



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK FENYKLU

STUDY OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF FENNEL

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jana Mierna

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2018

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1217/2017
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Jana Mierna**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**
Akademický rok: 2017/18

Název diplomové práce:

Studium biologicky aktivních látek fenyklu

Zadání diplomové práce:

1. Prostudujte relevantní zdroje o bioaktivních látkách fenyklu a spektrofotometrické metody jejich stanovení.
2. Připravte sérii extraktů z fenyklu a analyzujte přítomné látky v nich pomocí UV–VIS spektrometrie.
3. Otestujte účinek těchto extraktů na antimikrobiální aktivitu.
4. Experimentální data vyhodnoťte.

Termín odevzdání diplomové práce: 7.5.2018

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

Bc. Jana Mierna
student(ka)

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně, dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práca sa zaoberá štúdiom biologicky aktívnych látok feniklu. Teoretická časť popisuje základné charakteristiky feniklu a jeho chemické zloženie, bližšie špecifikuje rastlinné biologicky aktívne látky a antioxidanty, taktiež popisuje extrakčné techniky získania týchto bioaktívnych látok, metódy ich stanovenia a overenia antimikrobiálneho účinku.

V experimentálnej časti bol spektrofotometricky stanovený obsah polyfenolov a flavonoidov v pripravených extraktoch čaju, celého a drveného korenia feniklu. Na základe extrakčných kriviek bola u vzoriek s najvyššími hodnotami daných bioaktívnych látok zistená antioxidačná aktivita a sledovaný bol ich antimikrobiálny účinok voči vybraným mikroorganizmom *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*. Spomedzi sledovaných extraktov vykazoval inhibičný účinok len vodný výluh čaju, a to voči bakteriálnemu kmeňu *Micrococcus luteus*.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Fenikel obyčajný, biologicky aktívne látky, antioxidačná aktivita, antimikrobiálna aktivita

ABSTRACT

The master's thesis is focused on the study of biologically active compounds of fennel. The theoretical part describes basic characteristics of fennel and its chemical composition, further specifies plant's biological active substances and antioxidants, also describes extraction techniques for obtaining these bioactive compounds, methods of their determination and verification of antimicrobial effect.

In the experimental part were spectrophotometrically determined contents of polyphenols and flavonoids in the prepared extracts of fennel tea, whole and crush spice. On the basis of extraction curves, antioxidant activity and potential antimicrobial activity against the selected microorganisms *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus* was determined in the samples with the highest values of the given bioactive substances. Among the all monitored extracts, the inhibitory effect was showed only by an aqueous extract of the fennel tea against the bacterial strain of *Micrococcus luteus*.

KEY WORDS

Foeniculum vulgare, biologically active compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity

MIERNA, J. *Studium biologicky aktivních látek fenyklu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 58 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som sa poďakovala vedúcej svojej diplomovej práce RNDr. Márii Veselej, Ph.D. za odbornú pomoc, cenné rady, čas a starostlivosť, ktoré mi venovala pri jej vypracovaní.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1 Fenikel obyčajný.....	9
2.1.1 Obecná charakteristika.....	9
2.1.2 Chemické zloženie.....	9
2.2 Rastlinné biologicky aktívne látky.....	10
2.2.1 Terpény a terpenoidy	11
2.2.2 Alkaloidy	12
2.2.3 Fenolické zlúčeniny	14
2.2.3.1 Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny	15
2.2.3.2 Flavonoidy.....	15
2.2.3.2 Fenolické polyméry.....	16
2.3 Antioxidanty	16
2.3.1 Voľné radikály a oxidačný stres	17
2.3.2 Prírodné antioxidanty	18
2.3.2.1 Vitamín C (kyselina L-askorbová).....	18
2.3.2.2 Vitamín E (α -tokoferol)	20
2.3.2.3 Karotenoidy.....	20
2.3.2.4 Kyselina močová.....	21
2.4 Extrakčné techniky.....	21
2.4.1 Konvenčné extrakčné metódy.....	22
2.4.1.1 Macerácia	22
2.4.1.2 Hydrodestilácia.....	22
2.4.1.3 Extrakcia podľa Soxhleta	23
2.4.2 Nekonvenčné extrakčné metódy.....	24
2.4.2.1 Superkritická fluidná extrakcia (SFE).....	24
2.4.2.2 Extrakcia podporovaná ultrazvukom (UAE).....	24
2.4.2.3 Extrakcia podporovaná mikrovlnným žiarením (MAE)	25
2.5 Biochemické stanovenie aktívnych látok.....	25
2.5.1 Stanovenie celkových polyfenolov	26
2.5.2 Stanovenie celkových flavonoidov	26
2.5.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity	26
2.6 Metódy pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity	27
2.6.1 Kvalitatívne metódy.....	27
2.6.2 Kvantitatívne metódy.....	27
2.6.3 Kombinované metódy.....	28

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	29
3.1 Laboratórne vybavenie.....	29
3.1.1 Chemikálie	29
3.1.2 Prístroje a pomôcky	29
3.2 Použitý software.....	29
3.3 Analyzované vzorky	29
3.4 Charakteristika použitých mikroorganizmov	30
3.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	30
3.4.2 <i>Bacillus cereus</i>	31
3.4.3 <i>Micrococcus luteus</i>	31
3.4.4 <i>Serratia marcescens</i>	31
3.5 Kultivačné média a ich príprava	31
3.6 Príprava extraktov feniklu.....	32
3.7 Stanovenie celkových polyfenolov	32
3.8 Stanovenie celkových flavonoidov	33
3.9 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity.....	34
3.10 Overenie antimikrobiálneho účinku extraktov feniklu	34
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	35
4.1 Stanovenie celkových polyfenolov	35
4.2 Stanovenie celkových flavonoidov	39
4.3 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity vybraných extraktov.....	44
4.4 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity vybraných extraktov	45
5 ZÁVER.....	48
6 POUŽITÁ LITERATÚRA.....	50
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	58

1 ÚVOD

Súčasný moderný spôsob života má okrem množstva pozitív i svoje negatívne stránky. Ich príkladom je nie len rozšírenie civilizačných chorôb ako obezita, cukrovka či rakovina, ale i zvýšenie rezistencie baktérií voči antibiotikám z dôvodu ich nadmerného používania. Početné skupiny vedcov sa preto intenzívne zaoberajú vývojom a testovaním nových liečiv, ktoré by mohli pomôcť v boji s týmito novodobými problémami. Pri hľadaní alternatívnych riešení čoraz viac nachádzajú inšpiráciu v prírode, ktorá je lacným zdrojom širokého spektra farmaceuticky významných látok. Tie je možné izolovať z niektorých mikroorganizmov, húb, živočích, ale najmä z rastlín, ktoré sa pre svoje liečebné schopnosti a vysoký obsah biologicky aktívnych zlúčenín využívajú v tradičnej i modernej medicíne.

Na prvý pohľad nenápadnou, no z kulinárskeho, ale i lekárskeho hľadiska zaujímavou bylinou je bez pochyb aj fenikel obyčajný. V hojnej miere ho v ľudovom liečiteľstve používali už starovekí Rimania a Gréci, a to nie len na vyvolenie menštruácie a podporu tvorby materského mlieka, ale i na liečbu očných zápalov a ako korenie potláčajúce chuť do jedla. Dnes sa vo forme čaju využíva predovšetkým pri poruchách tráviaceho traktu, žalúdočných kŕčoch a nadmernej plynatosti. Taktiež pôsobí diureticky, podporuje krvný obeh a vďaka vysokému obsahu vitamínu C posilňuje imunitný systém. Menej známe sú i jeho pozitívne účinky na dýchacie cesty a schopnosť inhibovať rast niektorých baktérií, kvasiniek i plesní.

Náplňou tejto práce je napísať literárnu rešerš zaoberajúcu sa charakteristikou bioaktívnych látok, metódami ich získania a stanovenia. Súčasťou práce je i sledovanie množstva daných bioaktívnych látok, polyfenolov a flavonoidov, v pripravených feniklových extraktoch v závislosti na čase extrakcie. U vzoriek s najvyššími hodnotami týchto látok bola následne stanovená antioxidačná aktivita a sledovaný bol ich potenciálny antimikrobiálny účinok na vybrané druhy mikroorganizmov *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Fenikel obyčajný

2.1.1 Obecná charakteristika

Fenikel obyčajný (*Obrázok 1*), lat. *Foeniculum vulgare*, patrí do čeľade mrkvovité (*Apiaceae*), podobne ako rasca, kôpor, koriander či aníz. Je to dvojročná, prípadne trváca bylina dorastajúca do výšky až 2 m. Stonka je vzpriamená, dutá a zvnútra žliabkovaná. Listy rastú do dĺžky 40 cm. Spodné lístky majú dlhé pošvovité stopky, horné sú prisadnuté a mnohonásobné delené na nitkové segmenty. Žlté kvety tvoria zložité, desať až dvanásťlúčové okolíky. Koruna je päťpočetná, nezrastená a má päť tyčiniek. Plodom je podlhovastá dvojnažka s desiatimi pozdĺžnymi rebrami.

Fenikel kvitne v lete, plody dozrievajú na jeseň. Divoko rastie v rôznych častiach južnej Európy a oblastiach Stredozemného mora. Jeho pestovanie je rozšírené najmä v Taliansku, Francúzsku, Indii, Japonsku či USA. Rastlina sa vyznačuje špecifickou, silnou arómou a sladkastou chuťou. Konzumovať možno všetky jeho časti – semená, listy, stonku aj cibuľu [1, 2].



Obrázok 1: Fenikel obyčajný [3]

2.1.2 Chemické zloženie

Využitie feniklu ako liečivej rastliny, pochutiny a korenia úzko súvisí s jeho chemickým zložením. To sa však v závislosti na geografickom pôvode rastliny, podmienkach pestovania, genetických aspektoch či použitej extrakčnej metóde môže líšiť [4].

Z nutričného hľadiska fenikel obsahuje 36,6 % sacharidov, 15,8 % proteínov, 15,7 % vlákniny, 14,9 % tukov, 8,8 % vody a 8,2 % popola. Najviac zastúpenými minerálnymi látkami sú vápnik, draslík, sodík, horčík, fosfor a železo. Z vitamínov obsahuje predovšetkým vitamín A, tiamín, riboflavín, niacín a kyselinu askorbovú [2].

Semená feniklu, ktoré sú vďaka svojej výraznej aróme a chuti jeho najviac využívanou časťou, obsahujú 1 až 4 % esenciálneho oleja a 20 % mastných kyselín. Až 80 % všetkých mastných kyselín predstavuje kyselina petroselinová, ktorá je jediným známym prirodzenou sa vyskytujúcim izomérom kyseliny olejovej v rastlinách. Pre svoju značnú antimikrobiálnu aktivitu sa používa v kozmetických produktoch, ale i v potravinárstve ako aditívum zlepšujúce textúru potravín. Identifikované, i keď v nižších koncentráciách, boli aj kyseliny palmitová, steárová, olejová a linolová [5, 6].

Esenciálny olej možno extrahovať z každej časti rastliny, no v najväčšom množstve je prítomný predovšetkým v semenách. Práve olej je zodpovedný za charakteristickú sladkastú vôňu fenikla, preto sa často používa pri výrobe mydiel, šampónov, detergentov, v parfumérii či ako potravinárska aróma [6]. Jeho hlavnými zložkami sú *trans*-anetol, fenchón, estragol a limonén [2].

Viaceré štúdie naznačujú, že esenciálny olej a jeho jednotlivé zložky vykazujú značnú farmakologickú aktivitu. Anetol pôsobí ako estrogénne činidlo. Podporuje tvorbu materského mlieka, reguluje menštruáciu, uľahčuje pôrod, zmierňuje príznaky menopauzy a zvyšuje libido [7]. Okrem antimikrobiálnej aktivity disponuje i antitrombotickým účinkom. Podieľa sa na destabilizácii krvných zrazenín a protidoštičkovej aktivite organizmu [8]. Ako akaricídy účinné proti prachovým roztočom *Dermatophagoides farinae* a *Dermatophagoides pteronyssinus* boli identifikované zlúčeniny fenchón a *p*-anizaldehyd [9].

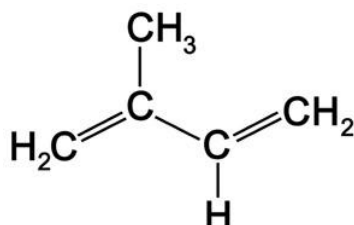
Estragol, jedna z najviac zastúpených zložiek feniklu, sa stal dôvodom pre obavy kvôli svojej potenciálnej genotoxicite a karcinogénnemu účinku. Podobne ako ďalšie analógy alkylbenzénov je i estragol v pečeni metabolizovaný rôznymi dráhami vrátane O-demetylácie, epoxidácie dvojitej väzby, 1'-hydroxylácie a oxidačnej degradácie postranného reťazca na karboxylovú skupinu. Práve oxidačné reakcie allylového reťazca vedú k vzniku potenciálnych genotoxických metabolitov, 1'-hydroxyestragolu a estragol-2',3'-oxidu. Indukovať môžu produkciu aduktov DNA a nádorov pečene. Pretože človek zväčša prijíma estragol ako zložku jedla alebo feniklového čaju, efekt čistého estragolu môže byť neutralizovaný prítomným komplexom bioaktívnych látok s antikarcinogénnym či antioxidačným účinkom. Protektívne pôsobí nie len *trans*-anetol, ale i flavonoidy, polyfenoly a ďalšie bioaktívne látky feniklu [10].

2.2 Rastlinné biologicky aktívne látky

Rastliny produkujú širokú škálu organických látok, ktorých funkcia priamo nesúvisí s ich rastom, vývojom alebo rozmnožovaním [11]. Tieto zlúčeniny, známe ako sekundárne metabolity, sú zvyčajne odvodené od základných metabolických dráh ako glykolýza, Krebsov cyklus či od šikimátovej dráhy syntézy aromatických látok. Produkované sú často len u jedného rastlinného druhu alebo v taxonomicky príbuzných skupinách [12]. Na rozdiel od primárnych metabolitov (cukrov, tukov, proteínov, nukleových kyselín), ich absencia v organizme nespôsobuje okamžitý úhyn rastliny [11]. Hlavnou funkciou sekundárnych metabolitov je ochrana rastliny voči baktériám, plesniam, vírusom, hmyzu a iným rastlinám, ktoré im konkurujú v nárokoch na svetlo, živiny či vodu. Mnohé slúžia ako atraktanty a signálne molekuly [12]. Pre človeka majú význam predovšetkým ich farmakologické, prípadné toxikologické účinky [13]. Najdôležitejšie skupiny týchto biologicky aktívnych látok sú zhrnuté v nasledujúcich kapitolách.

2.2.1 Terpény a terpenoidy

Terpény a terpenoidy sú jednou z najviac zastúpených skupín rastlinných bioaktívnych látok [14]. Termínom „terpén“ bola pôvodne pomenovaná zmes izomérnych uhlíkovodíkov identifikovaná v terpentíne. Dnes sa týmto názvom označujú všetky uhlíkovodíky, ktorých základnou štruktúrnou jednotkou je päťuhlíkatý izoprén (Obrázok 2). Terpenoidy, ako významné deriváty terpenov, obsahujú navyše vo svojej molekule atóm kyslíka.



Obrázok 2: Chemická štruktúra izoprénu (2-metylbuta-1,3-dién) [15]

Terpény sú hojne obsiahnuté v kvetoch, listoch i plodoch vyšších rastlín, v ihličnanoch, citrusoch a eukalypte [15]. Prekurzorom ich biosyntézy je acetyl-CoA alebo intermediáty glykolýzy [14]. Väčšinou sa jedná o vo vode nerozpustné bezfarebné kvapaliny. Len malé množstvo z nich sú tuhé látky (napr. gáfor). Môžu byť cyklické i acyklické, s jednou alebo viacerými dvojitými väzbami. V dôsledku toho podliehajú adičným reakciám s vodíkom, halogénmi či kyselinami. Množstvo ich adičných produktov sa vyznačuje antiseptickými vlastnosťami. Terpény sa môžu účastniť i polymerizácií a dehydrogenácií. Ľahko oxidujú v prítomnosti takmer všetkých oxidačných činidiel [15].

Rozdelenie terpenov podľa počtu izoprénových jednotiek udáva *Tabuľka 1*.

Tabuľka 1: Delenie terpenov na základe počtu izoprénových jednotiek [14, 16]

	Počet izoprénových jednotiek	Počet uhlíkov	Príklady látok
Hemiterpény	1	5	Izoprén a jeho deriváty
Monoterpény	2	10	Limonén, myrcén, pinén, pyretroidy
Seskviterpény	3	15	Humulén, kyselina abscisová
Diterpény	4	20	Fytol, giberelíny, kyselina abietová
Triterpény	6	30	Skvalén, steroly
Tetraterpény	8	50	Karotenoidy
Polyterpény	viac ako 8	viac ako 50	Kaučuk, gutaperča

V rastlinách terpény zastávajú predovšetkým ochrannú funkciu. Mnohé rastliny sa bránia proti škodcom a byľinožravcom produkciou odpudzujúcich alebo nepoživatelných látok.

V listoch a kvetoch chryzantém sú to estery monoterpénov, pyretroidy, ktoré sa vďaka silným insekticídnym účinkom, nízkej perzistencii v prostredí a hlavne nízkej toxicite voči cicavcom používajú ako zložka komerčných insekticídov [16]. V živicových kanáloch ihličnanov sa zas nachádzajú monoterpenické látky α -pinén, β -pinén, limonén a myrcén, ktoré sú toxické pre početné druhy hmyzu. Živicu zvyčajne vylučujú niektoré rastliny pri poranení ako obranný mechanizmus voči bakteriálnej alebo hubovej infekcii. Zaceľuje rany a pôsobí proti vyschnutiu. Obdobnú úlohu plní i prírodný kaučuk pri poškodení stromu kaučukovníka [17].

Zmesi prchavých monoterpénov a sekviterpénov sú súčasťou silíc, inak nazývaných aj esenciálne oleje. V rastlinách sú syntetizované v glandulárnych trichómoch na povrchu listov. Poskytujú im charakteristickú vôňu, odpudzujú určité druhy hmyzu a bylinožravcov. Príkladmi takýchto látok je limonén v citrusových olejoch alebo mentol v mäte piepornej [18].

Medzi významné terpény patria aj fytohormóny, a to gibberelíny a kyselina abscisová. Gibberelíny sú diterpény podporujúce rast nadzemných častí rastlín a stimulujúce klíčenie semien [14]. Kyselina abscisová je typický stresový hormón. Za nepriaznivých podmienok prostredia sa koncentrácia tohto seskviterpénu rýchlo zvyšuje, čím sa aktivujú špecifické signalizačné dráhy vedúce k modifikácii génovej expzie. Počas obdobia sucha zabraňuje úniku vody z listov uzatváraním prieduchov, spomaľuje rast rastlín, navodzuje dormanciu a reguluje syntézu zásobných proteínov [19].

Dôležité komponenty rastlinných membrán sú steroidne alkoholy, steroly. Prekurzorom ich syntézy je acyklický triterpén skvalén. Viac ako 70 % celkových sterolov vyšších rastlín tvoria stigmasterol a sitosterol. Znížením pohybu reťazcov mastných kyselín pomáhajú regulovať permeabilitu membrán a zvyšujú ich viskozitu [18]. Diterpén fytol, vysoko hydrofóbny alkohol nachádzajúci sa v chlorofyle, ako postranný reťazec ukotvuje v membráne niektoré molekuly a zvyšuje tak účinnosť procesu fotosyntézy [14].

Významnú úlohu v rastlinnom organizme zohrávajú i karotenoidy, patriace medzi tetraterpény. Vyskytujú sa v chloroplastoch alebo v špecializovaných, fotosynteticky neaktívnych plastidoch nazývaných chromoplasty. Svojou nápaditou farbou lákajú opel'ovačov a fungujú aj ako prídavné pigmenty fotosyntézy. Vyznačujú sa antioxidačnými vlastnosťami, vďaka čomu chránia fotosyntetický aparát pred fotooxidáciou [18].

2.2.2 Alkaloidy

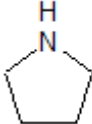
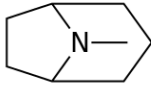
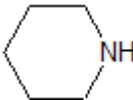
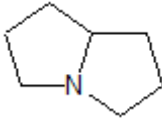
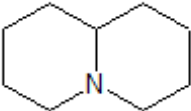
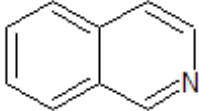
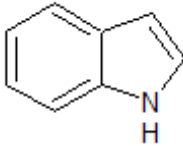
Alkaloidy sú dusíkaté organické zlúčeniny bázičného charakteru. Pretože atómy dusíka majú pravidla viazané v kruhu, možno ich považovať za deriváty heterocyklických zlúčenín [20]. V súčasnej dobe je známych viac ako 15 000 alkaloidov vyskytujúcich sa predovšetkým v semenách a koreňoch u približne 20 % rastlinných druhov [16].

Z fyzikálneho hľadiska sa jedná o zväčša bezfarebné, kryštalické pevné látky, málo rozpustné vo vode, ale dobre rozpustné v kyselinách alebo organických rozpúšťadlách ako chloroform, éter či etanol. V rastlinách sa väčšinou nachádzajú vo forme solí prítomných organických, prípadne anorganických kyselín.

Funkcia alkaloidov v rastlinnom organizme je stále predmetom rôznych štúdií. Kedysi boli alkaloidy považované za odpadové látky metabolizmu. Dnes sa kvôli ich všeobecnej toxicite a odpudzujúcim vlastnostiam predpokladá, že slúžia najmä ako ochrana rastlín proti bylinožravcom [20]. Spôsob ich účinku na bunecnej úrovni je pomerne variabilný. Mnoho

alkaloídnych zlúčenín interferuje so zložkami nervového systému, hlavne s neurotransmitermi. Ostatné ovplyvňujú membránový transport, proteosyntézu alebo enzýmovú aktivitu. Vo vysokých koncentráciách pôsobia alkaloidy toxicky, v nízkych dávkach môžu mať terapeutické účinky. Syntetizované sú v malých množstvách ako produkty metabolizmu niektorých bežných aminokyselín [16]. Zoznam hlavných skupín alkaloidov a ich aminokyselinových prekursorov zobrazuje *Tabuľka 2*.

