

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ
CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA PŘÍRODNÍCH
POLYFENOLŮ**
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

KAMILA ZIMANOVÁ
Biologie se zaměřením na vzdělání

Vedoucí práce: RNDr. Pavel Vlach, Ph.D.

Plzeň, 2023

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni dne 28.4. 2023

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla nejprve poděkovat RNDr. Pavlu Vlachovi, Ph.D., za ochotu během konzultací při psaní této kvalifikační práce, trpělivost a za pomoc při zpracování dat. Dále bych také chtěla poděkovat RNDr. Karlu Martínkovi, Ph.D., za poskytnutí čistých bakteriálních kultur a pracovníkům Gymnázia a SOŠ Rokycany za poskytnutí laboratoře a laboratorního vybavení. Děkuji také Ing. Janu Hrdličkovi, Ph.D., za propůjčení potřebných chemikálií a v neposlední řadě děkuji také celé své rodině za neskutečnou podporu nejen při psaní této kvalifikační práce, ale při celém studiu.

OBSAH

KLÍČOVÁ SLOVA.....	3
ÚVOD.....	4
1 ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA.....	6
2 PŘÍRODNÍ POLYFENOLY	7
2.1 FENOLOVÉ KYSELINY.....	8
2.2 FLAVONOIDY.....	10
2.2.1 Flavony.....	10
2.2.2 Flavonoly.....	12
2.2.3 Flavanoly.....	13
2.2.4 Flavanony.....	14
2.2.5 Anthokyanidiny.....	15
2.2.6 Isoflavony.....	16
2.3 STILBENY	18
2.4 LIGNANY	19
3 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ	21
3.1 ČAJOVNÍK ČÍNSKÝ.....	21
3.2 RÉVA VINNÁ.....	22
4 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ	24
4.1 ESCHERICHIA COLI.....	24
4.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS	26
4.3 BACILLUS SUBTILIS.....	27
5 MATERIÁL A METODY.....	29
5.1 METODY EXTRAKCE POLYFENOLŮ	29
5.1.1 Extrakce polyfenolů z červených hroznů révy vinné	29
5.1.1.1 Metoda přípravy adhezni pryskyřice.....	29
5.1.1.2 Metoda izolace polyfenolů.....	30
5.1.2 Extrakce polyfenolů ze zeleného čaje	30
5.2 METODY MIKROBIOLOGICKÝCH PRACÍ.....	31
5.2.1 Diluční metoda	31
5.2.1.1 Příprava živného roztoku a inokula.....	32
5.2.1.2 Příprava McFarlandových standardů.....	32
5.2.1.3 Postup zjištění MIC diluční metodou.....	32
5.3 ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT.....	33
6 VÝSLEDKY	34
6.1 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK ZÍSKANÝCH POLYFENOLŮ	34
6.1.1 Polyfenolové extrakce z červených hroznů révy vinné.....	34
.....	35
6.1.2 Polyfenolové extrakce ze zeleného čaje.....	36
7 DISKUSE.....	38
ZÁVĚR	41
RESUMÉ.....	42
CIZOJAZYČNÉ RESUMÉ.....	43
SEZNAM LITERATURY	44
INTERNETOVÉ ZDROJE.....	55
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ.....	56
SEZNAM ZDROJŮ OBRÁZKŮ.....	57
8 PŘÍLOHY	I
8.1 NAVÁZANÉ POLYFENOLY Z ČERVENÝCH HROZNŮ NA ADHEZNI PRYSKYŘICI	I
8.2 ROZTOK ETHYLACETÁTU S NAVÁZANÝMI POLYFENOLY ZE ZELENÉHO ČAJE	I

8.3	VYEXTRAHOVANÉ POLYFENOLY Z ČERVENÝCH HROZNŮ	II
8.4	VYEXTRAHOVANÉ POLYFENOLY ZE ZELENÉHO ČAJE	II
8.5	INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ Z ČERVENÝCH HROZNŮ NA <i>S. AUREUS</i>	III
8.6	INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ Z ČERVENÝCH HROZNŮ NA <i>B. SUBTILIS</i>	III
8.7	INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ Z ČERVENÝCH HROZNŮ NA <i>E. COLI</i>	III
8.8	INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ ZE ZELENÉHO ČAJE NA <i>S. AUREUS</i>	IV
8.9	INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ ZE ZELENÉHO ČAJE NA <i>B. SUBTILIS</i>	IV
8.10	INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ ZE ZELENÉHO ČAJE NA <i>E. COLI</i>	IV

KLÍČOVÁ SLOVA

Polyfenoly, antibakteriální aktivita, minimální inhibiční koncentrace, diluční metoda, metoda liquid-liquid, réva vinná, čajovník čínský, bakterie.

Úvod

Objev antibiotik a jejich zavedení do běžné praxe znamenaly značný pokrok v medicíně. Náhle bylo možné účinně léčit bakteriální infekce, a to i v případě velmi závažných onemocnění, které byly až životu ohrožující (Jindrák 2014). Antibiotika měla blahodárné účinky po celém světě. V rozvojových zemích, kde je hygiena stále špatná, snižují antibiotika nemocnost a úmrtnost způsobenou infekcemi přenášenými potravinami a dalšími infekcemi souvisejícími s chudobou (Ventola 2015).

Vzhledem k jejich širokému spektru použití se antibiotika podávají ale i při běžných, nezávažných onemocnění, které dokáže spontánně zvládnout přirozená obranyschopnost organismu (Jindrák 2014). Nesprávně předepisovaná antibiotika mají sporný léčebný přínos a vystavují pacienty možným komplikacím antibiotické terapie (Ventola 2015).

Na základě masového užívání a zneužívání antibiotik, jsou antibiotika, kromě jiných nežádoucích účinků, spojeny se vznikem perzistentních, rezistentních mikroorganismů (Melter 2021). Epidemiologické studie prokázaly přímou souvislost mezi konzumací antibiotik a vznikem a šířením rezistentních kmenů bakterií (Ventola 2015).

Perzistence bakterií vůči antibiotikům je jev, kdy celá kolonie bakterií je odolná vůči podávanému antibiotiku. Perzistence se liší od rezistence tím, že vznik perzistentních buněk není geneticky podmíněn, ale perzistentní buňky vznikají spontánně nebo indukovaně (Melter 2021). V klinické praxi neexistuje antibiotikum, které by bylo pro náš organismus naprosto neškodné, protože žádné antibiotikum není tělu vlastní (Beneš 2018).

Aby došlo k prevenci vzniku a šíření mikrobiální rezistence nebo perzistence na antibiotika, je třeba omezit jejich užívání a případně doplnit léčbu přírodními látkami vykazující antibakteriální aktivitu.

Mimo jiné mnoho farmaceutických společností se vzdalo výzkumu objevování nových antimikrobiálních léků. To je částečně dáno tím, že výroba antibiotik je, jak časově náročný, tak i finančně nákladný proces, který může trvat mnoho let a vyžaduje velké investice (Součková et al. 2016). Často lze ale dosáhnout totožného léčivého efektu i levnějším preparátem, mezi které můžeme právě řadit i polyfenoly, látky přírodní povahy s antibakteriálním účinkem.

Tyto polyfenolické sloučeniny jsou rozmanitou skupinou molekul, které se obvykle dělí na flavonoidy a ne-flavonoidy a dále je možné je rozdělit do několika podskupin v závislosti

na jejich oxidačním stavu. I přesto, že tato chemická klasifikace je poměrně jasná, literatura je často matoucí v prezentaci zdravotních účinků polyfenolů (Albuquerque et al. 2013).

Hlavním cílem této kvalifikační práce je proto poskytnout aktualizovaný přehled účinků polyfenolů jako antibakteriálních látek, možnosti využití antimikrobiální účinků přírodních extraktů. Cílem experimentální části je stanovení antibakteriální aktivity vybraných rostlinných přírodních extraktů vůči vybraným mikroorganismům, kterými jsou *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*.

1 ANTIBAKTERIÁLNÍ AKTIVITA

Již ve 20. letech minulého století objevil lékař Alexander Flemming účinek látky pronikající do agaru kolem náhodně vyrostlé plísně *Penicilium notatum* na kolonie stafylokoků. Na tomto principu se dodnes ověřuje antibakteriální aktivita látek (Bednář et al. 1996).

Základní vlastností látek s antibakteriální aktivitou je splnění kritéria selektivní toxicity (Bednář et al. 1996). To znamená, že hostitelský eukaryotní organismus nesmí být nijak poškozen, zatímco látka s antibakteriální aktivitou inhibuje růst, vývoj a množení mikroorganismu. Je proto možné tyto látky definovat jako látky, které selektivně poškozují struktury nebo metabolismus prokaryotických buněk bez ovlivnění buněk eukaryotických (Beneš 2018).

Antibakteriální účinek látky spočívá v zásahu do některého metabolického děje v bakteriální buňce (Štefan 2019). Látky mohou mít účinek bakteriostatický nebo baktericidní účinek. O bakteriostatický účinek se jedná pouze, když dojde inhibici růstu a množení bakterií. Jestliže látky mají baktericidní účinek, jedná se o usmrcení mikroorganismu (Bednář et al. 1996).

Účinek antibakteriální aktivity se hodnotí pomocí tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC je taková koncentrace antibiotika, která je ještě schopna inhibovat růst bakterie během kultivace v laboratoři. Čím je nižší hodnota MIC, tím je účinnější antibiotikum. Z tvrzení vyplývá, že stačí malé množství antibiotika, aby byl zastaven růst bakteriálních buněk. Minimální baktericidní koncentrace (MBC) je taková koncentrace, která vede k usmrcení bakterií (Štefan 2019).

2 PŘÍRODNÍ POLYFENOLY

Polyfenoly byly uznány jako jedna z největších a nejrozšířenějších skupin rostlinných sekundárních metabolitů (Ziaullah et al. 2015). Tyto molekuly produkované rostlinami mají široké spektrum biologických aktivit, od antioxidačních po antibakteriální (Ricke 2018). Léčebné účinky polyfenolů jsou částečně připisovány obousměrné asociaci se střevním mikrobiomem. Ovlivňují totiž složení střevního mikrobiomu způsoby, které vedou k lepšímu lidskému zdraví. Konkrétně střevní mikrobiom přeměňuje polyfenoly na bioaktivní sloučeniny, které mají blahodárný vliv na zdraví organismu (Rana et al. 2022).

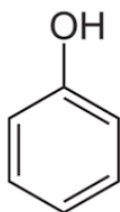
I když hlavním zaměřením bioaktivity polyfenolů bylo studium jejich antioxidačních vlastností, vědecké důkazy naznačují, že tyto sloučeniny mohou rovněž modulovat signální dráhy důležité pro prevenci nemocí (García-Pérez et al. 2017), jako jsou kardiovaskulární choroby, různá nádorová onemocnění a diabetes typu II (Ziaullah et al. 2015).

Je vědecky podloženo, že polyfenoly vykazují antimikrobiální aktivitu proti lidským patogenům, kdy působí přímo proti mikroorganismům a tím potlačují faktory virulence. Mohou tak působit synergicky v kombinaci s antibiotiky proti rezistentním mikrobiálním organismům (Daglia 2012). Existuje totiž významný vztah mezi přítomností určitých funkčních skupin polyfenolů (isoprenová skupina, fenolická hydroxylová skupina) v konkrétních polohách a antibakteriální aktivitou sloučenin (Mukne et al. 2011).

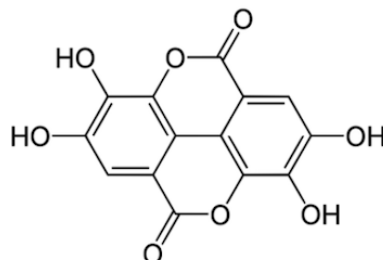
Některé polyfenoly jsou nezbytné pro fyziologii rostlin, protože se podílejí na různých funkcích, jako je pigmentace, opylování, zvýšená odolnost proti predátorům (působením jako fytoalexiny) nebo zvýšená svíravost, takže rostliny jsou jako potrava nechutné. Chrání plodiny před morem a před sklizní klíčících semen. Polyfenoly mají mnoho průmyslových aplikací, například při výrobě barev, papíru, kosmetiky, jako třísloviny a v potravinářském průmyslu jako přírodní barviva a konzervační látky (Kondratyuk et al. 2009)

Vyskytují se v ovoci, zelenině, luštěninách, obilovinách, čokoládě a nápojích, jako je čaj, víno nebo káva. Plody, jako jsou jablka, hroznové víno, hrušky, třešně a četné bobule, obsahují polyfenoly o koncentraci až 200–300 mg/100 g (Mukherjee 2019). Jejich koncentrace však závisí na rostlině, podmínkách prostředí, konzumované části rostliny, stupni zralosti a také na zpracování potravin (Pietta et al. 2003).

V rostlinné říši je přítomno přes 50 000 strukturálně rozmanitých polyfenolů (Ziaullah et al. 2015). Polyfenoly jsou velkou třídou molekul (obr. 2) obsahujících nejméně tři až pět fenolových skupin (obr. 1) (Ricke 2018).



Obr. 1. Fenolová skupina (Al-Khalid a El-Naas 2021) 1



Obr. 2. Polyfenolová struktura (Anonymus 2023) 1

Pro strukturální objasnění jakéhokoliv nového polyfenolu izolovaného z potravinové matrice se spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR) stala výkonným a běžně používaným analytickým nástrojem. NMR spektroskopie navíc nachází i mnoho dalších aplikací v potravinářských vědách a technologiích, jako jsou studie kontroly kvality a metabolomiky. S pomocí technologie NMR bylo také postupně odhaleno základní porozumění polyfenolové chemii a reaktivitě, což vrhá světlo na lepší pochopení vztahu mezi strukturou a vlastnostmi polyfenolů (Ye et al. 2015).

Lze je rozdělit do nejméně 10 různých tříd na základě jejich chemické struktury, od jednoduchých molekul, jako jsou například fenolové kyseliny, až po vysoce polymerizované sloučeniny, jako jsou třísloviny (Pietta 2003). Fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny a lignany představují čtyři hlavní skupiny polyfenolů (Marková et al. 2018).

2.1 FENOLOVÉ KYSELINY

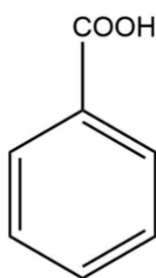
Fenolové kyseliny, často označovány také jako benzoové kyseliny (Hvězdová 2016), patří mezi nejrozšířenější rostlinné neflavonoidní fenolické sloučeniny přítomné ve volných, konjugovaných rozpustných i nerozpustných formách (Chandrasekara 2019). Volné fenolové kyseliny se nacházejí ve vnějších vrstvách jádra (oploží, testa a aleuronová vrstva), zatímco vázané fenolové kyseliny jsou spojeny s buněčnými stěnami (Ratnavathi 2019) ve formě glykosidů, amidů nebo esterů (Ullah et al. 2020).

Jejich základní struktura obsahuje jedno fenolické kruhové jádro s karboxylovou skupinou (Albuquerque et al. 2021). Počet a umístění hydroxylových skupin na aromatickém

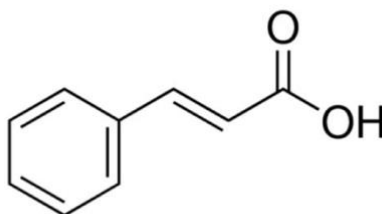
kruhu vytváří strukturální odchylky mezi fenolovými kyselinami (Ullah et al. 2020). Mnoho hydroxylových skupin, které je navázáno na uhlíkatý řetězec, má za následek vysokou míru antioxidačního potenciálu (Durasová et al. 2017) a chrání tak před oxidačním poškozením organismu, mezi které lze řadit cévní mozkovou příhodu, ischemickou chorobu srdeční a rakovinu (Ullah et al. 2020).

