



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

ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA ŠÍPKOVÝCH ČAJŮ

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEHIP TEAS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mária Ďubašáková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2016

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1009/2015
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Mária Ďubašáková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**
Akademický rok: 2015/16

Název bakalářské práce:

Antimikrobiální aktivita šípkových čajů

Zadání bakalářské práce zadání:

1. Vypracujte literární rešerši o antimikrobiálních látkách přítomných v léčivých bylinách.
2. Připravte a ověřte vliv extraktů na vybrané mikroorganismy.
3. Vyhodnoťte a zpracujte experimentální výsledky.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Mária Ďubašáková
student(ka)

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo stanovenie koncentrácie biologicky aktívnych látok ako sú polyfenoly a flavonoidy a tiež celkovú antioxidantnú kapacitu v čajových extraktoch s hlavným obsahom *Rosa canina*. Ďalej bolo predmetom experimentu zistenie antimikrobiálnej aktivity a účinnej koncentrácie extraktu voči vybraným baktériám.

Teoretická časť je zameraná na popis prírodných antioxidantných látok a ich aktívnom účinku proti voľným radikálom, popis a rozdelenie čaju, botanický a chemický popis ruže šípovej a základné informácie o baktériách. V experimentálnej časti sú popísané vybrané metódy stanovenia polyfenolov, flavonoidov, celkovej antioxidantnej aktivity pripravených extraktov a tiež overenie antimikrobiálnej aktivity voči grampozitívnej a gramnegatívnej baktérii.

Z výsledkov vyplýva, že stanovené extrakty nemajú žiadny inhibičný účinok voči daným baktériám. Taktiež bolo zistené, že vodné extrakty majú vysoký podiel flavonoidov a polyfenolov.

ABSTRACT

The aim of this bachelor theses was to determine the concentration of biologically active substances such as polyphenols and flavonoids and also total antioxidant activity of tea extract of rosehip and also research antimicrobial activity and the effective concentration of the extracts against selected bacteria.

Theoretical part is focuses on the description of natural antioxidants and active effect against free radicals, description and distribution of tea, botanical and chemical description od rosehip and basic information about bacteria. There is section describe selected methods for the determination of polyphenols, flavonoids, total antioxidant activity of these extracts, and verification of antimicrobial activity against grampositive and gramnegative bacteria in experimental section.

From the results is flow, that the analyzed extracts have no inhibition activity against bacteria. Also was found that aqueous extracts has high proportion flavonoids and polyphenols.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

antimikrobiálna aktivita, antioxidantná aktivita, Ruža šípová, čaj, čajové extrakty, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*

KEYWORDS

Antimicrobial activity, antioxidant activity, *Rosa canina*, tea, tea extracts, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*

ŘUBAŘÁKOVÁ, M. *Antimikrobiální aktivita šípkových čajů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 39 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

PREHLÁSENIE

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

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Chcela by som poďakovať mojej vedúcej RNDr. Márii Veselej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a čas, ktorý mi venovala pri riešení tejto bakalárskej práce.

OBSAH

PREHLÁSENIE	4
podpis študenta	4
POĎAKOVANIE	4
1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1 Antimikrobiálne látky rastlinného pôvodu	8
2.2 Antioxidanty	8
2.2.1 Klasifikácia antioxidantov	8
2.2.2 Antioxidačná aktivita	9
2.2.3 Oxidačný stres	10
2.3 Charakteristika prírodných antimikrobiálnych látok	11
2.3.1 Fenolické látky	11
2.3.2 Flavonoidy	11
2.3.3 Chinóny	12
2.3.4 Triesloviny	12
2.3.5 Silice	13
2.3.6 Alkaloidy	13
2.4 Spektrálne metódy stanovenia antioxidačnej aktivity	13
2.4.1 Celková antioxidačná kapacita	14
2.4.2 Spektrálne stanovenie polyfenolov	14
2.4.3 Spektrálne stanovenie flavonoidov	14
2.5 Mikrobiologické metódy	14
2.6 Čaj	15
2.6.1 Členenie čaju a výrobkov z čajov	15
2.6.2 Suroviny	16
2.6.3 Technológia spracovania	16
2.7 Ruža šípová (<i>Rosa Canina</i>)	16
2.7.1 Botanický popis	16
2.7.2 Chemické zloženie	16
2.8 Baktérie	17

2.8.1	Prokaryotické organizmy	18
2.8.2	Doména <i>Bacteria</i>	18
3.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	20
3.1	Zoznam použitých prístrojov	20
3.2	Zoznam použitých chemikálií	20
3.3	Analyzované vzorky čajov	21
3.4	Charakteristika použitých mikroorganizmov	22
3.4.1	<i>Bacillus cereus</i>	22
3.4.2	<i>Serratia marcescens</i>	23
3.5	Príprava kultivačného média	24
3.6	Príprava čajových extraktov	24
3.6.1	Príprava výluhov	24
3.6.2	Príprava macerátov	25
3.7	Overenie antimikrobiálnej aktivity extraktov	25
3.8	Antioxidačné systémy.....	25
3.8.1	Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity čaju pomocou <i>ABTS*</i>	25
3.9	Stanovenie celkových polyfenolov	26
3.9.1	Stanovenie celkových flavonoidov	27
4.	VÝSLEDKY A DISKUSIA	29
4.1	Overenie antimikrobiálnej aktivity extraktov	29
4.1.1	Inhibičný účinok výluhov	29
4.1.1	Inhibičný účinok macerátov.....	31
4.1.2	Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity	32
4.1.1	Stanovenie polyfenolov	33
4.1.1	Stanovenie celkových flavonoidov	34
5.	ZÁVER.....	36
6.	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	37
7.	ZOZNAM SKRATIEK	39

1. ÚVOD

Rastliny ako byliny a koreniny sa využívajú od staroveku vďaka ich aromatickým vlastnostiam a chuti, v tradičnej medicíne, a tiež ako konzervačné látky. [1]

Prírodné sa vyskytujúce molekuly, prevažne sekundárne metabolity, sú zdrojom väčšiny liekov s antiinfekčnými účinkami. Prírodné produkty alebo lieky na báze prírodných produktov tvoria viac ako 75% z 97 schválených antimikrobiálnych chemických látok zavádzaných v rokoch 1981 - 2006 a s dôrazom na pokračujúci význam prírodných produktov ako základ nových liekov pre bakteriálne infekčné ochorenia. [24]

Prírodné antimikrobiálne látky môžu byť obsiahnuté v rôznych zdrojoch, vrátane rastlín, zvierat, baktérií, rias a húb. Medzi významné antimikrobiálne látky prítomné v rastlinách patria polyfenolické zlúčeniny. Ich účinnosť proti patogénnym organizmom je daná výraznou štruktúrnou rozmanitosťou a variáciou v chemickom zložení. Za antimikrobiálnu aktivitu rastlín teda môže prítomnosť polyfenolických látok alebo ostatných hydrofóbných zlúčenín v esenciálnych olejoch. Avšak, ešte nie je dostatočne preskúmaný vzťah medzi štruktúrou a funkciou týchto zlúčenín. V dôsledku toho, dôležitosť chemickej štruktúry látky rastlinného pôvodu s ohľadom na jej antimikrobiálnu aktivitu stále nie je úplne vysvetlená. [1]

Využívanie prírodných antimikrobiálnych látok v potravinách získava veľkú pozornosť zo strany spotrebiteľov. Je to spôsobené predovšetkým dvomi hlavnými faktormi, a to zneužitie a nesprávne zaobchádzanie s antibiotikami, čo má za následok dramatický nárast mikroorganizmov, vrátane patogénov, ktoré sú rezistentné voči antibiotikám. Okrem toho zvýšenie povedomia spotrebiteľov o potenciálny negatívny dopad syntetických konzervačných látok na zdravie v porovnaní s výhodami prírodných prísad. [1]

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo overenie antimikrobiálnej aktivity čajových výluhov a macerátov s hlavným obsahom ruže šípacej oproti vybraným mikroorganizmom *Bacillus cereus* a *Serratia marcescens*. Ďalším cieľom bolo stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity pripravených extraktov a koncentrácie konkrétnych zlúčenín s antioxidačnou aktivitou.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Antimikrobiálne látky rastlinného pôvodu

Fenoly a ich kyslík substituované deriváty pôsobia ako sekundárne metabolity, ktorých výhodou je práve antimikrobiálna aktivita voči patogénnym a hnilobným mikroorganizmom. Hlavné skupiny látok, ktoré sú zodpovedné za antimikrobiálnu aktivitu z rastlín zahŕňajú fenoly, fenolové kyseliny, chinóny, saponíny, flavonoidy, triesloviny, kumaríny, terpenoidy a alkaloidy. [1]

Štruktúrna rôznorodosť rastlinných derivátov je veľmi široká a vplyv antimikrobiálneho pôsobenia závisí od konštrukčného usporiadania. Fenolové zlúčeniny majú veľké štrukturálne zmeny a sú jedny z najviac rôznorodých skupín sekundárnych metabolitov. [1]

Predpokladá sa, že inhibičný účinok fenolových zlúčenín spôsobuje hydroxylová skupina (-OH), tá dokáže integrovať s bunkovou membránou baktérií a tak môže dôjsť k narušeniu membránovej štruktúry a tým dôjsť k uniku bunkových zložiek. [1]

Aktívna skupina ako je hydroxylová podporuje premiestňovanie elektrónov, ktoré potom pôsobia ako protónové výmenníky a znižujú gradient cez cytoplazmatickú membránu bakteriálnych buniek, to spôsobí kolaps protón hybnej sily a vyčerpanie ATP, čo v konečnom dôsledku vedie k smrti bunky. Ďalší výskum uvádza, že tieto hydroxylové skupiny môžu ľahko viazať aktívne miesta enzýmov tým, že menia metabolizmus buniek a mikroorganizmov. [1]

2.2 Antioxidanty

Týmto názvom označujeme enzýmy, aminokyseliny, vitamíny minerály i výživové doplnky, ktoré chránia telo pred voľnými radikálmi. To sú látky, ktoré môžu vyvolať nekontrolovanú oxidáciu a tým poškodzovať rozmnožovacie funkcie buniek a oslabovať imunitný systém. Časť týchto voľných radikálov si vytvára samo telo pri uvoľňovaní energie, jedná sa o veľmi nežiadúce vedľajšie produkty metabolizmu, vznikajú väčšinou pri maximálnych telesných záťažach. [2]

2.2.1 Klasifikácia antioxidantov

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

- reagujú s voľnými radikálmi (primárne antioxidanty) alebo redukujú vzniknuté hydroperoxydy (sekundárne antioxidanty),
- viažu do komplexov katalyticky pôsobiace kovy,
- eliminujú prítomný kyslík. [3]

K primárnym antioxidantom patria všetky povolené látky: kyselina askorbová a jej deriváty, tokoferoly, fenolové látky, galláty a iné. K sekundárnym antioxidantom patria napríklad cysteín, lipová kyselina, methionin a iné prirodzene sa vyskytujúce zlúčeniny, ktoré sa však ako antioxidanty nepoužívajú. [3]

Ďalšia klasifikácia je podľa pôvodu, kedy sa rozoznávajú antioxidanty:

- prírodné,
- syntetické.

