

Antimikrobiální účinky extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce

Bc. Michal Kutňák

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michal Kutňák**

Osobní číslo: **T14760**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie potravin**

Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Antimikrobiální účinky extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce**

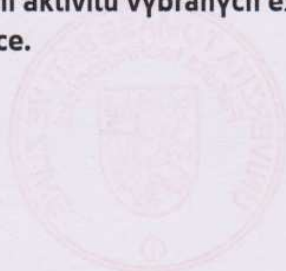
Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte generativní orgány rostlin.
2. Popište nejrůznější možnosti extrakce biologicky aktivních látek z rostlin.
3. Vyhledejte informace o antimikrobiálních účincích extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce.

II. Praktická část

1. Připravte alkoholové extrakty z jedlých květů a netradičních druhů ovoce.
2. Stanovte antimikrobiální aktivitu vybraných extraktů z jedlých květů, příp. netradičních druhů ovoce.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] VOON, Han Ching, Rajeev BHAT a Gulam RUSUL. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012, roč. 11, č. 1, s. 34-55. ISSN 15414337. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x. Dostupné z:

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x>

[2] SATI, S.C., K. KHULBE a S. JOSHI. Antibacterial Evaluation of the Himalayan Medicinal Plant *Valeriana wallichii* DC. (Valerianaceae). *Research Journal of Microbiology*. 2011-3-1, roč. 6, č. 3, s. 289-296. ISSN 18164935. DOI: 10.3923/jm.2011.289.296.

Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jm.2011.289.296>.

[3] SARKER, Satyajit D, Zahid LATIF a Alexander I GRAY. *Natural products isolation*. 2nd ed./ . Totowa, N.J.: Humana Press, c2005, xii, 515 p. ISBN 15-925-9955-9

[4] KOPEC, Karel a Josef BALÍK. *Kvalitologie zahradnických produktů: nauka o hodnocení a řízení jakosti produktů a produkčních procesů*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008, 171 s. ISBN 978-80-7375-198-2.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

29. dubna 2016

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně
24.4.2016

.....


¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu alkoholových extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce a stanovení jejich antimikrobiálních účinků. K přípravě extraktů byla využita metoda macerace s kontinuálním či diskontinuálním působením ultrazvuku. Antimikrobiální účinky byly stanoveny pomocí diskové difúzní metody na vybrané gram-pozitivní a gramnegativní bakterie. Největší antimikrobiální účinek byl stanoven u metanolového a etanolového extraktu ze vzorku *Salvia officinalis*. Nejúčinnějším extrakčním činidlem byl etanol, který je v potravinářství považován za bezpečný. Z netradičních druhů ovoce byla antimikrobiální aktivita prokázána u vzorku *Amelanchier* „Tišnovský“.

Klíčová slova: jedlé květy, rostlinný extrakt, extrakční metody, antimikrobiální účinky

ABSTRACT

This thesis is focused on making alcoholic extracts of edible flowers and nontraditional kinds of fruits and determination their antimicrobial effects. To prepare extracts method was used for maceration and continuous and discontinuous sonication. Antimicrobial effects were determined using the disk diffusion method to the selected Gram-positive and Gram-negative bacteria. The greatest antimicrobial activity was determined in methanolic and ethanolic extract of *Salvia officinalis* sample. The most efficient extraction agent was ethanol, which is considered safe food. Of the nontraditional fruits, the antimicrobial activity is demonstrated in the sample *Amelanchier* „Tišnovský“.

Keywords: edible flowers, plant extract, extraction method, antimicrobial activity

Touto cestou vyslovuji poděkování paní Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za pomoc, odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracování mé diplomové práce.

Také bych chtěl poděkovat celé své rodině a přátelům za veškerou pomoc a podporu při studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 GENERATIVNÍ ORGÁNY ROSTLIN	12
1.1 KVĚT.....	12
1.1.1 Květenství	14
1.2 SEMENO	16
1.3 PLOD	16
1.3.1 Apokarpní plody.....	17
1.3.2 Cenokarpní plody	17
2 MOŽNOSTI EXTRAKCE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK Z ROSTLIN	19
2.1 MOŽNOSTI EXTRAKCE	20
2.1.1 Macerace	21
2.1.2 Perkolace	22
2.1.3 Extrakce ponořením s mícháním.....	22
2.1.4 Dekokce.....	23
2.1.5 Extrakce ultrazvukem.....	23
2.1.6 Extrakce mikrovlnami (MAE)	24
2.1.7 Frenchův lis	24
2.1.8 Soxhletova extrakce	25
2.1.9 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PFE).....	26
2.1.10 Extrakce subkritickou vodou (SWE)	27
2.1.11 Superkritická fluidní extrakce (SFE)	28
2.1.12 Extrakce pevnou fází (SPE)	29
2.1.13 Mikroextrakce pevnou fází (SPME)	29
3 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA EXTRAKTŮ Z JEDLÝCH KVĚTŮ A NETRADIČNÍCH DRUHŮ OVOCE	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
4 CÍL PRÁCE	36
5 MATERIÁL A METODY	37
5.1 POMŮCKY A NÁSTROJE.....	37
5.2 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	37
5.2.1 Příprava živné půdy MHA	37
5.2.2 Příprava živné půdy MPB	37
5.2.3 Příprava fyziologického roztoku	38
5.3 VZORKY JEDLÝCH KVĚTŮ A NETRADIČNÍCH DRUHŮ OVOCE	38
5.4 PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ	38
5.4.1 Příprava metanolových extraktů 1	38
5.4.2 Příprava metanolových extraktů 2	39
5.4.3 Příprava metanolových extraktů s kontinuálním působením ultrazvuku.....	39
5.4.4 Příprava metanolových extraktů s diskontinuálním působením ultrazvuku.....	41
5.4.5 Příprava etanolových extraktů.....	41
5.4.6 Příprava etanolových extraktů s kontinuálním působením ultrazvuku	41

5.5	TESTOVANÉ KMENY BAKTERIÍ.....	41
5.5.1	Příprava inokula	42
5.6	DISKOVÁ DIFÚZNÍ METODA	43
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
6.1	METANOLOVÉ EXTRAKTY	44
6.2	ETANOLOVÉ EXTRAKTY	47
6.3	METANOLOVÉ A ETANOLOVÉ EXTRAKTY OŠETŘENÉ ULTRAZVUKEM	49
	ZÁVĚR	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	57
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	70
	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
	SEZNAM TABULEK.....	72
	SEZNAM PŘÍLOH.....	73

ÚVOD

Rostliny s potencionálními léčivými účinky byly od nepaměti používány k prevenci a léčbě různých neduhů a infekčních onemocnění. Různé rostliny a jejich části či produkty byly používány v tradiční medicíně k léčbě běžných poruch a degenerativních onemocnění u lidí, stejně jako u zvířat. Sekundární metabolity či bioaktivní sloučeniny (fytochemikálie) přítomny v rostlinách nesou odpovědnost za různé pozorovatelné biologické aktivity.

Povědomí spotřebitelů o možných nežádoucích účincích syntetických, chemických antimikrobiálních látek donutil vědní obory prozkoumávat antimikrobiální látky na přírodní, rostlinné bázi, které jsou toxikologicky bezpečné, a to zejména při použití v potravinářství.

V poslední době vědecké práce potvrdily antimikrobiální účinky z tradičně využívaných rostlin a jejich jednotlivých částí. Výhody používání přírodních antimikrobiálních látek zahrnují snížení celkové závislosti na antibiotikách, snížení rezistence patogenních mikroorganismů na antibiotikách a posílení lidského imunitního systému.

Současné rostoucí tržní trendy naznačují zvýšení využití bioaktivních látek z rostlin a jejich částí, zejména pak semen, plodů, kořenů, oddenků a květů. Obzvláště extrakty z květů dosáhly vysoké priority a našly různá využití, díky bohatému obsahu bioaktivních látek a antimikrobiálním účinkům.