Tabuľka 2: Hlavné skupiny alkaloidov a prekursorzy ich biosyntézy [16]

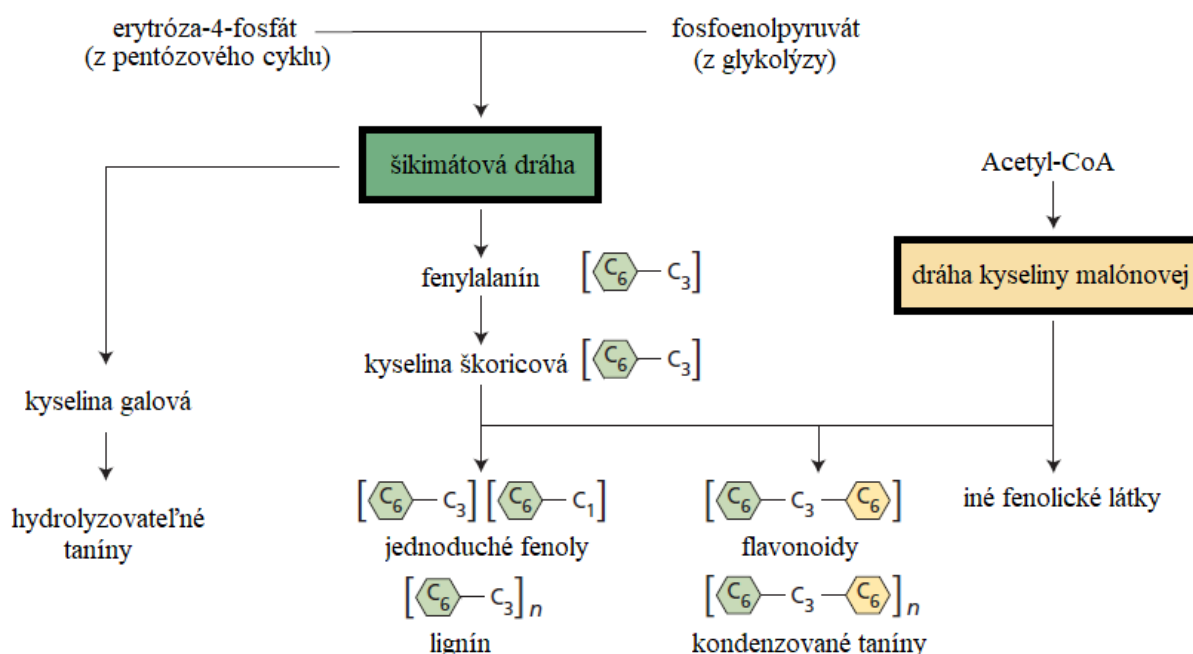
Štruktúrny typ	Chemická štruktúra	Prekursor biosyntézy	Príklad alkaloidu
Pyrolidín		Ornitín	Nikotín
Tropán		Ornitín	Atropín, kokaín
Piperidín		Lyzín	Koniín
Pyrolizidín		Ornitín	Retronecín
Chinolizidín		Lyzín	Lupinín
Izochinolín		Tyrozín	Kodeín, morfín
Indol		Tryptofán	Strychnín, rezerpín

Jednotlivé skupiny sa vyznačujú rôznymi farmakologickými vlastnosťami. Napríklad tropánové alkaloidy (atropín, hyoscyamín, kokaín), produkované prevažne v rastlinách čeľade ľuľkovitých, sú účinné anticholínergiká. Narušujú nervový prenos a v medicíne sa často využívajú aj na uvoľňovanie kŕčov hladkého svalstva. Pyrolizidínové alkaloidy majú na organizmus najmä nepriaznivé účinky. Po bioaktivácii u ľudí i zvierat poškodzujú pečeň. Zastúpené sú značne v rastlinách čeľade astrovitých a borákovitých. Izochinolínové alkaloidy sú predovšetkým toxické látky makovitých rastlín. Zo šťavy nezrelých makovíc je možné izolovať viaceré ópiové alkaloidy, ale z medicínskeho hľadiska sú najdôležitejšie morfín,

kodeín, noskapín a papaverín. Morfín, ako látka tlmiača bolesti, sa v lekárstve používa už desaťročia. Jeho značnou nevýhodou je však návykovosť a možnosť ľahkej transformácie na heroín. Kodeín a noskapín sa primárne využívajú do prípravkov proti kašľu, papaverín ako spazmolitikum a k liečbe dysfunkcie erekcie [13, 18]. V listoch tabaku je prítomný purínový alkaloid nikotín. Syntetizovaný je z aminokyseliny ornitínu a kyseliny nikotínovej. V malých dávkach pôsobí stimulačne a povzbudzuje činnosť centrálnej nervovej sústavy. Vo vyšších množstvách okrem iného zvyšuje krvný tlak, zužuje cievy a negatívne pôsobí na žalúdočnú sliznicu [16]. Medzi bežnou verejnosťou najznámejšie a najviac prijímané alkaloidy patria metylxantíny, a to kofeín, teofylín a teobromín. Nachádzajú sa v káve, čaji, respektíve v kakaových bôboch. Krátkodobo povzbudzujú nervovú sústavu a srdečnú činnosť [13].

2.2.3 Fenolické zlúčeniny

Rastlinné fenolické zlúčeniny sú chemicky heterogénnou skupinou bioaktívnych látok, ktorých štruktúra je odvodená od najjednoduchšieho aromatického alkoholu, fenolu [16]. Na benzénovom jadre majú teda priamo naviazanú jednu alebo viac hydroxylových skupín [21]. Syntetizované sú buď zo sacharidických prekursorov cez šikimátovú dráhu alebo prostredníctvom dráhy kyseliny malónovej (viz. Obrázok 3), ktorá je významná najmä pre baktérie a huby, menej u rastlín [16].



Obrázok 3: Schematické znázornenie biosyntézy fenolických látok [16]

Väčšina fenolických látok je prítomná vo forme esterov alebo glykozidov, len zriedka sa vyskytujú ako voľné zlúčeniny. Ich úloha v rastlinnom organizme je značne rozmanitá [21]. Niektoré slúžia ako ochrana voči herbivorom a patogénom, iné zastávajú mechanickú funkciu [18]. Ako pigmenty a vône lákajú opel'ovačov, absorbujú škodlivé ultrafialové žiarenie či potláčajú rast okolitých konkurenčných rastlín [16]. Pre človeka majú význam ich protizápalové, antikarcinogénne, antimikrobiálne a antioxidantné účinky. Pomáhajú tak zamedziť rozvoju kardiovaskulárnych a neurodegeneratívnych ochorení, cukrovke či rakovine [22].

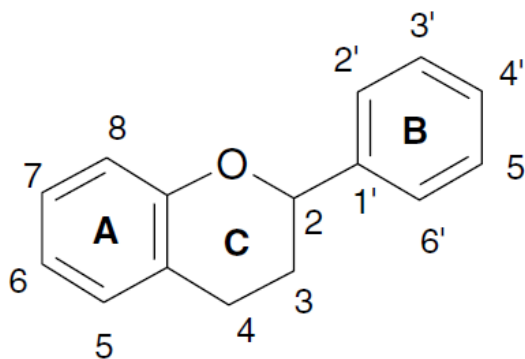
2.2.3.1 Jednoduché fenoly a fenolové kyseliny

Prikladom jednoduchých fenolov je katechol a floroglucinol. V rastlinných tkanivách sa zvyknú vyskytovať ako štruktúrna zložka rôznych polyfenolov. Floroglucinol bol objavený vo forme glukozidu v kôre citrusových plodov, katechol napríklad v listoch rastlín rodu Gaultéria [21].

Fenolové kyseliny možno rozdeliť do dvoch podskupín, a to na hydroxybenzoové a hydroxyškoricové kyseliny. Zástupcami najbežnejších hydroxybenzoových kyselín sú kyselina galová, *p*-hydroxybenzoová, vanillová, protokatechová a syringová. Medzi aromatické zlúčeniny s trojuhľikátym postranným reťazcom, hydroxyškoricové kyseliny, patria kyseliny kávová, ferulová, *p*-kumarová a sinapová. Vykazujú antioxidačný účinok, pôsobia ako chalatačné činidlá a zhášace voľných radikálov [23].

2.2.3.2 Flavonoidy

Medzi látky produkované prevažnou väčšinou zelených rastlín, ktoré priaznivo pôsobia nie len na samotný rastlinný organizmus, ale i na ten ľudský, patria flavonoidy [18]. S viac ako 8 000 rozličnými, doteraz známymi zástupcami, sú jednou z najväčších skupín prírodných sekundárnych produktov. Prítomné sú vo väčšine rastlinných pletív, a to najmä vo vakuole [21]. Tieto nízkomolekulárne zlúčeniny pozostávajú z dvoch aromatických kruhov A a B, spojených trojuhľikovými mostíkmi [23]. Jedná sa o deriváty fenypropánu, ktorých štruktúra je odvodená od skeletu heterocyklického flavanu (Obrázok 4) [18]. Možno ich rozdeliť do šiestich základných kategórií, a to na flavony, flavonoly, flavanony, flavanoly isoflavony a antokyanidíny [23].



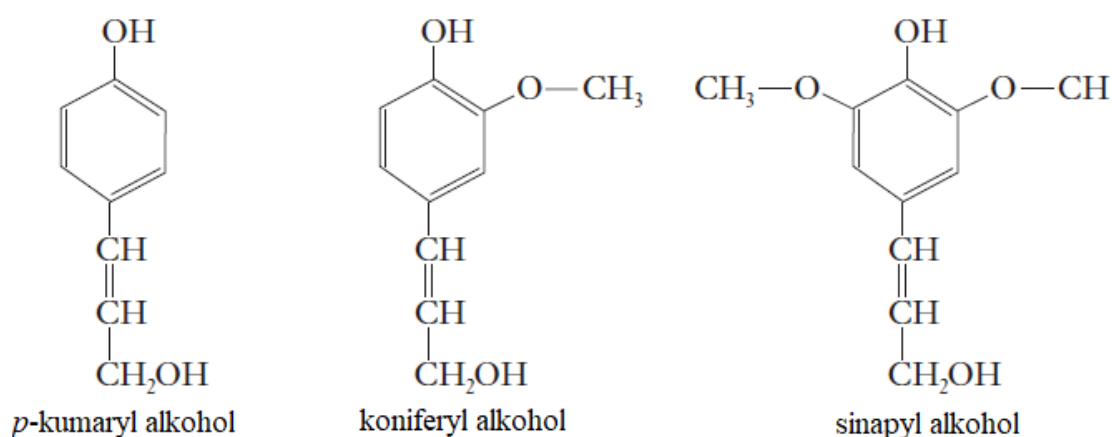
Obrázok 4: Chemická štruktúra flavanu [23]

Biologické účinky flavonoidov úzko súvisia s ich štruktúrou. Antokyanidíny sú vo vode rozpustné červené, modré alebo purpurové pigmenty kvetov, ovocia a zeleniny [24]. Ich farba silno závisí od pH prostredia [18]. Najbohatším zdrojom týchto látok sú plody čučoriedok, černíc, malín či jahôd. Podobne ako ďalšie flavonoidy, vykazujú i antokyanidíny antioxidačné, antiproliferačné, apoptické či protizápalové vlastnosti [24]. V rastline však plnia predovšetkým úlohu atraktantov opel'ovačov [16]. Prakticky všetky flavonoidy silno absorbujú UV žiarenie a poskytujú tak ochranu rastlinným pletivám pred poškodením [18]. Významné zlúčeniny sú aj isoflavony. Pretože ich štruktúra je podobná estrogénom, majú v rôznych tkanivách estrogénny, ale v niektorých prípadoch i antiestrogénny efekt. Telo môžu chrániť pred ochoreniami súvisiacimi s hormonálnou sústavou, ako rakovinou prs, maternice

či prostaty [25]. V rastlinách sa rýchlo syntetizujú pri napadnutí patogénmi a pôsobia ako obranné látky fytoalexíny [18].

2.2.3.2 Fenolické polyméry

V bunecnej stene drevín a bylín sa vyskytuje fenolový polymér lignín. Po celulóze je druhou najviac zastúpenou štruktúrnou rastlinnou zložkou [21]. Vo vode a väčšine organických rozpúšťadiel je nerozpustný. Pretože ho nie je možné extrahovať bez značnej degradácie, jeho štruktúra nie je úplne známa. Zistilo sa však, že pozostáva z komplexného systému vzájomne prepojených väzieb medzi jednoduchými fenolovými alkoholmi, a to koniferyl, *p*-kumaryl a sinapyl alkoholom (Obrázok 5). Táto zložitá štruktúra dodáva bunecnej stene tvrdosť a pevnosť, čím zvyšuje jej odolnosť voči namáhaniu [18].



Obrázok 5: Chemická štruktúra jednoduchých fenolových alkoholov lignínu [18]

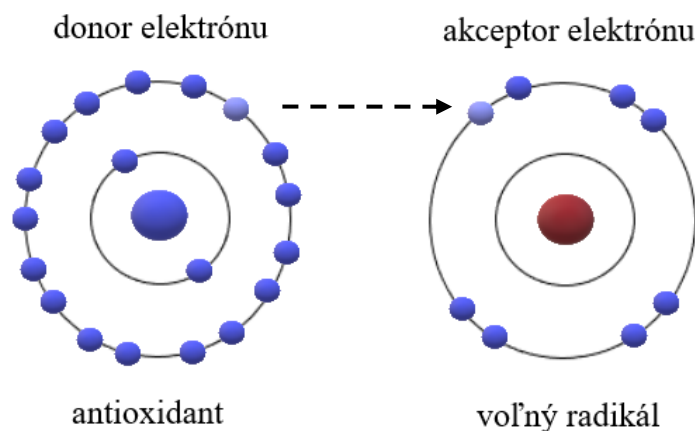
Taníny sú polymérne zlúčeniny s relatívne vysokou molekulovou hmotnosťou. Vyznačujú sa trpkou chuťou a schopnosťou zrážať bielkoviny aj alkaloidy. Vytváraním komplexov s proteínmi v potravinách znižujú ich stráviteľnosť v čreve. Takisto obmedzujú absorpciu niektorých minerálov, napríklad železa a medi [23]. V rastlinách plnia predovšetkým ochrannú úlohu. Vďaka ich nepríjemnej chuti odrádzajú zvieratá od konzumácie častí rastlín s ich obsahom [16]. Taníny sú taktiež významné chuťové látky niektorých druhov ovocia, kávy, čaju a červeného vína [18].

Vo vyšších rastlinách sa nachádzajú dve základné skupiny tanínov. Hydrolyzovateľné taníny sa pôsobením kyselín, zásad a niektorých hydrolytických enzýmov rozkladajú na cukry (zvyčajne D-glukózu) a kyselinu galovú, prípadne elagovú [21]. Kondenzované taníny vznikajú polymerizáciou flavonoídnych jednotiek. Hydrolýze nepodliehajú, ale môžu byť pôsobením silných kyselín oxidované na antokyanidíny [18].

2.3 Antioxidanty

Antioxidanty možno definovať ako zlúčeniny, ktorých prítomnosť už vo výrazne nízkych koncentráciách v porovnaní s látkou, ktorú by mali chrániť, môže zabráňovať alebo spomaľovať oxidačnú deštrukciu týchto látok. Bezpečne vstupujú do interakcií s voľnými

radikálmi a ukončujú ich reťazovú reakciu skôr, než dôjde k poškodeniu dôležitých molekúl (viz. Obrázok 6) [26].



Obrázok 6: Princíp udržiavania oxidačnej rovnováhy prostredníctvom antioxidantov [27]

2.3.1 Voľné radikály a oxidačný stres

Voľné radikály sú nestabilné, veľmi reaktívne častice schopné samostatnej existencie, ktoré majú vo svojom elektrónovom obale jeden alebo viac nespárených elektrónov [26]. Ich vysoká reaktivita vyplýva zo snahy nepárového elektrónu spojiť sa s ďalším elektrónom a vytvoriť tak stabilnú chemickú väzbu. Tým však oxidujú iné častice, čím podmieňujú iniciáciu reťazovej reakcie, ktorá môže viesť až k poškodeniu niektorých biologicky významných molekúl [28].

Tvorba voľných radikálov, ako vedľajších produktov metabolizmu, prebieha v ľudskom organizme neustále, a to predovšetkým v mitochondriách, peroxizómoch či prostredníctvom enzýmov (napr. xantínoxidáza) [29]. Ich fyziologicky pozitívny účinok pozostáva z účasti na bunecnej regulácii, podpore niektorých enzymatických a imunitných reakcií bunky či procesov spojených s premenou energie. V nadbytku však voľné radikály predstavujú značné riziko, pretože vďaka svojej reaktívnej povahe môžu poškodzovať niektoré bunecné štruktúry vrátane DNA [30].

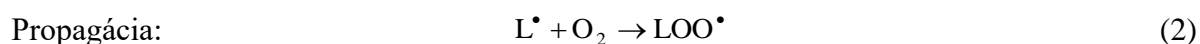
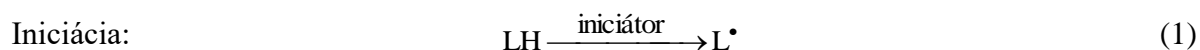
Okrem endogénnych radikálov, vznikajúcich vo vnútri organizmu, existujú ešte radikály exogénne, ktoré sa do tela dostávajú z vonkajšieho prostredia. Ich hlavnými zdrojmi sú znečistené ovzdušie, niektoré chemikálie a pesticídy, ionizačné alebo UV žiarenie, cigaretový dym, ozón a iné [29].

Medzi voľné radikály patria reaktívne formy kyslíka (ROS), dusíka (RNS) a niektorých organických zlúčenín. Okrem superoxidu, peroxidu vodíka a oxidu dusnatého sa aj ďalšie reaktívne častice primárne tvoria v bunke ako vedľajšie produkty alebo cielene prostredníctvom enzýmov [31]. Výsledkom nerovnováhy medzi koncentráciou týchto vysoko reaktívnych častíc a antioxidačnou kapacitou bunky je oxidačný stres. Štúdie ukazujú, že oxidačný stres zohráva kľúčovú rolu v patofyziológii niektorých kardiovaskulárnych a neurodegeneratívnych ochorení. Podieľa sa na vzniku aterosklerózy, Alzheimerovej a Parkinsonovej choroby, na bunecnom starnutí, rozvoji diabetes mellitus či rakoviny. Oxidačný stres sa s vekom zvyšuje, k čomu prispieva aj nesprávny životný štýl [30].

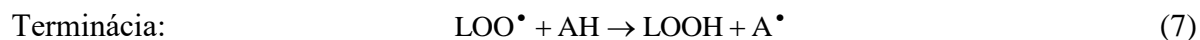
2.3.2 Prirodzené antioxidanty

Ludský organizmus je schopný sám produkovať, ale i prijímať v potrave látky vykazujúce antioxidačný účinok, ktoré pomáhajú redukovať a tak regulovať množstvo prítomných voľných radikálov. Nastoleniu oxidačného stresu predchádzajú znižovaním koncentrácie kyslíka, zachytávaním singletového kyslíka, väzbou katalyzátora iónov kovov, narušením reťazovej reakcie neutralizáciou iniciačného radikálu alebo rozkladom primárnych produktov na neradikálové zlúčeniny (NRP).

Antioxidanty účinne inhibujú oxidáciu biomolekúl, ktorá obvykle prebieha mechanizmom autooxidácie. Uskutočňuje sa v troch po sebe nasledujúcich krokoch pozostávajúcich z iniciačnej, propagačnej a terminačnej reakcie.



Počas iniciácie dochádza k produkcii voľných radikálov, ktoré napríklad pri oxidácii tukov reagujú v propagačnom kroku s nenasýtenými masnými kyselinami odobratím atómu vodíka z ich molekuly. Táto reťazová radikálová reakcia pokračuje až do terminačného kroku, ktorý môže byť podmienený i prítomnosťou antioxidantu. Poskytnutím atómu vodíka alebo elektrónu antioxidanty neutralizujú a stabilizujú peroxylové radikály, čím ukončujú oxidačný proces [32].

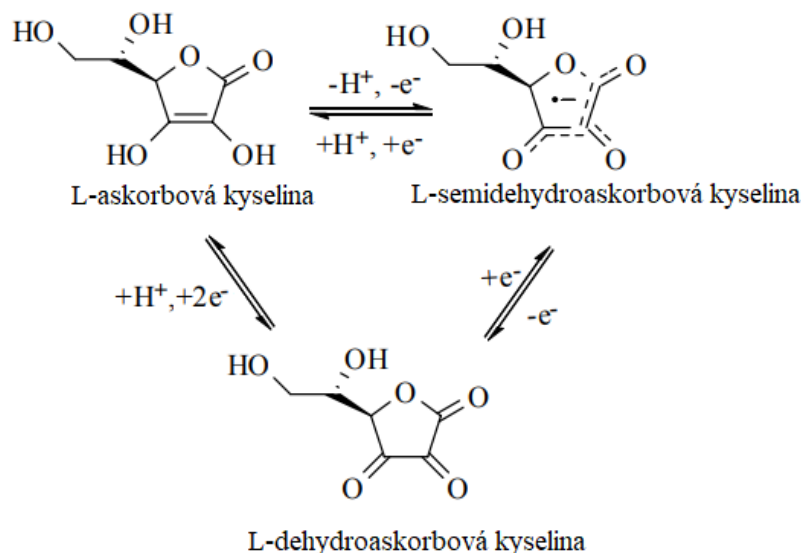


Prirodzené antioxidačné systémy možno rozdeliť na enzymatické a neenzymatické. Príkladom enzymatických antioxidantov v bunkách je superoxid dizmutáza, glutation peroxidáza alebo kataláza. Neenzymatické antioxidanty, ktorými sú prevažne malé neproteínové molekuly, sa do tela dostávajú najmä z exogénnych zdrojov rastlinného a živočíšneho pôvodu. Patria sem vitamín C, vitamín E, β -karotén, koenzým Q10, kyselina močová a iné [26].

2.3.2.1 Vitamín C (kyselina L-askorbová)

Kyselina askorbová (γ -laktón 2-oxo-L-gulónovej kyseliny) je vo vode rozpustný vitamín odvodený od glukózy. Tvorí biochemický reverzibilný redoxný systém (Obrázok 7), ktorý navyše zahŕňa produkt jej jedoelektrónovej oxidácie L-semidehydroaskorbovú kyselinu a produkt dvojelektrónovej oxidácie L-dehydroaskorbovú kyselinu. Dehydroaskorbová kyselina si zachováva redukčné vlastnosti, predovšetkým v alkalickom prostredí. Ďalej môže podliehať oxidácii molekulárnym kyslíkom, peroxidom vodíka alebo manganistanom draselným za tvorby rôznych produktov, ktoré však už viac nie sú fyziologicky aktívne, ako

napríklad kyselina threonová alebo šťavel'ová. Vitamín C je látka pomerne nestála. Rýchlo sa rozkladá a stráca svoju účinnosť predovšetkým vplyvom alkalického prostredia, zvýšenej teploty, pôsobením slnečného žiarenia a vzdušného kyslíka [33, 34].