Podle jejich uhlíkové kostry se dělí na dvě skupiny. První skupinu představují hydroxybenzoové kyseliny (C6-C1), které jsou odvozené od benzoové kyseliny (obr. 3) a druhá skupina je zastoupena deriváty kyseliny hydroxyskořicové (C6-C3), které jsou odvozené od kyseliny skořicové (obr. 4) (Albuquerque et al. 2021). Mezi deriváty kyseliny benzoové patří kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina salicylová, kyselina gallová a kyselina ellagová. Nejběžnějšími deriváty kyseliny skořicové jsou kyselina p-kumarová, kyselina kofeinová a kyselina ferulová (Padmanabhan et al. 2016).

Hydroxybenzoové kyseliny a kyseliny hydroxyskořicové tvoří asi třetinu fenolických sloučenin v naší stravě. Deriváty kyseliny skořicové se nacházejí téměř v každé rostlině. Jedním z nejrozšířenějších zástupců je kurkumin. Hojně se používá jako potravinářské konzervační a žluté barvivo pro potraviny, léky a kosmetiku. (Kondratyuk et al. 2009). Kyselina kofeinová se vyskytuje v mnoha dietních látkách, jako jsou jablka, švestky, rajčata a hrozny (Kondratyuk et al. 2009).



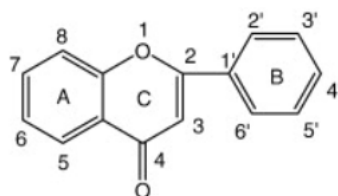
Obr. 3. Kyselina benzoová
(Sharma 2022) 1



Obr. 4. Kyselina skořicová (Rýdlová, 2015)
1

2.2 FLAVONOIDY

Flavonoidy jsou komplexní skupinou polyfenolických rostlinných metabolitů, které sdílejí tříkruhovou strukturu dvou aromatických center, kruhů A a B, a centrální kyslíkaté heterocyklické části, kruhu C (Kondratyuk et al. 2009) neboli pyranového kruhu (obr. 5).



Obr. 5. Základní struktura flavonoidů (Jiang et al. 2009) 1

Bylo identifikováno více než 8000 sloučenin s flavonoidní strukturou, z nichž mnohé jsou zodpovědné za atraktivní barvy květů, plodů a listů. U rostlin fungují tyto sloučeniny jako přírodní pesticidy (Hostetler et al. 2017) a poskytují ochranu proti ultrafialovému záření, patogenům a býložravcům (Babu et al. 2009).

Flavonoidy jsou v poslední době středem současného nutričního a terapeutického zájmu pro jejich širokou škálu biologických a farmakologických aktivit, jako jsou antibakteriální, antivirové, antimykotické a protizánětlivé účinky. Jsou proto považovány za doplňky stravy podporující zdraví a prevenci nemocí, zvláště již zmiňovaného kardiovaskulárního onemocnění (Babu et al. 2009).

Populační studie totiž prokázaly, že jejich vlastnosti hrají významnou roli v nižší kardiovaskulární mortalitě při vyšším příjmu flavonoidů. (Babu et al. 2009).

Flavonoidy lze dále rozdělit do sedmi hlavních podtříd na základě variací v heterocyklickém C-kruhu, včetně **flavonů**, **flavonolů**, **flavanolů**, **flavanonů**, **anthokyanidinů** a **isoflavonů** (Daglia 2012; Kondratyuk 2019), které se liší svými antioxidačními vlastnostmi, fyziologickými aktivitami a biologickou dostupností (Robert 2020).

2.2.1 FLAVONY

Jejich název je odvozen ze slova *flavus* – latinsky žlutá (Kurhekar 2020). Pro jejich přirozeně zářivě žlutou barvu se používaly společně s flavonoly k barvení hedvábných a vlněných látek (Alihosseini et al. 2011).

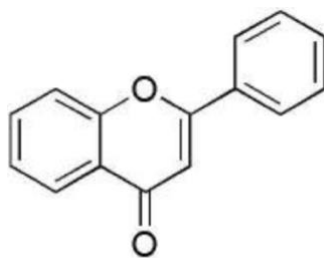
Lze je nalézt v různých bylinkách, jako je heřmánek, petržel, paprika a mnoho dalších (Soković et al. 2021) ve formě glykosidů i aglykonů (Sekaran et al. 2022). Nejrozšířenější v přírodě jsou luteolin a apigenin (Soković et al. 2021).

Heřmánek a petržel mají nejvyšší koncentrace flavonů, a to až 5320 mg apigenin-O-glykosidů/100 g sušených květů heřmánku nebo 1350 mg/100 g sušeného listu petržele. Luteolin 8-C-glukosid (orientin) a luteolin 6-C-glukosid (isoorientin) jsou nejvíce zastoupeny v čaji rooibos. Vědci pozorovali, že infuze rooibosu s přirozeným obsahem polyfenolů vykazovaly antimikrobiální aktivitu proti třem druhům bakterií: gram pozitivním *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus aureus* a gram negativní *Escherichia coli* (Gollücke et al. 2018).

Zelené, černé a oolong čaje obsahují orientin a isoorientin, stejně jako různé apigeninové mono- a di-C-glykosidy. Flavon O-glykosidy jsou také uváděny v mnoha rostlinách z čeledi hluchavkovitých (*Lamiaceae*), ale jejich uváděné koncentrace se mezi zdroji značně liší. Například luteolinové glykosidy v mátě peprné se pohybovaly od 42 do 3070 mg/100 g suchého listu, v závislosti na zdroji a použitých analytických metodách (Hostetler et al. 2017).

Flavony jsou známé svým silným antioxidačním potenciálem a jsou spojeny s metabolismem léčiv (Soković et al. 2021). Působí také jako signální molekuly pro rostliny, kdy podporují kolonizaci kořenů bakteriemi fixujícími dusík a mykorrhizními houbami (Hostetler et al. 2017).

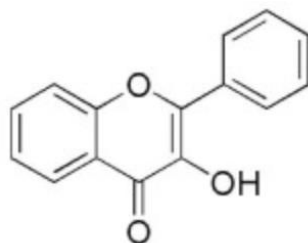
Spolu s flavonoly jsou primárními pigmenty v bílé a krémově zbarvených květech a působí jako kopigmenty s anthokyany v modrých květech (Hostetler et al. 2017).



Obr. 6. Základní struktura flavonů (Wang et al. 2018) 1

2.2.2 FLAVONOLY

Svou strukturou jsou flavonoly blízké příbuzné flavonům; liší se pouze tím, že mají hydroxylovou skupinu v poloze 3 na C-kruhu (obr. 7) (Zuiter 2014).



Obr. 7. Základní struktura flavonolů (Wang et al. 2018)

1

Flavonoly jsou nejrozšířenější z flavonoidů v rostlinné potravě a existují ve dvou formách; aglykony a glykosidy. Nejběžnějšími flavonolovými aglykony jsou kvercetin, kempferol a myricetin. Jejich glykosylované formy jsou spojeny s cukernou složkou, často glukózou nebo rhamnózou (Zuiter 2014).

Flavonoly jsou v rostlinné potravě přítomny především v listech a ve vnějších částech rostlin. Kvercetin a jeho glykosid jsou všudypřítomné v ovoci a zelenině. Naopak kempferol a myricetin jsou distribuovány méně (Pietta et al. 2003).

Cibule, červené hrozny, jahodník, fík, špenát, květák, kadeřavá kapusta, pórek, brokolice a borůvky jsou bohatými zdroji flavonoly. Slupka cibule, zejména červené cibule, má nejvyšší procento zastoupení směsí kvercetinu, kempferolu a kvercetinu-3-O-glykosidu (Alihosseini et al. 2011). Množství flavonolů v cibuli se pohybuje od 200–1000 μg na 1 g čerstvé hmotnosti, u jahody kolem 40 μg na 1 g čerstvé hmotnosti a ostatní rostliny obsahují mezi 12 a 19 μg na 1 g čerstvé hmotnosti (Zuiter 2014).

Kvercetin, myricetin a kempferol jsou hlavní flavonoly, které tvoří 2-3 % ve vodě rozpustného extraktu v čaji. Flavonoly v čaji jsou převážně v glykosidické formě, protože neglykosidické formy jsou ve vodě nerozpustné (Tariq et al. 2010).

Pokud jde o flavonoly, lze pozorovat antibakteriální aktivitu proti několika gram pozitivním bakteriím, jako je např. *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, ale i proti gram negativním bakteriím, jako je *Prevotella oralis* nebo *Prevotella melaninogenica* (Daglia 2012).

2.2.3 FLAVANOLY

Existují v monomerní formě (katechiny) a v polymerní formě (proanthokyanidiny) (Herrero et al. 2012). Proanthokyanidiny, kondenzované taniny, jsou oligomery nebo polymery monomerních flavan-3-olů (obr. 9) produkovaných jako konečný produkt biosyntetické dráhy flavonoidů (Rauf et al. 2019).

Antibakteriální aktivita katechinů, flavan-3-olů, je známá z 90. let minulého století, kdy bylo prokázáno, že tyto sloučeniny, převážně přítomné v čaji oolong a především v zeleném čaji (*Camellia sinensis*), inhibovaly in vitro růst několika druhů bakterií, jako jsou *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans* a *Clostridium perfringens*. (Daglia 2012).

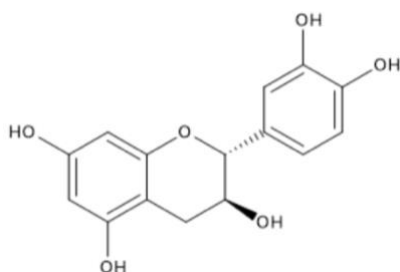
Katechiny jsou nejnáze vstřebatelné flavonoidy, protože jsou jedinou formou, která není vázána na cukry (flavonoidy-glykosidy se snadněji vstřebávají po transformaci na aglykanovou formu). Je diskutabilní, zda by tato třída látek měla být seskupena s flavonoidy, protože mají mírně odlišnou chemickou strukturu (obr. 8), ale sdílejí s jinými sloučeninami této třídy vysokou antioxidační aktivitu a mnoho jiných prospěšných biologických funkcí (Bonetti et al. 2017).

Katechiny lze získat z různých zdrojů včetně mnoha bylin, ovoce, zeleniny, nápojů, řas a cukrovinek. Vysoké koncentrace jsou zaznamenány v meruňkách, fazolích, červených hroznech, víně, čokoládě atd. Jejich obsah a typy se však mezi různými zdroji značně liší. I dostupnost různých zdrojů se po celém světě liší, což je hlavní důvod pro nerovnoměrný příjem ve výživě (Shukla et al. 2018).

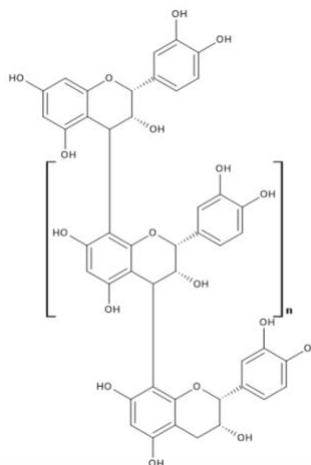
Hroznová šťáva (bohatá na katechin a epikatechin) se zdá být schopná snižovat glutamátovou excitotoxicitu a vykazovat silnou antioxidační aktivitu, a tak zlepšovat endoteliální funkci a snižovat agregaci krevních destiček a oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) (Bonetti et al. 2017).

Uvádí se, že vysoký obsah katechinu, jak už bylo zmíněno, je dále přítomen především v čerstvých čajových lístcích. Osmdesát procent všech polyfenolů přítomných v zeleném čaji tvoří katechiny. EGCG (epigalokatechin-3-galát) je nejhojnější a farmakologicky nejúčinnější katechin nalezený v zeleném čaji (Shukla et al. 2018). Mimo jiné byl EGCG první polyfenol, o kterém bylo zjištěno, že působí jako kovalentní topoizomerázový jed (Esselen et al. 2014).

Vzhledem k tomu, že zelený čaj je nejběžnějším aromatickým nápojem na celém světě, existuje několik klinických studií hodnotících příznivé účinky katechinů při léčbě nebo obnově kognitivních funkcí u několika neurodegenerativních onemocnění souvisejících se stárnutím (Andrade et al. 2015).



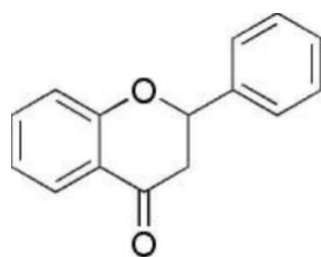
Obr. 8. Základní struktura katechinů (Tazzini 2014). 1



Obr. 9. Základní struktura proanthokyanidinů (Tazzini 2014). 1

2.2.4 FLAVANONY

Flavanony, nazývané dihydroflavony (Zuiter 2014), se odlišují od ostatních flavonoidů nepřítomností dvojné vazby mezi polohami C-2 a C-3 v pyranovém kruhu flavonoidního skeletu a přítomností chirálního centra v poloze C-2 (obr.10) (Ziaullah et al. 2015).



Obr. 10. Základní struktura flavanonů (Wang et al. 2018). 1

V závislosti na druhu rostlin lze flavanony objevit ve všech jejich částech – nad zemí i pod zemí, od vegetativních částí až po generativní orgány: větve, kůra, stonek, listy, kořeny, květy, plody, semena, oddenky i slupky (Mukherjee 2019).

Nacházejí se v rajčatech a aromatických rostlinách, jako je máta, ale jejich hlavním zdrojem jsou citrusové plody, zejména grapefruit. Flavanony existují přirozeně ve formě

aglykonů a glykosidů. Hlavními aglykony jsou naringenin (Zuiter 2014) a jeho glykosylovaná forma naringin (Morissette et al. 2018) v grapefruitu, hesperetin (jeho glykosid hesperidin) v pomerančích a eriodictyol v citronech (Zuiter 2014).

Distribuce je však značně rozptýlená a mnohem vyšší koncentrace se nacházejí v pevných tkáních ve srovnání se šťávou. Například jedinec pijící pomerančový džus (250 ml) bude mít denní příjem flavonů (jako aglykonů) v rozmezí 25–60 mg; konzumace dužiny celého pomeranče (200 g) poskytne asi 125–375 mg (Pietta et al. 2003).

Flavanon poncirin byl extrahován z trojlistého pomeranče a bylo stanoveno, že metabolity poncirinu prokázaly antimikrobiální aktivitu proti *Helicobacter pylori*, lidské střevní bakterii (Ziaullah 2015).

2.2.5 ANTHOKYANIDINY

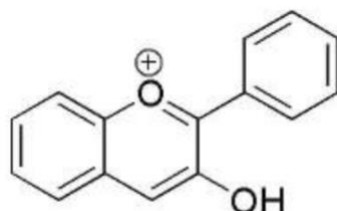
Anthokyanidiny jsou soli 2-fenylbenzopyrylia, které mají různé hydroxy nebo methoxy substituenty (Moldoveanu 2019). Anthokyanidiny (z řeckého slova; *anthos* – květ a *kyanos* – modrý) se obecně vyskytují v aniontové formě se strukturálním derivátem kationtu flavyliia (Benaiges et al. 2007), který je ale činí značně nestabilními, proto je jejich výskyt v aglykonované formě v rostlinném materiálu výjimečný (Pietta et al. 2003).