Z prírodných antioxidantov sú ako aditíva povolené iba tokoferoly, ale i dnes sa získavajú prevažne synteticky. Ďalšie prírodné antioxidanty sú prítomné v rade olejov a iných tukov. Nemajú však obvykle konštantné zloženie, bývajú menej účinné a drahšie než syntetické antioxidanty. [3]

Podľa štruktúry sa rozoznávajú antioxidanty:

- fenolové - z povolených prírodných látok k nim patria tokoferoly, fenolové antioxidanty a galláty a iné,
- endioly - z povolených látok k nim patria askorbová a erythorbová kyselina, ich soli a deriváty,
- iné látky. [3]

2.2.2 Antioxidačná aktivita

Prítomnosť voľnej hydroxylovej skupiny vo fenolových zlúčeninách tiež spôsobuje anti-oxidačné účinky tým, že inhibuje tvorbu reaktívnych foriem kyslíka, ako aj vyplavovanie voľných radikálov tým, že zníži redoxný potenciál bunky. Toto zníženie redoxného potenciálu môže ďalej obmedziť rast nežiaducich mikroorganizmov. Voľné radikály poškodzujú organizmus a antioxidanty tieto voľné radikály zachytávajú a deaktivujú. Proces prebieha tak, že antioxidanty voľným radikálom poskytujú vlastný elektrón a tým sa zablokuje odber elektrónu z iných molekúl v organizme. Po tejto reakcii sa z antioxidantov stávajú voľné radikály, ktoré reagujú s ďalšími antioxidantmi, a tak sa vracajú do pôvodného stavu. [1]

2.2.2.1 Voľné radikály

V posledných rokoch boli získané mnohé doklady o tom, že v organizme bežne vzniká rad reaktívnych foriem kyslíka a reaktívnych foriem dusíka, a že tieto látky majú značný fyziologický aj patogenetický význam. [2]

Tabuľka č. 1: najdôležitejšie reaktívne formy kyslíka a dusíka

Voľné radikály kyslíka	Voľné radikály dusíka
Superoxid, O_2^{\bullet}	Oxid dusnatý, NO_2^{\bullet}
Hydroxylový radikál, HO^{\bullet}	Oxid dusičitý NO^{\bullet}
Peroxyl, ROO^{\bullet}	
Alkoxyl, RO^{\bullet}	
Hydroperoxyl, HO_2^{\bullet}	

Voľné radikály sú z chemického hľadiska atómy alebo skupina atómov s voľným (nepárovým) elektrónom. Tvorja sa z niektorých látok znečisťujúcich prostredie. Vznikajú vplyvom radiačného i slnečného žiarenia (UV), ale aj pri bežných metabolických procesoch v ľudskom tele, ako je metabolizmus lipidov, zvýšená fyzická námaha i vplyv slnečného žiarenia pri opaľovaní a iné. Voľné radikály sú veľmi nestabilné, preto substancie s voľnými radikálmi hľadajú chemicky stabilnejšiu formu tak, že reagujú s inými komponentmi alebo voľnými radikálmi, čo prakticky znamená, že odovzdávajú svoj nepárový elektrón. Pri nadmernej tvorbe radikálov (najmä reaktívnych foriem kyslíka) dochádza k chemickým reakciám, ktoré môžu mať na ľudský organizmus dramatický dosah. V skutočnosti ide o porušenie rovnováhy medzi oxidačnými a antioxidačnými reakciami, pričom dochádza k tzv. oxidačnému stresu. Tento je dokázateľne pôvodcom veľkého počtu civilizačných a degeneratívnych ochorení. [4]

2.2.3 Oxidačný stres

Oxidanty a antioxidanty sa musia udržiavať v rovnováhe, aby sa minimalizovalo poškodenie molekúl, buniek a tkanív. Termín oxidačný stres sa využíva pre zameranie pozornosti na nerovnováhu, ktorá vzniká, keď pôsobením oxidantov dôjde ku zmene normálnej rovnováhy medzi oxidantmi a antioxidačnými. Antioxidanty sa nachádzajú v potravinách alebo rastlinných doplnkoch stravy a pomáhajú chrániť organizmus pred oxidačným poškodením, ktorý môže vzniknúť jednak z vlastného metabolizmu a jednak pôsobením vonkajších stresorov životného prostredia. Najprirodzenejším dôsledkom oxidačného stresu je starnutie. Antioxidanty na seba vzájomne pôsobia pomocou siete neenzymatických a enzymatických vzájomne závislých reakcií a preventívne tak pôsobia proti vzniku oxidačného stresu. [5]

2.3 Charakteristika prírodných antimikrobiálnych látok

Rastlinné pletivá majú niekoľko účinných mechanizmov za účelom zmiernenia škôd spôsobených voľnými radikálmi, ktoré sa generujú pri normálnom vývoji plodu, ale aj pri pôsobení stresových podmienok. Tieto mechanizmy zahŕňajú prírodné nízkomolekulárne mechanizmy, ako sú fenolické a karotenoidné látky, kyselina askorbová a enzymatické systémy. [6]

2.3.1 Fenolické látky

Fenolické látky sa vyskytujú v celej rastlinnej ríši. V závislosti od druhu rastliny nachádzame rôzne zastúpenie jednotlivých skupín fenolov. Sú často uložené na strategicky dôležitých miestach, kde zohrávajú signalizačnú rolu a často i priamu rolu v obrane. Fenolické látky sa obvykle hromadia v centrálnych vakuolách epidermálnych buniek, rovnako ako v subepidermálnych bunkách listov a výhonkov. Okrem toho sú niektoré fenolické látky pripojené kovalentnou väzbou na stenu rastliny bunky. Ostatné sa vyskytujú vo voskoch alebo na vonkajšom povrchu rastlinných orgánov. [6]

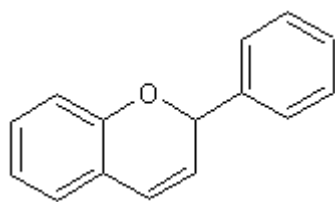
Sú veľmi heterogénnou skupinou zlúčenín, z ktorých sa niektoré uplatňujú ako vonné látky (jednoduché fenoly), ktoré vznikajú ako degradačné produkty fenolových kyselín a deriváty hydroxyfenolových kyselín. Fenoly sú tiež chuťové látky jednoduché fenoly aj polyfenoly, ako sú napr. kondenzované triesloviny zvané flavolany, ktoré sú nositeľmi trpkkej chuti, prírodné farbivá (niektoré chinóny, flavonoidy a iné). Vykazujú výrazné biologické účinky preto sa radia medzi antioxidanty. [3]

Samotný fenol je ako antioxidant neúčinný, avšak substitúcia alkylovými skupinami v o- alebo p- polohe zvyšuje konjugačným efektom hustotu elektrónov na skupine OH, a zvyšuje tak schopnosť fenolu reagovať s voľnými radikálmi. [3]

2.3.2 Flavonoidy

Flavonoidné látky sú vo vode rozpustné a nachádzajú sa ako farbivá v zelenine, ovocí, zrninách, v listoch a kôre stromov. Je mnoho typov týchto látok, ktoré sa vyskytujú v rôznych koncentráciách v celej rastlinnej ríši. Tie, ktoré sú biologicky aktívne sa nazývajú bioflavonoidy. Niektoré z nich majú až 50-krát väčšiu antioxidačnú aktivitu ako vitamín C a E. [2]

Flavonoidné látky sú veľmi rozsiahlou skupinou rastlinných fenolov obsahujúcich v molekule 2 benzénové kruhy spojené trojuhlikatým reťazcom. Jedná sa o usporiadanie C₆-C₃-C₆. Flavonoidy sú odvodené od kyslíkatej heterocyklickej zlúčeniny 2*H*-chroménu, substituovaného v polohe C-2 fenylovou skupinou, ktorý sa nazýva flavan. [7]



Obrázok č. 1 štruktúra flavanu [7]

Z flavonoidných látok vykazujú najvyššiu antioxidačnú aktivitu zlúčeniny s dvomi hydroxidovými skupinami v polohách C-3' a C-4', karboxylovú skupinou v polohe C-4 a voľnou hydroxidovou skupinou v polohe C-3 alebo dvomi hydroxidmi v polohách C-3 a C-5. [7]

2.3.3 Chinóny

V rastlinných látkach sa nachádza veľké množstvo farebných fenolov, a tiež od fenolov odvodené chinóny. Chinóny predstavujú skupinu asi 200 žltých, červených, hnedých až takmer čiernych farbív s premenlivou štruktúrou. V prírode sa vyskytujúce farbivá sú najčastejšie odvodené od benzochinónu, naftochinónu a anthrachinónu. [7]

Sú to aromatické zlúčeniny s dvomi oxo skupinami v polohe para, formálne odvodené od difenolov oxidáciou príslušných hydroxylových skupín. Chinóny sú veľmi reaktívne látky. V mikrobiálnej bunke tvoria iverzibilné komplexy s nukleofilnými aminokyselinami, čím spôsobujú enaktiváciu proteínov a stratu ich funkcie. Pravdepodobne tiež reagujú s povrchovými adhezidmi, polypeptidmi bunkovej steny a enzýmami viazanými na membránach. [8]

2.3.4 Triesloviny

Primárnou príčinou trpkkej, zvieravej alebo adstringentnej chuti sú interakcie proteínov slín s niektorými fenolovými zlúčeninami prítomnými v potravinách rastlinného pôvodu. Tieto reakcie vedú k denaturácii proteínu slín, tým k strate ich ochranného vplyvu, v dôsledku ktorého dochádza k interakcii s proteínmi ústnej dutiny. Fenolové zlúčeniny interagujúce s proteínmi sa súhrne nazývajú triesloviny. Triesloviny sa delia na dve veľké skupiny látok:

- hydrolyzované triesloviny,
- kondenzované triesloviny. [7]

2.3.5 Silice

V rôznych častiach rastlín (kvety, listy, kôra, plody) sú obsiahnuté prchavé látky, intenzívne zapáchajúce silice. Z chemického hľadiska sú to zmesi obsahujúce rôzne organické zlúčeniny, napr. alkoholy, aldehydy, ketóny a kyseliny. Množstvo silíc v rastlinách nie je konštantné, kolísajú od tisícín percenta až po jednotky. Hlavnou zložkou sú terpény. [9]

2.3.5.1 *Terpény, terpenoidy*

Terpény (isoprenoidy) sú rozsiahlou skupinou zlúčenín mnohorôznych štruktúrnych typov, prevažne rastlinného pôvodu. Ich spoločným znakom je uhľikátý skelet molekuly, zložený z päťuhľikátých vetvených stavebných jednotiek.