I když se instrumentální techniky stále rozvíjí, je příprava vzorku nedílnou součástí analýzy. Současnost dává vzniknout novým extrakčním metodám, které nejenže šetří čas a spotřebu extrakčního rozpouštědla, ale i množství extrahovaného materiálu. Jedná se zejména o mikroextrakci na pevnou fázi, mikrovlnnou extrakci, extrakci rozpouštědlem za zvýšené teploty a tlaku a extrakci s využitím nadkritické kapaliny.

Na základě těchto skutečností se tato práce zaměřuje na přípravu alkoholových extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce a zjištění jejich potencionálních antimikrobiálních účinků pomocí diskové difúzní metody. V neposlední řadě pak jejich vzájemné porovnání a vyhodnocení nejúčinnější metody.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 GENERATIVNÍ ORGÁNY ROSTLIN

Generativní neboli reprodukční orgány rostlin jsou určeny k pohlavnímu rozmnožování rostlin, kdy dochází k produkci pohlavních buněk gamet a jejich spájení v zygotu. Mezi generativní orgány krytosemenných rostlin se řadí květ, semeno a plod, které udržují a rozšiřují svůj druh v daném prostředí [1].

1.1 Květ

Květ (flos, anthos) je rozmnožovací neboli reprodukční orgán krytosemenných rostlin. Vzniká přeměnou listů a koncových částí stonku. Celistvý květ se skládá ze samčích sporofylů (tyčinek) a samičích sporofylů (pestíků). K těmto orgánům se řadí květní obaly neboli okvětí v podobě kalicha a koruny. Květ může být oboupohlavní, který obsahuje jak tyčinky, tak i pestíky, nebo jednopohlavní, který obsahuje pouze tyčinky nebo pouze pestíky. Pokud je květ bez tyčinek a pestíků, označuje se jako sterilní. Pokud jsou na jednom jedinci pestíkové květy a na druhém jedinci tyčinkové květy, označují se tyto rostliny jako dvoudomé. Jednodomé rostliny mají na jednom jedinci květy tyčinkové a současně i pestíkové. Někdy má jedinec květy oboupohlavní i jednopohlavní, v tomto případě se rostlina označuje jako polygamní [2].

Tyčinky a pestíky jsou základními orgány květu. Kromě nich se ke květu ještě řadí květní obaly a to zelený kalich a barevná koruna. Ty bývají často nahrazeny jednobarevným okvětím. Některým rostlinám květní obaly zcela chybí. Proto podle květních obalů rozlišujeme květy na achlamydní (nahé), heterochlamydní (mají kalich a korunu), monochlamydní (vyvinut je pouze kalich nebo koruna, druhý orgán je redukován) [3].

Rostliny s nahými květy se považovaly za vývojově starší, avšak výzkumy ukázaly, že šlo o zpětnou ztrátu květního obalu. Vývojový stupeň se určuje podle uspořádání jednotlivých částí květu do kruhů nebo spirály, přičemž se spirála pokládá za vývojově starší. Vývojově starší jsou tedy magnóliovité a pryskyřníkovité rostliny se spirálovitě uspořádanými tyčinkami a pestíky, než růžovité a vrbovité rostliny, které mají orgány v kruzích [2].

Květní obaly vyrůstají z květního lůžka ve spirále nebo v kruzích. Květní lůžko může být prohloubené, pohárkovité a vytvářet číšku (cupulu). Pokud spodní část květních obalů srůstá s květním lůžkem, vzniká češule (receptaculum) [3].

Květ se tedy skládá z tyčinek, pestíků, koruny a kalicha (květních obalů).

Tyčinky (mikrosporofyly) jsou samčí pohlavní orgány. Soubor všech tyčinek v květu se nazývá andreceum, jedna tyčinka pak stamen. Jsou složeny ze stopkovité nitky (filamentum) a váčkovitého prašníku (anthera). Prašník má dva prašné váčky spojené jalovým parenchymatickým pletivem. Každý prašný váček obsahuje dvě prašná pouzdra, proto má prašník na příčném řezu čtyři pouzdra. Prašné váčky obsahují pylová zrnka, která vytváří jemný žlutý prášek [4].

Nejčastějším tvarem pylových zrněk je tvar koule nebo elipsoidy. Jejich povrch je tvořen vnější blánou (exina), která je buď hladká, nebo lepkavá s různými výstupky. U rostlin, u kterých se pyl přenáší nejčastěji pomocí větru je vnější blána pylu hladká, u pylu, který je přenášen pomocí hmyzu, je vnější blána lepkavá a navíc je opatřena háčky, ostny či lištami, což umožňuje lepší přichycení na těle hmyzu. Vnitřní blána (intima) je blanitá. Pylové zrno obsahuje generativní i vegetativní buňku [4].

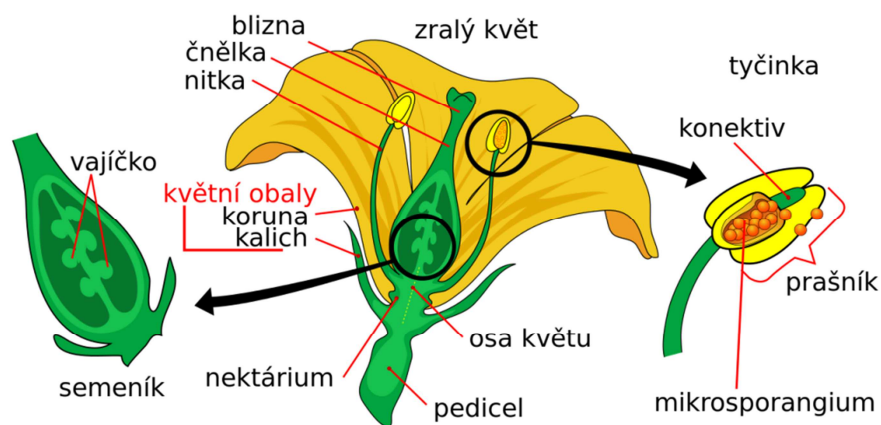
Pestík (pistillum) je samičí pohlavní orgán. Soubor pestíků se nazývá gyneceum, avšak většina květů má pouze jeden pestík. Obsahují mnohobuněčná vajíčka, z nichž po oplození vznikají semena. Pestík vzniká stočením nebo srůstem jednoho nebo více lístků, které se nazývají plodolisty [5].

Pestík se skládá z blizny (stigma), čnělky (stylus) a semeníku (ovarium). Čnělka je protáhá a spojuje bliznu a semeník. Uprostřed má kanálek vyplněný řídkým pletivem. Blizna je lepkavá nebo chlupatá a tvoří vrchol pestíku. Spodní částí pestíku je semeník baňkovitého tvaru. Uvnitř je jedno až několik vajíček. U některých rostlin je pestík delší než tyčinky, u jiných je tomu obráceně. Pokud je tedy pestík delší než tyčinky, má se tak zamezit samooplození tzv. různocnělečnosti (heterostylii), např. prvosenska, plicník [5].

Vajíčka se vyvíjí z dělivého pletiva plodolistů a semenice (placenty). Vyrůstají buď na okraji, nebo na vnitřní straně plodolistů. Drobná vajíčka jsou mnohobuněčná a k semenici přirůstají poutkem. Tvoří je pletivné jádro (nucellus), které je kryto jedním až dvěma vaječnými obaly (integumenty). Na vrchu vajíčka se nachází nepatrný otvor, který se nazývá otvor klovy (mikropyle) [6].

Kalich (*calyx*) je vnější obal květu, který chrání tyčinky a pestíky před nepříznivými podmínkami a poškozením. U jednodušších květů ho tvoří lístky volné a u složitějších srostlé. Kalich může mít tvar nafouklý, hruškovitý, nálevkovitý, válcovitý, zvonkovitý, dvoupyskatý apod. Barvu má v odstínech zelené a je většinou opadavý [4].