Na druhé straně antokyany, tj. glykosylované anthokyanidiny, jsou důležitou skupinou ve vodě rozpustných rostlinných pigmentů, které mají za následek růžová, červená, modrá a fialová zbarvení květů a plodů vyšších rostlin (Pietta et al. 2003). Jejich barva je závislá na pH (Zuiter 2014). Červeně zbarvená kationtová forma je stabilní v silně kyselém prostředí, ale ve slabě kyselém prostředí – mezi pH 4 a 6 – kation postupně ztrácí dva protony a zmodrá (Benaiges et al. 2007). Tato podtřída flavonoidů je pravděpodobně nejdůležitější skupinou rostlinných pigmentů viditelných lidským okem (Zuiter 2014).

Hlavními sloučeninami anthokyanidinů široce rozšířenými v rostlinách jsou kyanidin, delfinidin a pelargonidin, což jsou glykosylované a nemethylované sloučeniny (Zuiter 2014), dále také peonidin či malvidin (Soković et al. 2021). Malvidin je nejhojněji zastoupený anthokyanidin ve všech odrůdách vinné révy a lze jej proto považovat za hlavní složku zodpovědnou za barvu červených hroznů a červeného vína (Anonymus 2012).

Bohatým zdrojem flavonoidů této skupiny jsou také granátová jablka, červené, fialové a modré bobule, švestky (Soković et al. 2021), červené zelí nebo pigmentované obiloviny, jako je fialová kukuřice (Gonçalves et al. 2018).

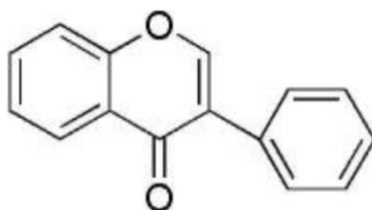
Tato skupina flavonoidů je spojena s antioxidačním potenciálem, zdravím srdce, obezitou a prevencí cukrovky. (Soković et al. 2021). Jejich potenciál v prevenci rakoviny je odvozený ze schopnosti modulovat mitochondriální funkce, čímž ovlivňují energetický metabolismus buněk a potenciálně indukují vnitřní cesty apoptózy. Kromě vnitřního použití se zjistili i přímé protektivní účinky anthokyanidinů při topickém použití (Ragač et al. 2019).



Obr. 11. Základní struktura anthokyanidinů (Wang et al. 2018).
1

2.2.6 ISOFLAVONY

Tato skupina flavonoidů se vyznačuje tím, že má B-kruh připojený v poloze C3 (obr. 12) a prochází různými modifikacemi vedoucími ke vzniku jednoduchých isoflavonů, jako jsou isoflavanony, isoflavany a isoflavanoly, jakož i složitějších struktur včetně rotenoidů, pterokarpanů a kumestanů (Zuiter 2014).



Obr. 12. Základní struktura isoflavonů (Wang et al. 2018) 1

Isoflavony jsou typem polyfenolu, který se nachází v luštěninách, včetně cizrny, fazolí, sójových bobů, nejbohatší zdroj isoflavonů vůbec, a ořechách (Thrane et al. 2017).

Obecně se má za to, že glukosidové formy jsou metabolizovány střevní mikroflórou nebo střevními glukosidázami, kdy jejich cukerná část je odstraněna z glykosidů, za vzniku aktivních sloučenin – odpovídajících aglykonů, které jsou pak skutečně absorbovány

v tenkém střevě (Cvejić et al. 2017). Mezi hlavní isoflavonové aglykony sóji lze považovat daidzein, genistein a glycitein (Křížová et al. 2019).

Syrové sójové boby mohou obsahovat 1,2–4,2 mg isoflavonů na 1g sušiny, zatímco sójová mouka s vysokým obsahem bílkovin obsahuje pouze 1,1–1,4 mg na 1 g sušiny. Strava bohatá na sójové boby má za následek zlepšení kognitivních schopností, prevenci osteoporózy a různých druhů rakoviny, zlepšení imunitní funkce a udržení zdraví u žen v menopauze a také potlačení CVD snížením celkového cholesterolu a LDL cholesterolu a zvýšením HDL v krevních cévách (Bultosa 2016).

Je zajímavé poznamenat, že vysoké koncentrace isoflavonů lze detekovat v prsní tkáni a v prostatě, pravděpodobně kvůli četným estrogenovým receptorům, které představují místa působení isoflavonů jako fytoestrogenových sloučenin (Cvejić et al. 2017).

Byl studován antibakteriální účinek isoflavonů z čeledi bobovitých rostlin (*Fabaceae*) proti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio cholerae* a *Vibrio parahaemolyticus* v mléce. Isoflavony se ukázaly jako nejaktivnější proti *S. aureus* a poté, v sestupném pořadí, proti *V. cholerae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* a *Pseudomonas spp.*, s minimální inhibiční koncentrací v rozmezí od 25 do 200 mg/l pro většinu mikroorganismů (Pina-Pérez et al. 2015). Z toho vyplývá, že mnoho z isoflavonů mají silnou aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím a zanedbatelnou nebo téměř žádnou proti gram-negativním bakteriím. Byl stanoven vzájemný vztah mezi přítomností izoprenové skupiny a hydroxylové skupiny v určitých polohách struktury isoflavonového kruhu s anti-*Staphylococcus aureus* a anti-MRSA aktivitou (Mukne et al. 2011)

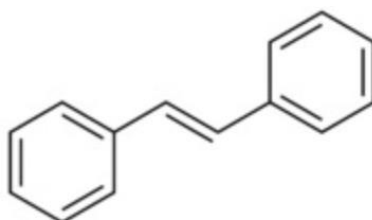
Kromě úplné inhibice začlenění metabolitů do bakteriálních buněk vykazuje pozorovaný intenzivní baktericidní účinek těchto sloučenin určitou podobnost s účinkem vyvolaným 4-chinolonovými antimikrobiálními činidly, které inhibují syntézu DNA. To je v souladu se skutečností, že isoflavony mají určitou strukturní podobnost s 4-chinolonovými antibakteriálními činidly (Mukne et al. 2011).

Ve srovnání s dříve zmíněnými flavonoly a flavanony, dokáže člověk isoflavony lépe strávit (Cvejić et al. 2017).

2.3 STILBENY

Rostliny používají četné obranné mechanismy zahrnující jak konstitutivní, tak indukovatelné bariéry, aby zabránily vstupu fytopatogenních mikroorganismů. U mnoha druhů rostlin je jednou z neúčinnějších reakcí na boj proti útočícím mikrobům (Albert et al. 2011) nebo houbám (Ziaullah et al. 2015) rychlá syntéza antimikrobiálních případně antifungálních fytoalexinů s nízkou molekulovou hmotností (Albert 2011). Většina stilbenů v rostlinách působí právě jako antifungální nebo antimikrobiální fytoalexiny, sloučeniny, které jsou syntetizovány pouze v reakci na infekci nebo poranění (Kondratyuk et al. 2009). Zvláště v posledních letech je stilbenům věnována velká pozornost jako aktivním molekulám funkčních potravin a přírodních léčiv (Su et al. 2022).

Stilbeny jsou strukturně charakterizovány přítomností 1,2-difenylethylenového jádra s hydroxyly substituovanými na aromatických kruzích a existují ve formě monomerů nebo oligomerů (obr. 13) (Rupasinghe et al. 2014).



Obr. 13. Základní struktura stilbenů
(Fillips et al. 2017). 1

Název pro stilben (1,2-difenylethylen) byl odvozen z řeckého slova *stilbos*, což znamená zářící, protože se vyznačuje intenzivními absorpčními a fluorescenčními vlastnostmi. Tyto chromofory mohou podléhat fotoizomeraci stejně jako azobenzeny, ale také vykazují fotodimerizaci (Menzel 2002). Používají se při výrobě barviv, optických zjasňovačů nebo scintilátorů (Ziaullah et al. 2015).

Nejvíce studovanou sloučeninou je trans-resveratrol, který má trihydroxystilbenový skelet (Rupasinghe et al. 2014). Resveratrol je fytoalexin neboli třída antibiotik rostlinného původu, produkováný především v hroznech a arašídech. Nejvyšší koncentrace resveratrolu (50–100 µg/g) se nachází ve slupce hroznů (Kondratyuk et al. 2009). Jeho obsah se však u různých odrůd *Vitis vinifera* i u různých kultivarů liší a během procesu zrání hroznů se množství resveratrolu postupně zvyšuje (Mikeš et al. 2008). Důvod syntézy resveratrolu v hroznech je spojen s přirozenými stresovými faktory, jako je plíseň šedá nebo houbové

infekce. Je považován za součást obranného systému rostlin. Významná množství resveratrolu byla detekována ve zdravých shlucích ovoce před vizuální detekcí plísňových lézí, což naznačuje, že resveratrol byl syntetizován brzy po rozpoznání patogenu rostlinou. Lze si představit, že resveratrol zprostředkovává příznivé účinky lidským buňkám mechanismy podobnými těm, které jsou zprostředkovány v rostlinných buňkách (Kondratyuk et al. 2009).

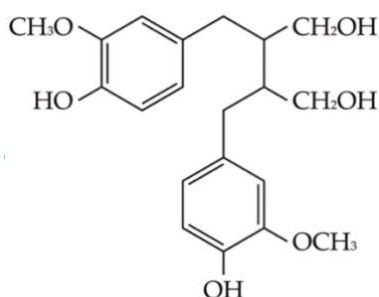
Resveratrol a jeho přírodní deriváty však vykazují pouze mírné antimikrobiální účinky. Nicméně může být užitečnou hlavní strukturou pro chemickou syntézu antimikrobiálních látek. Stilbeny byly testovány v agarovém difúzním testu proti několika bakteriím a houbám. Pro některé z těchto sloučenin byly inhibiční zóny pro bakterie a houby srovnatelné se zónami antibiotik tetracyklinu, streptomycinu, ampicilinu nebo kanamycinu, namířené proti prokaryotům (Albert et al. 2011).

Kromě jejich antimikrobiální aktivity, přispívají k ochraně jater, jsou aktivní proti Alzheimerově chorobě a inhibují zvýšení glukózy a triglyceridů v plazmě (Flamini et al. 2019).

Stilbenoid chemicky příbuzný resveratrolu, pterostilben (Ziaullah et al. 2015), kdy jeho zastoupení v hroznech je asi desetkrát nižší ve srovnání s resveratrolem (Mikeš et al. 2008), se nachází mimo jiné také v borůvkách. Studie naznačují, že pterostilben pomáhá při snižování krevních lipidů a cholesterolu (Ziaullah et al. 2015).

2.4 LIGNANY

Lignany jsou difenolické sloučeniny, které mají 2,3 - dibenzylbutanovou strukturu vzniklou dimerizací dvou zbytků kyseliny skořicové (obr. 14) (Kondratyuk et al. 2009).



Obr. 14. Základní struktura lignanů (Mrduljaš et al. 2017). 1

O takových sloučeninách je známo, že existují jako minoritní složky mnoha rostlin, kde tvoří stavební bloky pro tvorbu ligninu v rostlinné buněčné stěně a vyskytují se převážně v glykosidické formě. Glykosidy jsou převedeny fermentací v proximálním tračníku na savčí lignany (Zitterman 2003).

Dva hlavní savčí lignany, enterodiol a enterolakton, jsou produkty bakteriálního metabolismu rostlinných lignanů secoisolariciresinolu a matairesinolu, které se vyskytují v různých celozrnných obilovinách (ječmen, žito a pšenice), semenech, ořechách, luštěninách a zelenině (Barakat et al. 2018), v tlustém střevě (Zitterman 2003). Léčba enterodiolem a enterolaktonem vedla k inhibici růstu lidských buněk rakoviny tlustého střeva (Sang et al. 2014).

Nacházejí se hlavně v potravinách bohatých na vlákninu, nejbohatším známým dietním zdrojem enterolaktonových prekurzorů je lněné a sezamové semínko (Barakat et al. 2018), kde je hlavním rostlinným lignanem přítomný sesamin. Předchozí studie odhalily, že sesamin má mnoho silných farmakologických funkcí, včetně antioxidačních, antihypertenzních a antihyperlipemických vlastností (Martínez et al. 2014).

Pokud je v těle málo estrogenu, mohou se lignany chovat jako slabý estrogen, ale když je přirozený estrogen v těle hojný, mohou lignany snižovat účinek estrogenu tím, že jej vytěsňují z buněk. Toto vytěsnění hormonu může pomoci předcházet některým druhům rakoviny, jako je rakovina prsu, která závisí na estrogenu (Kondratyuk et al. 2009).

Podofylotoxin je nejvýznamnějším lignanem díky aktivitám jeho derivátů. Mezi semisyntetické deriváty podofylotoxinu patří antineoplastika etoposid a teniposid. Etoposid se používá při léčbě testikulárního a malobuněčného karcinomu plic spolu s dalšími nádory. Teniposid je schválen pro léčbu akutní lymfoblastické leukémie (Simpson et al. 2017).

Určité typy lignanů vykazují aktivitu proti citlivému a rezistentnímu *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *E. cloacae* a kmeny *M. tuberculosis* (Favela-Hernández et al. 2012).

3 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

3.1 ČAJOVNÍK ČÍNSKÝ

Zelený čaj má svůj původ v čajovníku čínském (*Camellia sinensis*). *Camellia sinensis*, patří do čeledi *Theaceae* (Singh et al. 2022), je celosvětově velmi důležitá rostlina pro člověka jak z hospodářského či zdravotního hlediska původem z Číny a jihovýchodní Asie (Shivashankara et al. 2019).

Čajovník je velmi různorodý kvůli své vlastní neslučitelnosti a křížení, což vede k široké genetické diverzitě a velké variabilitě vzhledu a vlastností. Nicméně jiné faktory, jako jsou ekogeografické rozdíly, však mohou také ovlivnit jeho morfologické a agronomické rysy. Proto je důležité a nezbytné získat přístup ke genetické rozmanitosti a správně identifikovat čajové lístky při sběru zdrojů zárodečné plazmy a při výběru rodičovských typů při křížení (Ma et al. 2010)

V současné době se široce pěstuje v celé Asii, Africe a různých částech Středního východu. Čaj lze pěstovat v oblastech s dobrou teplotou, kyselou půdou a vysoce vlhkými podmínkami prostředí (Tariq et al. 2010).

Jedná se o stálezelený strom nebo keř, který ve volné přírodě dosahuje výšky 10–15 m a při kultivaci 0,6–1,5 m. Listy jsou světle zelené, krátce stopkaté, kožovité, střídavé, kopinaté, s pilovitým okrajem, vespod lysé nebo pýřité, v délce 5–30 cm a šířce asi 4 cm. Zralé listy jsou jasně zelené, hladké a kožovité, zatímco mladé listy jsou opatřeny trichomy (Tariq et al. 2010).

Květy jsou bílé, vonné, 2,5–4 cm v průměru velké a vyskytují se jednotlivě nebo ve shlucích po dvou nebo čtyřech. Nesou četné tyčinky se žlutým prašníkem a vytvářejí hnědočervené tobolky. Plodem je zploštělá, hladká, zaoblená trojhranná třibuněčná tobolka, v každé se nachází jedno semeno velikosti malého oříšku (Tariq et al. 2010).