Významnou skupinou tetraterpénov sú farbivá karotenoidy, zložené z ôsmich izoprenových jednotiek, na rozdiel od iných terpénov je v ich molekulách rozsiahly systém konjugovaných dvojných väzieb, čím je podmienená ich farebnosť. Karotenoidy sa vyskytujú v listoch všetkých zelených rastlín, kde v membránach chloroplastov doprevádzajú chlorofyl. Najvýznamnejším je β -karoten. Pôsobí ako prirodzený antioxidant spoločne s tokoferolmi. [10]

2.3.6 Alkaloidy

Všetky alkaloidy obsahujú dusík, ktorého prítomnosť podmieňuje ich zásadité vlastnosti. Alkaloidy sú produktom metabolizmu rastlín. Rastliny obsahujúce alkaloidy sa vyskytujú pomerne často. V rastlinách sú alkaloidy takmer vždy v podobe solí s organickými a minerálnymi kyselinami. Medzi alkaloidy patrí kyselina nikotínová a jej amid nikotinamid. Spoločne sa radia do skupiny vitamínov B. [9][10]

2.4 Spektrálne metódy stanovenia antioxidačnej aktivity

Oxidačný stres môže nastať oslabením antioxidačnej ochrany organizmu. A naopak dlho trvajúce a intenzívne oxidačné zaťaženie môže vyčerpať alebo oslabiť antioxidačný systém. Preto je meranie jednotlivých zložiek a testovanie kapacity systému prakticky významné. Pre stanovenie obsahu antimikrobiálnych látok sa používajú najčastejšie spektrofotometrické metódy, pri ktorých sa využíva reakcia látky s niektorými činidlami za vzniku farebných zlúčenín. [17] [18]

2.4.1 Celková antioxidačná kapacita

Súčasťou metódy je arteficiálna tvorba radikálov v testovanom biologickom materiáli. Meria sa teda schopnosť systému radikálove reakcie zastaviť alebo spomaliť. Používa sa metóda ABTS, založená na inhibícii vzniku radikálového kationu 2,2-azinobis (3-etylbenzothiazolin-6-sulfonát) ABTS⁺ antioxidantmi obsiahnutým v biologickom materiáli. Tento radikál je tvorený interakciou ABTS⁺ s metmyoglobínom (železo). [17]

2.4.2 Spektrálne stanovenie polyfenolov

Jednou z najpoužívanejších metód je Folin-Ciocalteuho spektrofotometrická metóda, ktorá je založená na reakcii Folin-Ciocalteuho činidla a fosfomolybdenanu a fosfowolframu s fenolmi obsiahnutými v rastlinnej vzorke. Princípom je redukcia fenolov za vzniku chromogénov, modrých produktov, ktoré sa stanovujú spektrofotometricky. [28]

2.4.3 Spektrálne stanovenie flavonoidov

Jednou z najpoužívanejších metód stanovenia je Christ-Mullerová metóda. Princípom tejto metódy je spektrofotometrická detekcia farebných komplexov Al³⁺ s hydroxylovou a karboxylovou skupinou v alkalickej prostredí. Výsledný roztok sa v prítomnosti flavonoidov zafarbí nažltlo a stanoví sa spektrofotometricky. [6]

2.5 Mikrobiologické metódy

- Zried'ovacia – v rade riedení skúmanej látky sa stanovuje minimálna koncentrácia účinnej látky pre daný organizmus,
- nefelometrická – hodnotí sa odpoveď testovacieho organizmu na rad koncentrácií účinnej látky meraním intenzity rastu v tekutom prostredí,
- titrimetrické – hodnotí sa intenzita rastu pomocou fyzikálno-chemických zmien prostredia,
- difúzna – vyžadujú tuhé agarové médium, v ktorom je naočkovaný citlivý mikroorganizmus a testovacia látka difunduje médium, čím spôsobuje vznik inhibičných zón. Veľkosť zón je závislá na koncentrácii testovacej látky, na zložení pôdy, vlhkosti pôdy, hrúbky vrstvy kultivačnej pôdy, pH pôdy a doby inkubácie. [25]

Podľa spôsobu nanášania testovacej látky rozlišujeme metódu:

- kvapkovú – testovacia látka sa kvapne na povrch naočkovaného tuhého agarového média,
- diskovú – testovacou látkou sú nasýtené disky z filtračného papiera o priemere 6 mm, ktoré sa kladú na povrch naočkovanej agárovej platne,

- komínkovú – do naočkovanej agárovej vrstvy sa vtláčajú komínky zo skla, porcelánu alebo nehrdzavejúcej ocele s vnútorným priemerom 5 mm a do nich sa pipetujú testovacie roztoky,
- jamkovú – testovacie látky sa pipetujú do jamiek vyhlbených korkovitou priamo do naočkovanej agárovej platne.[25]

2.6 Čaj

Podľa vyhlášky 330/1997 Sb. sa čajom rozumie výrobok rastlinného pôvodu slúžiaci k príprave nápoja určeného k priamej spotrebe alebo nápoj pripravený z toho výrobku. [11]

Čajom pravým sa rozumie čaj vyrobený z výhonkov listov, listov alebo lupeňov alebo jemných častí zdrevnatených častí stonky čajovníku *Camellia sinensis*. [12]

2.6.1 Členenie čaju a výrobkov z čajov

Podľa druhu technologického spracovania čajových listov, ktorého základom je fermentácia (rada chemických a fyzikálnych reakcií, pri ktorých sa menia triesloviny enzýmov katalytickou oxidáciou a chlorofyl), pri ktorej čaj získava charakteristickú farbu, chuť a vôňu, členíme čaj na tieto skupiny:

- zelený čaj (čaj pravý, v ktorom neprebíha fermentácia),
- polofermentovaný čaj, žltozelený alebo červený (čaj pravý, v ktorom prebehla čiastočná fermentácia),
- čierny čaj (čaj pravý, v ktorom prebehla úplná fermentácia),
- ochutený čaj: zmes čaju pravého s ochucujúcimi časťami rastlín uvedených vo vyhláške, ktorých obsah nepresahuje 50% hmotnosti zmesi,
- bylinný čaj: čaj z časti bylín alebo ich zmesí uvedených vo vyhláške alebo bylín s pravým čajom, alebo ich zmesí s ovocím, pričom obsah bylín musí byť najmenej 50% hmotnosti,
- ovocný čaj: čaj zo sušeného ovocia a časti sušených rastlín uvedených vo vyhláške, kde podiel sušeného ovocia je vyšší než 50% hmotnosti. [11]

Výrobky z čaju zahŕňajú:

- čajový extrakt — výrobok získaný extrakciou čaju, slúžiaci po rozpustení vo vode k príprave nápoja,
- instantný čaj — instantný výrobok, obsahujúci čajový extrakt a iné zložky, určený k príprave nápojov rozpustením vo vode. [11]

2.6.2 Suroviny

Na prípravu bylinných a ovocných čajov sa používajú korene, listy, kôra, kvety, plody, semená i celé rastliny. Na prípravu bylinných a ovocných čajov sa dajú použiť len niektoré časti rastlín, ktoré sú uvedené vo vyhláske. Niektoré časti rastlín (kategória A) sa dajú použiť bez obmedzení, iné (kategória B) do výšky 30% hmotnosti a niektoré (kategória C) len do výšky 5% hmotnosti. Dôvodom obmedzení používania rastlín sú toxické látky, ktoré sú v niektorých bylinách obsiahnuté v množstvách, ktoré by mohli ohroziť ľudské zdravie. [13]

2.6.3 Technológia spracovania

Základom technológie výroby bylinných a ovocných čajov je sušenie a triedenie suroviny za podmienok špecifických pre daný druh, konečná úprava a balenie. Bylinne a ovocné čaje sa vyrábajú buď jednodruhovo alebo zmesi, sypané alebo porciované. [13]

2.7 Ruža šípová

Šípky sa zbierali už v prehistorickom období, ich zvyšky sa našli v blízkosti kolových stavieb. Zbierajú sa aj dnes a sušia sa v tenkých vrstvách v teplotách do 35°C. Usušené šípky (*Fructus cynosbati*) sa uskladňujú v suchu, nie však dlhšie ako jeden rok. Najznámejším a najpoužívanejším liečivým prostriedkom je šípkový čaj. Mal by sa piť už preventívne, pretože zvyšuje odolnosť proti chorobám a epidémiám, posilňuje enzymatické procesy v tele, podporuje tvorbu krvi a má slabý močopudný účinok. [14]

2.7.1 Botanický popis

Ker s previsnutými, ostnatými konármi, na ktorých rastú striedavé, nepárovito zložené listy. Kvety sú veľké a ružovo-biele. Plody sú nažky uzavreté v dužinatom červenom súplodí, ktoré sa nazýva šípky. Ruža šípová je udomácnená v Európe a rastie na suchých svahoch a na okrajoch lesov a hájov. Termín kvitnutia je jún-júl a termín zberu šípkov je september-október. [14]

2.7.2 Chemické zloženie

Fyziologické funkcie plodu šípky môžeme čiastočne pripísať skutočnosti, že obsahujú veľké množstvo zlúčenín zahŕňajúce fenoly, β -karotén, lycopén, kyselinu askorbovú, tokoferol, bioflavonoidy, ovocné kyseliny, triesloviny, pektín, cukry, organické kyseliny, aminokyseliny a esenciálne oleje. [15]

Tabuľka č. 2: základné zložky šípky [16]

Základné zložky	voda	sušina	bielkoviny	lipidy	sacharidy	popoloviny	vláknina
Obsah [g/kg]	490	510	36	4,4	220	30	224

Tabuľka č. 3: minerálne látky obsiahnuté v šípke [16]

Minerálne látky	Ca - vápnik	Fe - železo	Na - sodík	Mg - horčík	P - fosfor	Cl - chlór	K - draslík
Obsah [mg/kg]	1 800	180	140	550	540	63	3 200

Tabuľka č. 4: Vitamíny obsiahnuté v šípke [16]

Vitamíny	A - karotén	B1 - thiamín	B2 - riboflavín	B6 - pyridoxín	B9 - kyselina listová	C - kyselina askorbová	E - tokoferol
Obsah [mg/kg]	40	0,46	0,50	0,05	0,02	3 500	10

2.8 Baktérie

Najmenšou stavebnou jednotkou organizmu je bunka. Je to ďalej nedeliteľná jednotka schopná samostatného výkonu životných funkcií. Metodické pokroky biológie posledných desaťročí vyústili v jednoznačný záver, že bunky tvoriace organizmy sú zreteľne dvojitého konštitučného typu. Pretože snáď najdôležitejší rozdiel medzi dvomi typmi buniek je štruktúra a organizácia jadra, vžilo sa označenie „prokaryotická bunka“ a „eukaryotická bunka“. [19]

Baktérie tvoria samostatnú nadrišu *Procaryotae* zreteľne oddelenú od všetkých ostatných organizmov tvoriacich druhú nadrišu *Eucaryotae*. [19]

2.8.1 Prokaryotické organizmy

Sú tri kľúčové charakteristiky, ktoré bez výnimky platia pre všetky pokaryotické bunky a odlišujú sa od všetkých eukaryotických buniek.