Koruna (*corolla*) je vnitřní obal květu. Některé rostliny jej nemají, a proto jsou bezkorunné. Jednotlivý korunní lístek se nazývá *petalum* a buď mohou být volné, nebo srostlé. Srostlá koruna se podle tvaru rozlišuje na talířovitou (divizna), zvonkovitou (borůvka), kulovitou (andromeda), jazykovou (pupava), svícnovitou (šerák), pyskatou (hluchavka) a šklebivou (hledík). Koruna s volnými lístky bývá střechovitá (kapusta), paprskovitá (brslen), motýlovitá (bobovité) a ostruhatá (orlíček stračka). Korunní lístky jsou výrazně zbarvené, to proto, aby lákaly hmyz [5].



Obr. 1. Stavba květu [7].

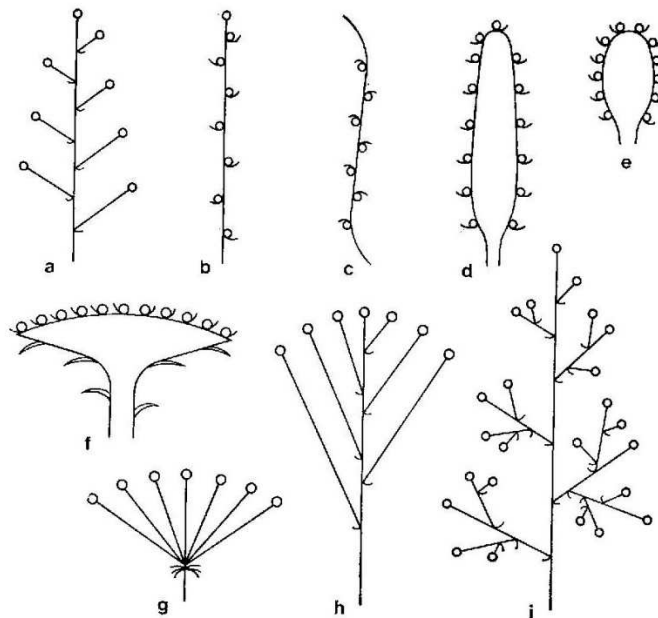
1.1.1 Květenství

Květy bývají velmi často sdruženy v charakteristické soubory nazývané květenství (inflorescentium). Koncová část stonku bývá ojediněle zakončena jedním květem (tulipán). Častěji dochází na koncové části stonku k rozvětvení a vytváří se mnohem nápadnější květenství, která mohou být jednoduchá nebo složená. Podle způsobu větvení se jednoduchá květenství dělí na hroznovitá a vrcholičnatá [8].

Hroznovitá (racemózní) květenství jsou charakterizována tak, že postranní stonky nepřerůstají stonkem hlavní a květy rozkvétají od zdola směrem nahoru nebo pokud je květenství ploché, tak od okraje směrem ke středu. Podle délky stonků a způsobu větvení se dělí na řadu forem:

- hrozen – na hlavním stonku, který je zakončen květem, vyrůstají postranní stonky s kvítky (rybíz, konvalinka);
- klas – postranní květy jsou přisedlé ke stonku (jitrocel, rdesno);
- jehněda – forma podobná klasu, ale hlavní stonk je převislý a chabý (vrba, topol);

- palice – odvozena od klasu se ztloustnutým hlavním stonkem (puškvorec, samičí květenství kukuřice);
- strboul (hlávka) – podobný palici se zkráceným hlavním stonkem, na který přisedají drobné květy (jetel);
- šištice a šiška – klas, jehož listeny a plodolisty dřevnatí (borovice, smrk);
- úbor – silně rozšířeno květní lůžko, ze kterého hustě vyrůstají přisedlé květy (heřmánek, slunečnice);
- chocholík – odvozen od hroznu, který má postranní květní stonky natolik prodloužené, že jsou v jedné rovině s hlavním stonkem (hrušeň, jabloň);
- okolík – z konce stonku vyrůstají stejně dlouhé květonosné stonky (prvosienka, třěšň) [2].



a – hrozen, b – klas, c – jehněda, d – palice, e – strboul, f – úbor,
g – okolík, h – chocholík, i – lata (hrozen hroznů)

Obr. 2. Velká hroznovitá květenství [9].

Vrcholičnatá (cymózní) květenství mají postranní stonky delší než stonky hlavní a rozkvétají od shora dolů nebo u plochých květenství od středu k okrajům. Zde se rozeznávají formy:

- mnohoramenný vrcholík – základní typ, který má vedlejší stonky vrcholičnatě rozvětvené (černý bez);
- dvouramenný vrcholík – větví se dvěma postranními stonky (silenkovité);

- jednoramenný vrcholík – větví se pouze jedním postranním stonkem, dále se dělí na několik typů: vějířek (kosatec), srpek (mečík), šroubel (třezalka) a vijan (kosti-val, blín) [2].

Kombinací jednoduchých květenství vznikají květenství složená. K nejčastějším zástupcům patří lata (vinná réva, šeřík), složený okolík (mrkvovité), složený klas (pšenice, žito), šroubel z úborů (čekanka), chocholík úborů (řebříček), apod.

1.2 Semeno

Semeno (semen) je mnohobuněčný rozmnožovací útvar, který se vyvíjí z vajíčka po jeho oplození. Vajíčko je mnohobuněčné a má charakteristickou stavbu. Nahosemenné rostliny mají vajíčko uložené za plodní šupinou volně přístupné k pylu. Krytosemenné rostliny mají vajíčka ukryta v semeníku a před samotným oplozením na blizně klíčí pylová láčka, která prorůstá k vajíčku. Vajíčko je se semeníkem spojeno poutkem, kterým prochází cévní svazek. Je kryto dvěma vaječnými obaly (integumenty), kdy se na jejich vrcholu nachází klo-vý otvor, kterým pylová láčka prorůstá do vajíčka. Pod klo-vým otvorem je ukryta vaječná buňka oosféra [10].

Po opylení větrem, či hmyzem začíná klíčit pylová láčka, která proniká čnělkou až do semeníku k vajíčku. Vývoj pylové láčky je řízen vegetativní buňkou a generativní (rozmnožovací) buňkou, která se dělí na dvě samčí (spermatické) buňky. Jedna splývá s vaječnou buňkou a vzniká zárodek (embryo), druhá pak splývá s diploidním jádrem zárodečného vaku a vzniká endosperm. Vaječné obaly se při zrání semene přeměňují v osemení (testa). V místě klo-vého otvoru je osemení ztenčeno, kdy právě z tohoto místa při klíčení proráží kořínek [6].

1.3 Plod

Při současném vývoji vajíček v semena, se semeník a další květní části přeměňují v plod (fructus). Plody jsou mnohobuněčné rozmnožovací útvary, které uzavírají jedno až několik semen. Stěny semeníku se mění v oplodí (perikarp), které je v době zralosti buď dužnaté, tzv. sarkokarp (borůvka), kožovité (slunečnice) nebo tvrdé, sklerenchymatické (lískový oříšek). Dále se dělí dle vrstev na vnější (exokarp), střední (mezokarp) a vnitřní (endokarp). Některé plody vyvíjí z endokarpu masité pletivo tzv. pulpu (citrusy, banán). Dělení plodů jsou různá, nejčastěji se však posuzují různé vlastnosti plodů, a to stavba gynecea,

počet semen, typ oplodí, způsob otvírání apod. Nejvhodnějším dělením je dělení dle typu gynecea, což je soubor plodolistů v květu [1].