V dnešní době má většina komerčních čajových lístků na trhu mnoho odrůd a čajové odrůdy se liší nejen z botanického hlediska, ale i z hlediska kvality (Chen et al. 2008). V závislosti na procesu fermentace se čaj rozděluje do tří typů. Zelený čaj představuje nefermentovanou formu. Této formě je věnována zvláště velká pozornost výzkumníků pro jeho specifické vlastnosti podporující zdraví způsobeny především dominantními polyfenolickými složkami. Pro extrakci těchto katechinů, které tvoří až 20–30 % sušiny zeleného čaje, je pro další zkoumání jejich zdravotních přínosů nanejvýš důležitá vhodná metoda extrakce (Tariq et al. 2010).

Zelený čaj byl propagován jako užitečný při široké škále stavů, včetně prevence rakoviny, kardiovaskulárních poruchách a AIDS. Mezi hlavní nepříznivé reakce na zelený čaj patří účinky kofeinu, s třesem a nespavostí a abstinenčními příznaky (bolesti hlavy, ospalost a únava) (Anonymus 2016).

3.2 RÉVA VINNÁ

Vinná réva (*Vitis vinifera*) je jednou z nejběžněji pěstovaných plodin na světě (Gharwalová et al. 2018). V České republice v roce 2014 činila plocha osázených vinic 783 ha, přičemž 93 % tohoto území připadalo na Jihomoravský kraj (Cviner et al. 2017).

Vinná réva je zařazena do rodu *Vitis*, v rámci čeledi Vitaceae. Dalšími známými zástupci čeledi jsou loubinec pětilistý (*Parthenocissus quinquefolia*) a liána virginská (*Parthenocissus tricuspidata*) (Jackson 2020).

Druhy této čeledi jsou typicky dřevití a mají popínavý habitus (Jackson 2020). Jejich vyvinuté popínavé orgány, úponky, jsou ontogeneticky příbuzné rozmnožovacím orgánům (Carmona et al. 2007). Listy se vyvíjejí střídavě na výhonech a mají ztloustlé uzliny, které mohou vytvářet úponky nebo shluky květů naproti listům. Květy jsou drobné, jednopohlavé nebo oboupohlavné a vyskytují se ve velkých hroznech. Většina částí květů se objevuje ve skupinách po čtyřech nebo pěti, přičemž tyčinky se vyvíjejí naproti okvětním lístkům. Pestík se skládá ze dvou plodolistů, částečně uzavřených schránkou, která se vyvíjí do dvoukomorové bobule. Plod obsahuje až čtyři semena (Jackson 2020), jež jsou endospermní.

Charakterizuje se tedy jako popínavá rostlina s důležitou vlastností apikální dominance, která se projevuje převahou růstu letorostů neboli výhonů vrcholové části rostliny. Každým rokem, nejčastěji během měsíce února, se provádí tzv. zimní řez. Cílem řezu je sesbírání a odstranění přebytečných výhonů, což je pro budoucnost keře, jeho správný růst a plození zásadní. Během vegetačního období révy vinné je klíčové zajistit optimální listovou plochu, která je zodpovědná za fyziologické děje, především fotosyntézu, respiraci a transpiraci. Intenzita odlistění ovlivňuje složení hroznů (obsah cukrů, kyselin) a kvalitu vinných produktů (Cviner et al. 2017).

Ekonomicky je réva vinná významná jako zdroj hroznů, jak pro přímou spotřebu, tak pro výrobu vína. Odpady a vedlejší produkty vznikají při pěstování hroznů i při výrobě vína. Každoročně se prořezává réva, která vytváří více než 1 tuna/ha/rok palic. Tyto palice jsou považovány za odpad a jsou obvykle spáleny (Gharwalová et al. 2018).

Během posledních deseti let bylo důkladně prozkoumáno chemické složení palic a bylo prokázáno, že jsou cenným zdrojem fenolických antioxidantů, konkrétně největších skupin polyfenolických sloučenin flavonoidů a stilbenoidů, které jsou produkovány rostlinami v reakci na stresové podmínky (mechanické poškození a UV záření) nebo na houbové infekce. Za nejvýznamnější stilbeny, jak už bylo zmíněno, jsou považovány resveratrol a jeho glykosidická forma polydatin (Gharwalová et al. 2018).

Resveratrol a jeho deriváty jsou stále žádanější jako nutraceutika, pro kosmetické účely a možná i pro farmaceutické účely, včetně doplňků stravy. Existuje však mnoho faktorů, které ovlivňují produkci a akumulaci polyfenolů v rostlinách *Vitis vinifera* (Gharwalová et al. 2018).

Několik studií prokázalo, že obsah polyfenolických sloučenin ve vinné révě a víně závisí na odrůdě podmínkách růstu. Byl studován vliv sucha na obsah polyfenolů (kyselina kávová, kyselina p-kumarová a kyselina ferulová) v listech a kořenech vinné révy. Již dříve bylo prokázáno, že teplota a intenzita slunečního záření mají vliv na obsah polyfenolů ve slupce bobulí během jejich zrání. Dále bylo stanoveno, že UV světlo, ozón nebo anoxie (prostředí bez kyslíku) spouštěly syntézu stilbenoidů u *Vitis vinifera*. Organické hrozny jsou obvykle ošetřovány pesticidy, jako je suchá tekutá síra a soli mědi, ale výsledky naznačují, že použití organického ochranného postřiku neovlivnilo celkový obsah polyfenolů ani antioxidační aktivitu. Všechny dříve zmíněné studie přispěly k lepšímu pochopení akumulace polyfenolů v různých částech rostliny ve vztahu k podmínkám prostředí (Gharwalová et al. 2018).

Réva vinná je druh velice náchylný k napadení především houbovými patogeny. V průběhu 19. století se patogeny jako padlí révové (*Uncinula necator*) a plíseň révová (*Plasmopara viticola*) dostaly do Evropy ze Severní Ameriky a staly se hlavními rizikovými faktory pro vinařství. Vzhledem k tomu, že *Vitis vinifera* nenese žádnou odolnost vůči plísním, stalo se pro tradiční kultivary nepostradatelné vícenásobné aplikace fungicidů za vegetační období. Nejlepší způsob, jak překonat tyto problémy, je vyvinout odolné kultivary produkující vysoce kvalitní plody (Figueiredo et al. 2008).

4 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ

4.1 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli je bakterie patřící do čeledi Enterobacteriaceae (Schindler 2014). Enterobacteriaceae se vyskytují kosmopolitně po celém světě a je to skupina bakterií, která je patogenní jak pro člověka, zvířata, hmyz i rostliny. Jsou intenzivně studovány v oborech lékařství, potravinářství, v oboru vodní mikrobiologie, biochemie i genetiky pro jejich způsobilost růstu na jednoduchých půdních laboratorních kulturách za tvorby hladké kolonie o průměru 3–5 mm. (Bednář et al. 1996).

Morfologicky se jedná o rovné tyčky délky 1–6 μm , o tloušťce 0,4–1 μm . Až na výjimky se pohybují pomocí bičků a jejich povrch je opatřen fimbriemi. K rozeznávání neslouží mikroskopie, vzhledem k jejich téměř totožnému vzhledu, ale řada metabolických testů. Mezi tyto testy patří schopnost štěpení cukrů, přítomnost a aktivita enzymatických látek nebo povaha metabolických produktů. V klinické praxi má význam jen několik málo rodů, se kterými se lze setkat v laboratoři, ovšem největší význam má *Escherichia coli* (Schindler 2014).

Escherichia coli představuje modelový organismus pro fyziologické, genetické i biochemické studie. Patří tak k nejprostudovanějšímu bakteriálnímu druhu, u kterého byla poprvé zpozorována a následně prozkoumána konjugace buněk a výměna genetického materiálu (Šilhánková 1983). Konjugace je proces, kdy dochází k přenosu DNA z donorové buňky do recipientní, které jsou spolu spojené přes sex pili. Konjugativní plazmid, kruhová dvoušrobovice molekuly DNA přítomna v cytoplazmě, je podmínkou pro průběh konjugace. U *E. coli* je to plazmid F, který efektivně uskutečňuje konjugaci tohoto druhu (Rosypal et al. 1981).

E. coli je gramnegativní tyčka neprodukcující spory, kdy se po odbarvovacím procesu za přítomnosti ethanolu na základě Gramova reakce, která spočívá v barvení bakterie krystalovou violetí a Lugolovým roztokem, zbarví červeně po přidání barviva safraninu. Skutečnost Gramova barvení je založena na stavbě buněčné stěny, která naopak u grampozitivních bakterií zabraňuje odbarvovacímu procesu ethanollem a zůstávají tak zbarveny fialově. (Rosypal et al. 1981)

Vyhledává prostředí bez přítomnosti kyslíku, ale přežije i v jeho přítomnosti, jedná se tedy o fakultativně anaerobní bakterii (Šandová 2020). Běžně se vyskytuje v tlustém střevě savců, a tedy ve stolici, proto je někdy označována jako střevní tyčka (Schindler

2014). Funguje jako indikátor fekální kontaminace pitné vody, kde může být přítomna kvůli fekálnímu znečištění (Bednář et al. 1996).

Escherichia coli je původce močových infekcí, kdy se dostává z konečníku po hrázi do močové trubice, dále do močového měchýře, čímž způsobuje jeho záněty. V horším případně proniká až do ledvinových pánviček. Kromě toho může způsobovat průjemové infekce, potom co má schopnost produkovat specifické faktory virulence (Schindler 2014). Kromě přichycovacích fimbrií, díky kterým se všechny druhy *E. coli* přichycují k povrchu, mají patogenní druhy specifický fimbrální antigen, který jim dovoluje přichytit se i na sliznici tenkého střeva, kterou za normálních podmínek neosidlují (Geržová 2010). Podle klinických projevů virulence lze kmen *E. coli* rozdělit do enteropatogenních skupin druhu (Schindler 2014).

Enteropatogenní kmeny *E. coli* (EPEC) mají za následek průjmy u novorozenců, kdy dochází k dehydrataci organismu, v krajních případech až ke smrti. (Bednář et al. 1996) Průjmy jsou běžně doprovázeny krví, bez horečky a produkce toxinů. (Schindler 2014)

Enterotoxigenní kmeny *E. coli* (ETEC) jsou původci průjmu jak u dětí, tak dospělých. Jsou často označovány jako cestovatelské průjmy, díky výskytu v jižních oblastech. (Bednář et al. 1996) Faktory virulence nejsou jen fimbrie, ale i produkce dvou toxinů, termolabilní LT a termostabilní ST (Geržová 2010).

Enteroinvazivní kmeny *E. coli* (EIEC) způsobují onemocnění podobající se bacilární úplavici (dysenterii). Jejich patogenita spočívá v mechanismu pronikání do buněk, kde se následně pomnoží (Bednář et al. 1996). Ve slizovité stolici je přítomna krev. (Schindler 2014)

Enterohemoragické kmeny *E. coli* (EHEC) se přichycují v tlustém střevě převážně u dětí (Bednář et al. 1996) a jsou jedny z nebezpečnějších. Způsobují hemoragickou kolitidu, která může přecházet až ve smrtelný hemoragicko-uremický syndrom (HUC). Pro HUC je typické selhání ledvin. Verotoxin neboli tzv. shiga toxin je produkován těmito bakteriemi a je hlavním faktorem onemocnění. Špatně tepelně upravené maso, mošty i voda mohou být zdrojem nákazy (Schindler 2014).

Enteroadherentní kmeny *E. coli* (EAEC) se přichycují ke sliznici, bez výrazného projevu infekce (Schindler 2014).

4.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus je grampozitivní bakterie (zbarvena fialově podle Grama) (Taylor et al. 2022), která získává energii a živiny oxidací organických látek, tedy dýcháním či kvašením. Při dýchání dochází k oxidaci glukózy molekulárním vzdušným kyslíkem na oxid uhličitý a vodu. Naopak kvašení je proces, který neprobíhá za přítomnosti vzdušného kyslíku, ale využívá kyslíku uvnitř bakterie (Říhová Ambrožová 2007). Proto se tato bakterie označuje jako chemoorganotrofní s metabolismem aerobním i anaerobním. (Rosypal et al. 1981).

S. aureus je kulovitého vzhledu o průměru asi jednoho mikrometru, jeho povrch není opatřen žádným pohyblivým aparátem a netvoří spory. Může se vyskytovat jednotlivě, ve dvojicích nebo v koloniích, které jsou označovány jako hroznovité (Bednář et al. 1996). Hrozny jsou zbarveny žlutě až zlatě kvůli přítomnosti karotenového pigmentu, od čehož dostal *S. aureus* svůj název (Taylor et al. 2022).

Typické biochemické identifikační testy zahrnují katalázu pozitivní (všechny patogenní druhy *Staphylococcus*) a koagulázu pozitivní (k odlišení *Staphylococcus aureus* od jiných druhů *Staphylococcus*). K rozeznání druhu *Staphylococcus saprophyticus* od *S. aureus* se využívá citlivosti na novobiocin (Taylor et al. 2022), antibiotikum, produkované aktinomycetou *Streptomyces nivosus* [1]. Mannitolová fermentace pozitivní slouží pro odlišení od *Staphylococcus epidermidis* (Taylor et al. 2022).

Adheziny jsou bílkoviny na povrchu buněčné stěny tohoto mikroorganismu, které mu umožňují přilnout na kůži a sliznici nosohltanu (Bednář et al. 1996). Odhaduje se, že až polovina dospělé populace je kolonizována a přibližně 15 % populace trvale nosí *S. aureus* v předních nosních dutinách. K přenosu dochází přímým kontaktem z člověka na člověka (Taylor et al. 2022).

K hnisavému (pyogennímu) onemocnění u zdravého lidského organismu běžně nedochází, pouze v případě oslabeného imunitního systému. Ohroženou skupinou mohou být nedonošení novorozenci, kojenci nebo starci (Bednář et al. 1996).

S. aureus se může šířit z povrchového místa krevním řečištěm do vnitřních orgánů, kde může vytvořit metastatické ložisko infekce. Hlavními místy infekce jsou chirurgické rány nebo bakterie kolonizují implantované zařízení a způsobují místní poškození (Foster 2002). Infekce mají často chronický charakter (Bednář et al. 1996).

Klíčovým znakem léčby je stanovení přítomnosti/nepřítomnosti kmenů rezistentních na léky. Masové předepisování penicilinu vedlo k vývoji rezistentních kmenů produkující enzym penicilinázu. Jedním z kmenů je MRSA (Methicilin-resistant-Staphylococcus aureus), který je ukázkovým příkladem neúspěchu antibiotické terapie (Schindler 2014) a je nutná alternativní léčba (Taylor et al. 2022).

Po požití potravin, která je kontaminovaná tímto druhem stafylokoka, je možná až smrtelná otrava jídlem. Do potravin se dostává z abscesových ložisek na ruce osob, které je připravují. *S. aureus* produkuje toxiny, které lze zničit varem, proto jsou riziková hlavně jídla bez tepelné úpravy (Šilhánková 1983).

4.3 BACILLUS SUBTILIS

V přírodě *B. subtilis* obývá půdu, kořeny rostlin a vodní prostředí. Ačkoli může růst v gastrointestinálním (GI) traktu zvířat, nepovažuje se za patogen pro člověka (Martinez 2013).

Jedná se o grampozitivní tyčinkovitou bakterii, která tvoří tepelně odolné spory. Své jméno dostala od Ferdinanda Cohna v roce 1872, který demonstroval tvorbu výtrusu odolného vůči teple. Efektivní systémy genetické analýzy pomohly *B. subtilis* stát se modelovým organismem právě pro studium tvorby spor (Piggot 2009).