1. Organizácia bunkového jadra. Jadro prokaryot je útvar morfológicky zreteľný, neoddeliteľný však od cytoplazmy membránou a tvorený jedinou, veľmi dlhou, zložito poskladanou a do kruhu uzavretou dvojzávitnicovou DNA, na ktorej nie sú viazané žiadne históny, ani iné bázické bielkoviny. Geneticky je jadro haploidné a v súvislosti s tým neexistuje u baktérií ani mitóza, ani meióza, ani sexualita. [19]
2. Neprítomnosť bunkových organel. V prokaryotickej bunke nie sú ani mitochondrie, ani chloroplasty, ani endoplazmatické retikulum, ani žiadne iné membránou obalené organely. Jedinou membránou je cytoplazmatická membrána na povrchu cytoplazmy. To súčasne znamená, že prokaryotická bunka je jediným, ďalej už membránami nedeleným priestorom. [19]
3. Vlastnosti ribozómov. Ribozómy prokaryotických buniek sa v rade vlastností líšia od ribozómov eukaryotických buniek, mimo iných aj veľkosťou a hmotnosťou. [19]

Prokaryotický typ bunky zdieľajú dve rozdielne skupiny organizmov: doména *Archaea* a doména *Bacteria*. [19]

2.8.2 Doména *Bacteria*

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

1. *Gramnegatívne baktérie* (G^-) majú bunkovú stenu zloženú z vonkajšej lipopolysacharidovej membrány a vnútornej tenkej vrstvy peptidoglykán. Ich bunky sú guľaté, oválne, tyčkovité, môžu tvoriť šrobovice či vlákna. Niektoré druhy tvoria pošvy či puzdrá. Reprodukujú sa priečnym delením, vzácne pučaním, mnohonásobným delením alebo tvorbou myxospór a plodíc. G^- môžu byť fototrofné či nefoto-trofné, litotrofné alebo heterotrofné; aeróbne, anaeróbne, fakultatívne anaeróbne či mikroaerofilné. [19]
2. *Grampozitívne baktérie* (G^+) majú bunkovú stenu, ktorá nemá vnútornú membránu a obsahuje pomerne silnú vrstvu peptidoglykán s reťazcom teichoových kyselín. Tvar buniek je guľatý, tyčkovitý či vláknitý, tyčky aj vlákna sa môžu vetviť. Reprodukujú sa obvykle priečnym delením, môžu tvoriť spóry. Niektoré grampozitívne baktérie tvoria endospóry. G^+ baktérie sú obvykle heterotrofné; aeróbne, anaeróbne, fakultatívne anaeróbne či mikroaerofilné. [19]

3. *Mykoplazmaty* sú baktérie bez bunkovej steny, nie sú schopné syntetizovať prekuzory peptidoglykánu a sú preto rezistentné k inhibítorom syntézy bunkovej steny. Bunka mykoplazmatov je obklopená iba cytoplazmatickou membránou a preto sú morfológicky pleomorfné. Rozmnožujú sa pučaním, fragmentáciou alebo priečnym delením. Až na výnimky sú nepohyblivé a netvorí kľudové štádia. [19]

3. EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

3.1 Zoznam použitých prístrojov

Spektrofotometer – UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic, Anglicko

Vortex – Reax Top, Heidoplh, Nemecko

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

Mikropipety Biohit Proline

Autokláv – Vaposteri BMT, Brno

Biologický inkubátor P 100-U, Biotech Praha

3.2 Zoznam použitých chemikálií

Destilovaná voda

Ethanol 96% (VWR)

Folin-Ciocalteho činidlo (Sigma–Aldrich Chemie GmbH)

Uhlíčitán sodný (LACHEMA)

Kyselina gallová (PENTA)

Dusitan sodný (PENTA)

Katechín (LACHEMA)

Chlorid hlinitý (PENTA)

Hydroxid sodný (LACHEMA)

3.3 Analyzované vzorky čajov

Na analýzu fenolických látok a overovanie inhibičných účinkov proti G^- a G^+ mikroorganizmu boli použité dve vzorky čajov.

1. Čajová zmes Aronie & Šípek & Černý rybíz.
 - Zloženie: Šípka oplodie 50%, arónia plod 40%, čierna ríbezľa plod 10%.
 - Firma: Valdemar Grešík-Natura s.r.o.



Obrázok č. 2: čajová zmes použitá pri analýze [26]

2. Šípky drvené
 - Zloženie: šípka drvená.
 - Firma: ROSA CANINA.



Obrázok č. 3: šípkový čaj použitý pri analýze [27]

3.4 Charakteristika použitých mikroorganizmov

Použité mikroorganizmy *Bacillus cereus* (CCM 2010) a *Serratia marcescens* (CCM 303) boli dodané z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne.

3.4.1 *Bacillus cereus*

Rod *Bacillus* je veľmi rozsiahly a v prírode veľmi rozšírený. Jeho druhy tvoria väčšinou G⁺ peritrichné tyčinky, ktoré majú bohaté enzýmové vybavenie, takže môžu rozkladať najrôznejšie organické zlúčeniny. [21]

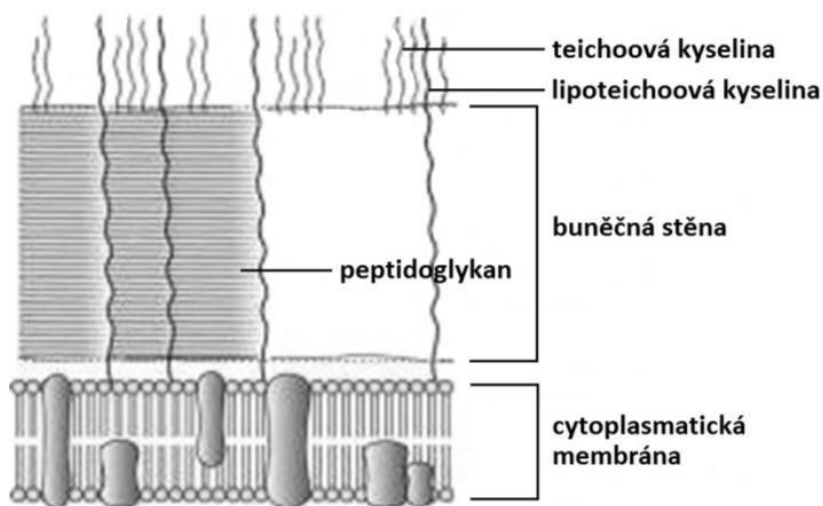
Bunky tvoria nepohyblivé tyčinky veľkosti až 1,2×3 - 5 μm, ktoré sa zvyčajne zoskupujú za sebou a vytvárajú rozličné retiazky, často rozlične zamotané. Spóry sú elipsoidné, centrálné až subcentrálne a nerozširujú bunky. [21]

Bunky sa rozmnožujú delením. Sú aeróbne, optimálna teplota ich rastu je 30 °C, no spóry sú voči teplote veľmi odolné. *Bacillus cereus* (BC) skvasuje glukózu, sacharózu, glycerol a salicín, pričom tvorí kyseliny, ale netvorí plyn. Má silné proteolytické vlastnosti. Pri rozklade bielkovín tvorí amoniak. Z dusičnanov tvorí dusitany, hydrolyzuje škrob a tvorí acetylmetylkarbinol. V lakmusovom mlieku zapríčiňuje rýchlu peptonizáciu. [22]

Na agarovej pôde tvorí nepravidelné, sivobiele kolónie, želatínové pôdy skvapalňuje. Skvapalňuje aj krvné sérum a tvorí hemolýzu na krvnom agare. Pri mikrobiologickej kontrole sa *Bacillus cereus* najlepšie odpočítava na agarovej pôde s vaječným žltom. Na tejto pôde tvorí pri teplote 37°C za 24 hodín až 48 hodín veľké, belavé až bezfarebné, ploché kolónie s priemerom 7 aj viac mm, s nízkymi nerovnomernými a nepravidelnými okrajmi, z ktorých často vyrastajú ploché, skrútené pomerne hrubé výbežky. Povrch kolónií je zrnitý. Konzistencia kolónií je kašovitá. Okolo kolónií sa vytvára po 24 hodinách v dôsledku silnej tvorby lecitinázy rozlične široký dvorec precipitácie a niekedy v tesnom susedstve kolónií aj zóna vyjasnenia. Veľmi vhodná diagnosticko-selektívna pôda na odpočítanie *Bacillus cereus* je polymyxínový agar s fenolovou červenou a so žĺtkom. Na tejto pôde sú kolónie *Bacillus cereus* obklopené hustou zónou precipitátu (aktivita lecitinázy) so svetlofialovým až červeným pozadím. [22]

BC je v prírode veľmi rozšírený mikroorganizmus. Vyskytuje sa v prachu, v pôde a v najrozličnejšom rozkladajúcom sa materiáli. Preto sa s ním tak často stretávame pri najrozličnejších mikrobiologických kontrolách v celom potravinárskom priemysle. Zapríčiňuje tu veľmi nežiadúce kontaminácie. [22]

Pri raste produkuje na polysacharidových substrátoch toxíny, ktoré môžu byť príčinou otráv. K otrávam dochádza pri premnožení tejto baktérie v potravine na koncentráciu buniek 10⁷ g⁻¹ potraviny. Najčastejšou príčinou týchto otráv sú potraviny obsahujúce obilniny alebo škrob. Otrava sa prejavuje za 12 hodín po použití potraviny a k jej príznakom patrí nevoľnosť, brušné kŕče, hnačka a zvracanie. [22]



Obrázok č. 4: bunková stena G^+ baktérie [22]

3.4.2 *Serratia marcescens*

Serratia marcescens (SM) patrí do čeľade *Enterobacteriaceae*, zahŕňajúca G^- črevné tyčinky, má veľký význam z hygienického hľadiska. Jedná sa o nespórotvorné tyčinky, peritrichné alebo bez bičíkov, ktoré majú respiračný aj kvasný metabolizmus.