1.3.1 Apokarpní plody

Vznikají z jediného plodolistu. Dále se dělí na:

- plody pukavé – v době zralosti se otvírají a semena se uvolňují;
 - a) měchýřek – puká jedním švem na místě srůstu okrajů plodolistu (pivoňka, blatouch, šácholan);
 - b) lusk – puká dvěma švy v místě srůstu plodolistu (hrách);
- plody nepukavé – v době zralosti se neotvírají a od mateřské rostliny se oddělují v celistvosti nebo se rozpadají v části;
 - a) jednoplodolistová nažka – přítomnost doplňkových orgánů k rozšiřování (chlupy, háčky);
 - b) bobule – nemá vnitřní sklerenchymatickou pecku, vnější vrstvy je blanitá nebo kožovitá, obsahuje většinou větší počet semen (borůvka, okurka, rajče);
 - c) peckovice – má sklerenchymatický endokarp (třešeň, oliva).

Z apokarpního gynecea může vzniknout souplodí, kde se např. řadí malvice.

1.3.2 Cenokarpní plody

Gyneceum je srostlé z více plodolistů. Dále se dělí na:

- plody pukavé – v době zralosti se otvírají a semena se uvolňují;
 - a) tobolka – různorodý druh, který se dělí podle vzniku, uložení semen a otevírání;
 - b) suché tobolky – pukají ve švech a tím vznikají chlopně;
 - c) dužnaté tobolky – oplodí je dužnaté i za zralosti semen (karambola, netýkavka);
 - d) šešule – specifická forma tobolky, která vzniká z parakarpního dvouplodolistového gynecea brukvovitých;
- plody nepukavé – v době zralosti se neotvírají a od mateřské rostliny se oddělují v celistvosti nebo se rozpadají v části;
 - a) víceplodolistová nažka – je vybavena doplňkovými orgány k rozšiřování (chmýr);
 - b) oříšek – má dřevnaté oplodí, které volně objímá semeno (líska);
 - c) obilka – v podstatě nažka, jejíž oplodí srostlo s osemněním (ječmen);
 - d) bobule – oplodí je dužnaté s větším počtem semen (rybíz);

- e) peckovice – střední vrstva oplodí je dužnatá, vnější blanitá a vnitřní sklerenchymatická (oliva, šicha) [1, 2, 11].

2 MOŽNOSTI EXTRAKCE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK Z ROSTLIN

Biologicky aktivní látky jsou zajímavé malé organické molekuly, které se často nazývají sekundárními metabolity. Jsou produkovány různými živými organismy včetně rostlin, mikroorganismů, mořských organismů, hmyzu či obojživelníků. Na rozdíl od všudypřítomných makromolekul primárního metabolismu, což jsou základní živiny pro přežití (polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny, lipidy), sekundární metabolity patří do řady chemicky různých skupin. Jsou často specifické pro konkrétní druh a nejsou striktně nezbytné pro přežití.

Nicméně, roste zájem o vědecké studie, které prokazují účinky těchto metabolitů z organismů, neboť představují potencionální impozantní zdroj k vývoji nových léčiv. Avšak před samotnou analýzou těchto metabolitů se musí provést jejich extrakce. Cílem je extrahovat buď známý metabolit nebo směs neznámých metabolitů v dostačujícím množství a určit je podle systematických fytochemických testů.

Rostliny jsou komplexní formy, které produkují celou řadu sekundárních metabolitů s různými funkčními skupinami a polaritami. V rostlinách se běžně vyskytují vosky a mastné kyseliny, polyacetyleny, terpenoidy, steroidy, éterické oleje, fenoly, flavonoidy, trísloviny, antokyany, chinony, kumariny, lignany, alkaloidy, glykosidové deriváty, např. saponiny a další. Existuje několik technik pro extrakci těchto biologicky aktivních látek. Ačkoliv se voda používá jako extrakční činidlo v mnoha extrakčních tradičních technikách, organická rozpouštědla různé polarity jsou obecně vybírána do modernějších metod [12].

Jakýkoliv rostlinný druh či rostlinná část získána náhodně může být zkoumána za použití dostupných fytochemických metod. Nicméně cílenějšímu přístupu se dává přednost před náhodným výběrem. Rostlinný materiál může být vybrán i na základě lidového léčitelství. U extraktů, které jsou připravené z rostlin, jež se používají v lidovém léčitelství k léčbě některých onemocnění, je větší pravděpodobnost, že budou obsahovat biologicky aktivní látky. Případně může být rostlina vybrána na základě chemotaxonomie. To znamená, že jeli znám příbuzný druh nebo rod, který obsahuje podobné biologicky aktivní látky zkoumané rostliny, tak je pravděpodobné, že je zkoumaná rostlina bude také obsahovat. Další možností je výběr rostliny s cílem ji testovat na specifickou farmakologickou aktivitu [12].

Získány by měly být pouze zdravé vzorky celé rostliny nebo jejich části (listy, stonky, květy, plody, semena, kůra, hlízy, kořeny) v závislosti na tom, kde se biologicky aktivní látky

hromadí. Pokud je známo, že rostlina obsahuje těkavé nebo termolabilní látky, měla by být co nejdříve po odběru zmrazena. Zmrazené vzorky mohou být uchovány v mrazničce při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo v lyofilizované formě [12].

2.1 Možnosti extrakce

Extrakce je z pohledu fyzikální chemie proces, v němž prochází daná složka či složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Z analytického hlediska jako proces extrakce mohou být považovány i další metody, při kterých je složka směsi převáděna fázovým rozhraním z jedné fáze (pevné, plynné nebo kapalné) do fáze druhé (pevné, plynné nebo kapalné) [13].

Podle skupenství fází, mezi kterými složky přechází, se extrakce dělí na:

- z pevné fáze do kapaliny – daná složka se extrahuje z pevného materiálu do kapaliny za použití vhodného rozpouštědla, ostatní složky se nepřevedou;
- z kapaliny do kapaliny – složka přechází do rozpouštědla, ve kterém je lépe rozpustná. Extrakce je založena na rozdělovací rovnováze dvou nemísitelných kapalin;
- z kapaliny na pevnou fázi – dané složky jsou selektivně zachyceny z roztoku pevnou fází, ze které se získají teplem nebo roztokem;
- z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi tzv. mikroextrakce – založena na pozměněné extrakci pevnou fází, kdy adsorpcí na polymer, který pokrývá křemenné vlákno, dojde k zakoncentrování analytu [13].

Cílem extrakce je dosáhnout kvantitativního a reprezentativního extraktu pokud možno co nejrychleji, nejjednodušeji s nízkými náklady a automatizací [13]. Pevné vzorky jsou před samotnou extrakcí v mnoha případech homogenizovány.

Mezi nejčastější polární extrakční rozpouštědla se pro rostlinné materiály využívá metanol, etanol, voda nebo se využívá jejich směsí v určitém poměru. Do nepolárních rozpouštědel využívaných pro extrakci lipofilních sloučenin se řadí chloroform, etylacetát nebo hexan [14].

Organická rozpouštědla narušují buněčnou stěnu, propustnost cytoplazmatické membrány rostlinných buněk a tím dochází k eluci biologicky aktivních látek, které se rozpouštějí extrakčním činidlem.

Využití klasických extrakčních metod je velmi časově náročné, avšak mnoho autorů pro přípravu extraktů z rostlinných materiálů je stále využívá [15]. Nicméně současnost dává vzniknout novým extrakčním metodám, které nejenže šetří čas a spotřebu rozpouštědla, ale i množství extrahovaného materiálu. Jedná se zejména o mikroextrakci na pevnou fázi, mikrovlnnou extrakci, extrakci rozpouštědlem za zvýšené teploty a tlaku a extrakci s využitím nadkritické kapaliny.

2.1.1 Macerace

Tento jednoduchý způsob extrakce je stále široce využíván. Vhodně homogenizovaný rostlinný materiál se nechá macerovat ve vhodném rozpouštědle v uzavřené nádobě při pokojové teplotě. Pro zvýšení rychlosti extrakce a zvýšení extrakce bioaktivních látek z rostlinného materiálu se může doplnit proces o příležitostné nebo kontinuální mechanické míchání pomocí třepačky nebo míchadla. Tím se rovněž zvyšují molekulární interakce v průběhu extrakce. Extrakce je ukončena, když se ustanoví rovnováha metabolitů v rozpouštědle a rostlinném materiálu [12].