Obrázok 7: Redoxný systém kyseliny L-askorbovej [34]

Fyziologické účinky vitamínu C úzko súvisia s jeho redukčnými schopnosťami a vysokou antioxidačnou aktivitou. Askorbát ničí voľné radikály, čím predchádza rozvoju rakoviny a predčasnému starnutiu. Spevňuje cievy, znižuje koncentráciu cholesterolu v krvi a zamedzuje vzniku aterosklerózy, hypertenzie či mŕtvice. Regeneruje vitamín E, napomáha správne fungovaniu imunitného systému a vstrebávaniu železa z potravy, taktiež prispieva k rýchlejšiemu hojeniu rán. Podporovaním tvorby kolagénu, rastu chrupavky a kostí zamedzuje niektorým ochoreniam spojivových tkanív [35].

Pre väčšinu cicavcov nie je kyselina askorbová vitamínom, pretože si ju dokážu v organizme sami syntetizovať. Výnimku tvoria primáty, morčatá a niektoré druhy netopierov, ktoré postrádajú enzým gulonolaktón oxidázu [33]. Pre človeka je hlavným zdrojom vitamínu C predovšetkým bobuľové ovocie, citrusové plody, čerstvá zelenina (paprika, kapusta), strukoviny, niektoré byliny a koreniny [27]. Doporučená denná dávka vitamínu C je 80 mg [36].

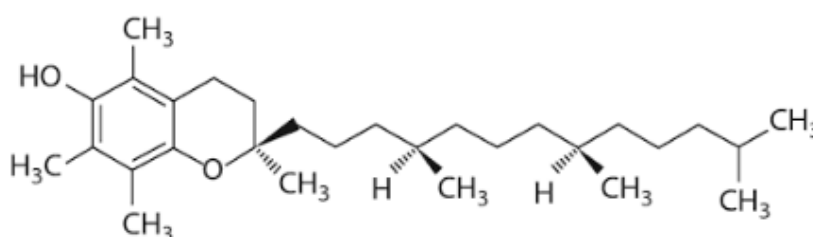
Deficit kyseliny askorbovej vedie k vzniku skorbutu. Príznakmi ochorenia sú slabosť, únava, bolesť svalov a kĺbov, krvácanie ďasien a strata zubov. V extrémnych prípadoch sa objavujú i edémy dolných končatín, anémia, krvácanie z nosu či psychické poruchy. Nadbytočný príjem môže spôsobovať žalúdočné kŕče, koliku, a taktiež môže viesť k tvorbe oxalátových kameňov v dôsledku ukladania ťažko rozpustných kryštálikov šťavel'anu v obličkách.

Kyselina askorbová sa v značnej miere využíva i v potravinárstve, a to predovšetkým ako aditívum pre zachovanie prirodzenej vône, chuti a farby potravín. Pretože pomáha zabraňovať oxidácii tukov, pridáva sa hlavne do mäsových výrobkov a údenín k udržaniu žiaducej červenej farby produktu [37].

2.3.2.2 Vitamín E (α -tokoferol)

Vitamín E predstavuje skupinu ôsmich lipofilných izomérov, štyroch tokoferolov (α -, β -, γ -, δ -) a štyroch tokotrienolov (α -, β -, γ -, δ -), pozostávajúcich z chromanového kruhu a hydrofóbného ftylového alebo farnesylového reťazca [38].

Biologicky najaktívnejší a najviac zastúpený je α -tokoferol (Obrázok 8), ktorý sa stal hlavným predstaviteľom celej skupiny. Ako významný antioxidant zachytáva voľné radikály, čím chráni biologické membrány a lipoproteínové častice pred oxidačným stresom. Podporuje i imunitný systém, potláča vznik rakoviny a aterosklerózy. Reakciou s voľnými radikálmi však vzniká tokoferoxylový radikál, ktorý sám môže vykazovať oxidačný účinok, a je preto nutné ho redukovať. V ľudskom organizme regeneruje vitamín E kyselina askorbová a enzým glutathion peroxidáza [26, 29].



Obrázok 8: Chemická štruktúra α -tokoferolu [38]

Pretože človek nie je schopný si vitamín E sám syntetizovať, musí ho prijímať do tela z exogénnych potravinových zdrojov. Absorbujeme sa v tenkom čreve a krvou sa prenáša viazaný v lipoproteínoch. Vo väčšom množstve sa vitamín E vyskytuje predovšetkým v rastlinných olejoch, margarínoch, orechoch, semenkách či zelenine [39]. Doporučená denná dávka predstavuje 12 mg [36].

Typickými príznakmi nadbytočného príjmu tokoferolov je bolesť hlavy, únava, žalúdočná nevoľnosť, rozmazané videnie a vo vážnejších prípadoch i dysfunkcia pohlavných orgánov. Hypovitaminóza je veľmi vzácna. Vyskytuje sa prevažne u pacientov s poruchami vstrebávania a distribúcie lipidov, pri cystickej fibróze či syndróme krátkeho čreva. Prejaviť sa môže neplodnosťou, hemolýzou, neuropatiou či svalovou slabosťou [39, 40].

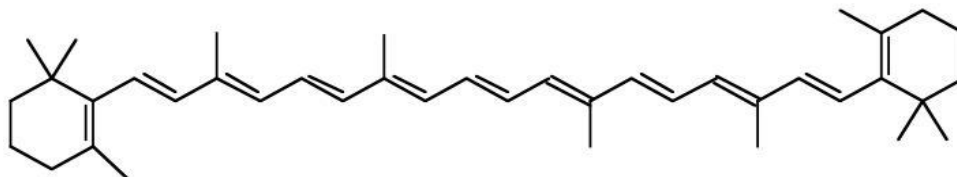
2.3.2.3 Karotenoidy

Karotenoidy sú žlté, oranžové, červené a výnimočne žltozelené lipofilné pigmenty vznikajúce vo fotosyntetizujúcich rastlinách, niektorých hubách, riasach alebo mikroorganizmoch. U živočíchov sa karotenoidy vyskytujú hlavne v povrchových tkanivách ako koža, šupiny, perie a zobák, ale tiež vo vaječnom žĺtku alebo ako zrkové pigmenty. I tie sú však rastlinného pôvodu, pretože živočíchy nie sú schopné sami si karotenoidy syntetizovať a prijímajú ich výhradne v potrave [41].

Z chemického hľadiska patria karotenoidy medzi tetraterpenoidy pozostávajúce z ôsmich izoprénových jednotiek. Za svoju farebnosť vďaka reťazcu konjugovaných dvojitých väzieb, ktoré sú prevažne v konfigurácii „all-trans“. Vytvorený delokalizovaný systém elektrónov umožňuje zachytiť energiu excitovaných molekúl a voľných radikálov, čím zabraňuje poškodeniu proteínov, DNA i fotosyntetického aparátu. Karotenoidy tak pomáhajú potlačiť

niektoré formy rakoviny, aterosklerózu, chráni kožu pred nadmerným pôsobením slnečného žiarenia a podporujú činnosť imunitného systému. Pri zvýšenom parciálnom tlaku kyslíka alebo vyššej koncentrácii karotenoidov v organizme však vykazujú nežiaduci prooxidačný účinok [42, 43].

Do dnes je známych viac ako 600 prirodzene sa vyskytujúcich karotenoídnych pigmentov, ale len približne 50 z nich vykazuje aktivitu vitamínu A. Najznámejší z nich je β -karotén (Obrázok 9), ktorý spolu s lykopénom patrí do skupiny karoténov. Biochemickou oxidáciou karoténov vznikajú kyslíkaté zlúčeniny nazývané xantofyly [26].



Obrázok 9: Chemická štruktúra β -karoténu [42]

Pre praktické využitie sa karotenoidy získavajú extrakciou z rastlinných materiálov. Priemyselne možno previesť ich čiastočnú alebo úplnú syntézu. V potravinárstve sa využívajú na farbenie margarínov, syrov, jogurtov, ovocných džúsov, cestovín, cukrárskych a ďalších výrobkov. Taktiež sa pridávajú do krmív dojníc a hydiny pre zaistenie žiaducej pigmentácie mlieka, mliečnych výrobkov, vajec a mäsa. Ako pigmenty ich možno využiť i vo farmácii a kozmetickom priemysle [41].

2.3.2.4 Kyselina močová

Kyselina močová je konečným produktom metabolizmu purínových nukleotidov u človeka. Až 90 % kyseliny močovej sa v obličkách spätne reabsorbuje do krvi, čo svedčí o jej významnej funkcii v tele. V plazme je najviac zastúpeným antioxidantom. Odstraňuje singletový kyslík a peroxynitril, čím inhibuje peroxidáciu lipidov a predchádza rozkladu erytrocytov. Pozitívne pôsobí v boji proti niektorým neurodegeneratívnym ochoreniam ako Parkinsonova choroba alebo roztrúsená skleróza. Napriek významnému antioxidačnému účinku, hyperurikémia môže prispieť k patologickým stavom vedúcim k rozvoju metabolického syndrómu a kardiovaskulárnych ochorení. Častým problémom je i dna a zápal obličiek, vyvolané usadzovaním kryštálikov kyseliny močovej [26, 44].

2.4 Extrakčné techniky

Separovať farmaceuticky významné zlúčeniny z rastlinných preparátov je možné tradičnými i modernými extrakčnými metódami [45]. Extrakcia je teda primárnym krokom analýzy rastlín, pri ktorej dochádza k difúzii rozpúšťadla rastlinným materiálom a následnej extrakcii komponent o polarite podobnej použitému rozpúšťadlu. Voľba vhodného extrakčného činidla zohráva kľúčovú rolu celého extrakčného procesu. Ovplyvňuje nie len celkový výťažok, ale i kvalitu cieľových zlúčenín a minimalizuje zastúpenie nežiaducich interferujúcich látok. Hoci je škála známych extrahovadiel pomerne široká, na extrakciu rastlinných aktívnych látok sa používajú prevažne menej toxické rozpúšťadlá o nízkej teplote varu (viz. Tabuľka 3) [46].

Ďalšie faktory ovplyvňujúce extrakčný proces sú teplota, tlak, čas, a v neposlednej rade samotná rastlinná matrica [47]. Prírodné zložky možno získať z rôznych rastlinných častí (kôra, listy, kvety, koreň, plod, semená a iné). Za účelom urýchlenia procesu a dosiahnutia vyšších výťažkov je však nutné pred extrakciu zväčšiť plochu povrchu analyzovaného materiálu, čo je možné doceliť napríklad jeho rozomletím [46].

Tabuľka 3: Prehľad rozpúšťadiel používaných na extrakciu aktívnych látok [47]

Extrahovadlo	Bioaktívna rastlinná látka						
Voda	antokyaníny	taníny	terpenoidy	saponíny			
Etanol	terpenoidy	taníny	alkaloidy	flavonoly	polyfenoly		
Metanol	antokyaníny	taníny	terpenoidy	saponíny	polyfenoly	flavony	
Chloroform	terpenoidy	flavonoidy					
Dichlórmetanol	terpenoidy						
Éter	terpenoidy	alkaloidy					
Acetón	flavonoidy						

2.4.1 Konvenčné extrakčné metódy

Tradičné extrakčné techniky sú založené na využití extrakčnej sily rôznych rozpúšťadiel, aplikácii tepla či miešania [47]. Okrem toho, že pri ich prevedení dochádza k väčšej spotrebe rozpúšťadla, sú tieto metódy i časovo náročnejšie. Patrí sem napríklad lúhovanie, macerácia, perkolácia, hydrodestilácia či extrakcia podľa Soxhleeta [48].

2.4.1.1 Macerácia

Macerácia je jednoduchá metóda vhodná na extrakciu termolabilných látok z čerstvého alebo práškového rastlinného materiálu. Prebieha pri izbovej ako aj pri mierne zvýšenej teplote krátkodobo (cca 30 minút) alebo dlhodobo (po dobu 3 až 7 dní) [45, 46].

Proces macerácie pozostáva z niekoľkých krokov. Rastlinný materiál je najskôr za účelom zväčšenia povrchovej plochy nutné rozdrviť. Samotné macerovanie začína po pridaní vhodného rozpúšťadla do uzavretej nádoby. Médium býva často príležitostne premiešavané, aby sa uľahčila difúzia rozpúšťadla rastlinnou matricou. Po ukončení procesu macerovania sa kvapalná fáza oddelí a tuhé zvyšky dodatočne vylisujú. Získané kvapaliny je po zmiešaní ešte potrebné prefiltrovať, aby sa zbavili prípadných nečistôt [47].

2.4.1.2 Hydrodestilácia

Hydrodestilácia patrí medzi najjednoduchšie a najlacnejšie destilačné metódy využívajúce sa na extrakciu esenciálnych olejov [49]. Rozoznávame tri základné typy hydrodestilácie, a to vodnú destiláciu, destiláciu vodou a vodnou parou, a priamu destiláciu parou [50].

Pre prevedenie procesu je nutné vložiť rastlinný materiál do destilačnej nádoby a pridať dostatočné množstvo vody. Voda je zahrievaním privedená k varu za vzniku vodnej pary,

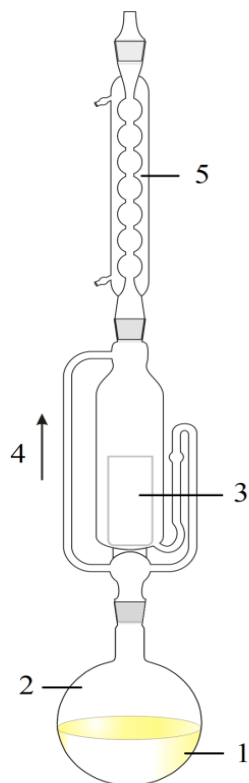
ktorá spolu so vznikajúcim teplom spôsobuje rozpad bunecnej steny matrice, čo vedie k uvoľneniu prchavých organických zlúčenín. Plyná zmes vody a molekúl esenciálneho oleja v chladiči kondenzuje na kvapalinu, ktorá je privádzaná do separátora. V ňom dochádza k statickému oddeleniu ľahšej olejovej fázy od skondenzovanej vody [47, 49].

2.4.1.3 Extrakcia podľa Soxhleta

Soxhletov extraktor (viz. *Obrázok 10*) bol prvýkrát navrhnutý nemeckým chemikom Franzom Ritter Von Soxhletom v roku 1879. Dnes však jeho použitie nie je limitované len na extrakciu tukov, ale v širokej miere sa aplikuje i pri získavaní cenných bioaktívnych zlúčenín z rozmanitých prírodných zdrojov [47].

Všeobecný postup prevedenia extrakcie začína umiestnením vzorky do patróny extrakčného nadstavca, ktorý je situovaný pod spätným chladičom. Rozpúšťadlo je v destilačnej banke zahrievané za vzniku výparov. Tie v chladiči kondenzujú a kvapkajú na materiál v patróni, ktorý je postupne extrahovaný. Po dosiahnutí hladiny prepadu je rozpúšťadlo obohatené o extrahované látky odvedené trubičkou extrakčného nadstavca späť do banky. Celý proces sa niekoľkokrát opakuje s regenerovaným rozpúšťadlom až do dosiahnutia úplnej extrakcie.

Metóda extrakcie podľa Soxhleta je obľúbená pre svoju jednoduchosť, ekonomickú nenáročnosť a nevyžaduje zaradenie filtrácie na prečistenie výsledného produktu. Nevýhodou však je možná tepelná degradácia látok či nemožnosť aplikovať miešanie k urýchleniu extrakcie. Čoraz viac sa však proces zvykne modifikovať s cieľom automatizácie a skrátenia extrakčného času, a to využitím vysokého tlaku, ultrazvuku či mikrovlnného žiarenia [45, 51].



Obrázok 10: Schéma Soxhletovho extraktora: 1 – extrakčné rozpúšťadlo, 2 – destilačná banka, 3 – extrakčná patróna, 4 – výpary, 5 – chladič [52]

2.4.2 Nekonvenčné extrakčné metódy

Alternatívou voči pomalším klasickým metódam extrakcie sú nekonvenčné extrakčné techniky ako superkritická fluídna extrakcia, mikroextrakcia tuhou fázou, extrakcia podporovaná ultrazvukom či mikrovlnným žiarením [45]. Nižšia spotreba organických rozpúšťadiel, lepšie výťažnosti a kvalita extraktov sú len jedny z mála výhod, ktoré robia tieto metódy atraktívnymi [47]. Spomínané procesy je možné automatizovať, a taktiež eliminujú ďalšie kroky čistenia a koncentrovania vzoriek pred chromatografickou analýzou [53].

2.4.2.1 Superkritická fluídna extrakcia (SFE)

Nadkritické tekutiny sa ako rozpúšťadlá využívajú pre širokú radu aplikácií. Najvýznamnejšie z nich sú extrakcia esenciálnych olejov, dekofeinizácia kávy a čaju, polymérna syntéza či nukleácia častíc [45, 54].

Termín nadkritická tekutina označuje tekutinu vyskytujúcu sa nad svojím kritickým bodom, tj. nad svojou kritickou teplotou T_k a kritickým tlakom p_k [47]. Za týchto okolností vykazuje tekutina vlastnosti kvapalín i plynov. V porovnaní s konvenčnými kvapalnými rozpúšťadlami majú tekutiny v nadkritickom stave vyšší difúzny koeficient, nižšiu viskozitu a nulové povrchové napätie, čo umožňuje rýchlejší transport extrahovaných látok [51].

V praxi je pri prevedení SFE najčastejšie využívaním rozpúšťadlom CO_2 , a to hneď z niekoľkých dôvodov. Okrem toho, že jeho kritické hodnoty sú nízke ($p_k = 74$ bar, $T_k = 32$ °C), je relatívne netoxický, nehorľavý, lacný, dostupný vo vysokej čistote a ľahko odstrániteľný z extraktu [54, 55]. Pretože v nadkritickom stave vykazuje polaritu podobnú pentánu a hexánu, je vhodným rozpúšťadlom pre lipofilné zlúčeniny [56]. Kvôli svojmu nepolárnemu charakteru je však neschopný extrahovať polárne analyty. Tento nedostatok možno odstrániť prídavkom malého množstva polárneho organického rozpúšťadla, tzv. modifikátora (metanol, etanol, acetonitril, acetón, voda, dichlórmetán a iné) [47, 51]. Superkritická fluídna extrakcia je pomerne jednoduchým a finančne dostupným procesom. K extrakcii aktívnych látok dochádza v extrakčnej nádobe opatrenej regulátorom tepla a tlakovými ventilmi na vstupe i výstupe. Tlak v extrakčnej nádobe je udržiavaný pomocou čerpadla. Rozpúšťadlo a rozpustené látky sú transportované do separátora, kde sa znižovaním tlaku alebo zvyšovaním teploty cielene znižuje rozpúšťacia schopnosť kvapaliny. Produkt sa odoberá pomocou ventilu umiestneného v spodnej časti separátora. Kvapalina je ďalej regenerovaná a vracia sa späť do obehu [51].

2.4.2.2 Extrakcia podporovaná ultrazvukom (UAE)

Metóda extrakcie podporovanej ultrazvukom spočíva v aplikácii zvukových vln o frekvencii vyššej ako 20 kHz za účelom vytvorenia mechanických vibrácií v danom médiu [51]. Pohyb vln vyvoláva expanziu a kompresiu molekúl média, čo sa v kvapalnom prostredí prejaví postupnou tvorbou, rastom až zánikom kavitačných bublín [57]. Implózia bublín v systéme vyvoláva lokálne vysoký tlak a teplotu, v čoho dôsledku dochádza k narušeniu bunecnej steny rastlinného materiálu a uvoľneniu bunecného obsahu [45].

Mechanické účinky ultrazvuku teda napomáhajú lepšiemu prieniku rozpúšťadla rastlinnou maticou a zlepšujú tak transport látok. Dosiahnuť vyšších extrakčných výťažkov je tým pádom možné v kratšom časovom intervale. Potrebné je však zabezpečiť chladenie extrakčnej nádoby, aby sa zamedzilo tepelnej degradácii niektorých extrahovaných látok vplyvom

zvýšenej teploty prostredia. Ďalšie faktory, ktoré ovplyvňujú konečný extrakčný výťažok, sú predovšetkým frekvencia a čas pôsobenia ultrazvuku, vlastnosti matrice a použitého rozpúšťadla, teplota a tlak [47, 58].

2.4.2.3 Extrakcia podporovaná mikrovlnným žiarením (MAE)

Mikrovlny sú elektromagnetickým žiarením o vlnovej dĺžke od 0,001 m do 1 m, spadajúce do frekvenčného pásma 0,3–300 GHz. Pre priemyselné aplikácie, podobne ako pre komerčne dostupné mikrovlnné rúry, sa najviac využívajú zariadenia o frekvencii 2,45 GHz. Pretože energia fotónov je pri danej frekvencii príliš malá na to, aby rozštiepila vodíkové väzby alebo vyvolala Brownov pohyb, účinok mikrovlnného žiarenia je striktne založený na premene elektromagnetickej energie na teplo.

Generácia tepla je pritom podmienená prítomnosťou polárnej zlúčeniny, ktorou okrem použitého rozpúšťadla môže byť i vlhkosť (voda) obsiahnutá v rastlinnej matrici. Vo väčšine prípadov sa na extrakciu volia rozpúšťadlá o vysokej dielektrickej konštante (viz. *Tabuľka 4*), ktoré sú schopné silno absorbovať dopadajúce žiarenie. Ojedinele sa však za účelom predísť tepelnej degradácii niektorých termolabilných látok zahrieva iba rastlinná matrica, ktorej bioaktívne látky sa po rozrušení bunecnej steny uvoľnia do studeného, málo polárneho rozpúšťadla [59, 60].

V porovnaní s konvenčnými extrakčnými metódami dosahuje extrakcia mikrovlnným žiarením vysokých extrakčných výťažkov za kratší časový úsek. Pretože pri svojom prevedení nevyžaduje spotrebu veľkého množstva organických rozpúšťadiel, možno ju považovať za tzv. zelenú metódu spĺňajúcu určité environmentálne kritériá [47].

Tabuľka 4: Dielektrická konštanta vybraných rozpúšťadiel pri 2,45 GHz a laboratórnej teplote [60]

Rozpúšťadlo	Dielektrická konštanta
Voda	80,4
DMSO	45,0
DMF	37,7
Etylénglykol	37,0
Metanol	32,6
Etanol	24,3
Chloroform	4,8
Toluén	2,4
Hexán	1,9

2.5 Biochemické stanovenie aktívnych látok

Spektrofotometrické techniky sú jedny z najrozšírenejších analytických metód využívaných k stanoveniu rôznych typov látok. Jedná sa o rýchle, jednoduché, efektívne merania nenáročné na prípravu a spracovanie analyzovanej vzorky. Ďalšou výhodou je aj potenciálna prispôsobivosť analýz pre použitie v teréne. Nakoľko existuje lineárny vzťah medzi absorbanciou a koncentráciou látok, spektrofotometrické metódy sú obzvlášť atraktívne pre kvantitatívne merania [61, 62].