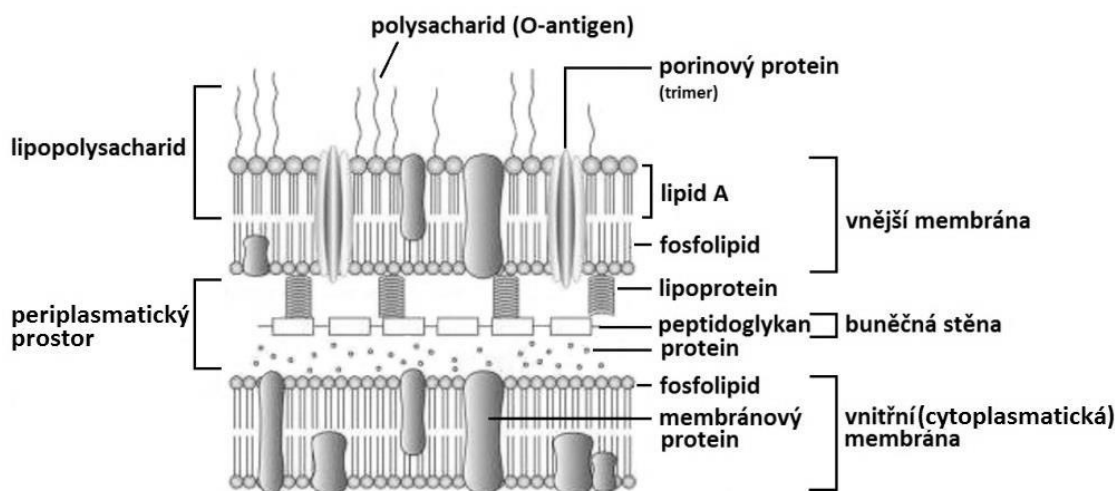
Rod *Serratia* je podmienene patogénny, čo znamená že môže spôsobiť ochorenie iba vo vyšších koncentráciách. [21]

Bunky SM, podobne ako všetky ostatné bunky rodu *Serratia*, majú tvar veľmi krátkych tyčiniek, niekedy až kokovitého tvaru, s priemerom ani nie 1 μm . Vyskytujú sa jednotlivo alebo v krátkych reťazkách. [22]

Bunky sa rozmnožujú delením. Optimálna teplota ich rastu je okolo 25°C. Pri 37°C prestanú rásť. Sú fakultatívne aeróbne. Z glukózy a z iných cukrov tvoria CO_2 a H_2 , takisto kyselinu octovú, mravčiu, jantárovú, acetylmetylkarbinol a 2,3-butylénglykol. Z dusičnanov tvoria dusitany. Ich významnou vlastnosťou je tvorba červeného pigmentu – prodigizínu. Vyznačujú sa aj amylolytickou a proteolytickou enzýmovou činnosťou. [22]

Serratia marcescens dobre rastie na všetkých základných bežných pôdach a veľmi dobre, ak pridáme k týmto pôdam škrob. Veľmi dobre sa diagnostikuje na škrobovom agare. Na agare tvorí okrúhle kolónie s priemerom 1 až 3 mm, riedke, hladké a červeno sfarbené. Kolónie na mäsopeptidovej želatíne sú riedke, červeno sfarbené, s vlnivým okrajom. Pri vpichu do želatíny skvapalňuje želatínu a povrchový prírast je červený. Bujón kalí difúzne s červeným okrajom a usadeninou. [22]

Všetky baktérie rodu *Serratia* sú v prírode veľmi rozšírené, vyskytujú sa v pôde, vo vode, v poľnohospodárskych produktoch a inde, stretávame sa s nimi veľmi často v mikrobiologickej kontrole v potravinárskom priemysle. Kontaminujú najmä škrobové látky, škrob scukorňujú (štiepia) a skvasujú. Bývajú hlavným pôvodcom červených škvŕn, na potravinách, ktoré obsahujú škrob. [22]



Obrázok č. 5: štruktúra G⁻ baktérií [22]

3.5 Príprava kultivačného média

Na prípravu kultivačného média bol použitý Nutrient agar No.2 od firmy HIMEDIA

Tabuľka č. 5: zloženie kultivačného média

zložka	Obsah [g/l]
mäsovy peptón	10,0
hovädzí extrakt	10,0
chlorid sodný	5,0
agar	15,0

Príprava: Na 1000ml destilovanej vody bolo použitých 40g živného média. Živné médium bolo sterilizované v autokláve pri 120 °C po dobu 20 minút.

3.6 Príprava čajových extraktov

3.6.1 Príprava výluhov

Príprava vodného výluhu

Do sterilnej fľašky so skrutkovacím uzáverom bola navážená vzorka čaju o hmotnosti 10g. Obsah bol zaliaty 100 ml destilovanej vody o teplote 100 °C a fľaška sa extrahovala vo vodnom kúpeli 30 minút pri 100 °C. Čajový výluh bol potom prefiltrovaný a uchovaný pri 4 °C.

Príprava etanolového výluhu

Do sterilnej fľašky so skrutkovacím uzáverom bola navážená vzorka čaju o hmotnosti 10g. Obsah bol zaliaty 100 ml 99,8% etanolom o teplote 50 °C a fľaška sa extrahovala vo vodnom kúpeli 30 minút pri 50 °C. Čajový výluh bol potom prefiltrovaný a uchovaný pri 4 °C.

3.6.2Príprava macerátov

Príprava vodného macerátu

Do sterilnej fľašky so skrutkovacím uzáverom bola navážená vzorka čaju o hmotnosti 10g. Obsah bol zaliaty 100 ml destilovanej vody o laboratórnej teplote a macerovaný 7 dní bez prístupu svetla pri laboratórnej teplote. Čajový macerát bol potom prefiltrovaný a uchovaný pri 4 °C.

Príprava etanolového macerátu

Do sterilnej fľašky so skrutkovacím uzáverom bola navážená vzorka čaju o hmotnosti 10g. Obsah bol zaliaty 100 ml 99,8% etanolom o laboratórnej teplote a macerovaný 7 dní bez prístupu svetla pri laboratórnej teplote. Čajový macerát bol potom prefiltrovaný a uchovaný pri 4 °C.

3.7Overenie antimikrobiálnej aktivity extraktov

Pre overenie antimikrobiálnych extraktov bola použitá jamková difúzna metóda. Do 200 ml sterilizovaného kultivačného média boli vnesené 2 ml bujónu s 24 hodinovou kultúrou baktérie. Toto inokulum bolo vnesené do sterilných petriho misiek do požadovanej výšky. Po stuhnutí agaru bolo korkovitom o priemere 1 cm vytvorených 6 jamiek v každej miske. Do jamiek bolo napipetovaných 100 µl sledovaného extraktu, pričom jedna jamka bola zvolená ako kontrolná, naplnená daným rozpúšťadlom. Vzorky boli kultivované 72 hodín pri 27 °C. Po dokončení kultivácie boli sledované inhibičné zóny v okolí jamiek.

3.8 Antioxidačné systémy

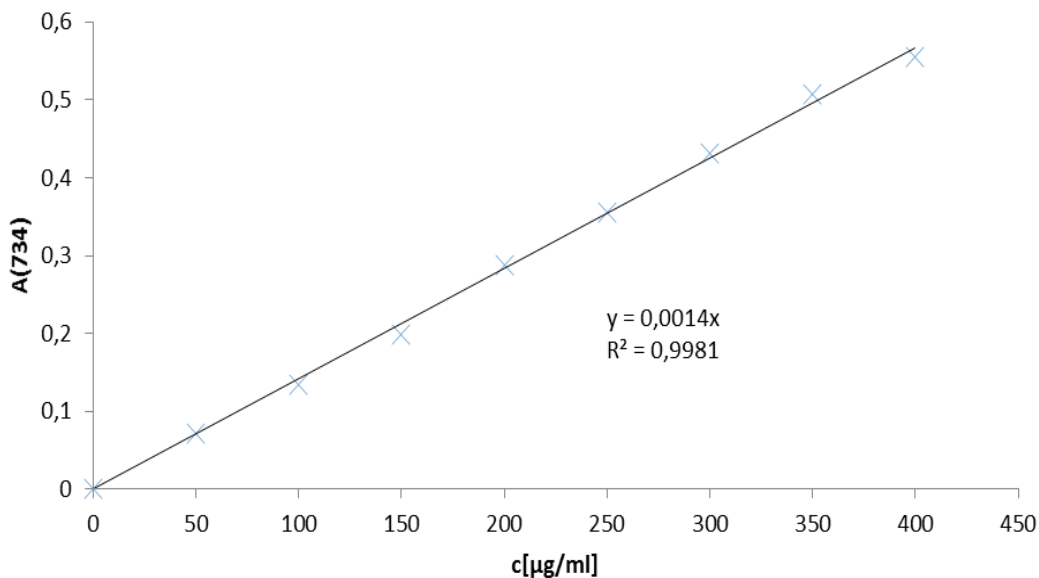
3.8.1Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity čaju pomocou ABTS*

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

Pred použitím bol ABTS•+ zriedený etanolom na absorbanciu 0,70 pri 734 nm oproti etanolu. Do zúženej kvety bol napipetovaný 1 ml ABTS•+ a 10 µl použitého extrakčného rozpúšťadla (destilovaná voda alebo etanol) a bola zmeraná absorbancia A_0 v čase $t = 0$.

Potom bol do ďalšej kyvety napipetovaný 1 ml ABTS•+ a 10 µl extraktu vzorky. Kyveta bola na 10 minút uložená do tmy a potom bol zmeraný pokles absorbancie A_{10} .

Kalibračná rovnica troloxu bola pripravená v rozmedzí koncentrácií 50–400 ng·ml⁻¹.