Vynikající fyziologické vlastnosti této aerobní bakterie a vysoce adaptibilní metabolismus umožňuje její pěstování na levných substrátech. Růst a fermentační cyklus této bakterie se odhaduje kolem 48 hodin (Su et al. 2020). Když se pěstování *B. subtilis* setká s omezením živin, může podstoupit řadu reakcí, které jí pomohou přežít. Odezvy zahrnují syntézu antibiotik a extracelulárních enzymů, schopnost přijímat DNA, pohyblivost a tvorbu biofilmu. Tvorba spor je nejdramatičtější reakcí na omezení živin. Výtrusy jsou tepelně odolné a spící, ale mohou rychle klíčit a vrátit se k vegetativnímu růstu (Piggot 2009).

Průmyslová aplikace *B. subtilis* se v posledních deseti letech rychle rozvinula a stala se hlavní továrnou na mikrobiální buňky pro mnoho průmyslových produktů (Su et al. 2020). *B. subtilis* hraje hlavní roli při výrobě potravin (fermentované produkty, zvýrazňovače chuti, sladidla a přísady do krmiva), detergentů pro domácnost, antibiotik a vitamínů a při vývoji vakcín; slouží jako modelový organismus pro vývoj sporicidů, chemických látek, které zabíjejí spory (Martinez 2013).

Kromě toho je *B. subtilis* široce používán v biotechnologii. V poslední době se zlepšená exprese a sekrece proteinů *B. subtilis* stala účinným nástrojem pro produkci enzymů. Odhaduje se, že druhy *Bacillus*, včetně *B. subtilis*, produkují 60 % komerčně dostupných enzymů (Martinez 2013).

B. subtilis je schopen vylučovat různé nízkomolekulární antimikrobiální peptidy a bakteriociny. Tyto antimikrobiální peptidy z *B. subtilis* představují slibné terapeutické nástroje díky své široké aktivitě a schopnosti rychle zabít různé patogeny. Vzhledem k narůstajícím problémům s mikrobiální rezistencí, které jsou způsobeny neracionálním používáním konvenčních antibiotik, budou antimikrobiální peptidy hrát významnější roli v léčbě bakteriálních infekcí. Další výhodou antimikrobiálních peptidů je jejich bezpečnost a šetrnost k životnímu prostředí. V zemědělství jsou široce vyžívány jako přísady do krmiv ke zlepšení trávení živočišné vlákniny a zdraví střev. *B. subtilis* může pomoci zlepšit rovnováhu střevní flóry a má potenciál zlepšit zdraví střev a účinnost vstřebávání potravy. Studie ukázaly, že přidání spor *B. subtilis* do krmiva dojnic může zlepšit produkci mléka a bílkovin (Su et al. 2020).

5 MATERIÁL A METODY

5.1 METODY EXTRAKCE POLYFENOLŮ

Extrakce polyfenolů je proces získávání bioaktivních látek z rostlinných materiálu, v tomto případě z červených hroznů a zeleného čaje.

Jednou z extrakčních metod je metoda liquid-liquid. Tato metoda, která byla využita v rámci této kvalifikační práce, spočívá v přenosu určitých složek z jedné kapalně fáze do druhé kapalně fáze, jež jsou vzájemně nemísitelné (Mazzola et al. 2008), kdy musí být překonáno určité fázové rozhraní pro přenos hmoty (Müller et al. 2000). Pro dosažení separace dvou složek se přidává většinou organické nepolární rozpouštědlo k původní polární kapalině obsahující složky, které mají být extrahovány (Müller et al. 2000). Tento proces extrakce je široce používán v chemickém průmyslu díky své jednoduchosti, účinnosti, nízkým nákladům a krátkého času separace (Mazzola et al. 2008).

5.1.1 EXTRAKCE POLYFENOLŮ Z ČERVENÝCH HROZNŮ RÉVY VINNÉ

Nejprve bylo odváženo 400 g červených semenných hroznů pomocí digitální váhy a následně bylo toto množství hroznů důkladně omyto vodou, aby se odstranily částice nečistot. Omyté hrozny byly ponořeny do 300 ml destilované vody o teplotě cca 30 °C a směs byla zhomogenizována tyčovým mixérem.

Zhomogenizovaný vzorek byl přefiltrován přes gázu, která byla třikrát přeložena ve filtrační nálevce, a touto filrací se získalo 320 ml filtrátu. Toto množství filtrátu bylo následně sterilizováno acetonem v poměru 1 : 1 a po dobu 24 hodin byla směs desublimována ve vodní lázni při teplotě 40 °C.

Druhý den byla provedena čichová zkouška k zjištění nepřítomnosti acetonu. Sterilní roztok byl dvakrát filtrován přes filtrační papír KA 3, kdy bylo získáno 120 ml filtrátu, který byl použit k extrahování čistých polyfenolů dle Taleb et al. (2016) metodou liquid-liquid spočívající nejprve v přípravě adhezní pryskyřice, na kterou byly vázány polyfenolové sloučeniny.

5.1.1.1 Metoda přípravy adhezní pryskyřice

Příprava adhezní pryskyřice byla uskutečněna dle Taleb et al. (2016). Na jeden filtrát přírodních extraktů bylo naváženo na digitální váze cca 47 cm³ pryskyřice Amberlite XAD- 4. Dále bylo připraveno si 100 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 7,3 %.

Na příprava tohoto množství kyseliny o stanovené koncentraci bylo odpipetováno 73 ml 10% kyseliny chlorovodíkové do kádinky a poté bylo odměřeno a přilito k odpipetovanému množství kyseliny 27 ml destilované vody. Bylo tak dosaženo požadovaného roztok kyseliny chlorovodíkové o přesné koncentraci.

Po dobu jedné hodiny byla pryskyřice kondicionována ve 100 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 7,3 % a po uplynutí stanoveného času 1 hodiny byla tato směs jednou přefiltrována přes filtrační papír. Samotná pryskyřice byla poté umístěna přes noc do roztoku metanolu a vody v poměru 39 ml : 39 ml (1 : 1), aby nabobtnala.

5.1.1.2 Metoda izolace polyfenolů

Druhý den byly naplněny dvě byrety směsí nabobtnalé pryskyřice, destilované vody a metanolu a byly ucpána vatovým tamponem. Naplněné byrety pryskyřicí byly nejprve prolity 400 ml destilované vody (každá 200 ml). Sterilní filtrát červených hroznů (120 ml) byl poté pomalu postupně naléván do připravených byret rychlostí 10 ml za 45 minut. Poté byly byrety prolity roztokem kyseliny chlorovodíkové (250 ml) o pH 2, která byla připravena ze 31% kyseliny chlorovodíkové a ta následně zředěná destilovanou vodou. Pomocí pH metru bylo stanoveno požadované pH, které bylo ověřeno pH papírky. Následovalo propláchnutí byret 300 ml metanolu, který byl spolu s fenolickými frakcemi zachycen ve sterilní kádince a nechal se odpařit na vodní lázni při teplotě 50 °C. Na dně kádinky, zakryté alobalovou čepičkou pro zachování sterility, tak zůstalo 0,52 g čistých polyfenolů. Toto množství vyextrahovaných polyfenolů bylo smícháno s 10 ml destilované vody ve sterilní zkuševce a uchováno pro další analýzy.

5.1.2 EXTRAKCE POLYFENOLŮ ZE ZELENÉHO ČAJE

Metoda extrakce polyfenolů ze zeleného čaje, použitá Bharadwaze a Bhattacharje (2012), spočívala v rozdrčení 30 g nahrubo sušených čajových lístků tloučkem ve třecí misce. Rozdrčené množství čajových lístků bylo přesypáno do kádinky, kam byla přilévána destilovaná voda v poměru 1 : 20 (tedy 600 ml) za občasného míchání skleněnou tyčinkou, aby došlo k deaktivaci enzymů. Roztok obsahující čajové kousky byl zahříván po dobu 1 hodiny nad kahanem při teplotě 58 °C, která byla kontrolována teploměrem.

Mezitím byla sestavena filtrační aparatura a roztok byl filtrován nejprve přes gázu, kdy bylo získáno 400 ml filtrátu. Dále bylo toto množství filtrováno třikrát přes filtrační

papír KA 3, aby se dosáhlo co nejmenšího množství kalu. Jelikož bylo zapotřebí získat čistý zelený čaj, následoval proces dekofeinizace.

K dekofeinizaci čaje bylo použito 245 ml čajového filtrátu, který byl smíchán v dělicí nálevce s dichlormethanem v poměru 1 : 1 a následně byl roztok pečlivě protřepán. Po důkladném protřepání se roztok nechal odstát a po nějakém čase se rozdělil na dvě vrstvy, na horní dekofeinizovanou vrstvu a spodní vrstvu obsahující dichlormethan s kofeinem. Spodní vrstva byla upuštěna do kádinky a svrchní vrstva byla podrobena tomuto procesu dekofeinizace ještě pětkrát. To znamená, že po každém postupu dekofeinizace byl zaznamenán objem získaného čaje zbaveného kofeinu a bylo přidáno stejné množství dichlormethanu (1 : 1). Po tomto procesu bylo získáno 196 ml dekofeinizovaného čaje.

Získané množství čaje bylo poté smícháno opět v dělicí nálevce s 250 ml ethylacetátu. Poté bylo naváženo na analytické váze 0,1 g kyseliny askorbové na hodinovém skle. Toto množství kyseliny askorbové bylo přidáno též do roztoku, aby se zabránilo oxidaci. Směs byla důkladně protřepána a znovu rozdělena na dvě vrstvy, horní obsahující ethylacetát s polyfenoly a spodní obsahující čajový filtrát s oleji a lipidy. Spodní vrstva byla upuštěna a horní vrstva přelita do kádinky a uchována. Za účelem co největší výtěžnosti fenolických sloučenin byl tento postup s čajovým filtrátem představující spodní vrstvu proveden třikrát, ale už bez přítomnosti kyseliny askorbové. Všechny horní vrstvy obsahující ethylacetát s polyfenoly byly slity dohromady do kádinky. Kádinka byla ponechána k odpaření na vodní lázni při teplotě 50 °C do dalšího dne opatřená alobalovou zátkou.

Výsledné vysušené polyfenoly (0,72 g) na dně kádinky byly rozpuštěny v 10 ml destilované vody a uchovány ve sterilní zkumavce pro další analýzy.

5.2 METODY MIKROBIOLOGICKÝCH PRACÍ

5.2.1 DILUČNÍ METODA

Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace antibakteriální látky potřebnou k inhibici růstu bakterií byla použita diluční metoda. Tato kvantitativní metoda, která je referencí pro testování antimikrobiální citlivosti a spočívá v přípravě sériového ředění antibakteriálního činidla (Montalvão et al. 2014). Tyto testy se provádějí v živných roztocích, které obsahují různé zvolené koncentrace antibiotik nebo jiných látek vykazujících antibakteriální aktivitu. Standartní inokulum testovaného mikroba se injektuje do živného roztoku a po inkubaci při určité teplotě v závislosti na optimální teplotě růstu

bakterií se odečte minimální inhibiční koncentrace, což je nejnižší množství antibakteriálního činidla potřebné k inhibici viditelného růstu mikroba (Marešová 2012).

5.2.1.1 Příprava živného roztoku a inokula

K přípravě živného roztoku byly použity 4 g práškového živného agaru smíchaného se 125 ml destilované vody. Po důkladném rozpuštění bylo kultivační médium přefiltrováno přes filtrační papír do kádinky a sterilizováno horkým vzduchem při teplotě 121 °C po dobu 15 min. Sterilní živný roztok byl poté pipetován pomocí mikropipety do 120 sterilních zkumavek po 1,4 ml. Každá zkumavka byla opatřena alobalovou čepičkou k udržení sterility.

Inokulace je proces přidání mikroorganismů do kultivačního média s cílem umožnit jejich růst a množení. Inokulace byla provedena pomocí mikrobiologické kličky vysterilizované v Bunsenově kahanu, kdy bylo odebráno několik kolonií určité bakterie a aplikováno do zkumavky s destilovanou vodou. Pro dosažení zákalu odpovídajícího McFarlandovu roztoku č.2 byl proces opakován několikrát. Inokula, roztoky bakterií v živném roztoku, byla následně použita v diluční metodě.

5.2.1.2 Příprava McFarlandových standardů

Minimální inhibiční koncentrace antibakteriálního činidla potřebná k inhibici bakteriálního růstu se určuje porovnáváním zakalení bakteriální suspenze s tzv. McFarlandovými roztoky pomocí vizuálního hodnocení. McFarlandovy roztoky č. 1 a č. 2 byly připraveny smícháním dihydrátu chloridu barnatého $BaCl_2 \cdot 2 H_2O$ a kyseliny sírové H_2SO_4 . Srovnávací standart č. 1 byl připraven kombinací 0,1 ml 1% roztoku dihydrátu chloridu barnatého s 9,9 ml 1% kyseliny sírové. Pro přípravu McFarlandova roztoku č. 2 bylo odpipetováno 0,2 ml 1% dihydrátu chloridu barnatého a 9,8 ml 1% kyseliny sírové (McFarland 1907).

5.2.1.3 Postup zjištění MIC diluční metodou

Nejprve bylo připraveno 10 sterilních zkumavek s alobalovou zátkou pro každou bakterii s jednou testovací účinnou látkou. To představuje celkem 120 zkumavek pro tři bakterie, dva extrakty polyfenolů a dvě opakování. Osm zkumavek pro jednu bakterii bylo vloženo do předem označeného stojanu zkratkou dané bakterie a označeny čísly 1–8. Kromě

toho byly zbylé dvě připravené zkumavky pro každou bakterii označené jako kontrolní K1 a K2, které byly také vloženy do stojanu. Následně bylo do každé zkumavky odpipetováno 1,4 ml sterilního živného roztoku.

Jak už bylo zmíněno diluční metoda spočívá v sériovém ředění činidla, proto bylo potřeba vytvořit sériovou řadu pro každou substanci. Po vytvoření série zkumavek bylo množství 1,4 ml roztoku polyfenolů odpipetováno a přidáno do první zkumavky, kde již bylo předem odpipetované množství 1,4 ml živného roztoku. Z této zkumavky po důkladném protřepání bylo následně odebráno 1,4 ml, přidáno do další zkumavky a celý postup se opakoval až do zkumavky označené číslem 8. Po protřepání osmé zkumavky z ní bylo odpipetováno nadbytečné množství roztoku, takže každá zkumavka obsahovala poloviční množství účinné látky při zachování stejného objemu. Kontrolní zkumavky K1 a K2 zůstaly bez polyfenolů. Tento postup se opakoval pro všechny geometrické řady pomocí sterilní mikropipety se zobáčkem pro každou účinnou látku vyextrahovanou z přírodního zdroje (tj. pro dvě řady s polyfenoly z červených hroznů pro jednu zvolenou bakterii a dvě řady s polyfenoly ze zeleného čaje též pro jednu bakterii).

Po postupném odměřování polovičního množství do zbylých zkumavek proběhlo očkování zkumavek 20 μ l příslušného inokula. Takto připravené zkumavky byly zázátkovány a kultivovány při teplotě vhodné pro bakteriální růst (37 °C) do druhého dne.

Druhý den byly zkumavky porovnávány s McFarlandovými standarty, kde čisté živné médium značilo úplnou inhibici, lehce zakalené médium odpovídající roztoku McFarland č. 1 značilo částečnou inhibici a vysoce zakalené médium odpovídající roztoku McFarland č. 2 představoval neúčinnost přidaného množství aktivní látky.

5.3 ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT

Získaná data byla nejprve uspořádána do tabulky a následně zpracována pomocí grafů, které byly použity ve výsledcích. Ze získaných hodnot byla provedena logistická analýza pravděpodobnosti inhibičního efektu polyfenolů na vybrané druhy bakterií. K tomuto účelu byl použit software SW QC Expert.