2.5.1 Stanovenie celkových polyfenolov

K stanoveniu polyfenolov vo víne, alkoholických nápojoch či rastlinných extraktoch sa najčastejšie používa metóda Folin-Ciocalteu. Založená je na chemickej redukcii reagentu (zmesi oxidov wolfrámu a molybdénu) s polyfenolmi, pričom dochádza k tvorbe modro sfarbených chromoforov [63]. Tie možno spektrofotometricky detegovať sledovaním hodnôt absorpcie pri 750 nm. Výsledná koncentrácia fenolových zlúčenín sa získa prepočtom na ekvivalentné množstvo kyseliny galovej [64].

Nevýhodou metódy je značná nešpecifickosť Folin-Ciocalteuho činidla. To môže interferovať s inými, ľahko oxidovateľnými nefenolovými látkami. Príkladom takýchto zlúčenín je kyselina askorbová, oxid siričitý, aromatické amíny či redukujúce cukry [63].

2.5.2 Stanovenie celkových flavonoidov

Spektrofotometrické meranie založené na tvorbe komplexov hliníka je jedným z najviac používaných postupov pre stanovenie celkových flavonoidov vo vzorkách potravín či liečivých rastlín. Táto metóda, pôvodne navrhnutá Christom a Müllerom v roku 1960, bola v priebehu rokov niekoľkokrát modifikovaná až do dnešnej podoby. Široko využívané sú nasledujúce dva postupy.

Prvý využíva 2–10% roztok chloridu hlinitého, ktorý sa pridáva k vzorke v prítomnosti kyseliny alebo acetátu. Absorbancia sa meria 2 až 60 minút po pridaní $AlCl_3$ pri 404–430 nm. Ako štandard pre získanie kalibračnej závislosti možno využiť quercetín, rutín, galancín či katechín.

V druhom, často používanom postupe, sa tvorba hliníkových komplexov uskutočňuje za účasti $NaNO_2$ v alkalickej prostredí. Princíp metódy spočíva v nitrácii aromatického kruhu nesúceho katecholovú skupinu s tromi alebo štyrmi nesubstituovanými pozíciami, prípadne skupinami bez sterickej zábrany. Po pridaní Al^{3+} sa vytvorí žltý roztok hlinitého komplexu, ktorého farba sa v prítomnosti $NaOH$ okamžite zmení na červenú. Absorbancia sa meria pri 510 nm a výsledná koncentrácia sa získa prepočtom z kalibračnej závislosti katechínu [65].

2.5.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Celková antioxidačná aktivita je pojem zavedený pre vzájomné porovnanie a hodnotenie antioxidačných účinkov rôznych vzoriek biologického pôvodu. K jej stanoveniu možno využiť metódy priame (TEAC, DPPH, ORAC), založené na schopnosti inhibovať oxidačné reakcie látok, alebo metódy nepriame (FRAP, CUPRAC), ktoré určujú schopnosť vzorky redukovať komplexy kovov.

Základnou a veľmi používanou metódou stanovenia celkovej antioxidačnej aktivity je metóda TEAC. Testuje schopnosť antioxidantov zhasať kation-radikál $ABTS^{*+}$. V reakčnej zmesi sa $ABTS^{*+}$ generuje oxidáciou $ABTS$ peroxidom vodíka, metmyoglobínom, peroxidisíranom draselným či oxidom manganičitým. Má modro-zelenú farbu s maximálnou absorpciou pri 734 nm. Zníženie intenzity sfarbenia roztoku je ekvivalentné koncentrácii antioxidačných látok prítomných vo vzorke, ktorá sa vypočíta z kalibračnej krivky štandardného roztoku Troloxu, analógu vitamínu E [66, 67].

2.6 Metódy pre stanovenie antimikrobiálnej aktivity

Dôležitou úlohou mikrobiologických laboratórií je testovanie citlivosti mikroorganizmov voči antimikrobiálnym látkam. Cieľom je predovšetkým zistiť potenciálnu rezistenciu mikroorganizmov k testovanej látke, ktorá je v dnešnej dobe výrazným problémom limitujúcim účinnosť antibiotík [68].

2.6.1 Kvalitatívne metódy

Diskový difúzny test je jednoduchou a praktickou metódou určenia citlivosti, prípadne rezistencie mikroorganizmu k testovanej látke. Pretože nevyžaduje žiadne špeciálne vybavenie, náklady na jeho prevedenie sú pomerne nízke. Uskutočňuje sa aplikáciou pripraveného mikrobiálneho inokula na povrch Petriho misky s tuhým živným médiom, najčastejšie s Mueller-Hintonovým agarom. Na zaočkovaný agar sa umiestnia papierové disky napustené antibiotickou látkou o danej koncentrácii. Tá difunduje do živného média, a po kultivácii sa jej citlivosť k mikroorganizmu prejaví vytvorením inhibičnej zóny okolo disku, ktorej priemer v milimetroch sa porovnáva s tabuľkovými hodnotami. Na veľkosť inhibičnej zóny má vplyv rýchlosť množenia mikroorganizmu, fyzikálne vlastnosti testovanej látky a jej schopnosť difundovať agarom, či hrúbka živnej pôdy [68, 69].

Podľa spôsobu nanášania testovanej látky rozlišujeme okrem diskového difúzneho testu ešte ďalšie tri kvalitatívne metódy:

- kvapková – látka sa kvapká na povrch tuhého média,
- komínová – látka sa pipetuje do skleneného, porcelánového alebo nerezového komína vtlačeného do agaru,
- jamková – látka sa pipetuje do jamiek vyhlbených korkovrtom priamo do naočkovanej agarovej vrstvy [69].

2.6.2 Kvantitatívne metódy

Kvantitatívne metódy slúžia k zisteniu minimálnej inhibičnej koncentrácie MIC, to znamená minimálnej koncentrácie antibakteriálnej látky, pri ktorej ešte nie je pozorovaný rast baktérie. MIC sa obvykle vyjadruje v mg/l alebo v $\mu\text{g/ml}$. Odčítané hodnoty MIC sa porovnávajú s interpretačnými kritériami, na základe čoho sa testovaný mikroorganizmus označí ako citlivý, intermediárne rezistentný či rezistentný k danému antibiotiku.

Stanovenie možno previesť na agarových pevných pôdach alebo v bujónových živných médiách, ktoré obsahujú dané koncentrácie antibakteriálnej látky nariadenej tzv. geometrickou radou. Do pôd sa naočkuje inokulum testovaného mikroorganizmu a po inkubácii (obvykle po 24 hodinách pri 37 °C) sa skúma viditeľný rast baktérií sledovaním vytvoreného zákalu.

Obdobou bujónového dilučného testu je mikrodilučná metóda. Tekuté médium (napr. Mueller-Hintonov bujón) obohatené o antimikrobiálnu látku sa dávkuje do jamiek mikrotitračnej doštičky. K jednotlivým riedeniam sa následne pridáva inokulum testovaného kmeňa. Jedna jamka obvykle slúži ako kontrola rastu testovaného mikroorganizmu, prípadne sa do jamky mikroorganizmus vôbec neočkuje, čím sa sleduje možná kontaminácia bujónu. Po príslušnej dobe inkubácie sa pre jednotlivé antibiotiká odčíta hodnota MIC. Tú je možné

zistiť vizuálne alebo pomocou readeru, ktorý spektrofotometricky zmeria absorbanciu v každej jamke. Hodnote MIC zodpovedá jamke so skokovou zmenou absorbancie [68–70].

2.6.3 Kombinované metódy

Príkladom stanovenia kombinujúceho princípy difúzných a dilučných metód je komerčne dostupný E-test. Ten využíva tenký plastový testovací prúžok, na spodnej strane impregnovaný postupne klesajúcou koncentráciou daného antibiotika. Konkrétne hodnoty koncentrácií sú vyznačené na číselnej stupnici na druhej strane prúžku. Prúžok sa prikladá na povrch misiek s agarovým živným médiom a po inkubácii je možné test okamžite vyhodnotiť. MIC je určená priesečníkom elipsovitej spodnej časti oblasti inhibície rastu s testovacím prúžkom. Pretože pre každé antibiotikum je potrebný samostatný prúžok, náklady na túto metódu môžu byť pomerne vysoké [68, 71].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Laboratórne vybavenie

3.1.1 Chemikálie

Destilovaná voda

Etanol 96 % (VWR-chemicals, Francúzsko)

Etanol pre UV/VIS (VWR-chemicals, Francúzsko)

Folin-Ciocalteho činidlo (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Uhličitan sodný (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)

Kyselina galová (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Dusitan sodný (PENTA, Česká republika)

Chlorid hlinitý (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Hydroxid sodný (MACH-chemikálie, Česká republika)

Katechín (Sigma-Aldrich, Nemecko)

ABTS (Sigma-Aldrich, Nemecko)

Peroxodisíran draselný (Sigma-Aldrich, Nemecko)

3.1.2 Prístroje a pomôcky

Spektrofotometer Helios delta (ThermoSpectronic, Anglicko)

Laboratórne váhy (KERN EMB, Česká republika)

Analytické váhy (A&D GR-202-EC, Japonsko)

Mikropipety (Biohit Proline, Nemecko)

Laboratórne sklo

3.2 Použitý software

Operačný systém Windows

MS Excel

MS Word

3.3 Analyzované vzorky

Na prípravu macerátov a výluhov bol použitý feniklový čaj a korenie.

1. Feniklový čaj, výrobca Sonnentor – obsahuje fenikel bio 100 % (krajina pôvodu Rakúsko)



Obrázok 11: Feniklový čaj, výrobca Sonnentor [72]

2. Fenikel celý, výrobca DAFO koření – krajina pôvodu Egypt



Obrázok 12: Fenikel – celé korenie [73]

3.4 Charakteristika použitých mikroorganizmov

Modelové mikroorganizmy použité pri experimente *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus* boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov Prírodovedeckej fakulty Masarykovej univerzity v Brne.

3.4.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je grampozitívna tyčinkovitá baktéria, za nepriaznivých podmienok produkujúca termorezistentné, dormantné spóry. Patrí medzi fakultatívne anaeróbné mikroorganizmy a vyskytuje sa predovšetkým v pôde. Rastie v teplotnom rozmedzí od 10 do 55 °C na jednoduchých živných médiách obsahujúcich esenciálne minerálne látky, zdroj uhlíka, dusíka a fosforu.

B. subtilis je producentom komerčne dôležitých proteáz a amyláz. V génových technológiách sa vďaka svojmu nepatogénnemu charakteru a známemu genómu využíva na priemyselnú produkciu rekombinantných proteínov [74].

3.4.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus (rod *Bacillus*, čeľaď *Bacillaceae*) je fakultatívne anaeróbny, grampozitívny mikroorganizmus tyčinkovitého tvaru schopný pohybu vďaka prítomnosti peritrichných bičiek. Vegetatívne bunky, ktorých veľkosť je v priemere 3–7 µm, sa nachádzajú samostatne alebo vo forme rôzne dlhých retiazok. Ich rastové optimum je 30–35 °C, maximum 48–55 °C, pri teplotách pod 10 °C sa obvykle nemnožia. Výnimku tvoria psychrotrofné kmene mnohokrát prítomné v mliečnych výrobkoch, množiace sa i pri teplote 4 °C.

Termorezistentné spóry *B. cereus* sa prirodzene vyskytujú v pôde, prachu, vode a často tak kontaminujú potraviny rastlinného, ale i živočíšneho pôvodu. Produkciou proteolytických, lipolytických a amylolytických enzýmov v potravinách degradujú základné nutričné zložky a uplatňujú sa tak pri ich kazení. U dospelého človeka môže *Bacillus cereus* pomnožený v potravinách na približne 10^7 buniek na gram spôsobiť alimentárne otravy v dôsledku pôsobenia emetického toxínu, prípadne enterotoxínu, ktoré táto baktéria vytvára [75].

3.4.3 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus je striktne aeróbna, grampozitívna nesporulujúca koková baktéria. Koky sú nepohyblivé, usporiadané obvykle do balíčka alebo zhluku buniek. Prirodzene sa vyskytuje na koži cicavcov, sekundárne i v mäse, mliečnych výrobkoch, pôde alebo vo vode. V solených potravinách a živočíšnych produktoch môžu tvoriť žlté, oranžové až intenzívne ružové kolónie. Toto sfarbenie je spôsobené karotenoídnymi farbivami prítomnými v ich bunkách. Tie chránia bunky pred pôsobením ultrafialovej zložky slnečného žiarenia. Za normálnych okolností sú mikrokoky považované za nepatogénne baktérie, no u osôb so zníženou imunitou môžu vyvolať závažné infekcie [76, 77].

3.4.4 *Serratia marcescens*

Baktérie rodu *Serratia* sú krátke, pohyblivé gramnegatívne tyčinky vyskytujúce sa prevažne vo vode a pôde. Typickým zástupcom je druh *Serratia marcescens*. Jedná sa o nesporulujúci, fakultatívne anaeróbny mikroorganizmus charakteristický tvorbou červeno pigmentovaných kolónií. Táto baktéria je hlavným pôvodcom červených škvŕn na potravinách obsahujúcich škrob. Produkuje proteínázy i lipázy. Môže byť príčinou niektorých nozokomiálnych nákaz [76, 77].

3.5 Kultivačné média a ich príprava

Pre uchovávanie a množenie testovaných mikroorganizmov bolo použité živné médium firmy Himedia: Nutrient agar No. 2.

Zloženie a príprava média na 1 000 ml destilovanej vody

Pepton.....	10 g
Hovädzí extrakt.....	10 g
Chlorid sodný.....	5 g
Agar.....	15 g
pH.....	7,2

40 g prášku živného média sa rozpustí v 1 000 ml destilovanej vody, a následne sa nechá vysterilizovať v autokláve pri teplote 121 °C po dobu 15 minút.

3.6 Príprava extraktov feniklu

V experimente bol na prípravu extraktov použitý feniklový čaj, celé korenie a korenie dopredu rozdrvené na porcelánovom mažiari.

Príprava vodných výluhov

10 g naváženej vzorky bolo zaliatych 100 ml sterilnej destilovanej vody o teplote 100 °C. Z takto pripraveného výluhu boli odoberané vzorky v časoch 5, 10, 15, 20, 30 a 60 minút' od začiatku lúhovania. Získané výluhy boli prefiltrované a uchované v mrazničke pri teplote -4 °C

Príprava vodných macerátov

10 g naváženej vzorky bolo zaliatych 100 ml sterilnej destilovanej vody o teplote 25 °C. Macerované boli pri laboratórnej teplote po dobu 7 dní bez prístupu svetla. Z macerátov bola každých 24 hodín odobraná jedna vzorka. Získané maceráty boli prefiltrované a uchované v mrazničke pri teplote -4 °C.

Príprava etanolových macerátov

10 g naváženej vzorky bolo zaliatych 100 ml 60% etanolu o teplote 25 °C. Macerované boli pri laboratórnej teplote po dobu 7 dní bez prístupu svetla. Z macerátov bola každých 24 hodín odobraná jedna vzorka. Získané maceráty boli prefiltrované a uchované v mrazničke pri teplote -4 °C.

Príprava zrýchlených etanolových macerátov

10 g naváženej vzorky bolo zaliatych 100 ml 20%, 40%, 60%, 80% etanolom o teplote 25 °C. Macerované boli pri laboratórnej teplote po dobu 24 hodín bez prístupu svetla. Vzorky boli odoberané v časoch 1, 2, 3, 4 a 24 hodín od začiatku macerácie. Získané maceráty boli prefiltrované a uchované v mrazničke pri teplote -4 °C.

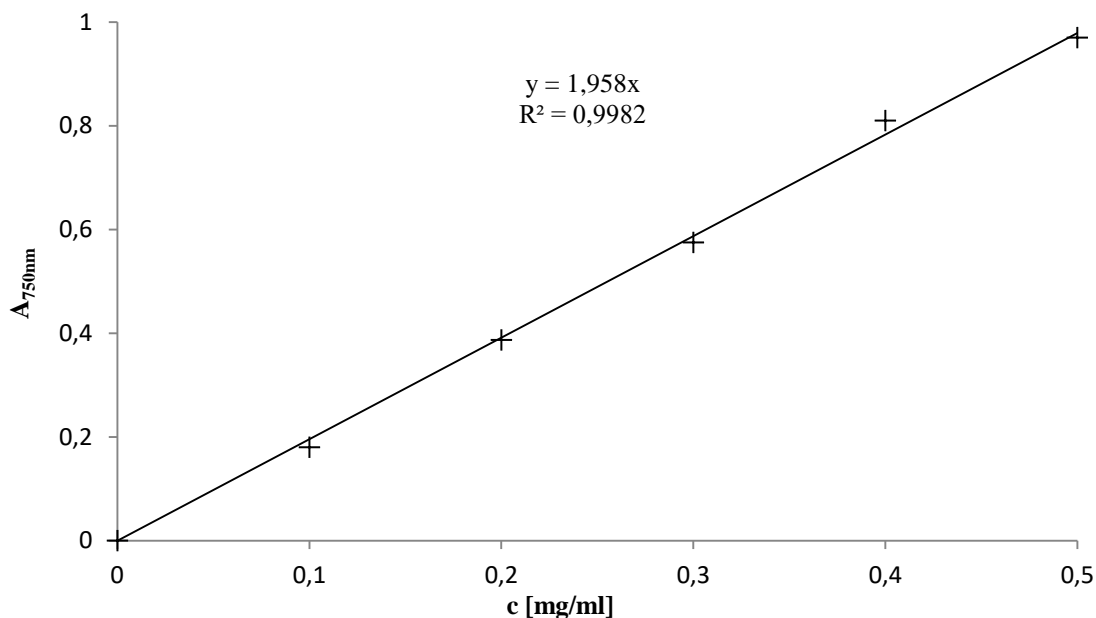
3.7 Stanovenie celkových polyfenolov

Meranie kalibračnej závislosti

Zo zásobného roztoku kyseliny galovej o koncentrácii 1 g/l bolo pripravených päť kalibračných roztokov o koncentrácii 0,1–0,5 mg/ml. Z každého takto pripraveného roztoku bolo do čistej skúmavky odpipetovaných 100 µl. K nim bol pridaný 1 ml destilovanej vody a 1 ml Folin-Ciocalteuovho činidla vopred zriedeného v pomere 1:9. Skúmavky boli premiešané a po 5-minútovom stáťi pri laboratórnej teplote bol do nich pridaný 1 ml nasýteného roztoku uhličitanu sodného. Po premiešaní sa skúmavky nechali stáť ďalších 15 minút. Reakciou fenolických zlúčenín s činidlom vzniklo modré sfarbenie, ktorého intenzita bola spektrofotometricky zmeraná pri vlnovej dĺžke 750 nm. Ako blank bol použitý roztok pripravený obdobne ako kalibračné roztoky, ale namiesto roztoku kyseliny galovej bolo použitých 100 µl destilovanej vody.

Vlastné stanovenie

Z pripravených extraktov bolo do čistých skúmaviek odpipetovaných 100 μ l a ďalší postup bol analogický ako v prípade merania kalibračnej závislosti. Celkové množstvo polyfenolov v extraktoch bolo vypočítané pomocou kalibračnej krivky.



Obrázok 13: Kalibračná krivka kyseliny galovej

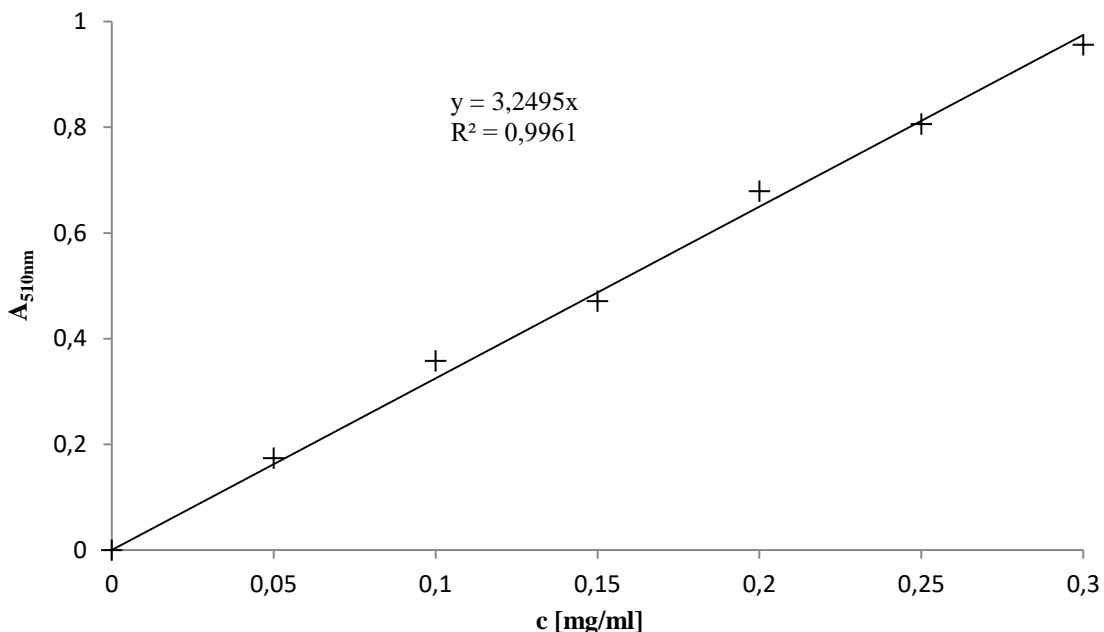
3.8 Stanovenie celkových flavonoidov

Meranie kalibračnej závislosti

Zo štandardného roztoku katechínu o koncentrácii 1 g/l bolo pripravených šesť kalibračných roztokov o koncentráciách v rozmedzí 0,05–0,3 mg/ml. Z každého takto pripraveného roztoku bolo do čistej skúmavky odpipetovaných 0,5 ml. K nim bolo pridaných 1,5 ml destilovanej vody a 0,2 ml 5% roztoku dusitanu sodného. Skúmavky boli premiešané a po 5-minútovom stáí pri laboratórnej teplote bolo do nich pridané 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého. Po premiešaní a 10-minútovom stáí bolo do skúmaviek pridaných 1,5 ml 1M hydroxidu sodného a 1 ml destilovanej vody. Roztoky boli opäť premiešané. Po 15 minútach bola spektrofotometricky stanovená absorbanca pripravených kalibračných roztokov pri vlnovej dĺžke 510 nm. Ako blank bol použitý roztok pripravený obdobne ako kalibračné roztoky, ale namiesto roztoku katechínu bolo použitých 0,5 ml destilovanej vody.