Po extrakci se zbytkový rostlinný materiál (matolina) musí oddělit od rozpouštědla. Pro tuto operaci se využije dekantace, po které obvykle následuje filtrace přes filtrační papír. Pro dokonalé odstranění rostlinného materiálu, obzvláště pokud se pro maceraci použil jemný prášek, se využije centrifugace. Pro odbourání kroku filtrace se rostlinný materiál může zabalit do mušelínu a poté macerovat. Pro zvýšení výtěžnosti metabolitů z rostlinného materiálu se matolina jednou až dvakrát opět maceruje přidáním čerstvého rozpouštědla. Poté se všechny filtráty slejí dohromady [12].

Aby se zabránilo degradaci nebo polymeraci fenolických sloučenin neměl by být extrakt uložen při pokojové teplotě a vystaven přímému slunečnímu záření po dlouhou dobu. Macerace probíhá v kónických baňkách či jiných nádobkách, jejichž hrdla musí být zakryta hliníkovou fólií nebo parafilmem, aby se zabránilo odpařování rozpouštědla [16].

Pro extrakci se používají běžná rozpouštědla jako je metanol, etanol, hexan, aceton, etylacetát nebo chloroform. Extrakce se provádí buď v čisté formě, za použití rozpouštědla nebo po naředění destilovanou vodou v určitém poměru [17]. Volba výběru rozpouštědla závisí především na rozpustnosti bioaktivních látek a bezpečnostních aspektů [18].

Udržování stability bioaktivních látek je velmi důležité při výběru vhodné a účinné metody extrakce. Některé ze sloučenin (hlavně ty s fenoly) mají tendenci oxidovat nebo degradovat při vysokých teplotách [19].

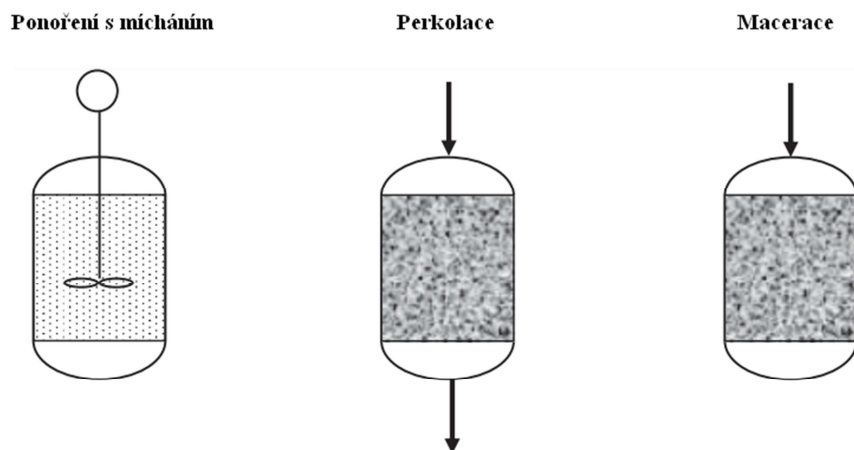
Hlavní nevýhodou macerace je, že může být velmi časově náročná. Proces může trvat od několika hodin až po několik týdnů. Také se mohou spotřebovat velké objemy rozpouštědla. Kromě toho, některé sloučeniny nemusí být účinně extrahovány, pokud jsou špatně rozpustné při pokojové teplotě. Na druhé straně, když se extrakce provádí při pokojové teplotě, je nepravděpodobné, že proces povede k degradaci termolabilních metabolitů [20].

2.1.2 Perkolace

Do perkolátoru se nejprve vloží provlhčený vzorek, který zalije rozpouštědlem a maceruje se při pokojové teplotě. Po určité době se otevře výpustný kohout perkolátoru a extrakt se nechá pomalu odkapávat. Současně se přilévá čerstvé teplé rozpouštědlo až do úplného vyextrahování. Poté se všechny díly extraktu slejí dohromady. Dodatečná filtrace není zapotřebí, protože na výstupu z perkolátoru je umístěn filtr. Tato metoda je vhodná i pro objemnější vzorky. Určitý rostlinný materiál však může negativně ovlivnit výnos extrakce. Jedná se zejména o rostlinné materiály obsahující větší množství slizů a pryskyřic, které se vyznačují bobtnavostí, čímž mohou perkolátor ucpat. Zhoršení výnosů extrakce může způsobit i hustý rostlinný materiál, který nebude v perkolátoru homogenní a rovnoměrně rozmístěn. Rozpouštědlo tak nemusí proniknout na určitá místa vzorku a tím bude extrakce neúplná. Zvýšená teplota rozpouštědla může vést k rozkladu termolabilních složek. Další nevýhodou je to, že je perkolace náročná na použití velkého objemu rozpouštědla a také tento proces může být časově zdlouhavý [12].

2.1.3 Extrakce ponořením s mícháním

Jedná se o alternativní uspořádání macerace, kdy se homogenizovaný vzorek zcela ponoří do rozpouštědla a extrahuje se za neustálého míchání. Míchání zajišťuje intenzivní kontakt mezi vzorkem a rozpouštědlem. Mechanické namáhání na částice je poměrně vysoké. Jakmile se dosáhne rovnováhy koncentrací mezi vzorkem a rozpouštědlem, extrakce je ukončena a následuje filtrace [21].



Obr. 3. Základní princip pro extrakci pevná látka-kapalina [21].

2.1.4 Dekokce

Odvar je nejrozšířenější, populární tradiční způsob pro přípravu vodných extraktů z léčivých rostlin. Vyváření se provádí varem vzorku ve vodě po určitou dobu [22]. Velkou nevýhodou je působení vysokých teplot na rostlinný materiál. Vysokou teplotou degradují bioaktivní látky citlivé na teplo a tím vodný extrakt ztrácí svou účinnost [16].

2.1.5 Extrakce ultrazvukem

Použití ultrazvuku je využívanou a účinnou mechanickou extrakční metodou. Jde v podstatě o modifikovanou maceraci, kdy je extrakce usnadněna použitím ultrazvukových (vysokofrekvenčních) pulsů. Obvykle se pracuje s frekvencí 15-25 kHz. Působením ultrazvukových vln na kapaliny vzniká jev tzv. kavitace. Při tomto procesu se v kapalině vytvářejí oblasti stlačení a zředění. V oblastech zředění vznikají dutiny, které v oblasti stlačení opět zaniknou. Bubliny, které vznikly v dutinách, jsou tímto způsobem stlačeny tlakem až několik set MPa. Při zániku dutiny vzniká tlaková vlna, která se právě považuje za onen destruktivní prvek. Kromě toho k destrukci zřejmě přispívá i aktivovaný kyslík, který vzniká při průchodu ultrazvukových vln médiem [23].

Sonda se umísťuje pod hladinu kapaliny a rychle se ohřívá, proto se doporučuje proces přerušit. Taktéž se doporučuje ochladit extrahovanou rostlinnou suspenzi. Účinnost extrakce závisí na zvolené frekvenci, doby působení ultrazvukových vln, pH a teplotě [23]. Při zvolení vyšších kHz se vytváří tzv. „bílý šum“, který pro někoho může být na poslech nepříjemný. Extrakce může být ovlivněna amplitudou vibrací a povrchovým tlakem. Nevýhodou sonifikace může být podstatná denaturace enzymů v důsledku přehřívání sondy.

Ultrazvuk je aplikován jen zřídka na extrakci velkého množství materiálu. Běžně se však využívá pro usnadnění extrakce intracelulárních metabolitů z rostlinných materiálů [24].