Obrázok č. 6: Kalibračná krivka troloxu

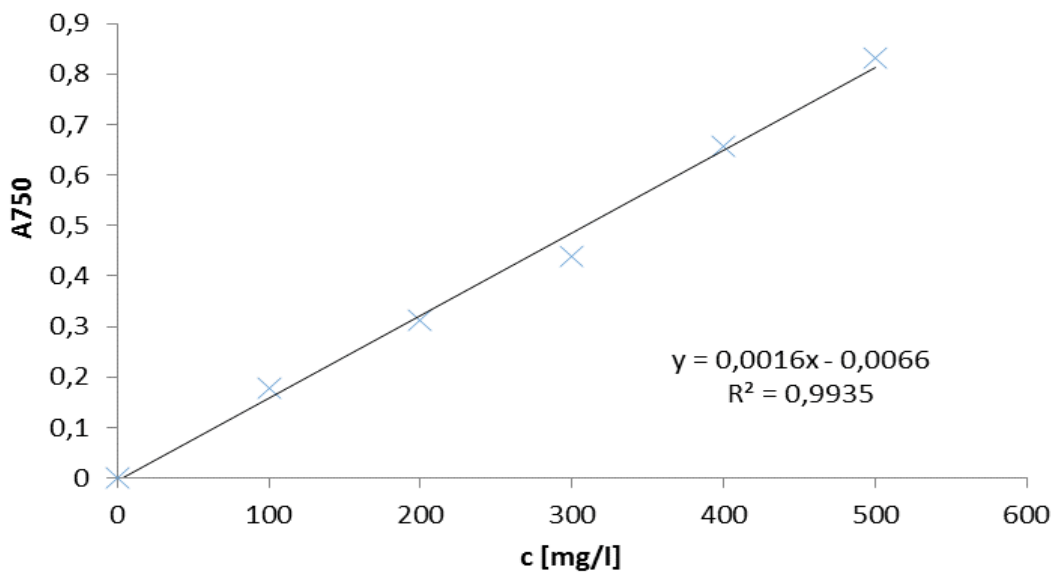
3.9 Stanovenie celkových polyfenolov

Príprava kalibračnej krivky:

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

Tabuľka č. 6: objem použitých roztokov

roztok	Objem V [ml]
Folin-Ciocaltauvo	1
vzorka čaju	0,1
uhličitan sodný	1
uestilovaná voda	1



Obrázok č. 7: kalibračná krivka kyseliny gallovej

Príprava vzoriek:

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

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

3.9.1 Stanovenie celkových flavonoidov

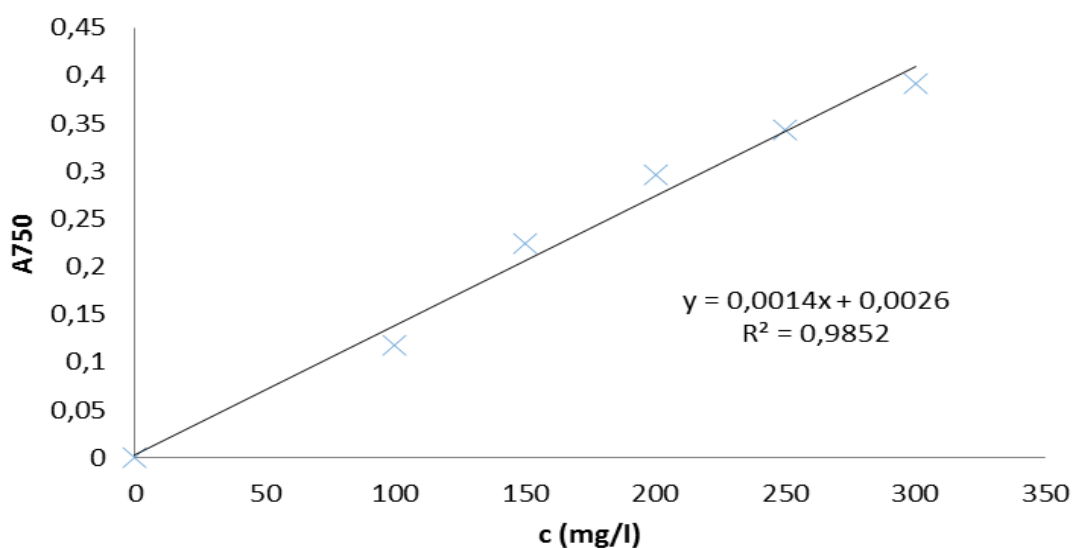
Chemikálie: dusičnan sodný 5%, chlorid hlinitý 10%, hydroxid sodný 1 mol/l, 1 mol katechín

Príprava kalibračnej krivky

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

Tabuľka č. 7: objem použitých roztokov pre stanovenie flavonoidov

roztok	Objem V [ml]
vzorka čaju	0,5
destilovaná voda	2,5
dusičnan sodný 5%	0,2
chlorid hlinitý 10%	0,2
hydroxid sodný	1,5



Obrázok č. 8: kalibračná krivka katechínu

Príprava vzoriek:

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

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

4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

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

4.1 Overenie antimikrobiálnej aktivity extraktov

Pre zistenie antimikrobiálnej aktivity čajových extraktov boli pripravené extrakty z čaju drvených šípiek a zmesi Arónie, Šípky, Ríbezle. Pre sledovanie boli pripravené vodné a etanolové výluhy šípky a zmesi s navážkou 10 g čaju na 100 ml rozpúšťadla. Ďalej boli pripravené vodné a etanolové maceráty z 10 g navážky zmesi na 100 ml rozpúšťadla. Aktivita pripravených extraktov v koncentráciách 10; 5 a 2 g bola sledovaná voči G^+ baktérii *Bacillus cereus* a G^- baktérii *Serratia marcescens*. Po 72 hodinovej kultivácii pri 27 °C boli sledované inhibičné účinky extraktov voči mikroorganizmom.

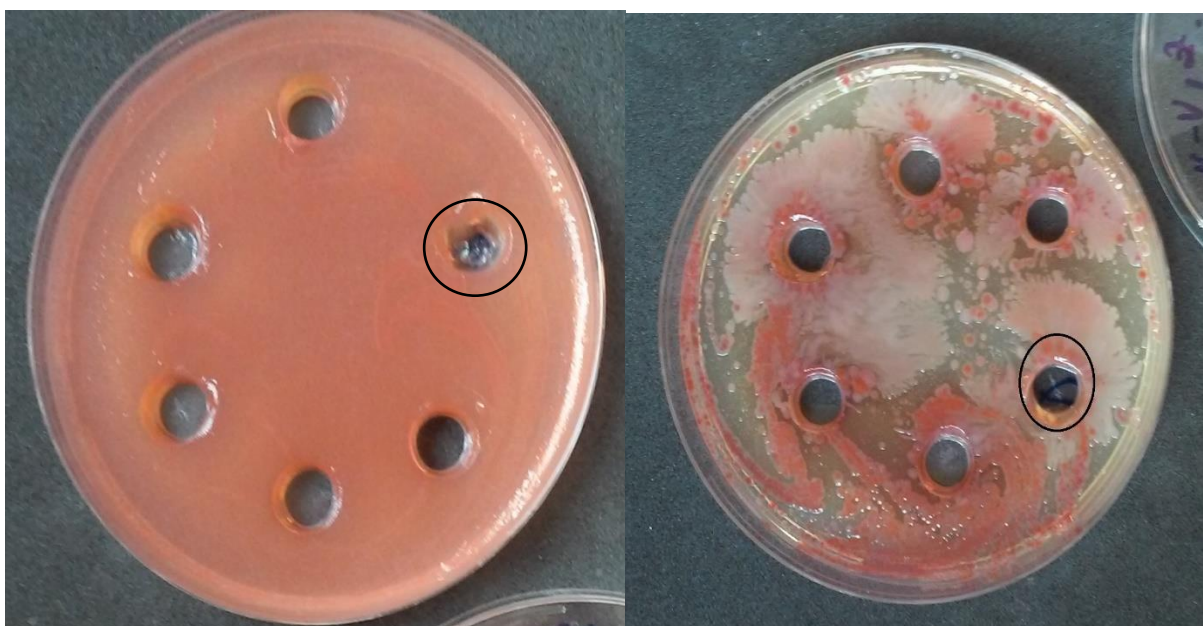
4.1.1 Inhibičný účinok výluhov

Pre zistenie inhibičných účinkov čajových výluhov boli pripravené vodné a etanolové výluhy z vybraných čajových vzoriek. U každého stanovenia bolo vždy prevedené aj paralelne stanovenie. Experiment bol pre overenie výsledkov s koncentráciou 10 g prevedený dvakrát.

Z výsledkov vyplýva že pripravené výluhy: šípka vo vode, zmes vo vode, šípka v etanole, zmes v etanole nie sú účinné v žiadnej koncentracii voči použitým mikroorganizmom *Bacillus cereus* a *Serratia marcescens*. Niektoré štúdie ukazujú, že gramnegatívne baktérie sú odolnejšie voči pôsobeniu prírodných zlúčenín než grampozitívne baktérie, iné udávajú že inhibičné účinky nesúvisia s účinkami prírodných látok s delením baktérii na grampozitívne a gramnegatívne. [23]



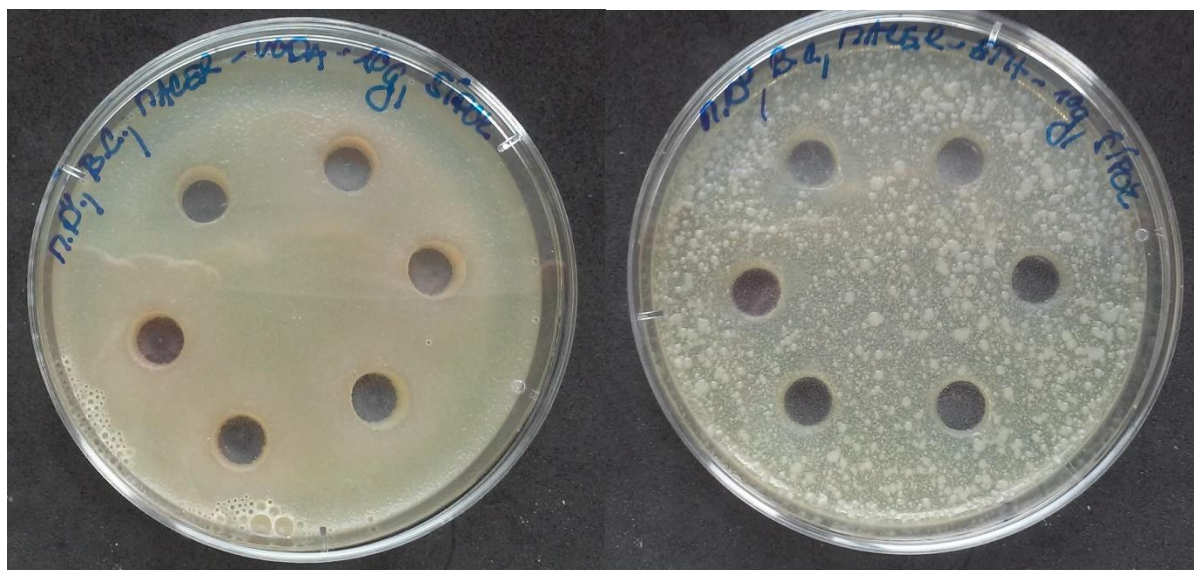
Obrázok č. 9: vodný výluh zmesi voči BC (vľavo) a etanolový výluh zmesi voči BC