Vlastné stanovenie

Z pripravených extraktov bolo do čistých skúmaviek odpipetovaných 0,5 ml a ďalší postup bol analogický ako v prípade merania kalibračnej závislosti. Celkové množstvo flavonoidov v extraktoch bolo vypočítané pomocou kalibračnej krivky katechínu.



Obrázok 14: Kalibračná krivka katechínu

3.9 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity

Rozpustením ABTS v destilovanej vode bol pripravený roztok ABTS o koncentrácii 7 mM. Radikálový kation z ABTS bol získaný reakciou s 2,45 mM peroxidom draselným. Získaný roztok bol ponechaný v tme najmenej 12 hodín pri laboratórnej teplote.

Pred použitím bol ABTS^{•+} zriedený etanolom pre UV/VIS na absorbanciu $0,70 \pm 0,02$ pri 734 nm (merané proti etanolu pre UV/VIS). Do zúženej kyvety bol napipetovaný 1 ml ABTS^{•+} a zmeraná bola absorbancia v čase 0. K nemu bolo pridaných 10 μ l extraktu a kyveta bola následne uložená do tmy. Pokles absorbancie bol zmeraný po 10 minútach.

Pre výpočet celkovej antioxidačnej aktivity bola použitá kalibračná rovnica troloxu:

$$A = 0,00138913 \cdot c,$$

jednotky koncentrácie sú v μ g/ml.

3.10 Overenie antimikrobiálneho účinku extraktov feniklu

Na overenie inhibičných účinkov feniklových extraktov bola zvolená jamková difúzna metóda na tuhom agarovom živnom médiu.

Do skúmaviek s 5 ml sterilného tekutého bujónu bola naočkovaná daná mikrobiálna kultúra, ktorá bola inkubovaná v termostate 24 hodín pri 27 °C. Po uplynutí tejto doby bolo 1,5 ml kultúry napipetovaných do 150 ml vysterilizovaného agaru ochladeného na 40–45 °C. Takto pripravené zaočkované médium bolo rozlievané do Petriho misiek a po zatuhnutí boli doň sterilným skleneným korkovrtom vyhlbené štyri jamky. Do troch jamiek bolo napipetovaných 100 μ l vzorky extraktu, do štvrtej jamky bolo pridaných 100 μ l čistého rozpúšťadla bez aktívnej látky, tzv. blank. Petriho misky boli následne inkubované po dobu 48 hodín pri 27 °C. Nakoniec bola zmeraná veľkosť inhibičných zón a zhotovená fotodokumentácia jednotlivých Petriho misiek.

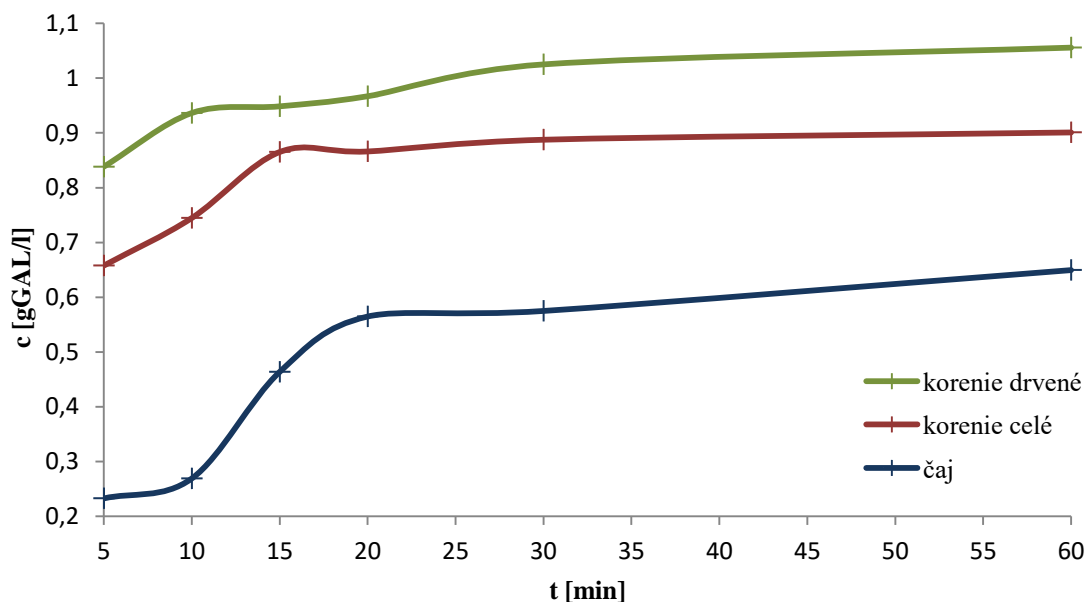
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom experimentálnej časti bolo pripraviť extrakty z čaju, korenia a rozdrvených semien feniklu vo zvolených rozpúšťadlách. V takto prichystaných extraktoch bol stanovený obsah biologicky aktívnych látok, polyfenolov a flavonoidov. U vzoriek s najvyššími hodnotami daných bioaktívnych látok bola zistená antioxidačná aktivita a sledovaný bol ich potenciálny antimikrobiálny účinok voči vybraným mikroorganizmom *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*.

4.1 Stanovenie celkových polyfenolov

Celkový obsah polyfenolov v extraktoch feniklu bol stanovený spektrofotometricky pomocou Folin-Ciocalteho činidla. Metóda je založená na redukcii fenolových látok prítomných vo vzorke za vzniku modro sfarbených chromoforov, ktorých absorbancia sa meria pri vlnovej dĺžke 750 nm. Každá vzorka bola zmeraná dvakrát a pre výpočet bola použitá priemerná hodnota. Z rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky kyseliny galovej (viz. *Obrázok 13*) bol vypočítaný celkový obsah polyfenolov v jednotlivých extraktoch. Výsledné hodnoty sú vyjadrené v g kyseliny galovej na 1 l vzorky (gGAL/l). Závislosť celkového obsahu polyfenolov v jednotlivých vzorkách na čase odberu znázorňujú extrakčné krivky.

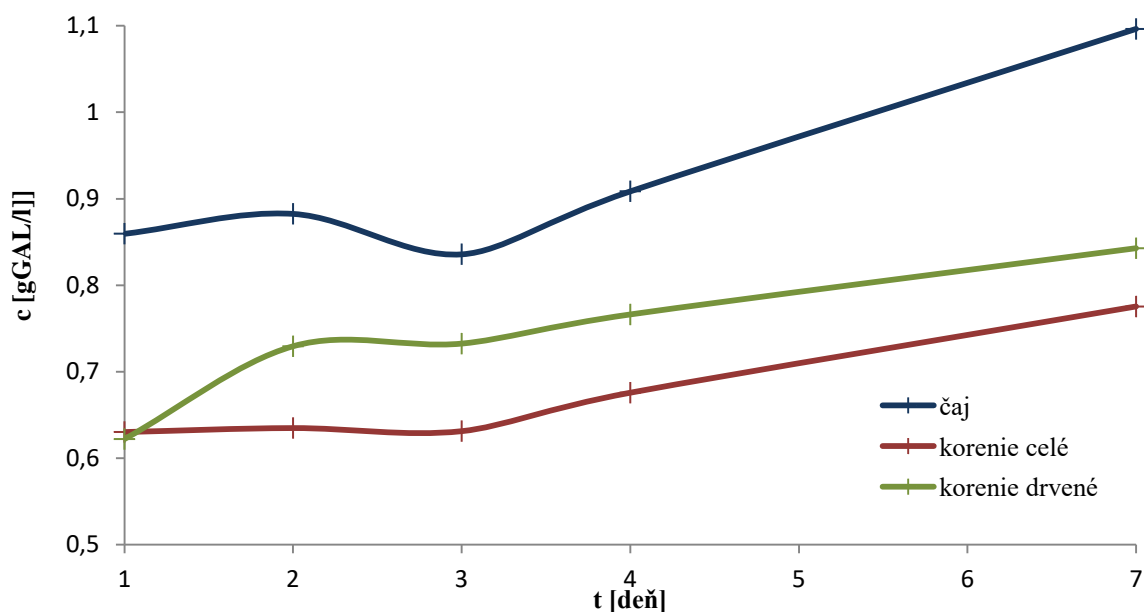
Pre všetky vzorky vodných výluhov s rastúcim časom rástla aj koncentrácia stanovovanej látky (viz. *Obrázok 15*). Najvyššie hodnoty obsahu polyfenolov boli detegované vo výluhoch odobraných v 60 minúte. Z feniklového čaju sa horkou vodou vyextrahovalo polyfenolov najmenej, naopak najväčšie množstvá boli získané z drveného korenia. Porovnaním extrakčných kriviek celého a drveného korenia možno pozorovať, že lepšej účinnosti extrakcie bolo dosiahnuté u extraktoch s rozrušenou štruktúrou semien.



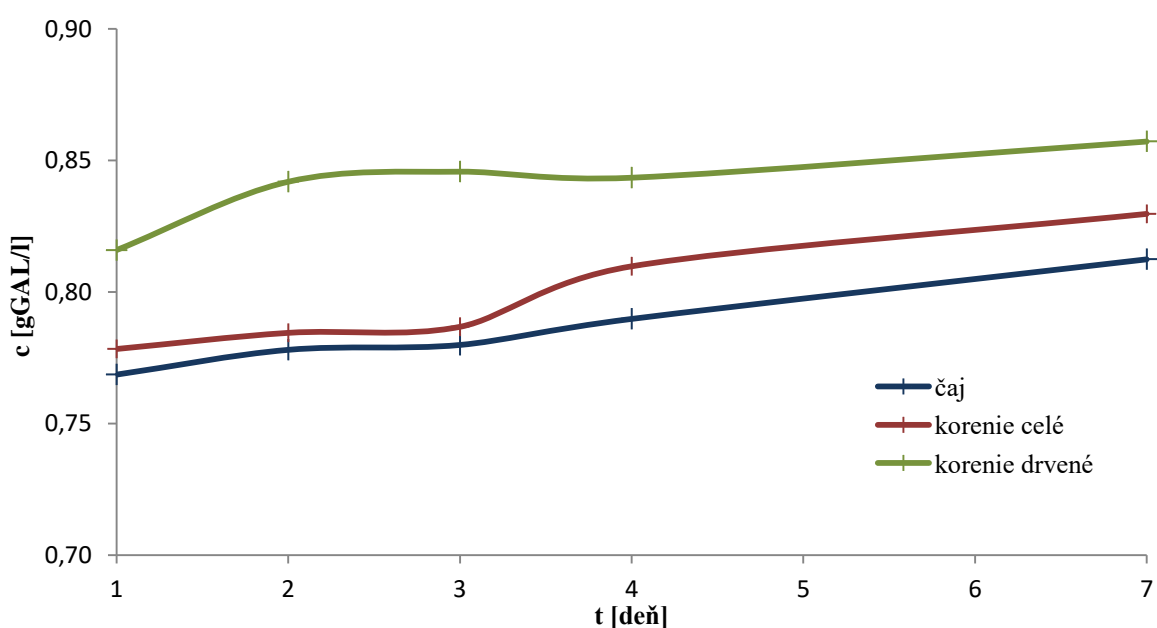
Obrázok 15: Extrakčné krivky vodných výluhov

U vodných aj etanolových macerátov, podobne ako u vodných výluhov, sa s rastúcou dobou extrakcie zvyšoval aj obsah polyfenolov v jednotlivých vzorkách, ktorého maximum bolo dosiahnuté na 7 deň od začiatku macerovania. Pozorovaný nárast bol však veľmi mierny, vzrastajúce koncentrácie vzoriek sa od seba priveľmi nelíšili (Obrázok 16 a Obrázok 17). Z feniklového čaju sa vodou o laboratórnej teplote vyextrahovalo polyfenolov najviac, naopak najmenšie množstvo bolo získané extrakciou z celého korenia. Najvyšší obsah polyfenolov u sedemdnových macerátov 60% etanolu bol detegovaný u drveného korenia, najmenej sledovanej bioaktívnej látky bolo zistených v extrakte feniklového čaju.

Pretože konečné hodnoty obsahu polyfenolov u vodných aj etanolových macerátov sú si veľmi blízke, možno tvrdiť, že obe rozpúšťadlá sú voči analyzovaným vzorkám rovnako účinné. Výnimku tvorí vzorka čaju, pre ktorú sa ako lepšie extrakčné činidlo osvedčila voda.



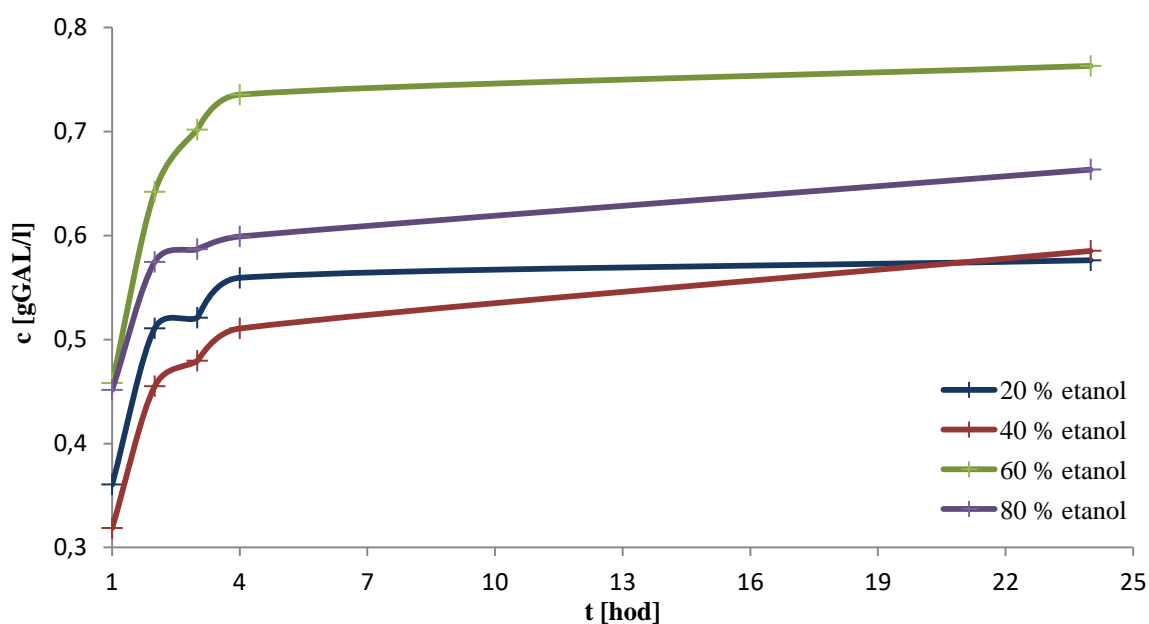
Obrázok 16: Extrakční krivky vodných macerátov



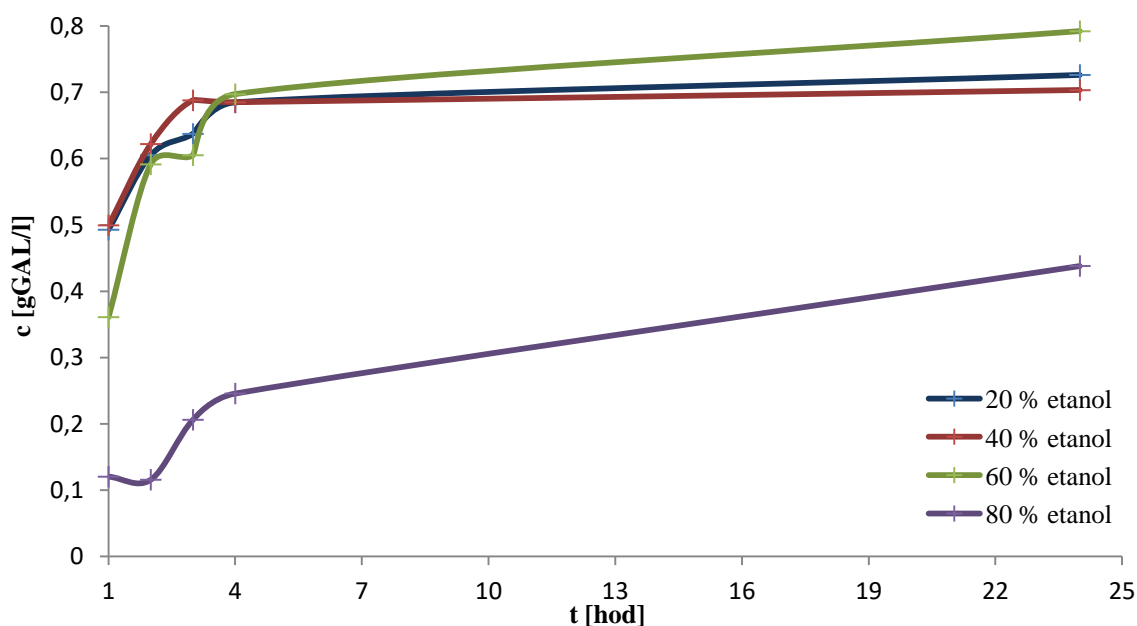
Obrázok 17: Extrakčné krivky etanolových macerátov

Sledovaný bol i vplyv etanolu o štyroch rôznych koncentráciách na účinnosť extrakcie pre jednotlivé vzorky. S rastúcim časom extrakcie rástla aj koncentrácia stanovovanej látky, najväčšie množstvo polyfenolov sa u všetkých vzoriek uvoľnilo po 24 hodinovej macerácii. Z feniklového čaju a celého korenia bolo najviac polyfenolov vyextrahovaných pri použití 60% etanolu ako extrakčného činidla, pre drvené korenie bol účinnejší 40% etanol. Naopak, najmenej polyfenolov bolo zo vzoriek celého a drveného korenia získané použitím 80% etanolu, u vzorky feniklového čaju extrakciou 20% etanolom.

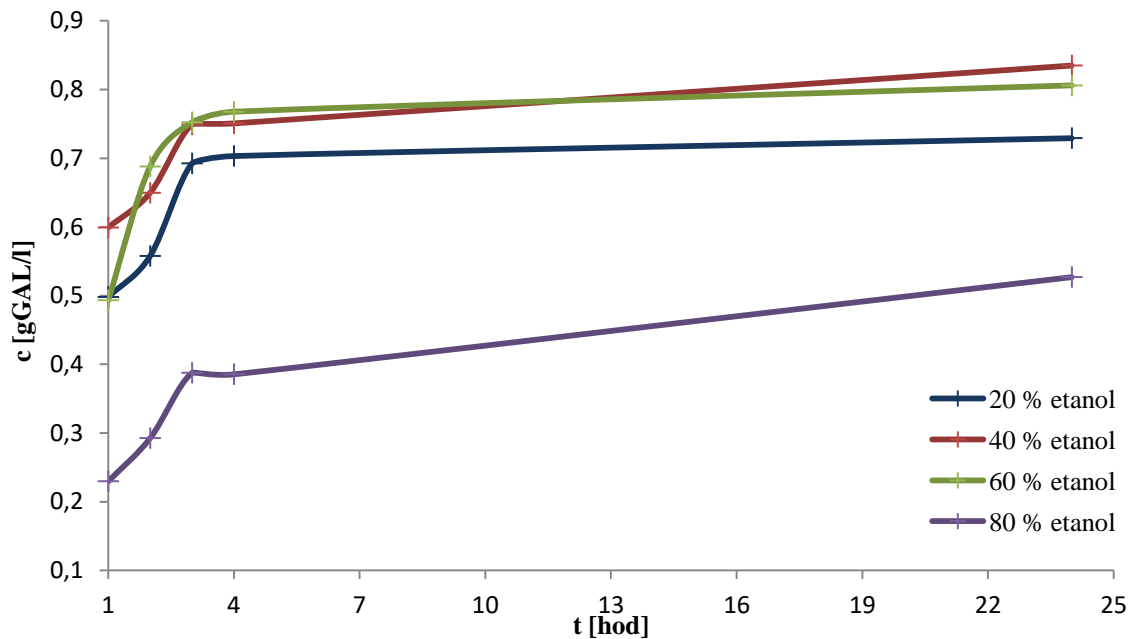
Na základe výsledkov experimentu možno tvrdiť, že etanol o koncentrácii 40 % a 60 % je na extrakciu polyfenolov zo vzoriek fenikla účinnejším činidlom ako etanol o najnižšej a najvyššej koncentrácii 20 % a 80 %.



Obrázok 18: Extrakčné krivky čajových macerátov v závislosti od použitého rozpúšťadla



Obrázok 19: Extrakčné krivky macerátov celého korenia v závislosti od použitého rozpúšťadla



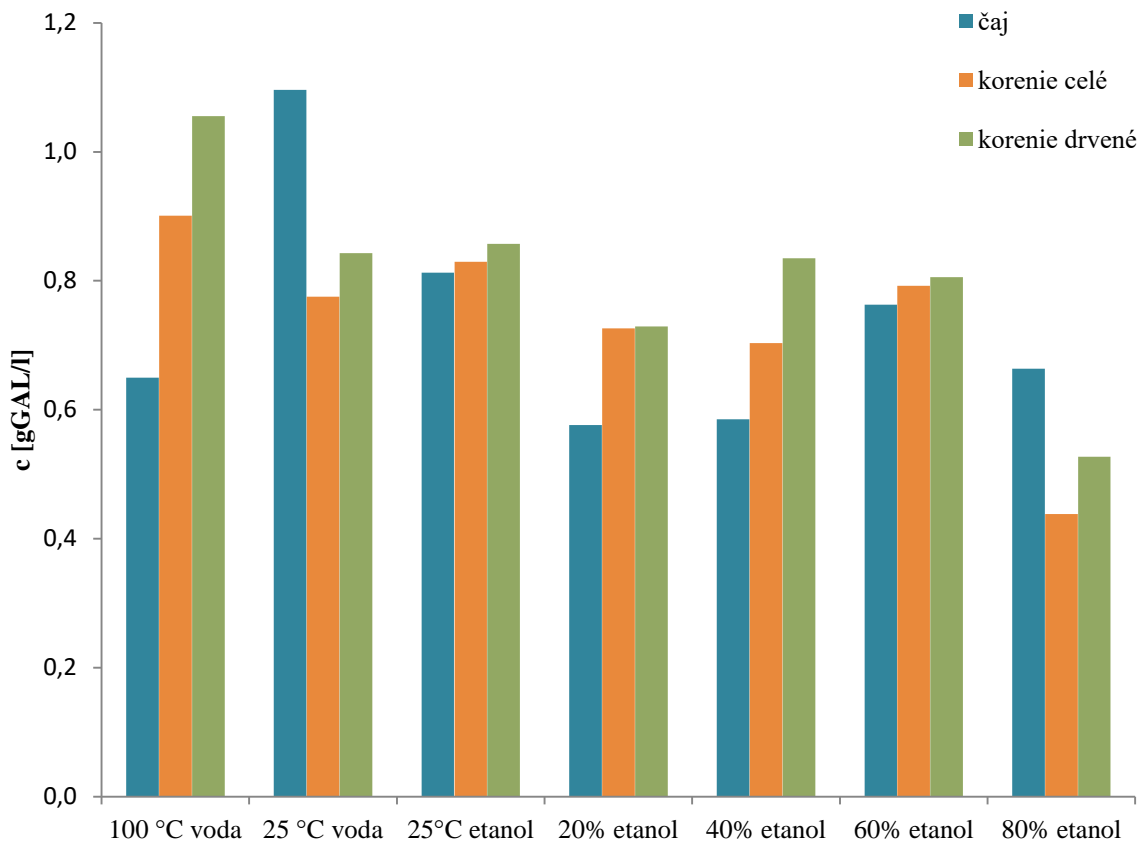
Obrázok 20: Extrakčné krivky macerátov drveného korenia v závislosti od použitého rozpúšťadla

V neposlednej rade boli z extrakčných kriviek vybrané a porovnané jednotlivé extrakty vzoriek s najvyšším obsahom polyfenolov (Tabuľka 5 a Obrázok 21). Z navážených vzoriek čaju sa najviac polyfenolov vyextrahovalo po 7 dňovej macerácii v destilovanej vode o laboratórnej teplote, najmenej extrakciou 20% etanolom. V prípade celých a drvených semien fenikla bolo najviac polyfenolov získaných po 60 minútovom lúhovaní v horkej vode, najmenej za použitia koncentrovaného 80% etanolu. Z pomedzi všetkých sledovaných vzoriek najviac polyfenolov obsahoval sedemdňový vodný macerát čaju, najmenej macerát celého korenia v 80% etanole.