6 VÝSLEDKY

Extrahováním metodou liquid-liquid z původních 400 g čerstvých červených hroznů révy vinné bylo získáno 0,52 g polyfenolů, zatímco ze 30 g sušených lístků zeleného čaje bylo získáno 0,71 g polyfenolických sloučenin.

Při zohlednění výtěžnosti polyfenolové extrakce, bylo dosaženo následujících hmotnostních koncentrací polyfenolů v jednotlivých zkumavkách (1-8):

červené hrozny révy vinné (mg/ml): 49,429; 24,715; 12,357; 6,179; 3,089; 1,544; 0,772; 0,386

zelený čaj (mg/ml): 66,293; 33,147; 16,573; 8,287; 4,143; 2,072; 1,036; 0,518.

6.1 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINEK ZÍSKANÝCH POLYFENOLŮ

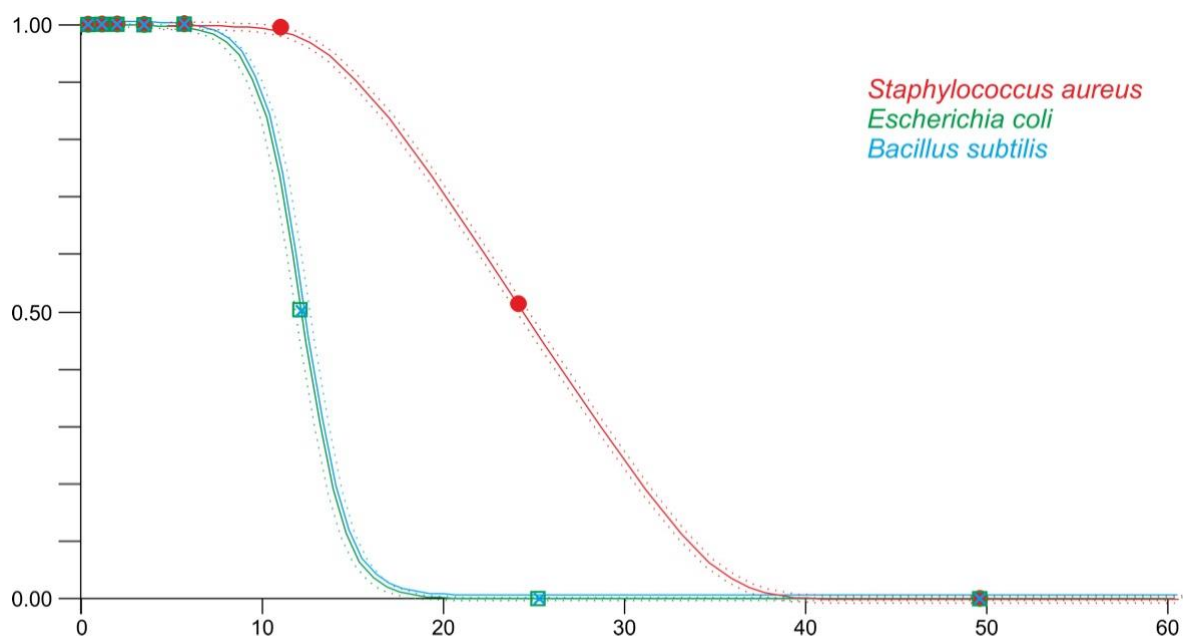
6.1.1 POLYFENOLOVÉ EXTRAKCE Z ČERVENÝCH HROZNŮ RÉVY VINNÉ

Polyfenoly získané z červených hroznů révy vinné měly účinnost na všechny tři testované bakterie.

Největší antibakteriální účinek byl zaznamenán proti gramnegativní bakterii *E. coli* a grampozitivní *Bacillus subtilis*. Účinek na *E. coli* byl patrný jak při prvním pokusu, tak při druhém již při koncentraci 12,357 mg/ml účinné látky, kdy základ odpovídal McFarlandovu roztoku č. 1. Došlo tedy k částečné inhibici a další množení bakterie bylo pozastaveno. Při koncentraci 24,715 mg/ml a 49,429 mg/ml byl její bakteriální růst již zcela inhibován.

U bakterie *Bacillus subtilis* byly shledány stejné výsledky při obou pokusech, stejně jako u *E. Coli*. Tato bakterie byla též rezistentní vůči účinné látce až do koncentrace 6,179 mg/ml, kdy zákal odpovídal McFarlandovu roztoku č. 2, ale už při koncentraci 12,357 mg/ml byl bakteriální růst částečně inhibován tzn., že zákal odpovídal McFarlandovu roztoku č. 1. Zcela čirý vzorek byl zaznamenán při nejvyšší koncentraci 24,715 mg/ml a 49,429 mg/ml účinné látky.

Nejméně účinné byly polyfenoly z červených hroznů proti grampozitivní bakterii *S. aureus*, a to při obou pozorování. *Staphylococcus aureus* vyšel v této studii jako nejodolnější ze všech tří testovaných bakterií, a tak byly zaznamenány rozdílné výsledky. Tento mikroorganismus zastavil svůj růst až při nejvyšší koncentraci 49,429 mg/ml, kdy byl vzorek zcela čirý, jako tomu bylo tedy i u ostatních testovaných bakteriích. Mírně zakalený vzorek odpovídající zákalu McFarlandovu roztoku č. 1 se ukázal při koncentraci 24,715 mg/ml, při nižších množstvích se pak polyfenoly ukázaly jako inhibičně neúčinné.



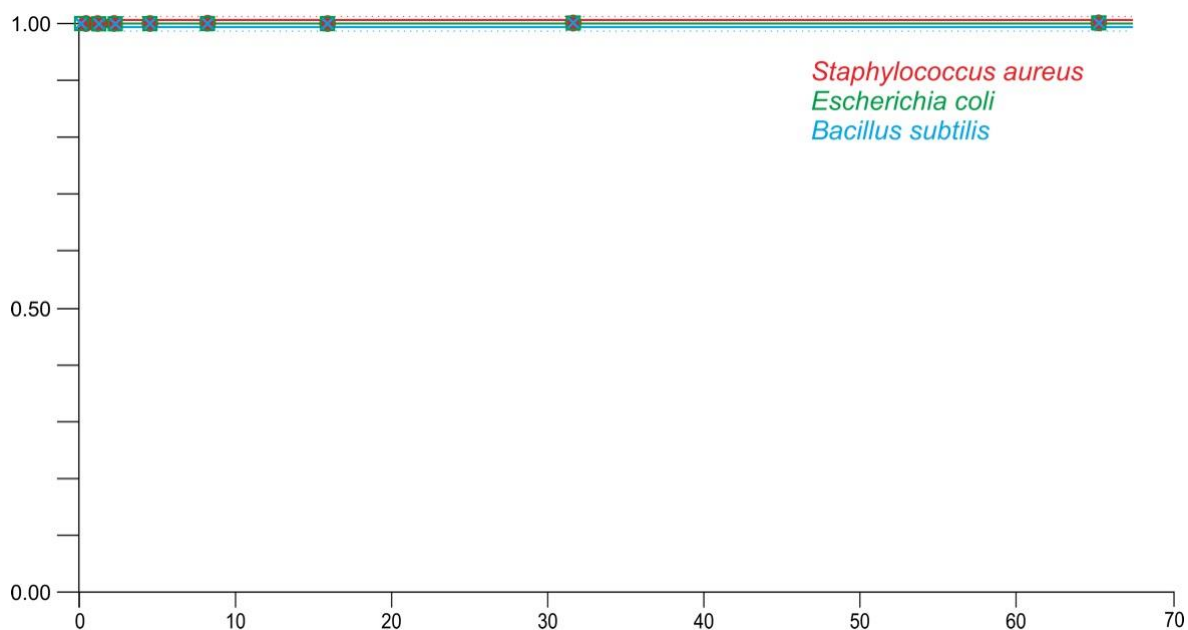
Graf 1 - inhibiční aktivita extraktu polyfenolů z červených hroznů na bakterie *E. coli* (zelená), *S. aureus* (červená) a *B. subtilis* (modrá) 1

Osa x: koncentrace polyfenolů v mg/ml

Osa y: inhibiční aktivita (0 – inhibovaná kultura; 0,5 – částečně inhibovaná kultura, omezení růstu na úrovni McFarland 1; 1 – bez inhibičního efektu, zákal na úrovni McFarlandovu roztoku č. 2.

6.1.2 POLYFENOLOVÉ EXTRAKCE ZE ZELENÉHO ČAJE

Zatímco u polyfenolů z červených hroznů byl antibakteriální účinek prokázán docela ve velké míře, tak u polyfenolových extraktů ze zeleného čaje nikoli. Ani u jedné ze tří testovaných bakterií nebyl prokázána inhibice růstu, a to ani při nejvyšší koncentraci účinné látky. Všechny vzorky vykazovaly zákal na úrovni McFarlandovu roztoku č. 2.



Graf 2 - inhiční aktivita extraktu polyfenolů ze zeleného čaje na bakterie *E. coli* (zelená), *S. aureus* (červená) a *B. subtilis* (modrá) 1

Osa x: koncentrace polyfenolů v mg/ml

Osa y: inhiční aktivita (0 – inhibovaná kultura; 0,5 – částečně inhibovaná kultura, omezení růstu na úrovni McFarland 1; 1 – bez inhičního efektu, zákal na úrovni McFarlandovu roztoku č. 2.

Tab. 1 - Přehled provedených analýz – inhibiční aktivita různých koncentrací přírodních polyfenolů na *E. coli*, *S. aureus* a *B. subtilis* 1

		8			7			6			5			4			3			2			1					
červené hrozny	mg/ml	0,386			0,772			1,544			3,089			6,179			12,357			24,715			49,429					
	1	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA			
	2	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA
zelený čaj	mg/ml	0,518			1,036			2,072			4,143			8,287			16,573			33,147			66,293					
	1	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA
	2	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA	BS	EC	SA



čiré

úplná inhibice



McFarland 1

částečná inhibice

McFarland
2

žádná inhibice

7 DISKUSE

Hlavním cílem této práce bylo stanovit, zda přírodní polyfenoly z extraktu červených hroznů a zeleného čaje vykazují antibakteriální aktivitu proti třem testovaným bakteriím, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Výsledky tohoto výzkumu naznačují, že mnoho přírodních polyfenolů má schopnost inhibovat růst různých druhů bakterií, včetně patogenních kmenů.

Polyfenoly vyextrahované z červených hroznů měly větší schopnost inhibovat bakteriální růst a množení, i když se je podařilo vyextrahovat v menším množství než ze zeleného čaje.

Extrakce je velmi důležitou fází izolace, identifikace a zásadním krokem pro pozdější použití fenolických sloučenin a neexistuje jediná a standartní metoda extrakce (Bucić-Kójić et al. 2007).

Ačkoli extrakce rozpouštědlem nabízí celkem vysokou výtěžnost fenolických sloučenin z hroznů, použití velkého množství organických rozpouštědel představuje pro výzkumníky zdravotní a bezpečnostní rizika a je nešetrná k životnímu prostředí (Xia et al. 2010).

Mimo jiné i přesto, že je to celkem časově nenáročná metoda extrakce, bylo vyvinuto několik vylepšených metod pro extrakci fenolických látek z hroznů, jako je mikrovlnná extrakce (MAE), ultrazvuková extrakce (UAE), superkritická tekutinová extrakce (SFE), tlaková extrakce kapalinou (PLE) a několik dalších, které dokážou ještě více zkrátit dobu extrakce, procesní teplotu a spotřebu rozpouštědla, a tím přispět k vyšší účinnosti extrakce, vyšší výtěžnosti extrakce a nižší spotřebě energie (Ghendov-Mosanu et al. 2022).

Jak uvádí Mikeš et al. (2008) množství polyfenolů v červených hroznech se však u různých odrůd *Vitis vinifera* i u různých kultivarů liší a během procesu zrání hroznů se množství polyfenolů postupně zvyšuje.

Katalinić et al. (2010) testovali antibakteriální aktivitu polyfenolů z červených hroznů mikrodilučním testem v bujónu s použitím grampozitivních bakterií druhu *Staphylococcus aureus*, rodu *Bacillus* i gramnegativních bakterií *Escherichia coli* a byla potvrzena proti všem testovaným mikroorganismům. Minimální inhibiční koncentrace byly zjištěny v rozmezí 0,014–0,59 mg/ml. V této studii byl inhibiční účinek zaznamenán ale až při koncentraci 12, 357 mg/ml u *E. coli* a *B. subtilis*. U *Staphylococcus aureus* byla však

potřeba ještě vyšší koncentrace účinné látky, aby byl prokázán inhibiční účinek, a to až při 24, 715 mg/ml.

Je důležité podotknout, že polyfenolové sloučeniny z různých částí hroznů vykazují různé antibakteriální účinky. Některé výzkumy ukázaly, že extrakty ze semen byly účinnější než jiné části hroznů. Pro tuto studii byly využity extrakty z celých hroznů, které se podle Xia et al. (2010) řadí na druhé místo z hlediska nejnižší antibakteriální aktivity po samotné dužině, která nevykazuje vůbec žádný antibakteriální účinek. Nejvyšší antibakteriální aktivitu podle studie Xia et al. (2010) vykazují vzestupně fermentované pokrutiny, slupka, list a semena. Naopak Kondratyuk et al. (2009) zase uvádí, že nejvyšší množství polyfenolů (50–100 µg/g) se nachází ve slupce hroznů, kde je nejvíce zastoupen resveratrol.

Pro srovnání extrakty z celého hroznového ovoce inhibovaly růst bakterií v koncentracích 0,68 mg/ml a 1,36 mg/ml pro grampozitivní a gramnegativní bakterie podle Xia et al. (2010), zatímco Jayaprakasha et al. (2003) dospěli k závěru, že extrakty z hroznových jader inhibovaly růst bakterií už při 0,34–0,39 mg/ml a 0,475–0,575 mg/ml pro grampozitivní a gramnegativní bakterie

Dále Rodriguez-Vaquero et al. (2007) se domnívali, že inhibice mikrobiálního růstu zejména u *E. coli* se zvyšovala s rostoucí koncentrací polyfenolů hroznového vína, což je v souladu s touto kvalifikační prací.

Zelený čaj obsahuje poměrně velké množství polyfenolů, především katechinů a jejich derivátů, kterých byla snaha dosáhnout. Pro extrakci těchto polyfenolických sloučenin je nanejvýš důležitá metoda extrakce, jak uvádí Tariq et al. (2010). Extrakce rozpouštědlem mohla ovlivnit výtěžnost katechinů zeleného čaje, kdy pro jiné experimenty může vzorek obsahovat čerstvě uvařený zelený čaj a množství katechinů bude odlišné. Při extrahování polyfenolů došlo ke kontaminaci vzorku vodou, což mohlo ovlivnit a následně zkreslit jejich inhibiční aktivitu.

Množství katechinů je výrazně ovlivněno i jinými faktory např. zpracováním čajových lístků, zeměpisnou polohou, kde je čajovník pěstován, podmínkami pěstování a přípravou samotného čaje (Reygaert 2014).

Bylo prokázáno, že zelený čaj má antimikrobiální účinky proti řadě grampozitivním i gramnegativním bakteriím např. proti *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*, které byly testovány. Dle Khan et al. (2019) jsou grampozitivní bakterie citlivější než gramnegativní bakterie. Příkládá to k rozdílu ve složení buněčné stěny, které se u nich liší.