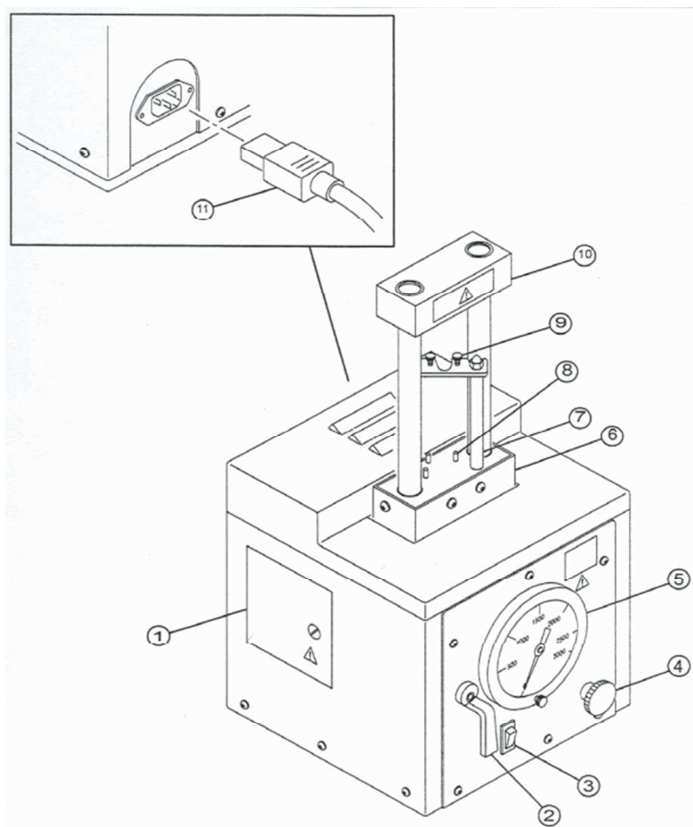
2.1.6 Extrakce mikrovlnami (MAE)

Jedná se o modifikovanou maceraci, kdy se na rostlinný materiál v rozpouštědle působí mikrovlnami a tím dochází ke zlepšení extrakce. Použitím mikrovln má tu výhodu, že se rozpouštědlo zahřívá mnohem rychleji, než při nepřímém vnějším zahřívání, tak jako u běžných extrakcí, např. Soxhletovi extrakce. Extrakční čas, z obvyklých 3-20 hodin se zkracuje na méně než 30 minut. Mikrovlny ozařují vzorek, vyvolávají rozkmitání molekul, čímž se zlepšuje průnik extrakčního rozpouštědla do buněk. Výtěžnost biologicky aktivních látek bývá ve srovnání s klasickými technikami vyšší [25]. Další výhodou je, že se může extrahovat současně více vzorků.

Musí se však zvážit výběr a povaha extrakčního rozpouštědla. Při absorpci mikrovln rozpouštědlem, by se nemělo rozpouštědlo silně zahřívát, jinak by to mohlo vést k degradaci biologicky aktivních látek. U MAE je sporné, zda by se tato technologie mohla převést do průmyslového měřítko, neboť ekonomická stránka a technická složitost v rozsáhlých zařízeních by byla značně vysoká a náročná [21].

2.1.7 Frenchův lis

Frenchův lis (French pressure cell press) vznikl v roce 1950 a velmi často se v laboratoři využívá k dezintegraci buněk. Skládá se z ocelového válce s malým otvorem a jehlovým uzávěrem a pístu s těsněním. Díky pístu, tlačeního hydraulickým lisem, se na vzorek působí vysokým tlakem (do 210 MPa). Když vzorek prochází přes výpustný ventil, prudce klesá tlak na hodnotu atmosférického tlaku, tím dochází k prasknutí buňky a vnitrobuněčný obsah se uvolní do rozpouštědla. Lis se před použitím chladí na 0 °C. Existují i různé modifikace klasické konstrukce lisu, zejména pak na chlazení jehlových uzávěrů, kdy je na chlazení použit stlačený CO₂ nebo podchlazený dusík. Chlazením se zabraňuje degradaci termolabilních složek biologického vzorku [26].



1 – přístup k zásobníku hydraulické kapaliny, 2 – přepínací ventil, 3 – hlavní vypínač, 4 – regulátor tlaku, 5 – manometr, 6 – spodní platforma, 7 – podporné tyče, 8 – centrovací kolíky, 9 – svorka s maticemi, 10 – vrchní platforma, 11 – síťový kabel

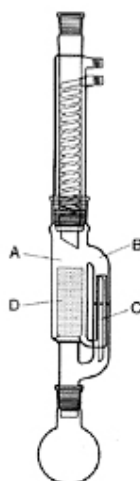
Obr. 4. Frenchův lis [27].

2.1.8 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce je široce využívána v extrakci rostlinných metabolitů pro své pohodlí. Do válcové extrakční papírové patrony se naváže vzorek a celá patrona se umístí do střední části přístroje. Vhodné rozpouštědlo se nalije do baňky, která se zahřívá k varu rozpouštědla. Páry rozpouštědla stoupají do chladiče, kde kondenzují. Rozpouštědlo pak kape na vzorek v patroně a tím dochází k extrakci. Střední část extraktoru se postupně plní a po jeho naplnění dochází k vrácení rozpouštědla obsahující analyty do varné baňky a celý proces se opakuje, dokud nejsou vyextrahovány požadované složky v dostatečném množství. Hlavní výhodou této extrakce je, že se jedná o kontinuální proces a není náročná na obsluhu. Nevýhodou je však to, že se extrakt neustále zahřívá k bodu varu rozpouštědla a tím může dojít k poškození termolabilních složek. Dalšími nevýhodami jsou časová náročnost, kdy celý proces může trvat až 20 hodin, dále pak vyšší spotřeba rozpouštědla, která

může činit až 500 ml na jeden vzorek a v neposlední řadě je kladen důraz na použití čistých rozpouštědel bez jakýchkoliv nečistot [12].

Jistou modifikací Soxhletovi extrakce je použití ultrazvuku při extrahování. Nejenže významně zkracuje dobu celé extrakce, ale extrakty nejsou vystaveny vysokým teplotám po dlouhou dobu [28].



- A – Extraktor
- B – Trubice na vedení páry
- C – Pěpádová trubice
- D – Extrakční patrona (filtrační papír nebo frit)

Obr. 5. Soxhletův extraktor [29].

2.1.9 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PFE)

Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (Pressurized Solvent Extraction – PSE) je založena na principu extrakce tuhé látky kapalinou a považuje se za relativně novou extrakční metodu. Probíhá za zvýšené teploty 40-200 °C a tlaku 10-15 MPa v krátkém časovém intervalu 5-20 minut. Při normálních podmínkách je rozpouštědlo v kapalném stavu. Při zvýšení teploty přechází rozpouštědlo z kapalného stavu do plynného, tím není schopno rozpouštět analyty a účinnost extrakce klesá k nule. Pokud však zároveň dojde i ke zvýšení tlaku, rozpouštědlo opět přechází do stavu kapalného a v důsledku vyšší teploty roste výtěžnost extrakce [30].

Výhodami vysokotlaké extrakce rozpouštědlem jsou, že zvýšená teplota urychluje rozpustnost analytů v rozpouštědle a uvolňuje bioaktivní látky z rostlinných matic. Zvýšený tlak udržuje rozpouštědlo v kapalném stavu nad jeho bodem varu a také napomáhá ke kontaktu

rozpouštědla s analyty v matricích. PFE vede ke snížení množství použitého rozpouštědla, časové nenáročnosti a efektivity [31]. Je vhodná pro extrakci bioaktivních látek z rostlinných pletiv [32].

Dawidowicz a kol. se zaměřili na antioxidační účinky alkoholových extraktů z květů, plodů a listů bezu černého s použitím PFE [33]. Z květu bezu černého touto metodou extrahoval Rieger a kol. polyfenolické sloučeniny [34]. Waksmundzka-Hajnos a kol. porovnávali extrakční techniky jako jsou Soxhletova extrakce, extrakce ultrazvukem, mikrovlnná extrakce a PFE z pohledu výtěžnosti flavonoidů z květu bezu černého. Největší obsah flavonoidů z květu bezu černého vyextrahovali pomocí Soxhletovi extrakce [35]. Salvador a kol. získali extrakt z bobulí bezu černého (*Sambucus nigra* L.) Soxhletovou extrakcí z 2,5 g rostlinného materiálu pomocí 80 ml dichlormetanu po dobu 8 hodin. Rozpouštědlo pak bylo odpařeno na rotační odparce [36].