Porovnaním hodnôt koncentrácií polyfenolov celého a drveného korenia možno pozorovať, že vo všetkých prípadoch bolo vyššej účinnosti extrakcie dosiahnuté u drveného korenia, a to z dôvodu väčšej povrchovej plochy umožňujúcej lepšiu difúziu rozpúšťadla maticou.

Tabuľka 5: Obsah polyfenolov u vybraných vzoriek čaju, celého a drveného korenia pre jednotlivé rozpúšťadlá

	čaj c [gGAL/l]	korenie celé c [gGAL/l]	korenie drvené c [gGAL/l]
100 °C voda	0,650	0,901	1,056
25 °C voda	1,096	0,775	0,843
25 °C etanol	0,813	0,830	0,857
20% etanol	0,576	0,726	0,729
40% etanol	0,585	0,703	0,835
60% etanol	0,763	0,792	0,806
80% etanol	0,663	0,438	0,527

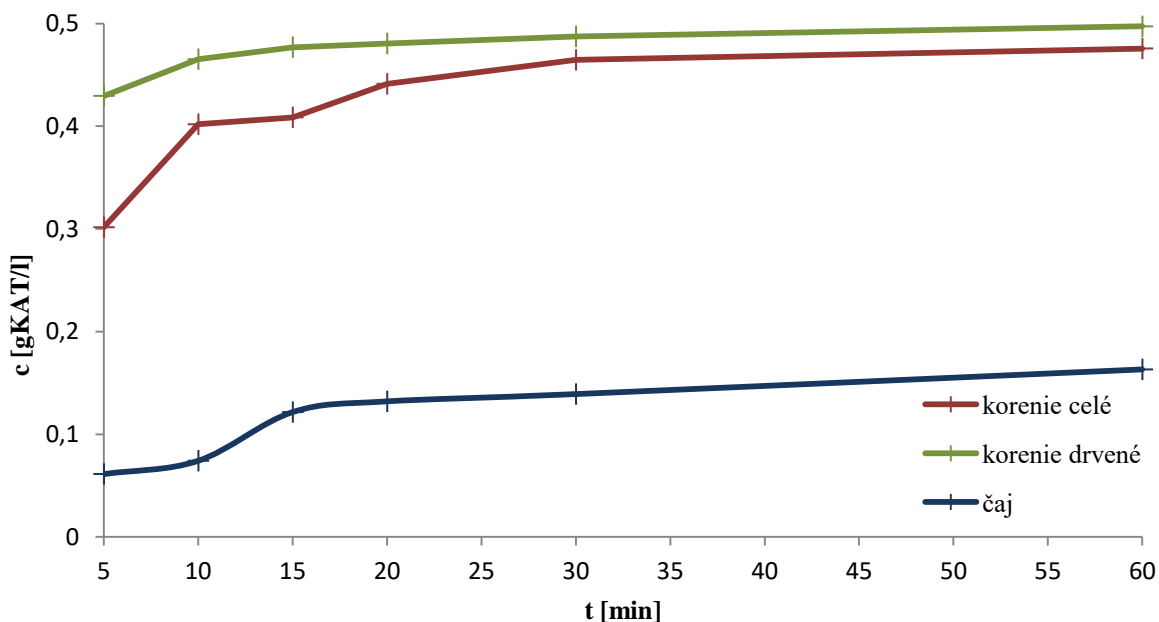


Obrázok 21: Grafické porovnanie vybraných vzoriek s najvyšším obsahom polyfenolov v závislosti od použitého rozpúšťadla

4.2 Stanovenie celkových flavonoidov

Celkový obsah flavonoidov v extraktoch feniklu bol stanovený spektrofotometricky reakciou hlinitej soli s dusitanom sodným. V prítomnosti flavonoidov vo vzorke dochádzalo k vzniku oranžovočerveného sfarbenia, ktorého absorbancia bola zmeraná pri 510 nm. Každá vzorka bola premeraná dvakrát a pre výpočet bola použitá priemerná hodnota. Z rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky katechínu (viz. Obrázok 14) bol vypočítaný celkový obsah flavonoidov v jednotlivých extraktoch. Výsledné hodnoty sú vyjadrené v g katechínu na 1 l vzorky (gKAT/l). Závislosť celkového obsahu flavonoidov v jednotlivých vzorkách na čase odberu udávajú extrakčné krivky.

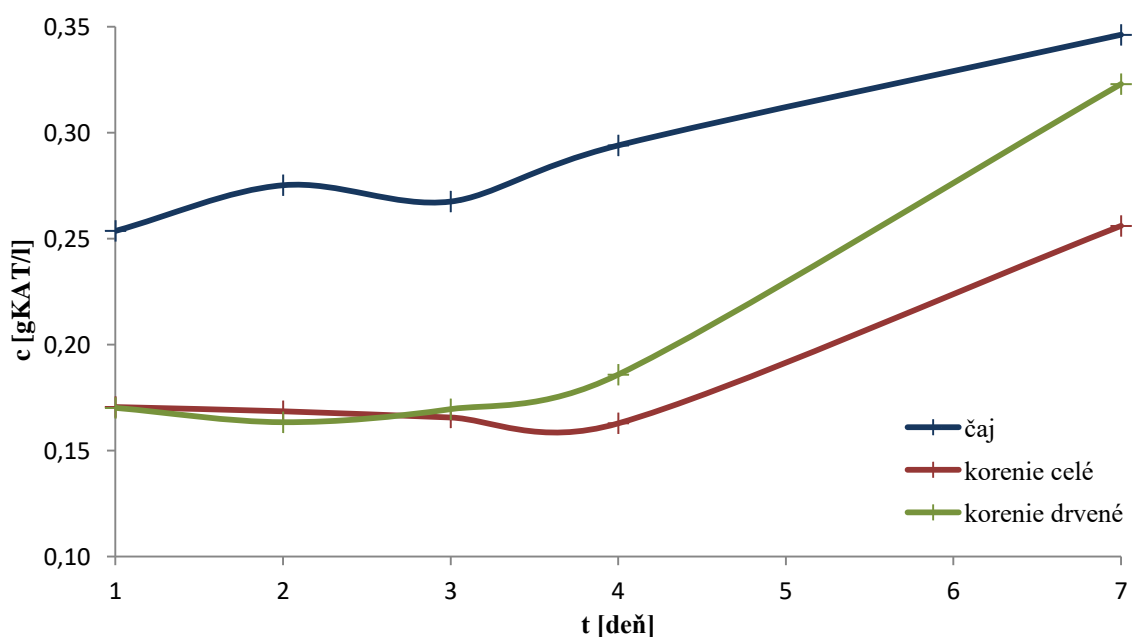
Pre všetky vzorky vodných výluhov s rastúcim časom rástla aj koncentrácia stanovovanej látky (viz. Obrázok 22). Obdobne ako u stanovení celkových polyfenolov, najvyššie hodnoty obsahu flavonoidov boli detegované vo výluhoch odobraných v 60 minúte. Z feniklového čaju sa horkou vodou vyextrahovalo flavonoidov najmenej, naopak najväčšie množstvá boli získané z drveného korenia. Porovnaním extrakčných kriviek celého a drveného korenia možno pozorovať, že lepšej účinnosti extrakcie bolo dosiahnuté u extraktoch s rozrušenou štruktúrou semien.



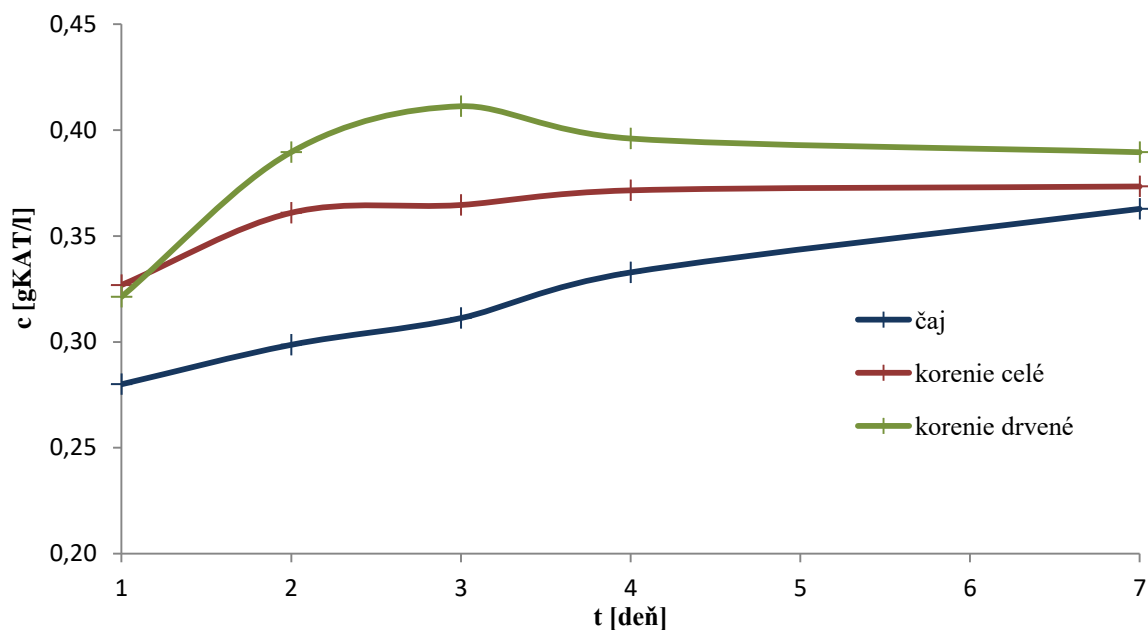
Obrázok 22: Extrakčné krivky vodných výluhov

Sledovaním extrakčných kriviek vodných a etanolových macerátov možno tvrdiť, že s rastúcou dobou extrakcie sa obsah flavonoidov v jednotlivých vzorkách opäť zvyšoval. Koncentrácie vzoriek vzrastali veľmi mierne a ich maximálna hodnota bola dosiahnutá po 7 dňoch macerovania. Z feniklového čaju sa vodou vyextrahovalo flavonoidov najviac, naopak najmenšie množstvo bolo získané extrakciou z celého korenia. Najvyšší obsah flavonoidov u sedemdnových macerátov 60% etanolu bol detegovaný u drveného korenia, najmenej sledovanej bioaktívnej látky bolo zistené v extrakte feniklového čaju.

Výsledky experimentu naznačujú, že pre vzorky celých a drvených semien sa ako lepšie extrakčné činidlo flavonoidov osvedčil 60% etanol. V prípade vzoriek čaju vykazovali obe rozpúšťadlá, voda i etanol, približne rovnakú účinnosť extrakcie.



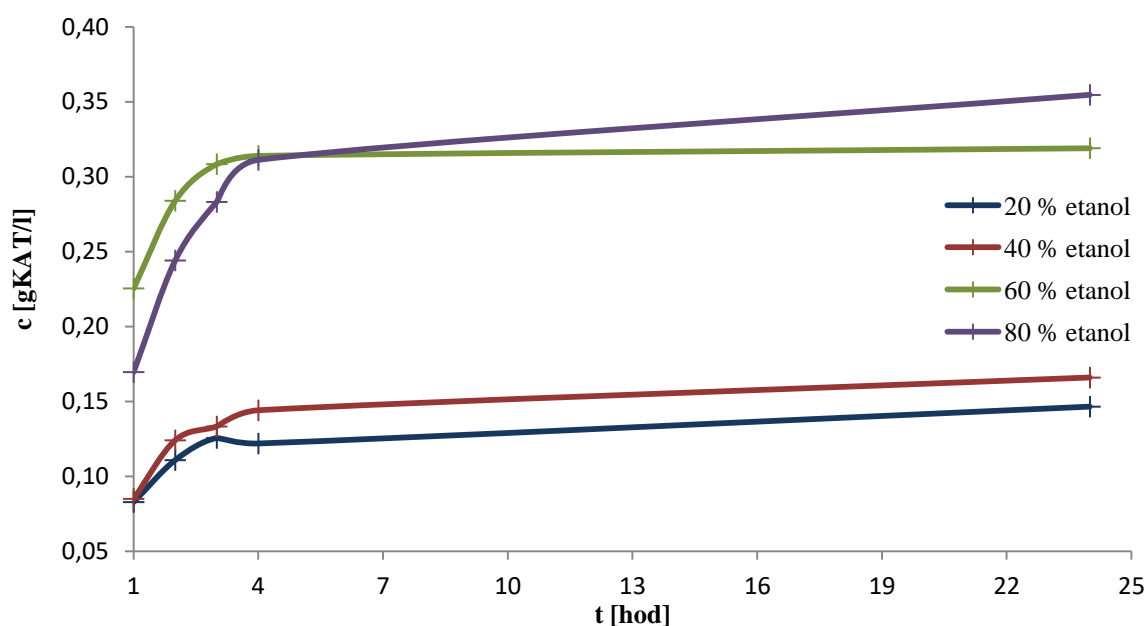
Obrázok 23: Extrakčné krivky vodných macerátov



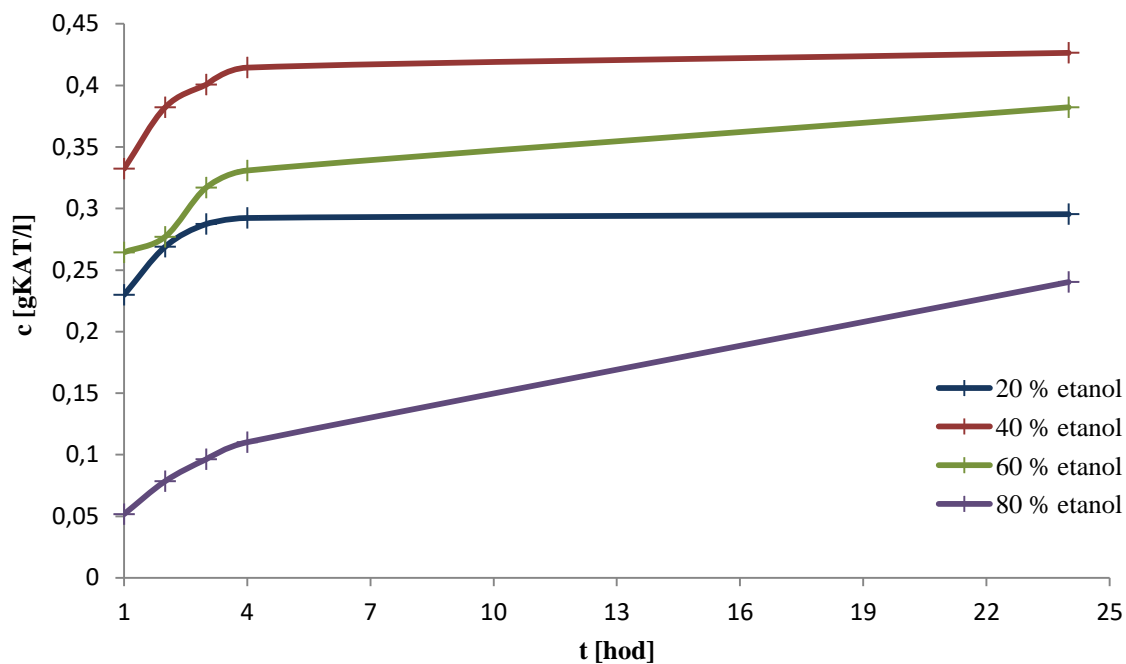
Obrázok 24: Extrakčné krivky etanolových macerátov

Sledovaný bol i vplyv etanolu o štyroch rôznych koncentráciách na účinnosť extrakcie pre jednotlivé vzorky. S rastúcim časom extrakcie rástla aj koncentrácia stanovovanej látky, najväčšie množstvo flavonoidov sa u všetkých vzoriek uvoľnilo po 24 hodinovej macerácii. Z feniklového čaju bolo najviac flavonoidov vyextrahovaných pri použití 80% etanolu ako extrakčného činidla, z celého a drveného korenia sa týmto rozpúšťadlom získalo stanovovanej látky najmenej. Pre čaj bol najmenej účinným extrakčným činidlom etanol o najnižšej koncentrácii 20 %. U vzoriek celého a drveného korenia bolo najviac flavonoidov získaných použitím 40% etanolu.

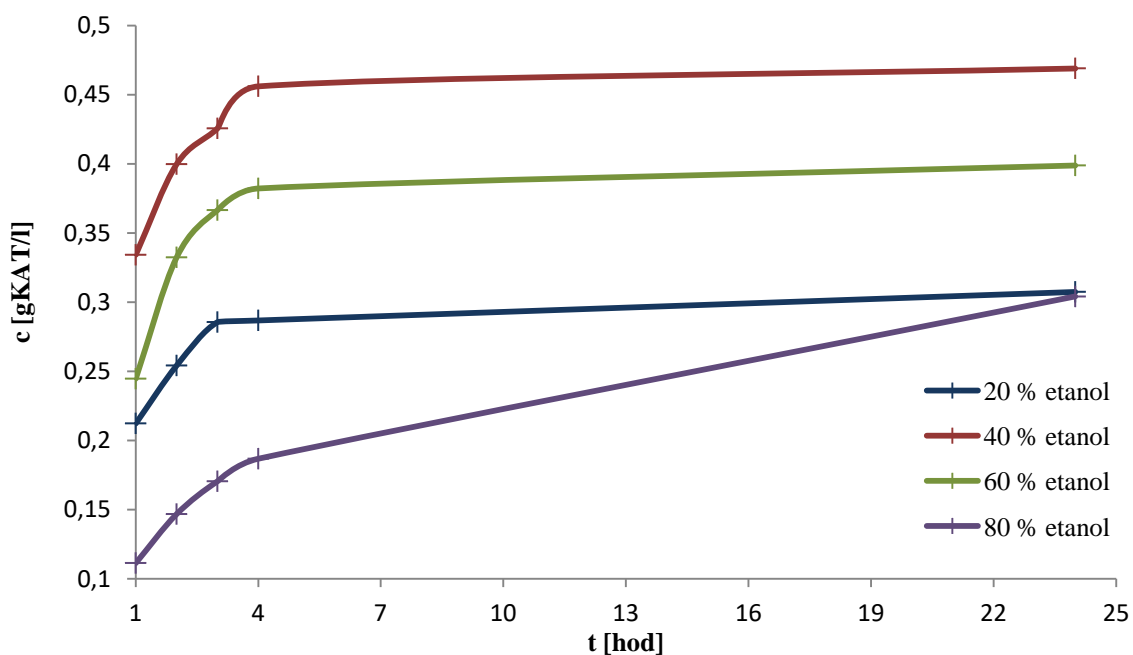
Na základe výsledkov experimentu teda možno tvrdiť, že na extrakciu flavonoidov zo vzoriek korenia sú najúčinnjšími extrakčnými činidlami 40% a 60% etanol, pre vzorky čaju etanol o najvyšších koncentráciách (80 % a 60 %).



Obrázok 25: Extrakčné krivky čajových macerátov v závislosti od použitého rozpúšťadla



Obrázok 26: Extrakčné krivky macerátov celého korenia v závislosti od použitého rozpúšťadla



Obrázok 27: Extrakčné krivky macerátov drveného korenia v závislosti od použitého rozpúšťadla

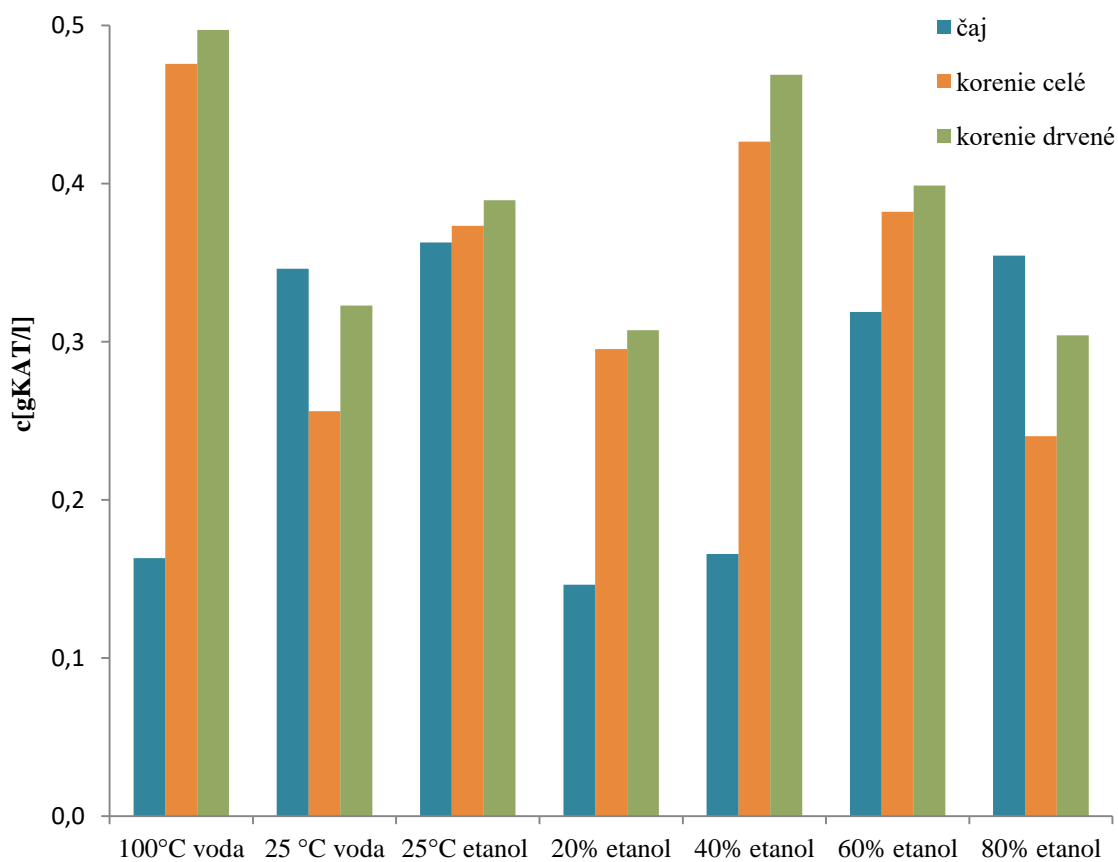
Na základe získaných extrakčných kriviek boli vybrané a navzájom porovnané extrakty s najvyšším obsahom flavonoidov (Tabuľka 6 a Obrázok 28). Z navážených vzoriek čaju sa najviac flavonoidov vyextrahovalo po 7 dňovej macerácii v etanole pri laboratórnej teplote, najmenej extrakciou 20% etanolom. Podobne ako v prípade polyfenolov, bolo najviac flavonoidov v extraktoch drvených a celých semien fenikla získaných po 60 minútovom lúhovaní v horkej vode, najmenej za použitia koncentrovaného 80% etanolu. Z pomedzi

všetkých sledovaných vzoriek najviac flavonoidov obsahoval vodný výluh drveného korenia, najmenej macerát čaju v 20% etanole.