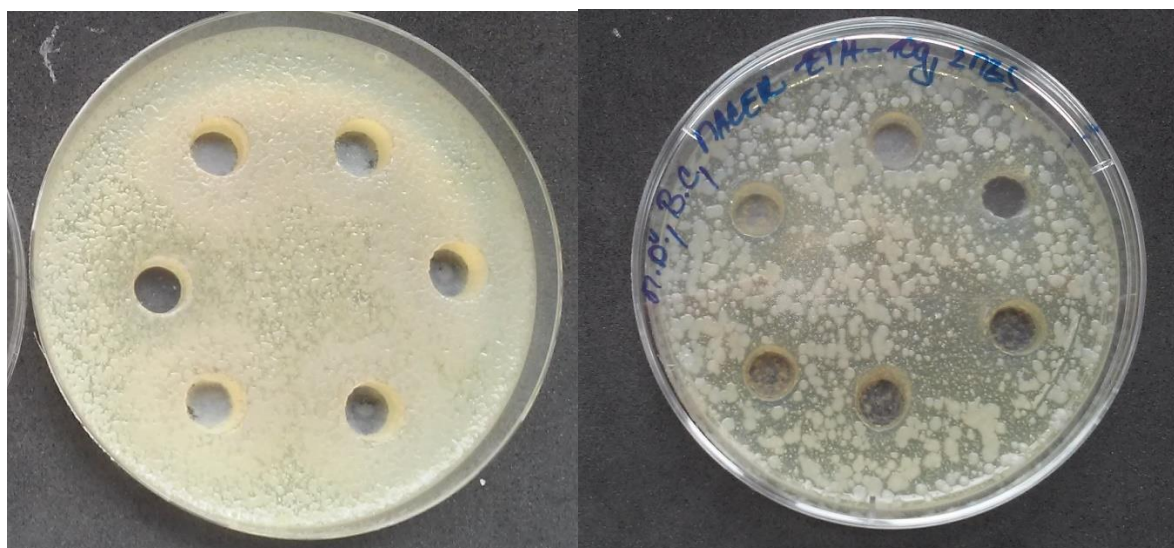
Obrázok č. 10: vodný výluh šípky voči SM (vľavo) a vodný výluh zmesi voči SM

4.1.1 Inhibičný účinok macerátov

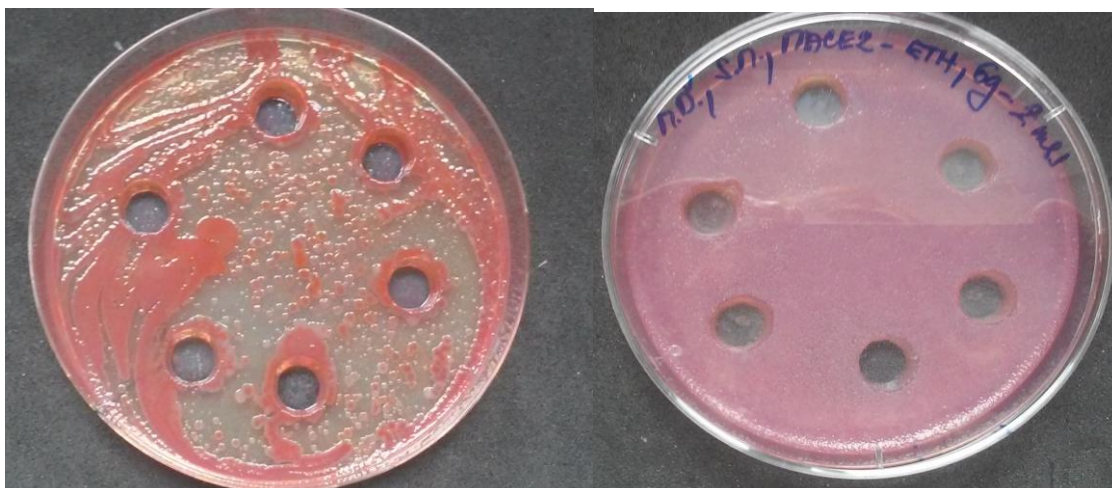
Meranie aktivity macerátov bolo prevedené tým istým spôsobom ako meranie účinku výluhov. Na meranie boli použité maceráty: Šípka vo vode, zmes vo vode, šípka v etanole, zmes v etanole v koncentráciách 10; 5 a 2 g na 100 ml rozpúšťadla. Na príslušných ukázkových obrázkoch č. 11 až č. 13 nie sú zjavné žiadne merateľné inhibičné zóny, z čoho vyplýva, že analyzované maceráty nemajú žiadny inhibičný účinok proti použitým mikroorganizmom.



Obrázok č. 11: vodný macerát šípky (vľavo) a etanolový macerát šípky (vpravo) proti BC



Obrázok č. 12: vodný macerát zmes (vľavo) a etanolový macerát zmes (vpravo) proti BC



Obrázok č. 13: vodný macerát šípky 2g (vľavo) proti etanolovému macerátu zmesi 5g (vpravo) proti SM

4.1.2 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity

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

Výsledná absorbancia vzorky bola vypočítaná podľa vzťahu:

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

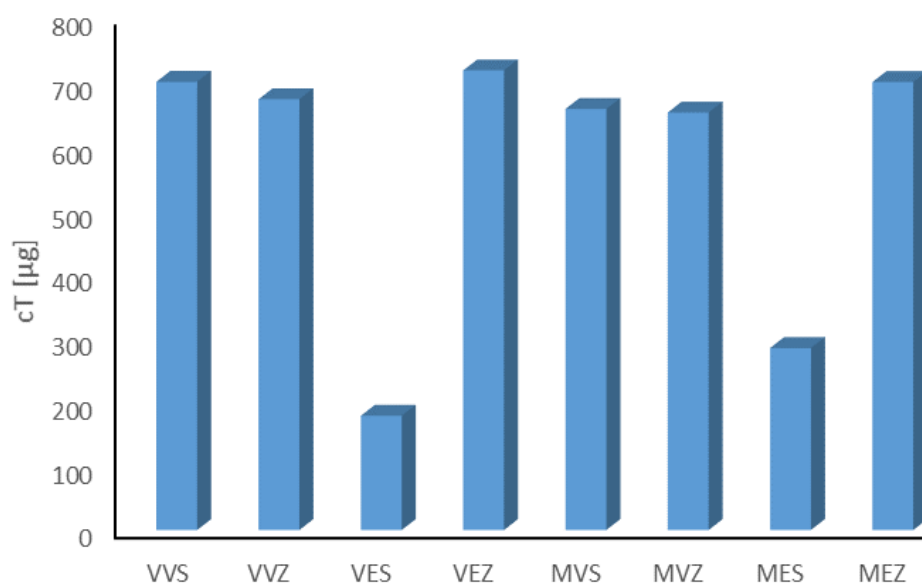
kde A_0 je absorbancia $ABTS^{\bullet+}$ v čase t_0 , A_{10} je absorbancia vzorky s roztokom $ABTS^{\bullet+}$ zmeraná 10 minút po pridaní vzorky. Každá vzorka bola premeraná trikrát a z priemernej hodnoty absorbancie bola vypočítaná celková antioxidačná aktivita vzorky pomocou regresnej rovnice kalibračnej krivky troloxu. Regresná rovnica troloxu bola stanovená na $A=0,0014 \cdot c$. Vypočítaná koncentrácia je vzťahnutá na μg troloxu v dm^3 vzorky.

Výsledky koncentrácie troloxu v tabuľke č. 8.

Z tabuľky č. 8 a obrázku č. 14 vyplýva, že najväčšiu celkovú antioxidačnú aktivitu vykazoval etanolový výluh čajovej zmesi Aronie & Šípek & Černý rybíz, vysoká koncentrácia antioxidačných látok bola stanovená aj vo vodných výluhoch zmesi a šípku a etanolovom maceráte zmesi. Nižšia koncentrácia antioxidačných látok bola stanovená v etanolovom výluhu a maceráte šípky.

Tabuľka č. 8: výsledná antioxidačná aktivita vzoriek

extrakt		A±SD	c _T (µg /dm ³) ± SD
macerát	voda-zmes	0,912±0,006	651,3±3,9
	voda-šípka	0,919±0,059	656,8±41,9
	etanol-zmes	0,979±0,02	698,9±14
	etanol-šípka	0,397±0,079	283,8±56,4
výluh	voda-zmes	0,941±0,056	672,1±39,7
	voda-šípka	0,979±0,022	699,2±15,9
	etanol-zmes	1,004±0,001	717,1±0,6
	etanol- šípka	0,249±0,044	178,1±31,5



Obrázok č. 14: celková antioxidačná aktivita v extraktoch

4.1.1 Stanovenie polyfenolov

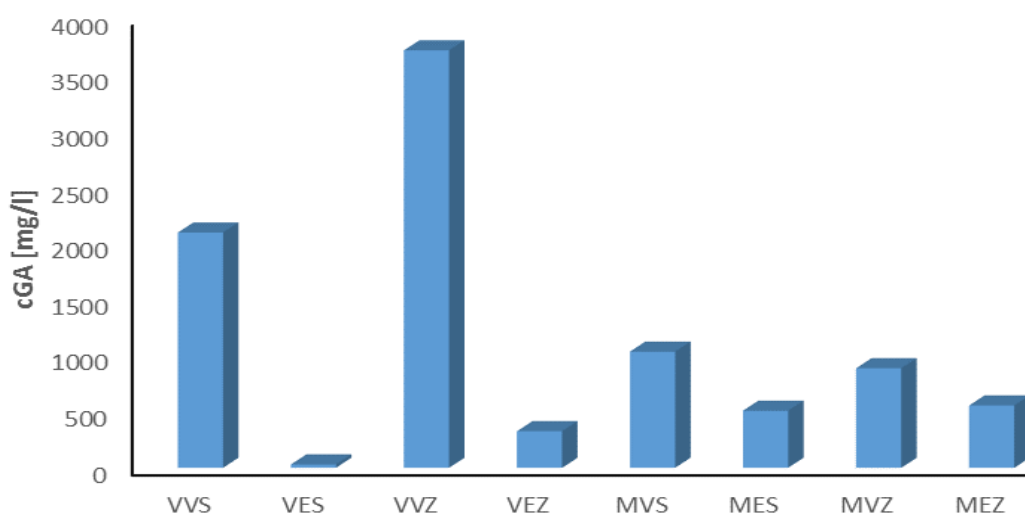
Celkový obsah polyfenoloch v čajových extraktoch bol stanovený spektrofotometricky pomocou Follin-Ciocaltauhovho činidla pri vlnovej dĺžke 750 nm. Táto metóda je založená na redukcii fenolických látok obsiahnutých v extraktoch za pozorovania farebných zmien. Každá vzorka bola premeraná trikrát a z priemernej hodnoty absorbancie sa za pomoci kalibračnej regresnej rovnice kyseliny gallovej vypočítaný celkový obsah polyfenolov. Všetky vodné výluhy boli zriedené desaťkrát. Regresná rovnica troloxu bola stanovená na:

$A=0,0016 \cdot c-0,0066$. Vypočítaná koncentrácia je vzťahnutá na mg kyseliny gallovej v dm³ vzorku.

Z tabuľky č. 9 a obrázku č. 15 vyplýva, že najväčšiu koncentráciu polyfenolických látok obsahoval vodný výluh čajovej zmesi. Asi o polovicu menšia koncentrácia bola stanovená vo vodnom výluhu šípky. Zvyšné extrakty mali len nízku koncentráciu polyfenolických látok. Najnižšia koncentrácia bola stanovená u etanolového výluhu šípky.