U gramnegativních bakterií je buněčná stěna obklopena vnějším obalem obsahujícím lipopolysacharidy (LPS), zatímco u grampozitivních nikoli. Tento vnější obal omezuje pronikání testované sloučeniny. Tuto skutečnost potvrzuje i Reygaert (2014), že čajové polyfenoly mají menší účinek na membrány gramnegativních bakterií. Reygaert (2014) to pokládá za následek, že vnější membrána z LPS gramnegativních bakterií je záporně nabitá. Tento fakt nebylo možné ověřit díky neúčinnosti zeleného čaje ani na jednu z testovaných bakterií.

Výraznou inhibiční aktivitu zeleného čaje na *E. coli* zjistili Tiwari et. al (2005). To není ale v souladu s výsledky této kvalifikační práce, kdy nebyla prokázána žádná inhibiční aktivita.

I Parvez et al. (2019) testovali surový extrakt polyfenolů EGCG ze zeleného čaje *Camellia sinensis* proti multirezistentním patogenům *E. coli* a *S. aureus*. Pro stanovení MIC jednotlivých extraktů byl jejich účinek stanoven též mikrodiluční metodou, ale hustota bakteriální kultury byla porovnána s 0,5 McFarlandovým roztokem. Surový extrakt zeleného čaje vykazoval minimální inhibiční koncentraci 0,125 mg/ml zeleného čaje pro *E. coli* i *S. aureus*, úplná inhibice nastala až při koncentraci 0,500 mg/ml. Při testování purifikovaného zeleného čaje dospěli ke koncentracím extraktů EGCG, které inhibovali růst a množení bakterií už v rozmezí od 4,75 µg/ml do 2500 µg/ml.

Ani ten fakt, že podle studie Khan et al. (2019) se mezi všemi testovanými organismy *Bacillus subtilis* jevil jako citlivější vůči vodnému extraktu ve srovnání se *S. aureus* a *E. coli* nejde vyvrátit, ale ani potvrdit k vzhledem dosaženým výsledkům.

Existuje několik faktorů, které ovlivňují hodnoty MIC, včetně inokula, typu testovaných organismů, pH a teploty. Výsledky těchto studií se mohou lišit od výsledků, které by mohly být stanoveny na základě striktních protokolů. V budoucnu bude velmi užitečné, když vědci použijí jednotlivé protokoly a budou je dodržovat. To usnadní porovnání výsledků a posouzení, zda jsou výsledky smysluplné, kromě toho, že jediné tak by bylo možné převést výsledky do klinického použití.

ZÁVĚR

Hlavním cílem této kvalifikační práce bylo poskytnout aktualizovaný přehled účinků polyfenolů jako antibakteriálních látek a stanovit antibakteriální aktivitu přírodních extraktů z červených hroznů révy vinné a zeleného čaje vůči třem vybraným mikroorganismům.

Výsledky ukazují, že mnoho z těchto látek projevuje antibakteriální aktivitu proti různým druhům bakterií včetně bakterií grampozitivních i gramnegativních. Jejich účinek je dán především jejich schopností působit na membrány bakteriálních buněk a inhibovat enzymy, které jsou pro bakteriální růst a množení nezbytné.

Minimální inhibiční koncentrace extraktů z polyfenolů vyextrahovaných metodou liquid-liquid z červených hroznů révy vinné a zeleného čaje byla stanovena pomocí diluční metody.

Byly prokázány antibakteriální účinky polyfenolů, konkrétně flavonoidů, které představují největší třídu polyfenolických sloučenin, dále fenolových kyseliny i stilbenů, z červených hroznů révy vinné na třech bakteriálních kulturách jako jsou *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. U extraktů polyfenolů zeleného čaje, které představují největší zastoupení katechinů, nebyla prokázána žádná inhibiční aktivita na třech výše zmiňovaných bakteriálních kulturách.

Z toho vyplývá, že i přestože se jedná o nadějnou oblast výzkumu, je důležité si uvědomit, že účinnost polyfenolů se může lišit v závislosti na druhu bakterie a na způsobu, jakým jsou polyfenoly aplikovány. Je tedy nutné provést další výzkum, aby bylo možné ještě lépe porozumět mechanismu účinku jejich farmakokinetickým a farmakodynamickým vlastnostem pro využití v terapeutických aplikacích, i když se jedná o látky s nízkou toxicitou a širokou spektrální aktivitou, aby se zajistilo jejich bezpečné účinné použití jako antibakteriálních látek.

Celkově lze říci, že přírodní polyfenoly mají vysoký potenciál jako antibakteriální látky a mohly by být využívány jako alternativa k běžným antibiotikům, zejména v době, kdy se vyskytuje stále větší odolnost bakterií vůči běžně podávaným konvenčním antibiotikům. Tyto výsledky přinášejí nový pohled na přírodní látky jako možné zdroje léčivých prostředků pro boj proti infekcím způsobenými bakteriemi, a to zejména díky své přirozené povaze a schopnosti potlačit růst bakterií.

RESUMÉ

Bakalářská práce na téma antibakteriální aktivita přírodních polyfenolů se zabývá studiem účinnosti různých polyfenolů v boji proti bakteriím. V teoretické části je definována antibakteriální aktivita, dále jednotlivé skupiny polyfenolů, a nakonec jsou charakterizovány použité přírodní zdroje a testované bakterie. V metodice jsou popsány použité metody pro měření antibakteriální aktivity, čímž je diluční metoda, a kromě toho také metoda, díky níž byly polyfenoly vyextrahovány, metoda liquid-liquid.

Výsledky této práce, které jsou zpracovány pomocí softwaru QC Expert, ukazují, že některé polyfenoly jsou velmi účinné proti určitým druhům bakterií, zatímco jiné polyfenoly nemají žádný účinek. Výzkum byl proveden na třech druzích bakterií *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*. Výsledky této práce mají potenciál využití k léčbě bakteriálních infekcí a mohou být zajímavou alternativou ke konvenční léčbě antibiotiky.

CIZOJAZYČNÉ RESUMÉ

The bachelor thesis on the antibacterial activity of natural polyphenols deals with the study of the effectiveness of various polyphenols in the fight against bacteria. In the theoretical part, the antibacterial activity is defined, then the individual groups of polyphenols, and finally the natural sources used and the bacteria tested are characterized. In the methodological part, the methods used to measure the antibacterial activity are described, which makes the dilution method, and in addition the method by which the polyphenols were extracted, the liquid-liquid method.

The results of this work, which are processed using QC Expert software, show that some polyphenols are very effective against certain types of bacteria, while other polyphenols have no effect. The research was carried out on three species of bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. The results of this work have the potential to be used for the treatment of bacterial infections and may be an interesting alternative to conventional antibiotic treatment.

SEZNAM LITERATURY

Albert, S., Horbach, R., Deising, H. B. Siewert, B. a Csuk, R. 2011. Synthesis and antimicrobial activity of (E) stilbene derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(17), 5155–5166.

Albuquerque A., Silva P., Cavalcante A. a Sampaio F. (2013). Polyphenols as a source of antimicrobial agents against human pathogens. *Plant Extracts*. 275–293.

Albuquerque, B. R., Heleno S. A., Oliveira, B. P. P, Barros, L. a Ferreira, I. C. F. R. 2021. Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & Function* 12(1), 14–29.

Alihosseini, F. a Sun, G. 2011. Antibacterial colorants for textiles. In Pan, N., Sun, G. (eds) *Functional Textiles for Improved Performance, Protection and Health*. Woodhead Publishing. 376–403.

Andrade, J. P. a Assunção M. 2015. Green Tea Effects on Age-Related Neurodegeneration. In Martin, C. R., Preedy, V. R. (eds) *Diet and Nutrition in Dementia and Cognitive Decline*. Academic Press. 915–924.

Anonymus. 2016. Theaceae. In Aronson, J. K. (ed.), *Meyler's Side Effects of Drugs*, 16. Elsevier Science. 812 s.

Anonymus. 2012. Polyphenols. In Moreno, J., Peinado, R. (eds), *Enological Chemistry*. Academic Press. 53–76.

Babu, P. V. A. a Liu, D. 2009. Flavonoids and Cardiovascular Health. 371–392. In Watson, R.R. (ed.) *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*. Academic Press.

Barakat, R., Park, J. CH., Perez A. P., Chiu, K. a Ko, CH. 2018. Female Antiestrogens. *Encyclopedia of Reproduction*, 2, 740–747.

- Bednář, M., et al. 1996. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 558 s.
- Benaiges, A. a Guillén, P. 2007. Botanical Extracts. In Salvador, A., Chisvert, A. (eds) *Analysis of Cosmetic Products*. Elsevier science. 345–363.
- Beneš, J. 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. Grada Publishing. Praha. 600 s.
- Bharadwaz, A. a Bhattacharjee, C. 2012. Extraction of polyphenols from dried tea leaves. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 3(5), 1–2.
- Bonetti, F., Brombo, G. a Zuliani G. 2017. Nootropics, Functional Foods, and Dietary Patterns for Prevention of Cognitive Decline. In Watson, R. R. (ed.) *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*. 211–232.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M. a Velić, D. 2007. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236–242.
- Bultosa, G. 2016. Functional Foods: Overview. In Wrigley, C., Seetharaman, K. (eds) *Encyclopedia of Food Grains*, 2. Academic Press. 1–10.
- Carmona, M. J., Cubas, P., Calonje, M. a Martínez-Zapater, M. J. 2007. Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L.) *Canadian Journal of Botany*, 85(8), 701–711.
- Cvejić Hogervorst, J., Atanacković Krstonošić, M., Bursać, M. a Miljić, U. 2017. Polyphenols. In Galanakis, CH. M. (ed.), *Nutraceutical and Functional Food Components*. Academic Press. 203–258.
- Cviner, P., Pádrová, K. a Koločovská, I. 2017. Moderní možnosti využití odpadních surovin ze zpracování vinných hroznů = Modern Utilization of Biowaste from Wine Grape Processing. *Chemické listy*, 111(2), 103–108.

- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181.
- Durasová, R., Pavlíková, M., Vaňková, M. 2017. *Přírodní polyfenoly a jejich antibakteriální aktivita*. MS. Kvalifikační práce depon in. Gymnázium Blovice, 28 s.
- Esselen, M. a Barth S. W. 2014. Food-Borne Topoisomerase Inhibitors. *Advances in Molecular Toxicology*, 8, 123–171.
- Favela-Hernandéz, J. M. J., García, A., Garza-González, E., Rivas-Galindo, V. M. a Camacho-Corona, M. R. 2012. Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea tridentata*. *Phytotherapy Research*, 26(12), 1957–1960.
- Figueiredo, A., Fortes M. A., Ferrerira, S. et al. 2008. Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *Journal of Experimental Botany*, 59(12), 3371–3381.
- Flamini, R. a Rosso, M. 2019. High-Resolution Mass Spectrometry and Biological Properties of Grapevine and Wine Stilbenoids. *Studies in Natural Products Chemistry*, 61, 175–210.
- Foster, T. J. 2002. *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology*, 2, 839–888.
- García-Pérez, M. E., Kasangana, P. B. a Stevanovic, T. 2017. Bioactive Polyphenols for Diabetes and Inflammation in Psoriasis Disease. *Studies in Natural Products Chemistry*, 52, 231–268.
- Geržová, L. 2010. *Escherichia coli ve střevní mikroflóře*. MS. Bakalářská práce, depon. in Masarykova univerzita v Brně, Fakulta Přírodovědecká, 39 s.

- Gharwalová, L., Hutár, D., Masák, J. a Kolouchová, I. 2018. Antioxidant activity and phenolic content of organic and conventional vine cane extracts. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(4), 289–295.
- Ghendov-Mosanu, A., Cojocari, D., Balan, G. a kol. 2022. Chemometric Optimization of Biologically Active Compounds Extraction from Grape Marc: Composition and Antimicrobial Activity. *Molecules*, 27(5).
- Gollücke, A. P. B., Peres, R. C., Ribeiro, D. A. a Aguiar, O. 2018. Polyphenols as Supplements in Foods and Beverages: Recent Discoveries and Health Benefits, an Update. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*, 2, 11–18.
- Gonçalves, A. C., Bento C., Jesus, F., Alves, G. a Silva, L. R. 2018. Sweet Cherry Phenolic Compounds: Identification, Characterization, and Health Benefits. *Studies in Natural Products Chemistry*, 59, 31–78.
- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A. a Ibáñez, E. 2012. Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food. In Pawliszyn, J. (ed.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 4. Academic Press. 159–180.
- Hostetler, G. L., Ralston, R. A. a Schwartz, S. J. 2017. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *Advances in Nutrition*, 8(3), 423–435.
- Hvězdová, K. 2016. *Výskyt a význam fenolových sloučeninách v potravinách*. MS. Bakalářská práce. depon. in Mendelova univerzita v Brně, Fakulta Zahradnická, 43 s.
- Chandrasekara, A. 2019. Phenolic Acids. In Melton, L., Varelis, P. (eds), *Encyclopedia of Food Chemistry*, 3. Elsevier. 535–545.
- Chen, Q., Zhao, J., Liu, M., Cai, J. 2008. Nondestructive identification of tea (*Camellia sinensis* L.) varieties using FT-NIR spectroscopy and pattern recognition. *Czech Journal Food Sciences*, 26, 360–367.

- Jackson, R. S. 2020. Grape Species and Varieties. In Jackson, R. S. (ed.), *Wine Science*, 5. Academic Press. 15-49.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T. a Sakariah, K. K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food research international*, 36(2), 117–122.
- Jindrák, V., Hedlová, D. a Urbášková, P. 2014. *Antibiotická politika a prevence infekcí v nemocnici*. Mladá fronta. Praha. 712 s.
- Katalinić, V., Možina S. S., Skroza, D. et al. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119(2), 715–723.
- Khan, I., Abbas, T., Anjum, K., Abbas, S. Q., Shagufta, B. I., Ali Shah, S. A. a Akhter, N. 2019. Antimicrobial potential of aqueous extract of *Camellia sinensis* against representative microbes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(2).
- Kondratyuk, P. T. a Pezzuto, M. J. 2009. Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health. *Pharmaceutical Biology*, 42(1), 46–63.
- Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J. a Kašparovský, T. 2029. Isoflavones. *Molecules*, 24(6), 1076 s.
- Kurhekar, J. V. 2020. Antimicrobial lead compounds from marine plants. In Egbuna, Ch., Kumar, S., Ifemeje, J. C., Ezzat, S. M., Kaliyaperumal, S. (eds), *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery*. Elsevier. 257–274.
- Ma, J., Zhou, Y., Ma, Ch., Yao, M., Jin, J., Wang, X. a CHen, L. 2010. Identification and characterization of 74 novel polymorphic EST-SSR markers in the tea plant, *Camellia sinensis* (Theaceae). *American Journal of Botany*, 97(12), 153–156.

- Marešová L. 2012. Vývoj antibiotické rezistence na vybrané bakteriální druhy v komunitě a v nemocnici ve spádové oblasti oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice Písek a.s. v letech 2000-2010. MS. Bakalářská práce depon Zdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, 55 s.
- Marková, M., Strolená, P. a Fuchs, J. 2018. *Antibakteriální aktivita přírodních polyfenolů*. MS. Kvalifikační práce depon. Gymnázium Blovice, 32 s.
- Martinez, R. M. 2013. *Bacillus subtilis*. In Maloy, S., Hughes, K. (eds), *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2. Academic Press. 246–248.
- Martínez, V., Mitjans, M. a Vinardell, M. P. 2014. Cytoprotective Effects of Polyphenols against Oxidative Damage. In Watson, R. R., Preedy, V. R., Zibadi, S. (eds), *Polyphenols in Human Health and Disease*, 1. Academic Press. 275–288.
- Mazzola, P. G., Lopes A. M., Hasmann F. A., Jozala A. Z., Penna, T., Magalhaes, P. Rangel-Yagui, C. a Pessoa, A. 2008. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(2), 143–157.
- McFarland, J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49, 1176–1178.
- Melter, O. 2021. *Bakteriální perzistence vůči antibiotikům*. Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. Praha, 102 s.
- Menzel, H. 2002. Photoisomerization in Langmuir-Blodgett-Kuhn Structures. In Sekkat, Z., Knoll, W. (eds), *Photoreactive Organic Thin Films*. Academic Press. 179–218.
- Mikeš, O., et al. 2008. Distribution of major polyphenolic compounds in vine grapes of different cultivars growing in South Moravian vineyards. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(3), 182–189.