Složení plodů podle studie ukazuje, že by mohly být zdrojem cenných bioaktivních látek (zejména triterpenických sloučenin) s protizánětlivými, antihepatotoxickými a antivirovými účinky. Patří mezi ně kyselina ursolová a kyselina oleanolová, které se často využívají v kosmetice a výživových doplňcích [37]. Navíc fytoosteroly snižují cholesterol a podporují imunní aktivitu [38]. Zájem o fytochemikálie a jejich zdroje se zvyšuje, neboť dokáží vyrovnat mírnou fyziologickou nevyváženost. Plody bezu lze pak využít jako vedlejší složka pro vytvoření low-cost potravinových doplňků, které lze považovat za účinné v prevenci různých chorob [39].

2.1.10 Extrakce subkritickou vodou (SWE)

Jedná se o upravenou vysokotlakou extrakci rozpouštědlem, kdy se rozpouštědlo nahrazuje vodou. Tuto metodu lze najít pod názvem extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou (Pressurized Hot Water Extraction – PHWE nebo Subcritical Water Extraction – SWE). Teploty subkritické vody se pohybují mezi bodem varu 100 °C a kritickým bodem varu 374 °C při tlaku 21,7 MPa [40].

Voda s rostoucím tlakem a teplotou mění své fyzikální a chemické vlastnosti. Mění se tak i dielektrická konstanta vody a tím se voda začíná chovat jako rozpouštědlo. Voda musí zůstat v kapalném stavu, tudíž tlak při extrakci musí být vyšší, než tlak nasycených par vody za dané teploty [41].

SWE byla nejdříve využívána na extrakci odpadních látek z půdy, poté se však její využití rozšířilo pro extrakce biologicky aktivních látek z rostlinných materiálů. Při srovnání metod SWE, extrakce ultrazvukem a macerace pro extrakci antioxidantů ze šalvěje lékařské, prokázala právě metoda SWE nejvyšší obsah antioxidantů [42]. Možnou nevýhodou této metody je působení vyšších teplot, tudíž možná destrukce termolabilních složek.

2.1.11 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická (nadkritická) kapalina je definována jako sloučenina, která se nachází nad svojí kritickou teplotou a tlakem s vlastnostmi mezi plynem a kapalinou. Kritická teplota je nejvyšší teplota, při které lze plynnou fázi ještě zkapalnit tlakem. Kritický tlak je dán bodem, nad kterým kapalinu nelze zvýšením teploty přeměnit na plyn. Pro Superkritické kapaliny je charakteristické to, že jejich viskozita je podobná plynům, tudíž lépe pronikají do porézních materiálů, zatímco hustota je podobná kapalinám, tudíž jsou využitelné jako kapalná rozpouštědla.

Superkritická fluidní extrakce je metoda, která se v posledních 20 letech běžně využívá díky komerčně dostupným přístrojům. Také se zpozorovalo, že je tato extrakční technika vhodná i na analýzu metabolitů. Nejpoužívanější superkritickou kapalinou je oxid uhličitý, CO_2 [43]. Existují i jiné superkritické kapaliny, jako oxid dusný nebo xenon. Oxid dusný má však silné oxidační účinky, které poškozují některé biologicky aktivní látky. Xenon je sice vhodný, ale velmi drahý. Oxid uhličitý má nízkou viskozitu a vysokou rychlost difúze s vysokou schopností se odpařovat, proto je vhodným rozpouštědlem [13].

Superkritický oxid uhličitý je nepolární rozpouštědlo a jeho nízká polarita je vhodná na extrakci nepolárních sloučenin, jako jsou tuky a lipidy. Přídavkem metanolu, vody či jiného polárního rozpouštědla se dosahuje extrakce polárnějších sloučenin biologicky aktivních látek rostlin [44].

Výhodou je zdravotní nezávadnost CO_2 , nízká pořizovací cena, rychlost extrakce, která trvá několik desítek minut, dále je CO_2 lehce dostupný, selektivní a mobilní, nehořlavý a je možné ho recyklovat [45]. SFE se využívá zejména ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu potravinových doplňků, léčiv a extraktů z bylin. V kosmetice pro výrobu extraktů z květů, listů a kořenů rostlin, esencí z rostlin a koření. V potravinářství pak pro extrakci rostlinných a živočišných tuků a olejů, esencí z rostlin a koření, pro výrobu chmelového extraktu, odstraňování kofeinu z kávy, pro výrobu syntetického BHT (Butylhydroxytoluen) nebo BHA (butylhydroxyanisolu) [46, 47].

2.1.12 Extrakce pevnou fází (SPE)

Extrakce pevnou fází (Solid Phase Extraction) je využívanou technikou, která je rychlá a selektivní pro přípravu vzorku. Je založena na zachycení molekul látky na tuhém porézním sorbentu, přes který protéká vzorek. Analyty jsou pak ze sorbentu vymývány zvoleným rozpouštědlem. Kolony pro SPE jsou nejčastěji na bázi silikagelu, mohou se však použít i jiné adsorbenty, např. na bázi syntetické pryskyřice nebo aluminy. Průtok rozpouštědla přes sorbent se může urychlit použitím vakua na výstupu z kolony, působením tlaku na vstupu kolony či centrifugací. Metoda šetří čas i rozpouštědlo a má široké využití v oblastech biochemie, farmacie, analýzy potravin, životního prostředí atd. [25, 13].

2.1.13 Mikroextrakce pevnou fází (SPME)

Mikroextrakce pevnou fází je modifikací SPE. Biologicky aktivní látky se z matric izolují bez použití rozpouštědla. Založena je na zachycení a koncentraci analytu adsorpcí na polymer pokrývající vlákno z taveného křemene. Vlákno je náchylné na mechanické poškození, proto je zasunuto v ocelové jehle. SPME je většinou spojena s analytickým stupněm, např. kapalinovou chromatografií [13]. Výhodou této techniky je, že je velmi citlivá, rychlá, hodí se pro izolaci analytů z různých matric a nepracuje se u ní s extrakčními činidly. Nevýhodou je křehkost vlákna z taveného křemene a dodržení určitých podmínek s jeho manipulací [13].

3 ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA EXTRAKTŮ Z JEDLÝCH KVĚTŮ A NETRADIČNÍCH DRUHŮ OVOCE

Léčivé rostliny s potenciálním terapeutickým účinkem byly od nepaměti používány k léčbě různých infekčních onemocnění. Sekundární metabolity či biologicky aktivní látky (fytochemikálie) přítomny v rostlinách nesou odpovědnost za různé pozorovatelné biologické aktivity. Povědomí spotřebitelů o možných žádoucích účincích požívání produktů s přírodními biologickými látkami vede různé společnosti a jejich vědecké týmy ke zkoumání rostlin vykazující antimikrobiální účinky, které jsou toxikologicky bezpečné a které by se daly potenciálně využít v potravinářství či farmacii [48].

V poslední době se objevují různé studie o potencionální antimikrobiální aktivitě tradičně využívaných rostlin, ze kterých se využívají jejich výtažky či éterické oleje.