Tabuľka č. 9: koncentrácia celkových polyfenolov

extrakt		A ± SD	C _{GA} (mg/dm ⁻³) ± SD
macerát	etanol- šípka	0,806±0,021	507,7±12,9
	etanol-zmes	0,879±0,053	553,9±32,9
	voda-šípka	0,145±0,032	1033,3±202,5
	voda-zmes	0,141±0,053	885,4±328,8
výluh	etanol-šípka	0,041 ±0,003	29,8±1,7
	etanol-zmes	0,512 ±0,034	325,4±21,3
	voda-šípka	0,351 ±0,073	2091,6±456,3
	voda-zmes	0,591 ±0,006	3713,5±36,6



Obrázok č. 15: celková koncentrácia polyfenolov v extraktoch

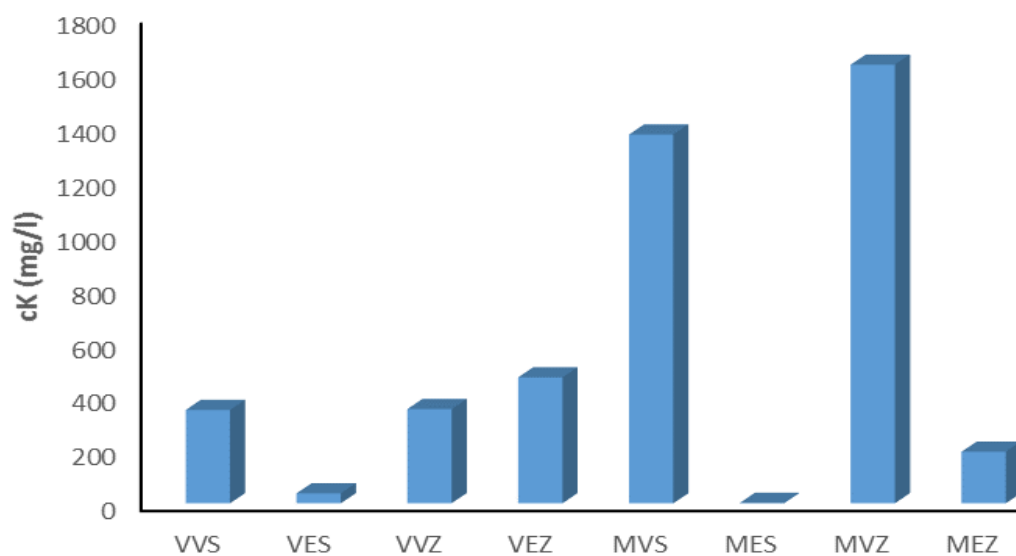
4.1.1 Stanovenie celkových flavonoidov

Obsah flavonoidov v čajových extraktoch bol stanovený spektrofotometricky pomocou reakcie hlinitej soli s dusitanom za vzniku farebných komplexov pri vlnovej dĺžke 510 nm. Každá vzorka bola premeraná trikrát a z priemernej hodnoty absorbancie sa za pomoci kalibračnej regresnej rovnice katechínu vypočítal obsah flavonoidov. Všetky vodné výluhy boli zriedené desaťkrát. Regresná rovnica katechínu bola stanovená na $A=0,0014 \cdot c-0,0026$. Vypočítaná koncentrácia je vzťahnutá na mg katechínu v dm³ vzorky.

Z tabuľky č. 10 a obrázku č. 16 vyplýva, že najväčšiu koncentráciu flavonoidov obsahoval vodný macerát čajovej zmesi. O niečo nižšiu koncentráciu obsahoval vodný macerát šípky. Zvyšné extrakty mali len nízku koncentráciu flavonoidov. Najnižšia koncentrácia bola stanovená v etanолоvom maceráte a etanолоvom výluhu šípky.

Tabuľka č. 10: stanovenie flavonoidov

extrakt		A± SD	C _k ± SD
macerát	voda-šípka	0,199±0,041	1326,2±295,8
	voda-zmes	0,241±0,011	1620±75
	etanol-šípka	0,081±0,005	1,45±3,5
	etanol-zmes	0,421±0,101	190,1±72
výluh	voda-šípka	0,057±0,006	344,3 ±39,3
	voda-zmes	0,054±0,011	347,7 ±76,4
	etanol-šípka	0,064±0,007	36,5 ±4,8
	etanol-zmes	0,849 ±0,057	464,8±40,4



Obrázok č. 16: celková koncentrácia flavonoidov v extraktoch

5. ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo stanoviť antimikrobiálne účinky čajových extraktov z Ruže šírovej oproti vybraným zástupcom gramnegatívnych a grampozitívnych baktérií *Bacillus cereus* a *Serratia marcescens*. Ďalším cieľom bolo stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity extraktov a konkrétne stanovenie koncentrácie látok s antioxidačnými účinkami. Analyzované boli extrakty z dvoch druhov čajov, extrahované dvomi spôsobmi a dvomi rôznymi rozpúšťadlami. Boli vytvorené čajové výluhy v prostredí destilovanej vody a etanolu a čajové maceráty v prostredí destilovanej vody a etanolu.

Celková antioxidačná aktivita extraktov bola stanovovaná pomocou zahasovania radikálu ABTS^{•+}. Z nameraných a vyhodnotených výsledkov vyplýva, že podobnú, vysokú antioxidačnú aktivitu majú všetky vodné extrakty oboch testovaných čajov. Nižšiu aktivitu vykazuje etanolový výluh šípky a etanolový macerát šípky. Najvyššiu koncentráciu polyfenolov vykazoval vodný výluh čajovej zmesi a vodný výluh šípky, naopak, takmer žiadna koncentrácia polyfenolov bola zistená v etanolových výluhoch šípky a zmesi. Najvyššia koncentrácia flavonoidov bola stanovená vo vodnom maceráte zmesi a o niečo menšia vo vodnom maceráte šípky. Z výsledkov vyplýva, že väčšiu antioxidačnú aktivitu vykazujú práve vodné výluhy a vodné maceráty. Etanolové extrakty vykazovali podstatne nižšiu koncentráciu polyfenolov a flavonoidov.

Antimikrobiálna aktivita bola stanovovaná difúznou jamkovou metódou. Z nameraných výsledkov vyplýva, že pripravené extrakty nemajú v stanovovaných koncentráciách žiadne účinky voči vybraným baktériám.

6. ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] GYAWALI, Rabin, Salam A. IBRAHIM, E. POGORZELSKI a A. NOWAK. Natural products as antimicrobial agents. *Food control*[online]. 2014(46), 412–429 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047. ISBN 10.1016/j.foodcont.2014.05.047. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351400320X>
- [2] MINDELL, Earl a Hester MUNDIS. *Nová vitaminová bible: nejnovější informace o vitamínech, minerálních látkách, antioxidantech, léčivých rostlinách, o doplňcích stravy, léčebných účincích potravin i lécích používaných v homeopatii*. Vyd. 2., (dopl., přeprac.). V Praze: Ikar, 2006. ISBN 80-249-0744-5.
- [3] Velíšek, J., *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: Nakladatelství OSSIS, 2002. 368S. ISBN 80-86659-02-X.
- [4] UHEROVÁ, Ružena. *Čo vieme o vitamínoch dnes*. Brno: Malé centrum, 2002. ISBN 80-968737-0-9
- [5] ORTEMBERG, Adriana. *Mládneme s antioxidanty*. Praha: Ivo Železný, 2003. Jak na to. ISBN 80-237-3742-2.
- [6] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 978-80-214-4788-2.
- [7] VELÍŠEK, Jan. *CHEMIE POTRAVIN 2*. 2. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1.
- [8] COWAN, M. M.: *Plant products as microbial agents*, Clin. Microbiol. Reviews, 1999, vol. 12, no. 4, s. 564 – 582
- [9] SENOV, Petr Leonidovič. *Farmaceutická chemie: (učebnice)*. 1. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1954.
- [10] TOMANDL, Josef. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. Černčice: Tiskárna KNOPP, 2014. ISBN 978-80-210-6973-2.
- [11] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2014. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2
- [12] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie. ISBN 978-80-7418-051-4. Dostupné také z: <http://kramerius.mzk.cz/search/handle/uuid:b366ae60-43da-11e4-aded-005056827e51>
- [13] *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1.
- [14] VOLÁK, J., J. STODOLA a F. SEVERA. *Velká kniha léčivých rostlin*. 1. Bratislava: Priroda. ISBN 064-029-87.

- [15] CZYZOWSKA, A., E. KLEWICKA, E. POGORZELSKI a A. NOWAK. Polyphenols, vitamin C and antioxidant activity in wines from *Rosa canina* L. and *Rosa rugosa* Thunb. *Food control* [online]. 2014(46), 412–429 [cit. 2016-04-26]. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.11.009. ISBN 10.1016/j.jfca.2014.11.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157514002099>
- [16] KOPEC, Karel. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Vyd. 1. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN 80-861-5364-9.
- [17] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-716-9704-4
- [18] DUŠEK, Jaroslav. *Praktická cvičení z farmakognosie*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2663-5.
- [19] KAPRÁLEK, František. *Fyziologie bakterií*. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986. ISBN 14-600-86.
- [20] BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Marta DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-741-1.
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-85605-71-6.
- [22] TVRDOŇ, Milan. *Školský atlas mikroorganizmov*. Bratislava: ALFA, 1979. ISBN 63-359-79.
- [23] *Antimikrobiální účinky přírodních látek* [online]. Pardubice [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/33854/SobkovaK_Antibakterialni%20ucinky_JM_2009.pdf?sequence=1
- [24] TAYLOR, Peter W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013, 42(3), 195-201. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2013.05.004. ISSN 09248579. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857913001829>
- [25] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
- [26] <http://www.gresik.cz/caje/ovocne-caje/ovocne-caje-porcovane/19-aronie-sipek-cerny-rybiz-porcovany/>
- [27] <http://www.babiccinobchod.cz/p/sipky-drcene-100-g/>
- [28] NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. Phenolics in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, vol. 41, issue 5, s. 1523-1542 [cit. 2015-04-27]. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708506003062>

7. ZOZNAM SKRATIEK

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

GA — kyselina gallová

K — katechín

T — trolox

G⁻ — gramnegatívna baktéria

G⁺ — grampozitívna baktéria

BC — *Bacillus cereus*

SM — *Serratia marcescens*

VVS — vodný výluh šípky

VVZ — vodný výluh zmesi

VES — etanolový výluh šípky

VEZ — etanolový výluh zmesi

MVS — vodný macerát šípky

MVZ — vodný macerát zmesi

MES — etanolový macerát šípky

MEZ — etanolový macerát zmesi