Porovnaním hodnôt koncentrácií flavonoidov celého a drveného korenia možno opäť pozorovať, že viac stanovovanej látky sa vyextrahovalo z korenia s rozrušenou štruktúrou semien.

Tabuľka 6: Obsah flavonoidov u vybraných vzoriek čaju, celého a drveného korenia pre jednotlivé rozpúšťadlá

	čaj c [gKAT/l]	korenie celé c [gKAT/l]	korenie drvené c [gKAT/l]
100 °C voda	0,163	0,476	0,497
25 °C voda	0,346	0,256	0,323
25 °C etanol	0,363	0,373	0,390
20% etanol	0,146	0,295	0,307
40% etanol	0,166	0,427	0,469
60% etanol	0,319	0,382	0,399
80% etanol	0,355	0,240	0,304



Obrázok 28: Grafické porovnanie vybraných vzoriek s najvyšším obsahom flavonoidov v závislosti od použitého rozpúšťadla

4.3 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity vybraných extraktov

Celková antioxidačná aktivita bola stanovená metódou ABTS, ktorá je založená na schopnosti vzorky zhášať radikál-katión $ABTS^{\bullet+}$, pripravený zmiešaním peroxidisíranu draselného s ABTS. Zhášanie radikálu bolo sledované spektrofotometricky na základe zmien absorpčného spektra $ABTS^{\bullet+}$. Výsledná absorbancia vzoriek bola vypočítaná pomocou vzorca:

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

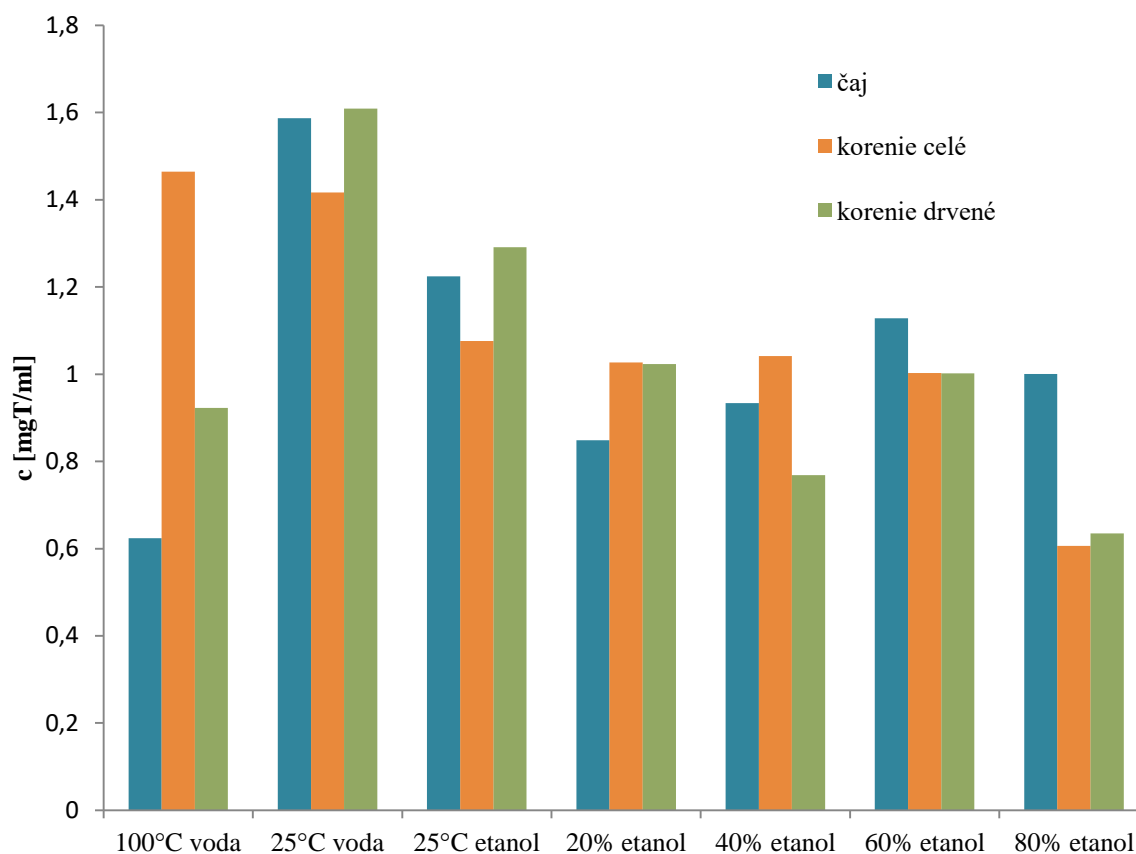
kde A_0 je absorbancia $ABTS^{\bullet+}$ v čase $t = 0$ a A_{10} je absorbancia extraktu vzorky s $ABTS^{\bullet+}$ zmeraná po 10 minútach. Každá vzorka bola premeraná trikrát a pre výpočet bola použitá priemerná hodnota. Dosadením do rovnice lineárnej regresie kalibračnej krivky troloxu bola stanovená celková antioxidačná aktivita jednotlivých extraktov. Výsledné hodnoty sú vyjadrené v mg troloxu na 1 ml vzorky (mgT/ml). Celková antioxidačná aktivita bola stanovená len u vybraných vzoriek čaju, celého a drveného korenia feniklu s najvyššími hodnotami polyfenolov a flavonoidov. Jednalo sa o 60 minútové vodné výluhy, 7 dňové vodné a etanolové maceráty, a 24 hodinové maceráty o štyroch rôznych koncentráciách etanolu.

U sledovaných extraktov feniklového čaju a drveného korenia bola najvyššia antioxidačná aktivita zistená u 7 dňových vodných macerátov, vo vzorkách celého korenia vo vodnom výluhu. Najnižšie hodnoty antioxidačnej aktivity v extraktoch celého a drveného korenia boli detegované u etanolových macerátov o koncentrácii 80 %, pre vzorky čaju vo vodnom výluhu. Z pomedzi všetkých sledovaných vzoriek boli najvyššie hodnoty antioxidačnej aktivity namerané u vodného macerátu drveného korenia, najmenej u 80% etanolového macerátu celého korenia.

Porovnaním hodnôt antioxidačnej aktivity vodných a etanolových macerátov možno sledovať, že lepšiu účinnosť extrakcie antioxidačných látok vykazovala voda. Na rozdiel od stanovenia polyfenolov a flavonoidov, hodnoty celkovej antioxidačnej aktivity drveného korenia neboli v porovnaní s extraktmi celého korenia feniklu vo všetkých prípadoch vyššie.

Tabuľka 7: Celková antioxidačná aktivita vybraných vzoriek čaju, celého a drveného korenia pre jednotlivé rozpúšťadlá

	čaj c [mgT/ml]	korenie celé c [mgT/ml]	korenie drvené c [mgT/ml]
100 °C voda	0,624	1,465	0,923
25 °C voda	1,587	1,417	1,609
25 °C etanol	1,225	1,076	1,291
20% etanol	0,848	1,027	1,023
40% etanol	0,934	1,041	0,768
60% etanol	1,128	1,003	1,002
80% etanol	1,001	0,606	0,635



Obrázok 29: Grafické porovnanie vybraných vzoriek s najvyšším obsahom aktívnych látok v závislosti od použitého rozpúšťadla

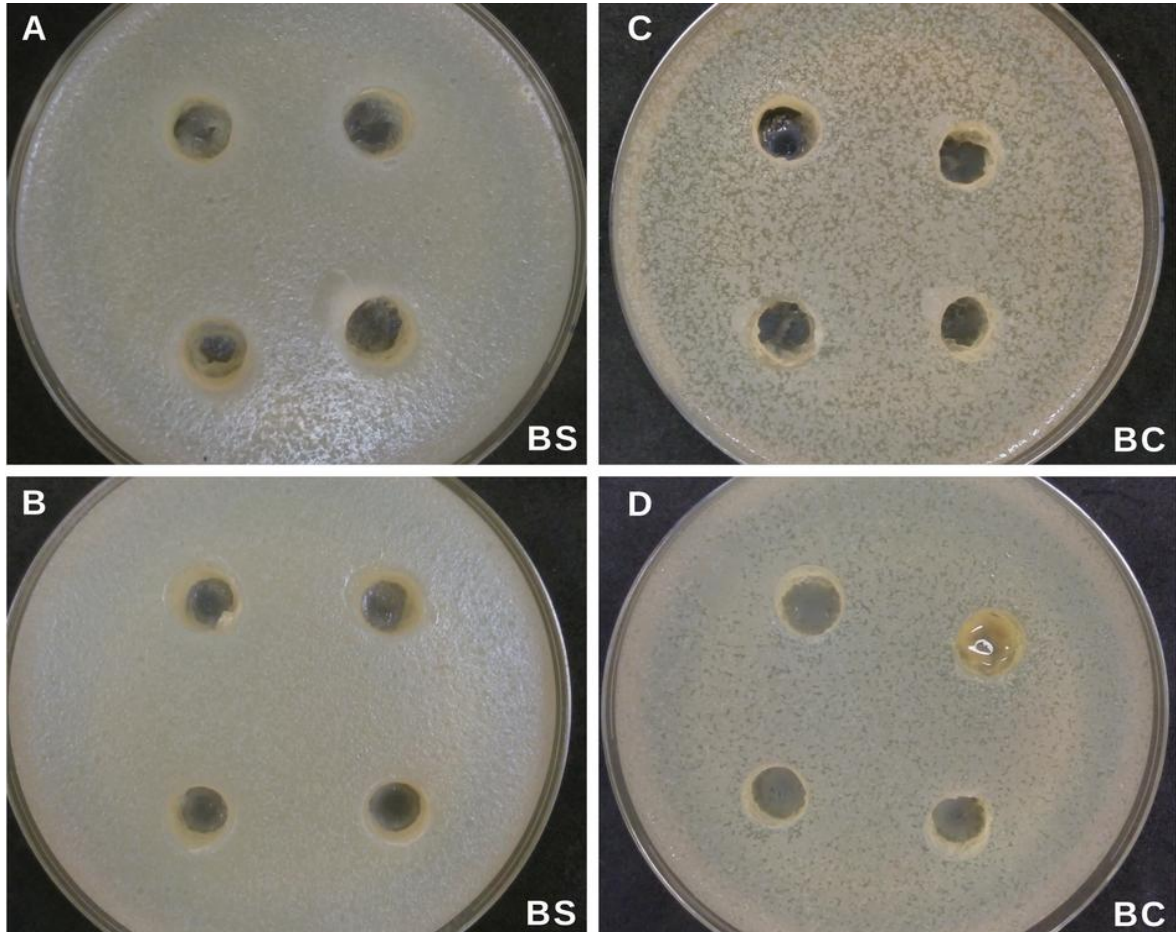
4.4 Stanovenie antimikrobiálnej aktivity vybraných extraktov

U vzoriek s najvyššími hodnotami daných bioaktívnych látok bol difúznou jamkovou metódou sledovaný ich potenciálny antimikrobiálny účinok voči vybraným mikroorganizmom. Príklady antibakteriálneho pôsobenia niektorých extraktov zobrazujú Obrázky 30–32.

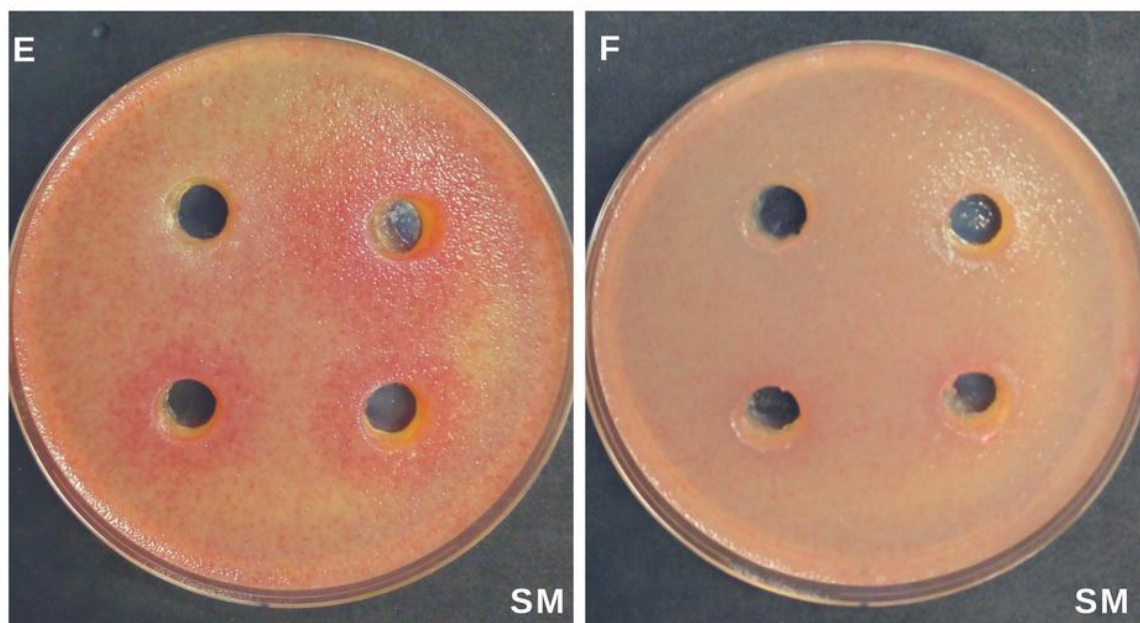
Na základe výsledku experimentu možno tvrdiť, že testované extrakty nemali v danej koncentrácii a objemovom množstve žiaden inhibičný účinok voči bakteriálnym kmeňom *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Serratia marcescens*. V prípade gramnegatívnej baktérie *Serratia marcescens* niektoré extrakty dokonca podporovali jej rast, čo sa prejavilo utvorením rastových zón v okolí vyhlbených jamiek. Vznik inhibičnej zóny o veľkosti 19,5 mm bol pozorovaný len u mikroorganizmu *Micrococcus luteus*, a to po aplikácii vodného výluhu z feniklového čaju. Pre ostatné extrakty bol preukázaný negatívny antimikrobiálny účinok.

Výsledky experimentov iných autorov naznačujú, že feniklový esenciálny olej vykazuje silný inhibičný účinok voči rôznym zástupcom bakteriálneho rodu *Bacillus*. Vo všeobecnosti pôsobí esenciálny olej efektívnejšie proti grampozitívnym baktériám, v porovnaní s tými gramnegatívnymi [78]. Čo sa týka antimikrobiálnej účinnosti feniklových extraktov, dosiahnuté výsledky sú rôzne. Líšia sa pravdepodobne z dôvodu použitia rôznych extrakčných techník a činidiel, ale i použitej metódy stanovenia antimikrobiálnej aktivity. V experimente *Khana* boli vodné i metanolové extrakty feniklových semien účinné proti

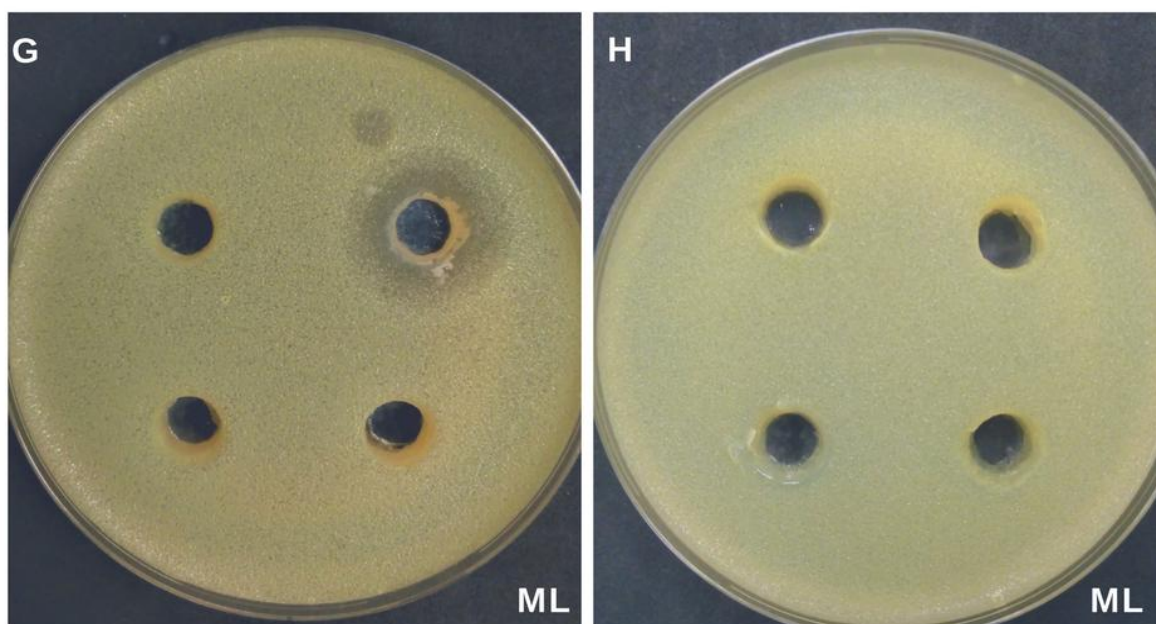
bakteriálnemu kmeňu *Bacillus subtilis*, no negatívny inhibičný účinok vykazovali proti *Bacillus cereus* a *Micrococcus luteus*. Sledovaním antimikrobiálneho účinku extraktov na rôzne mikroorganizmy bolo potvrdené, že vodné extrakty majú väčšiu antimikrobiálnu aktivitu ako metanolové [79]. Štúdia *M. Nourimanda* zas preukázala, že etanolové extrakty semien nemajú žiadny efekt na testované grampozitívne mikroorganizmy, a len nízky účinok voči analyzovaným gramnegatívnym baktériám [80].



Obrázok 30: Ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity vybraných extraktov voči bakteriálnym kmeňom *Bacillus subtilis* a *Bacillus cereus*: A – vodné maceráty, B – 20% etanol, C – 60% etanol, D – vodné výluhy.



Obrázok 31: Ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity vybraných extraktov voči bakteriálnemu kmeňu *Serratia marcescens*: E – etanolové maceráty, F – vodné maceráty



Obrázok 32: Ukážka sledovania antimikrobiálnej aktivity vybraných extraktov voči bakteriálnemu kmeňu *Micrococcus luteus*: G – vodné výluhy, H – 80% etanol.

5 ZÁVER

Cieľom práce bolo pripraviť extrakty čaju, celého a drveného korenia feniklu a stanoviť v nich obsah celkových polyfenolov a flavonoidov. Testované boli vodné výluhy, vodné a etanolové maceráty, a maceráty o štyroch rôznych koncentráciách etanolu (20 %, 40 %, 60 %, 80 %). U vzoriek s najvyššími hodnotami daných bioaktívnych látok bola zistená antioxidantná aktivita a sledovaný bol ich potenciálny antimikrobiálny účinok voči vybraným mikroorganizmom *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*.

Pre všetky analyzované extrakty s rastúcim časom extrakcie rástla aj koncentrácia polyfenolov vo vzorkách. V prípade vodných a etanolových macerátov bol však pozorovaný nárast len veľmi mierny. Konečné hodnoty obsahu polyfenolov v jednotlivých macerátoch sa v závislosti na použítom rozpúšťadle takisto priveľmi nelíšili, s výnimkou vzorky čaju, pre ktorú sa ako lepšie extrakčné činidlo osvedčila voda. Sledovaním vplyvu štyroch rôznych koncentrácií etanolu na účinnosť extrakcie možno tvrdiť, že etanol o koncentracii 40 % a 60 % je na extrakciu polyfenolov zo vzoriek fenikla účinnejším činidlom ako etanol o koncentracii 20 % a 80 %. Porovnaním hodnôt koncentrácií polyfenolov celého a drveného korenia možno pozorovať, že vo všetkých prípadoch bolo vyššej účinnosti extrakcie dosiahnutej u drveného korenia, a to pravdepodobne z dôvodu väčšej povrchovej plochy umožňujúcej lepšiu difúziu rozpúšťadla matricou. Z pomedzi všetkých sledovaných vzoriek najviac polyfenolov obsahoval sedemdnňový vodný macerát čaju, a to 1,096 gGAL/l.

Obdobne ako v prípade polyfenolov, s rastúcim časom extrakcie rástla aj koncentrácia flavonoidov v analyzovaných vzorkách. Koncentrácie stanovovanej látky vodných a etanolových macerátov však opäť vzrastali len veľmi mierne. Pre vzorky celého a drveného korenia sa viac flavonoidov vyextrahovalo použitím etanolu, v prípade vzoriek čaju vykazovali obe rozpúšťadlá, voda i etanol, približne rovnakú účinnosť extrakcie. Porovnaním extrakčných kriviek celého a drveného korenia možno opäť pozorovať, že lepšej účinnosti extrakcie flavonoidov bolo dosiahnutej u extraktov s rozrušenou štruktúrou semien. Z pomedzi všetkých sledovaných vzoriek najviac flavonoidov obsahoval vodný výluh drveného korenia, a to 0,497 gKAT/l.

