, HANA, HANA BOCHOŘÁKOVÁ a EVA TÁBORSKÁ. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické listy* [online]. 2004, 174179 [cit. 2023-02-18]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [80] BODEA, Ioana, Florin BETEG, Carmen POP et al. Optimization of Moist and Oven-Dried Bacterial Cellulose Production for Functional Properties. *Polymers* [online]. 2021, **13**(13) [cit. 2023-02-20]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13132088
- [81] NEGRO, C, L TOMMASI a A MICELI. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(1), 41-44 [cit. 2023-04-29]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/S0960-8524(02)00202-X
- [82] BODEA, Ioana M., Giorgiana M. CăTUNESCU, Carmen R. POP et al. Antimicrobial Properties of Bacterial Cellulose Films Enriched with Bioactive Herbal Extracts Obtained by Microwave-Assisted Extraction. *Polymers* [online]. 2022, **14**(7) [cit. 2023-05-01]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym14071435
- [83] HODEL, Katharine Valéria Saraiva, Bruna Aparecida Souza MACHADO, Giulia da Costa SACRAMENTO et al. Active Potential of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing: Analysis of Its Potential for Dermal Lesion Treatment. *Pharmaceutics* [online]. 2022, **14**(6) [cit. 2023-04-29]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics14061222

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)

BC – bakteriální celulóza

CAE – katechin

CE – konvenční extrakce

DNA – deoxyribonukleová kyselina

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

DPPH-H – difenylpikrylhydrazin

EA – enzymatická extrakce

GAE – kyselina gallová

HDL – lipoproteiny s vysokou hustotou

ICHS – ischemická choroba srdeční

LCM – lignocelulózový materiál

LCO – lignocelulózový odpad

ME – mikrovlnná extrakce

MBC – minimální bakteriocidní koncentrace

MIC – minimální inhibiční koncentrace

RE – rutin

TE – Trolox

Trolox – 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

UE – ultrazvuková extrakce