Moldoveanu, S. C. 2019. Pyrolysis of Aromatic Heterocyclic Compounds. *In* Moldoveanu, S. C. (ed.), *Pyrolysis of Organic Molecules*, 2. Elsevier Science. 715–762.

Montalvão S. I. G. H. M., Singh, V. a Haque, S. 2014. Bioassays for Bioactivity Screening. *Analysis of Marine Samples in Search of Bioactive Compounds*, Comprehensive Analytical Chemistry, 65, 79–114.

Morissette, M., Litim, N. a Di Paolo, T. 2018. Natural Phytoestrogens. *Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products*, 1, 9–61.

Mukherjee, P. K. 2019. Bioactive Phytocomponents and Their Analysis. *In Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. Elsevier. 237–328.

Mukne P. A., Viswanathan V. a Phadatare G. A. 2011. Structure pre-requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacognosy Review*, 5(9), 13–8.

Müller, E., Berger, R., Blass, E., Sluyts, D. a Pfennig, A. 2000. Liquid-liquid extraction. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.

Padmanabhan, P., Correa-Betanzo, J. a Paliyath, G. 2016. Berries and Related Fruits. *In* Caballero, B., Finglas, P. M., Toldrá, F. (eds), *Encyclopedia of Food and Health*. Academic Press. 364–371.

Parvez, M. A. K., Saha, K., Rahman, J. a kol. 2019. Antibacterial activities of green tea crude extracts and synergistic effects of epigallocatechingallate (EGCG) with gentamicin against MDR pathogens. *Heliyon*, 5(7).

Pietta, P., Minoggio, M. a Bramati, L. 2003. Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity. *Bioactive Natural Products (Part I)*, Studies in Natural Products Chemistry, 28, 257–312.

Piggot, P. J. 2009. Bacillus Subtilis. *In* Schaechter, M. (ed.), *Encyclopedia of Microbiology*, 3. Academic Press. 45-56.

- Pina-Pérez, M.C., Rodrigo, D. a Martinez, A. 2015. Using natural antimicrobials to enhance the safety and quality of milk. In Taylor, T. M. (ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Woodhead Publishing. 327–345.
- Ragač, O., et al. 2019. Analýza obsahu antokyánov v bobuliach *Vaccinium corymbosum*, *Vitis Vinifera* a *Aronia melanocarpa* z východného Slovenska = Analysis of Anthocyanin Content of *Vaccinium corymbosum*, *Vitis vinifera* and *Aronia melanocarpa* from East Slovakia. *Chemické listy*, 113(12), 738–744.
- Rana, A., Samtiya, M., Dhewa, T., Mishra, V. a Aluko, E. R. 2022. Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10), 14264 s.
- Ratnavathi, C.V. 2019. Grain Structure, Quality, and Nutrition. In Aruna, C., Visarada, K. B. R. S., Bhat Venkatesh, Tonapi, V. A. (eds), *Breeding Sorghum for Diverse End Uses*. Woodhead Publishing. 193–207.
- Reygaert, W. C. 2014. The antimicrobial possibilities of green tea. *Frontiers in Microbiology*, (5)434.
- Ricke, J. 2018. Biomimetic Chemistry at Interfaces. In Ball, V. (ed.), *Self-Assembly Processes at Interfaces-Multiscale Phenomena*, 21. 367–404.
- Rodriguez-Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., a Nadra, M. C. M. 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 587–593.
- Rosypal, S., Hoďák, K., Martinec, T. a Kocur, M. 1981. *Obecná bakteriologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha. 749 s.
- Rupasinghe, H. P. V., Nair, V. G. S. a Robinson, R. A. 2014. Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions. *Studies in Natural Products Chemistry*, 42, 229–266.

Říhová Ambrožová, J. 2007. Chemoorganotrofní organismy. *Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník* Praha: VŠCHT Praha.

Sang, S. a Zhu, Y. 2014. Bioactive Phytochemicals in Wheat Bran for Colon Cancer Prevention. In Watson, R. R., Zibadi, S. (eds), *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*. Academic Press. 121–129.

Sekaran, S., Roy, A. a Thangavelu, L. 2022. Re-appraising the role of flavonols, flavones and flavonones on osteoblasts and osteoclasts-A review on its molecular mode of action. *Chemico-Biological Interactions*, 355, 109831 s.

Shivashankara, A. R., Rao, S., George, T., Abraham, S., Colin, M. D., Palatty, P. L. a Baliga, M. S. 2019. Tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) as Hepatoprotective Agent. In Watson, R. R., Preedy, V. R. (eds), *Dietary Interventions in Liver Disease*. Academic Press. 183–192.

Shukla, A. S., Jha, A. K., Kumari, R., Rawat, K., Syeda, S. a Shrivastava, A. 2018. Role of Catechins in Chemosensitization. In Bharti, A. Ch., Aggarwal, B. B. (eds), *Role of Nutraceuticals in Chemoresistance to Cancer*, 2. Academic Press. 169–198.

Schindler, J. 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Grada Publishing. Praha. 248 s.

Simpson, D. a Amos, S. 2017. Other Plant Metabolites. In Badal, S., Delgoda, R. (eds) *Pharmacognosy*. Academic Press. 267–280.

Singh, A., Gautam, A., Singh, B. a Navneet. 2022. Antiviral effects of medicinal plants and their active phytochemical constituents against respiratory diseases and associated biological functions. In Egbuna, Ch (ed.), *Coronavirus Drug Discovery*, 2. Elsevier. 23–54.

- Soković, M. a Liaras, K. 2021. Natural products as antifungals. *In Antifungal Compounds Discovery*. Elsevier. 67–165.
- Součková, L. a Ruzsíková, A. 2016. Nová antibiotika v klinické praxi a výzkumu. *Klinická farmakologie a farmacie*, 30(3), 23–28.
- Su, X., Zhou, D., a Li, N. 2022. Bioactive stilbenes from plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 73, 265–403.
- Su, Y., Liu, C., Fang, H. *et al.* 2020. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 173 s.
- Šilhánková, L. 1983. *Mikrobiologie pro potravináře*. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 298 s.
- Štefan, M. 2019. *Antibiotika v klinické praxi*. Galén. Praha. 312 s.
- Taleb, H., Maddocks, S. E., Morris, R. K. a Kanekanian, A. D. 2016. The antibacterial activity of date syrup polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*. *Frontiers in microbiology*. 7.
- Tariq, M., Naveed, A. a Barkat, A.K. 2010. The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis* tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(19), 2028–2033.
- Taylor, T. A. a Unakal, C. G. 2022. *Staphylococcus aureus*. *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Thrane, M., Paulsen, P. V., Orcutt, M. W. a Krieger, T. M. 2017. Soy Protein. In Nadathur, S. R., Scanclin, L. (eds) *Sustainable Protein Sources*. Academic Press. 23–45.
- Tiwari R., Bharti S., Kaur H., Dikshit R. a Hoondal G. 2005. Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotics. *Indian Journal of Medical Research*, 122 (1), 80–84.

Ullah, H. a Khan, H. 2020. Epigenetic drug development for autoimmune and inflammatory diseases. In Castelo-Branco, P., Jeronimo, C. (eds), *Histone Modifications in Therapy*, 20. Academic Press. 395–413.

Ventola, C. L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277–83.

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., a Li, H. B. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 622–646.

Ye, Q., Wang, H. a Xu, J. 2015. Application of NMR Spectroscopy for the Characterization of Dietary Polyphenols. In Rahman, A. Choudhary, M. I. (eds), *Application of NMR Spectroscopy*, 3. Bentham Science Publishers. 37–77.

Ziaullah a Rupasinghe, H. P. V. 2015. Application of NMR Spectroscopy in Plant Polyphenols Associated with Human Health. In Rahman, A., Choudhary, M. I. (eds), *Applications of NMR Spectroscopy*, 2. Bentham Science Publishers. 3–92.

Zitterman, A. 2003. Dietary fiber | Bran. In Caballero, B. (ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2. Academic Press. 1844–1850.

Zuiter, A.S. 2014. Proanthocyanidin: Chemistry and Biology. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier.

INTERNETOVÉ ZDROJE

[1] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Novobiocin>

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK, GRAFŮ A DIAGRAMŮ

Obr. 1. Fenolová skupina (Al- Khalid a El-Naas 2021) 1	56
Obr. 2. Polyfenolová struktura (Anonymus 2023) 1	8
Obr. 3. Kyselina benzoová (Sharma 2022) 1	9
Obr. 4. Kyselina skořicová (Rýdlová, 2015) 1	9
Obr. 5. Základní struktura flavonoidů (Jiang et al. 2009) 1	10
Obr. 6. Základní struktura flavonů (Wang et al. 2018) 1	11
Obr. 7. Základní struktura flavonolů (Wang et al. 2018) 1	12
Obr. 8. Základní struktura katechinů (Tazzini 2014). 1	14
Obr. 9. Základní struktura proanthokyanidinů (Tazzini 2014). 1	14
Obr. 10. Základní struktura flavanonů (Wang et al. 2018). 1	14
Obr. 11. Základní struktura anthokyanidinů (Wang et al. 2018). 1	16
Obr. 12. Základní struktura isoflavonů (Wang et al. 2018) 1	16
Obr. 13. Základní struktura stilbenů (Fillips et al. 2017). 1	18
Obr. 14. Základní struktura lignanů (Mrduljaš et al. 2017). 1	19
Graf 1 - inhibiční aktivita extraktu polyfenolů z červených hroznů na bakterie <i>E. coli</i> (zelená), <i>S. aureus</i> (červená) a <i>B. subtilis</i> (modrá) 1	35
Graf 2 - inhibiční aktivita extraktu polyfenolů ze zeleného čaje na bakterie <i>E. coli</i> (zelená), <i>S. aureus</i> (červená) a <i>B. subtilis</i> (modrá) 1	36
Tab. 1 - Přehled provedených analýz – inhibiční aktivita různých koncentrací přírodních polyfenolů na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> a <i>B. subtilis</i> 1	37

SEZNAM ZDROJŮ OBRÁZKŮ

- Al-Khalid, T. a El-Naas, M. H. 2012. In: *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-common-phenolic-compounds_fig1_234137696
- Anonymus. 2023. In: *Polyphenols, flavonoids, anthocyanins- all antioxidants, but are they different?*. Dostupné z: <https://www.nzblackcurrants.com/en/difference-in-antioxidants/>
- Jiang, W., Kou, J., Zhang, Z. a Yu, B. 2009. In: *Thrombosis Research*. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0049384809002035>
- Mrduljaš, N., Krešić, G a Bilušić, T. 2017. In: *Functional Food-Improve Health through Adequate Food*. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-lignans-2_fig4_318986939
- Rýdlová, I. 2015. In: *Identifikace vybraných v polyfenolických látek v extraktech léčivých rostlin*. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/64318/120186062.pdf?sequence=1>
- Sharma, K. 2022. In: *Benzoic acid – Definition, Preparation, Properties, Uses*. Dostupné z: <https://thechemistrynotes.com/benzoic-acid-preparation-properties-uses/>
- Tazzini, N. 2014. In: *Catechins: Structure and food sources*. Dostupné z: <https://www.tuscany-diet.net/2014/02/02/catechins/>
- Tazzini, N. 2014. In: *Proanthocyanidins: Structure and intestinal absorption*. Dostupné z: <https://www.tuscany-diet.net/2014/02/12/proanthocyanidins/>
- Wang, T., Li Q. a Bi, K. 2018. In: *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32104374/>

Fillips, B., Ammazzalaroso, A. Fantacuzzi, M. a kol. 2017. In: *ChemMedChem*.
Dostupné z: https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cmdc.201700045?casa_token=CHTK_ItUJkAAAAA%3AP7Guyqq0s-VCxIBqI4w0znqqdTKzkwnQQN_efkodJOHzfdOgDVIZxOVX91jizmF_P3Ea19kfRdLofKk

8 PŘÍLOHY

8.1 NAVÁZANÉ POLYFENOLY Z ČERVENÝCH HROZNŮ NA ADHEZNÍ PRYSKYŘICI



8.2 ROZTOK ETHYLACETÁTU S NAVÁZANÝMI POLYFENOLY ZE ZELENÉHO ČAJE



8.3 VYEXTRAHOVANÉ POLYFENOLY Z ČERVENÝCH HROZNŮ



8.4 VYEXTRAHOVANÉ POLYFENOLY ZE ZELENEHO ČAJE



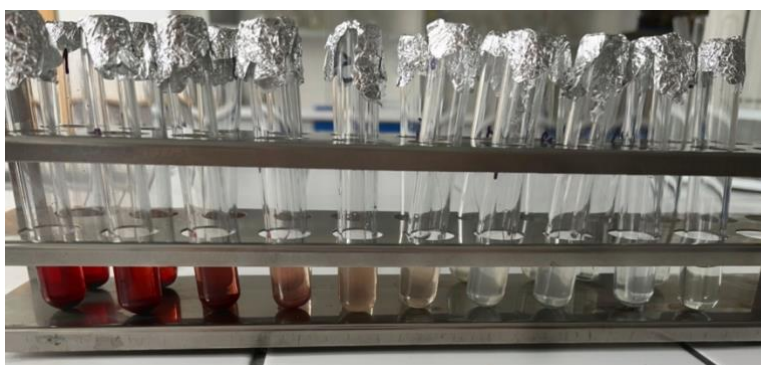
8.5 INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ Z ČERVENÝCH HROZNŮ NA *S. AUREUS*



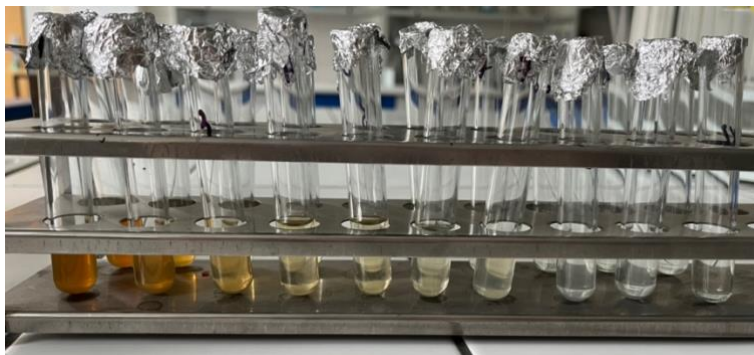
8.6 INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ Z ČERVENÝCH HROZNŮ NA *B. SUBTILIS*



8.7 INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ Z ČERVENÝCH HROZNŮ NA *E. COLI*



8.8 INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ ZE ZELENÉHO ČAJE NA *S. AUREUS*



8.9 INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ ZE ZELENÉHO ČAJE NA *B. SUBTILIS*



8.10 INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTU POLYFENOLŮ ZE ZELENÉHO ČAJE NA *E. COLI*