Celková antioxidantná aktivita bola stanovená len u vybraných vzoriek čaju, celého a drveného korenia feniklu s najvyššími hodnotami polyfenolov a flavonoidov. Z pomedzi všetkých sledovaných vzoriek boli najvyššie hodnoty antioxidantnej aktivity namerané u vodného macerátu drveného korenia, najmenej u 80% etanolového macerátu celého korenia. Porovnaním hodnôt antioxidantnej aktivity vodných a etanolových macerátov možno sledovať, že lepšiu účinnosť extrakcie antioxidantných látok vykazovala voda. Na rozdiel od stanovenia polyfenolov a flavonoidov, u vzoriek s rozrušenou štruktúrou semien fenikla nebola vo všetkých prípadoch detegovaná vyššia celková antioxidantná kapacita v porovnaní s extraktmi celého korenia.

V neposlednej rade bol u vzoriek s najvyššími hodnotami daných bioaktívnych látok sledovaný ich potenciálny antimikrobiálny účinok. Testované extrakty nemali v danom objemovom množstve a koncentracii žiaden inhibičný účinok voči bakteriálnym kmeňom *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Serratia marcescens*. V prípade baktérie *Serratia marcescens* niektoré extrakty naopak obsahovali látky podporujúce jej rast, čo sa prejavilo zvýšeným nárastom kolónií v okolí jamiek s extraktmi. Vznik inhibičnej zóny o veľkosti

19,5 mm bol pozorovaný len u mikroorganizmu *Micrococcus luteus*, a to po aplikácii vodného výluhu z feniklového čaju. Pre ostatné extrakty bol antimikrobiálny účinok negatívny.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] PAMUKOV, D. P. a Ch. Z. *Prírodná lekárň.* 3. Banská Bystrica: Príroda, 1986. ISBN 80-07-00494-7.
- [2] PARTHASARATHY, V. A., B. CHEMPAKAM a T. John. ZACHARIAH. *Chemistry of spices.* Cambridge, MA: CABI Pub., c2008. ISBN 978-184-5934-057.
- [3] Fenikel obyčajný. In: *JustNahrin* [online]. 2018 [cit. 2018-01-04]. Dostupné z: <https://www.justnahrin.sk/bylina/fenikel-obycajny>
- [4] DIAO, Wen-Rui, Qing-Ping HU, Hong ZHANG a Jian-Guo XU. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* [online]. 2014, 35(1), 109-116 [cit. 2018-01-06]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.06.056. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513003393>
- [5] COŞGE, Belgin, Mustafa KIRALAN a Bilal GÜRBÜZ. Characteristics of fatty acids and essential oil from sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. dulce) and bitter fennel fruits (*F. vulgare* Mill. var. vulgare) growing in Turkey. *Natural Product Research* [online]. 2008, 22(12), 1011-1016 [cit. 2018-01-06]. ISSN 1478-6419. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786410801980675>
- [6] SAYED-AHMAD, Bouchra, Thierry TALOU, Zeinab SAAD, Akram HIJAZI a Othmane MERAH. The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial Crops and Products* [online]. 2017, 109, 661-671 [cit. 2018-01-06]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.09.027. ISSN 09266690. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669017306258>
- [7] ALBERT-PULEO, Michael. Fennel and anise as estrogenic agents. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 1980, 2 (4), 337-344 [cit. 2018-01-09]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874180810154>
- [8] SENATORE, Felice, Filomena OLIVIERO, Elia SCANDOLERA, Orazio TAGLIALATELA-SCAFATI, Graziana ROSCIGNO, Massimo ZACCARDELLI a Enrica DE FALCO. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. vulgare var. azoricum (Mill.) Thell]. *Fitoterapia* [online]. 2013, 90, 214-219 [cit. 2018-01-14]. DOI: 10.1016/j.fitote.2013.07.021. ISSN 0367326x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X13002049>
- [9] LEE, Hoi-Seon. Acaricidal Activity of Constituents Identified in *Foeniculum vulgare* Fruit Oil against *Dermatophagoides* spp. (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, 52(10), 2887-2889 [cit. 2018-01-09]. DOI: 10.1021/jf049631t. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf049631t>
- [10] GORI, L., E. GALLO, V. MASCHERINI, A. MUGELLI, A. VANNACCI a F. FIRENZUOLI. Can Estragole in Fennel Seed Decoctions Really Be Considered a Danger for Human Health? A Fennel Safety Update. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2012, 2012, 1-10 [cit. 2018-01-

- 14]. DOI: 10.1155/2012/860542. ISSN 1741-427x. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/860542/>
- [11] TIWARI, Ruby a C.S. RANA. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science* [online]. 2015, 3(5), 661-670 [cit. 2018-01-17]. ISSN 2091-2730. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/282733096_Plant_secondary_metabolites_a_review
- [12] WINK, Michael. *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1999. ISBN 978-084-9340-857
- [13] Edited by AKSEL BERNHOFT. *Bioactive compounds in plants - benefits and risks for man and animals. Proceedings from a symposium held in Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, 13 - 14 November 2008*. Oslo: Novus Forlag, 2010. ISBN 978-827-0995-837.
- [14] MAZID, M., T.A. KHAN a F. MOHAMMAD. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* [online]. 2011, 3(2), 232-249 [cit. 2018-01-22]. ISSN 09748369. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/open-access/role-of-secondary-metabolites-in-defense-mechanisms-of-plants-0974-8369-3-128.pdf>
- [15] YADAV, N., R. YADAV a A. GOYAL. Chemistry of Terpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* [online]. 2014, 27(2), 272-278 [cit. 2018-01-22]. Dostupné z: <http://globalresearchonline.net/journalcontents/v27-2/45.pdf>
- [16] TAIZ, Lincoln a Eduardo ZEIGER. *Plant Physiology and Development*. 6. Oxford University Press: Sinauer Associates, 2014. ISBN 9781605352558.
- [17] SELL, Charles. *A fragrant introduction to terpenoid chemistry* [online]. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, c2003 [cit. 2018]. ISBN 978-085-4046-812. Dostupné z: <https://books.google.sk/books?id=ZGwoDwAAQBAJ&dq=terpenes+and+terpenoids&hl=sk>
- [18] HOPKINS, William G. a Norman P. A. HÜNER. *Introduction to plant physiology*. 4th ed. Hoboken, NJ: Courier/Kendallville, 2008. ISBN 978-0-470-24766-2.
- [19] WANI, Shabir H., Vinay KUMAR, Varsha SHRIRAM a Saroj Kumar SAH. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* [online]. 2016, 4(3), 162-176 [cit. 2018-01-22]. DOI: 10.1016/j.cj.2016.01.010. ISSN 22145141. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214514116300228>
- [20] ROBINSON, Trevor. *The Biochemistry of Alkaloids*. 2th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981. ISBN 978-366-2010-150.
- [21] LATTANZIO, Vincenzo. Phenolic Compounds: Introduction. *Natural Products* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, 2013-5-15, , 1543-1580 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1007/978-3-642-22144-6_57. ISBN 978-3-642-22143-9. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-22144-6_57
- [22] OCAKOGLU, Derya, Figen TOKATLI, Banu OZEN a Figen KOREL. Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra

- virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry* [online]. 2009, 113(2), 401-410 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.057. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608008789>
- [23] BALASUNDRAM, Nagendran, Kalyana SUNDRAM a Samir SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* [online]. 2006, 99(1), 191-203 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605006242>
- [24] MUNAGALA, Radha, Farrukh AQIL, Jeyaprakash JEYABALAN, et al. Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types. *Cancer Letters* [online]. 2017, 393, 94-102 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.02.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383517301040>
- [25] MIADOKOVÁ, Eva. Isoflavonoids — an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2009, 2(4), - [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.2478/v10102-009-0021-3. ISSN 1337-9569. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/intox.2009.2.issue-4/v10102-009-0021-3/v10102-009-0021-3.xml>
- [26] CAROCHO, Márcio a Isabel C.F.R. FERREIRA. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2013, 51, 15-25 [cit. 2017-11-21]. DOI: 10.1016/j.fct.2012.09.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512006941>
- [27] MINÁRIK, Peter a Tatiana KIMÁKOVÁ. Antioxidanty a ich úloha pri prevencii a liečbe rakoviny. *Praktické lekárnictvo* [online]. 2016, 6(1), 22-28 [cit. 2017-11-24]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/dbe5445f9c9cbff5ef65a142292f955a.pdf>
- [28] RADÁK, Zsolt. *Free radicals in exercise and aging* [online]. Champaign, IL: Human Kinetics, 2000, s. 265 [cit. 2017-11-24]. ISBN 0-88011-881-4. Dostupné z: https://books.google.sk/books?id=3TVElvqqR5EC&dq=free+radicals&hl=sk&source=gbs_navlinks_s
- [29] ARCHIBONG, Anthony E., et al., Oxidative stress in reproductive toxicology. *Current Opinion in Toxicology* [online]. 2018, 7, 95-101 [cit. 2017-11-24]. DOI: 10.1016/j.cotox.2017.10.004. ISSN 24682020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468202017301201>
- [30] MAO, Xiangbing, Changsong GU, Daiwen CHEN, Bing YU a Jun HE. Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. *Oncotarget* [online]. 2017, 8(46), 81649-81661 [cit. 2017-11-24]. DOI: 10.18632/oncotarget.20887. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/20887>
- [31] KOROVILA, Ioanna, Martín HUGO, José Pedro CASTRO, Daniela WEBER, Annika HÖHN, Tilman GRUNE a Tobias JUNG. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biology* [online]. 2017, 13, 550-567 [cit. 2017-11-24]. DOI: 10.1016/j.redox.2017.07.008. ISSN 22132317. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231716304694>
- [32] SHAHIDI, Fereidoon. *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*. Champaign, Ill.: AOCS Press, 1997. ISBN 09-353-1577-2.

- [33] PACKER, Lester. a Jürgen FUCHS. *Vitamin C in health and disease* [online]. New York: M. Dekker, 1997 [cit. 2017-12-06]. ISBN 978-082-4793-135. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=4nODCOzu2n8C&dq=vitamin+C&hl=sk&source=gbs_navlinks_s
- [34] SINGH, Biswajit K., Shyam S. VERMA, Namrata DWIVEDI a Rama P. TRIPATHI. L-Ascorbic acid in organic synthesis. *Current Organic Chemistry* [online]. 2009, (13), 99-122 [cit. 2017-12-07]. Dostupné z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.529.7411&rep=rep1&type=pdf>
- [35] ZHANG, Yuyang. *Ascorbic acid in plants: biosynthesis, regulation and enhancement*. New York: Springer, c2013. SpringerBriefs in plant science. ISBN 978-146-1441-274.
- [36] Předpis č. 225/2008 Sb.: Vyhláška, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin. In: *Zákony pro lidi* [online]. AION CS, 2010 [cit. 2017-12-06]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-225>
- [37] SILENCIO BARRITA, Jos Luis a Mara del Socorro SANTIAGO SNCHEZ. Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants* [online]. InTech, 2013 [cit. 2017-12-06]. DOI: 10.5772/52181. ISBN 978-953-51-1123-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/antioxidant-role-of-ascorbic-acid-and-his-protective-effects-on-chronic-diseases>
- [38] TAN, B., R. R. WATSON a V. R. PREEDY. *Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2013. ISBN 978-143-9884-416.
- [39] EDITED BY BALZ FREI. *Natural antioxidants in human health and disease*. San Diego: Academic Press, 1994. ISBN 978-008-0571-683.
- [40] FLETCHER, Robert H. a Kathleen M. FAIRFIELD. Vitamins for Chronic Disease Prevention in Adults. *JAMA* [online]. 2002, 287(23), 3116-3126 [cit. 2017-12-20]. DOI: 10.1001/jama.287.23.3116. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.287.23.3116>
- [41] ŠIVEL, M., B. KLEJDUS, S. KRÁČMAR a V. KUBÁŇ. LUTEIN – VÝZNAMNÝ KAROTENOID VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA. *Chemické listy* [online]. 2013, 107, 456-463 [cit. 2017-12-31]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_06_456-463.pdf
- [42] KACZOR, Agnieszka a Malgorzata BARANSKA. *Carotenoids: nutrition, analysis and technology* [online]. Hoboken, New Jersey: Wiley/Blackwell, 2016 [cit. 2017-12-31]. ISBN 978-111-8622-261. Dostupné z: <https://books.google.sk/books?id=F3djCwAAQBAJ&dq=carotenoids&hl=sk>
- [43] VALKO, M., C.J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC a M. MAZUR. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2006, 160 (1), 1-40 [cit. 2017-12-31]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279705004333>
- [44] YASUTAKE, Yuichi, Kengo TOMITA, Masaaki HIGASHIYAMA, et al. Uric acid ameliorates indomethacin-induced enteropathy in mice through its antioxidant

- activity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2017, 32(11), 1839-1845 [cit. 2018-01-03]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jgh.13785>
- [45] KURHAJEC, S., D. SABADKOVÁ, A. FRANČIĆ a D. VETČHÝ. Extrakty ako moderná lieková forma pre prírodné liečivá. *Chemické listy* [online]. 2017, 111(4), 251-257 [cit. 2017-11-02]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2017_04_251-257.pdf
- [46] PANDEY, A. a S. TRIPATHI. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* [online]. 2014, 2(5), 115-119 [cit. 2017-11-02]. ISSN 2278-4136.
- [47] AZMIR, J., et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* [online]. 2013, 117, 426-436 [cit. 2017-11-03].
- [48] DEVGUN, Manish, Arun NANDA a Shahid H. ANSARI. Comparison of conventional and non conventional methods of extraction of heartwood of *Pterocarpus marsupium* Roxb. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* [online]. 2012, 69(3), 475-485 [cit. 2017-11-03].
- [49] ORIO, Laura, Giancarlo CRAVOTTO, Arianna BINELLO, Giuseppe PIGNATA, Silvana NICOLA a Farid CHEMAT. Hydrodistillation and *in situ* microwave-generated hydrodistillation of fresh and dried mint leaves: a comparison study. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2012, 92(15), 3085-3090 [cit. 2017-11-06]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.5730>
- [50] SILVA, L.V., D.L. NELSON, M.F.B. DRUMMOND, L. DUFOSSÉ a M.B.A. GLÓRIA. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International* [online]. 2005, 38(8-9), 1087-1096 [cit. 2017-11-06]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996905001213>
- [51] WANG, Lijun a Curtis L. WELLER. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science* [online]. 2006, 17(6), 300-312 [cit. 2017-11-07]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405003559>
- [52] Soxhlet extractor. In: *Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary* [online]. Split, 2017 [cit. 2017-11-07]. Dostupné z: <https://glossary.periodni.com/>
- [53] SASIDHARAN, S., Y. CHEN, D. SARAVANAN, K.M. SUNDRAM a L. YOGA LATHA. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plant's extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* [online]. 2011, 8(1), 1-10 [cit. 2017-11-05].
- [54] POURMORTAZAVI, Seied Mahdi a Seiedeh Somayyeh HAJIMIRSADEGHI. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1163(1-2), 2-24 [cit. 2017-11-09]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307010229>
- [55] BERTOLI, A., B. RUFFONI, L. PISTELLI a L. PISTELLI. Analytical Methods for the Extraction and Identification of Secondary Metabolite Production in 'In Vitro' Plant Cell Cultures. In: *Bio-Farms for Nutraceuticals* [online]. Boston, MA: Springer US, 2010, s. 250-266 [cit. 2017-11-09]. Advances in Experimental Medicine and Biology. ISBN 978-1-4419-7346-7. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-7347-4_19

- [56] STARMANS, Dick A.J. a Herry H. NIJHUIS. Extraction of secondary metabolites from plant material: A review. *Trends in Food Science* [online]. 1996, 7(6), 191-197 [cit. 2017-11-09]. DOI: 10.1016/0924-2244(96)10020-0. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224496100200>
- [57] RODRIGUES, Giovana de Menezes, Bruna Tais Ferreira de MELLO, Vitor Augusto DOS SANTOS GARCIA a Camila da SILVA. Ultrasound-assisted extraction of oil from macauba pulp using alcoholic solvents. *Journal of Food Process Engineering* [online]. 2017, 40(5), e12530- [cit. 2017-11-14]. DOI: 10.1111/jfpe.12530. ISSN 01458876. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jfpe.12530>
- [58] PEREIRA, Marlene G., Fabiane HAMERSKI, Eriel F. ANDRADE, Agnes de P. SCHEER a Marcos L. CORAZZA. Assessment of subcritical propane, ultrasound-assisted and Soxhlet extraction of oil from sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis) seeds. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2017, 128, 338-348 [cit. 2017-11-14]. DOI: 10.1016/j.supflu.2017.03.021. ISSN 08968446. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089684461730044X>
- [59] ZHANG, Hua-Feng, Xiao-Hua YANG a Ying WANG. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2011, 22(12), 672-688 [cit. 2017-11-20]. DOI: 10.1016/j.tifs.2011.07.003. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441100149X>
- [60] CHEMAT, Farid a Giancarlo CRAVOTTO. Microwave-assisted extraction for bioactive compounds theory and practice [online]. New York: Springer, 2013 [cit. 2017-11-20]. ISBN 978-146-1448-303. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=8MA8SWRDVVMC&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [61] VISCARRA ROSSEL, R.A., D.J.J. WALVOORT, A.B. MCBRATNEY, L.J. JANIK a J.O. SKJEMSTAD. Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. *Geoderma* [online]. 2006, 131(1-2), 59-75 [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016706105000728>
- [62] TISSUE, Brian M. Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy. *Characterization of Materials* [online]. Hoboken, NJ, USA, 2002, 2002-10-15 [cit. 2018-02-12]. ISBN 0471266965. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471266965.com059>
- [63] ROVER, Marjorie R. a Robert C. BROWN. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [online]. 2013, 104, 366-371 [cit. 2018-02-12]. ISSN 01652370. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165237013001411>
- [64] VÁBKOVÁ, J. a J. NEUGEBAUEROVÁ. Determination of total phenolic content, total flavonoid content and frap in culinary herbs in relation to harvest time. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel.* [online]. 2012, LX(1), 167-172 [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: https://acta.mendelu.cz/media/pdf/actaun_2012060010167.pdf
- [65] PEKAL, Anna a Krystyna PYRZYNSKA. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* [online].

- 2014, 7(9), 1776-1782 [cit. 2018-02-12]. DOI: 10.1007/s12161-014-9814-x. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-014-9814-x>
- [66] RUBIO, Camila Peres, Josefa HERNÁNDEZ-RUIZ, Silvia MARTINEZ-SUBIELA, Asta TVARIJONAVICIUTE a José Joaquin CERON. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Veterinary Research* [online]. 2016, 12(1), - [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0792-7>
- [67] PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ a E. TÁBORSKÁ. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické listy* [online]. 2004, 98, 174 – 179 [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf
- [68] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2016, 6(2), 71-79 [cit. 2018-02-16]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>
- [69] Výukový materiál PŘF, MU, *Praktikum z obecné biologie. Biologicky aktivní látky. Stanovení citlivosti k antibiotikům Stanovení koncentrace antibiotik.* Dostupné 16.2.2018 z <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/Bi4091c/um/>
- [70] BURSOVÁ, Š., R. KARPÍŠKOVÁ, M. DUŠKOVÁ a L. NECIDOVÁ. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení I.: Obecná mikrobiologie.* 2. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-683-4.
- [71] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2009, 49 (11), 1749-1755 [cit. 2018-02-16]. DOI: 10.1086/647952. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/647952>
- [72] Fenykl čaj bio 20 g porcovaný bez přebalu. In: *Sonnentor* [online]. 2018 [cit. 2018-02-17]. Dostupné z: <https://www.sonnentor.com/cs-cz/eshop/caje/jednodruhove-caje/fenykl-caj-bio-porcovany-bez-prebalu>
- [73] FENYKL CELÝ. In: *DAFO koření* [online]. 2018 [cit. 2018-02-17]. Dostupné z: <http://www.prodej-koreni.cz/jednodruhova-koreni/200-fenykl-cely.html>
- [74] SCHAECHTER, Moselio. *Desk encyclopedia of microbiology.* 2nd ed. Oxford, UK: Academic Press/Elsevier, 2009. ISBN 978-008-0961-286.
- [75] Cupáková Š., L. Necidová a R. Karpíšková. Výukový materiál VFU. *Bakteriální původci alimentárních onemocnění.* Dostupné 26.2.2018 z <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/>
- [76] BEDNÁŘ, M., V. FRAŇKOVÁ, J. VÁNA. *Lékařská mikrobiologie.* Narvil 1996, 558 s.
- [77] MOSIO, Petra. *Atlas bakterií.* Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. ISBN 978-80-7395-467-3.
- [78] DIAO, Wen-Rui, Qing-Ping HU, Hong ZHANG a Jian-Guo XU. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* [online]. 2014, 35(1), 109-

116 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.06.056. ISSN 09567135. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513003393>

- [79] NT, Khan. In vitro Antibacterial Activity of *Foeniculum vulgare* Seed Extract. *Agrotechnology* [online]. 2017, 06(02), - [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.4172/2168-9881.1000162. ISSN 21689881. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/open-access/in-vitro-antibacterial-activity-of-foeniculum-vulgare-seed-extract-2168-9881-1000162.php?aid=91927>
- [80] NOURIMAND, Maryam, Sasan MOHSENZADEH a Jaime A. TEIXEIRA DA SILVA. Antimicrobial Screening of Fennel at the Seedling Stage. *Journal of Medicinal Plants and By-products* [online]. 2012, 1(1), 75-77 [cit. 2018-03-23]. Dostupné z: <http://www.sid.ir/En/Journal/ViewPaper.aspx?ID=278109>

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

pH	potential of hydrogen – potenciál vodíku
UV	ultrafialové žiarenie
ROS	Reactive oxygen species – reaktívne formy kyslíka
RNS	Reactive nitrogen species – reaktívne formy dusíka
NRP	non-radical products – neradikálové produkty
LOO [•]	peroxylový radikál
AH	antioxidant
SFE	Supercritical fluid extraction – supekritická fluidná extrakcia
T_k	kritická teplota
p_k	kritický tlak
UAE	Ultrasound assisted extraction – extrakcia podporovaná ultrazvukom
MAE	Microwave assisted extraction – extrakcia podporovaná mikrovlnným žiarením
DMSO	dimetylsulfoxid
DMF	dimetylformamid
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
DPPH	(1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl)
ORAC	The oxygen radical absorbance capacity
FRAP	Ferric reducing ability of plasma
CUPRAC	Cupric reducing antioxidant capacity
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolín-6-sulfónová kyselina)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
BS	<i>Bacillus subtilis</i>
BC	<i>Bacillus cereus</i>
SM	<i>Serratia marcescens</i>
ML	<i>Micrococcus luteus</i>