Najjaa a kol. zkoumali antimikrobiální aktivitu extraktu z rostliny *Allium roseum* L. ze severní Afriky, která se používá jako zelenina, koření a bylinný lék v tradiční medicíně. Bioaktivní látky extrahovali pomocí kyseliny sírové, Tris-HCl pufru a fosfátového pufru obsahující NaCl ze čtyř částí rostliny, a to z květů, cibulky, listů a semen. Antimikrobiální aktivitu testovali pomocí diskové difúzní metody. Antimikrobiální účinnost extraktů proti deseti testovaným mikrobiálním kmenům (grampozitivním bakteriím: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* a *Enterococcus faecalis*, gramnegativním bakteriím: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a kvasince *Candida albicans*) se lišila v závislosti na způsobu extrakce a použitého rostlinného materiálu. Analýza prokázala významný antibakteriální účinek v tomto pořadí na kmeny *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* a *Candida albicans*. Předchozí studie ukázaly, že gramnegativní bakterie jsou na výtažky z *Allium sativum* více citlivé. Difúzní testy prokázaly, že extrakty z květů a semen mají větší antimikrobiální účinek, než extrakty z listů a cibulek. Z pohledu účinnosti extraktů největší účinek vykazoval extrakt připravený pomocí Tris-HCl pufru, jak na gramnegativní bakterie, tak i grampozitivní bakterie, zatímco další dva extrakty vykazovaly slabou antimikrobiální aktivitu pouze proti grampozitivním kmenům. Výsledky naznačily potencionální využití části rostliny (květů, listů, cibulek a semen) jako koření a konzervační látky v potravinářském průmyslu [49].

López-García a kol. připravili extrakt z jedlých květů *Allium schoenoprasum*, *Salvia pratensis*, *Sambucus nigra* a *Taraxacum officinale* pomocí 90% metanolu. Následně byla provedena HPLC analýza, která zjistila přítomnost kyseliny benzoové, kyseliny hydroxyskořicové a flavonoidů jako hlavních složek. Antimikrobiální aktivita byla stanovena pomocí diskové difúzní metody na dva patogenní mikroorganismy: grampozitivní *Staphylococcus aureus* a gramnegativní *Escherichia coli*. Všechny metanolové extrakty z jedlých květů vykazovaly významnou antimikrobiální aktivitu [50].

Jedlé květy *Chrysanthemum perthenium* se prokázaly antimikrobiální aktivitou, kdy z nich Shafaghat a kol. připravili pomocí vodní destilace extrakt silic. Aktivita byla pozorována proti dvěma grampozitivním bakteriím a jedné gramnegativní bakterii diskovou difúzní metodou [51].

Polyfenolický extrakt jedlých květů *Sesbania grandiflora* byl testován proti běžným patogenním mikroorganismům. China a kol. extrakt připravili ze suchých jemně rozemletých květů, které se extrahovaly směsí extrakčního činidla metanolu a vody v poměru 80:20. Poté bylo extrakční činidlo odpařeno a extrakt byl uchován v lyofilizované formě. Při experimentech diskové difúzní metody byl extrakt rozpuštěn v 10% DMSO. Zajímavou obměnou této metody bylo, že do agarové plotny s Müller Hinton agarem již naočkovanou příslušným inokulem se nerezovým sterilním vrtákem vyhloubily jamky o průměru 6 mm, kdy do každé jamky se napipetovalo 50 µl extraktu a následně byla provedena kultivace. Inhibiční účinek byl zaznamenán proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* a *Vibrio cholerae*. Grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* byla na účinky extraktu nejcitlivější, zatímco nejvyšší odolnost vykazovala gramnegativní bakterie *Vibrio cholerae* [52].

Biologická aktivita extraktu závisí na jeho polyfenolickém složení. Almajano a kol. zjistili, že účinek extraktu závisí na bakteriálním kmeni, fenolické struktuře a množství použitého extraktu [53].

U jedlých květů *Sesbania grandiflora* využívaných jako zelenina pro přípravu různých pokrmů se věřilo, že jejich spotřeba může vyléčit některé nemoci a onemocnění. Tyto květy se podávaly lidem trpícími průjmy, což indikuje jejich antimikrobiální aktivitu [54].

Slanomilný druh rostliny *Tamarix gallica* se v tradiční medicíně využívá pro své stimulační účinky při léčbě různých poruch jater. Nálevy z listů a květů se používají při léčbě zánětů a při průjemových onemocněních. Ksouri a kol. zkoumali antimikrobiální účinky extraktů

z jedlých květů a listů této rostliny. Extrakty se připravily ze sušených květů jemně rozdrčených macerací v metanolu za současného míchání magnetickým míchadlem. Následně byl extrakt zfiltrován a za vakua částečně odpařen. Pro zjištění antimikrobiální aktivity byla zvolena disková difúzní metoda. Výsledky ukázaly, že větší antimikrobiální aktivitu mají jedlé květy, nežli listy. Extrakty vykazovaly značné antimikrobiální vlastnosti proti lidským patogenním kmenům bakterií. Nejsilnější antimikrobiální aktivita byla zaznamenána proti *Micrococcus luteus*, zatímco nejnižší aktivita byla pozorována proti *Escherichia coli*. Navíc extrakty vykazovaly slabou až střední aktivitu proti rodu kvasinek *Candida*. Metanolové extrakty více inhibovaly růst bakteriálních kmenů, než růst kvasinek, pravděpodobně díky jejich aktivním molekulám [55]. Několik studií připisuje inhibiční účinek extraktů proti bakteriálním patogenům díky jejich obsahu fenolických látek [47, 48].

Scalbert účinek fenolických látek vysvětluje jejich adsorpcí na buněčné membrány, interakcí s enzymy a ztrátou kovových iontů [58].

Jedlé květy a mladé listy opadavého ostnitého keře *Halimodendron halodendron* se v severozápadní Číně využívají od nepaměti. Wang a kol. testovali antimikrobiální aktivitu této rostliny, kdy z jednotlivých rostlinných částí (květů a listů) připravili extrakt pomocí 95% etanolu. Extrakt byl zahuštěn ve vakuu při teplotě 50 °C. Hnědý zbytek byl suspendován ve vodě a extrahován petroléterem a chloroformem. Následně pomocí fyzikálně-chemických analýz bylo izolováno jedenáct fenolických látek, které byly testovány na antimikrobiální účinek proti *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas lachrymans*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus haemolyticus*. Čtyři aglykony flavonoidů a tři fenolové kyseliny vykazovaly silnou antimikrobiální aktivitu. Obecně platí, že flavonoidové aglykony s relativně nízkou polaritou mají vyšší antimikrobiální i antioxidační účinky, než ty aglykony s vysokou polaritou. Nebyly zjištěny zjevné rozdíly v antimikrobiální aktivitě proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Výsledky naznačují potenciál této rostliny jako zdroj funkčních složek přírodních do potravin [59].

Antimikrobiální účinky jedlých květů léčivé rostliny *Salvia officinalis* zkoumali Aba-Elmageed a kol., kdy z usušených květů připravili dva extrakty pomocí 70% metanolu a vody. Antimikrobiální aktivita připravených extraktů byla testována diskovou difúzní metodou proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, kvasince *Candida albicans* a plísní *Aspergillus niger*. Metanolový extrakt se pro-

kázal výrazně vyššími antimikrobiálními účinky než extrakt vodní. 70% metanolový extrakt i vodní extrakt svou antimikrobiální aktivitou nejvíce působili proti růstu bakteriím v tomto pořadí: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* [60].

Sarikurkců a kol. se zajímali o antimikrobiální účinky esenciálních olejů ze dvou druhů Dobromysli obecné, *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* a *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*. Esenciální oleje byly testovány na antimikrobiální aktivitu metodou difúzních disků proti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* a *Enterococcus faecalis* [61].

Proti testovaným mikroorganismům vykazovaly oleje významnou aktivitu, přičemž se účinnost jednotlivých olejů značně lišila. Esenciální oleje z *O. vulgare* subsp. *vulgare* byly nejméně aktivní vůči *M. luteus*, *S. aureus*, *E. faecalis* a *B. cereus*. Obecně platí, že většina testovaných gram pozitivních bakterií byly citlivé na oba extrakty. Nejvíce rezistentní bakterie byly *S. typhimurium*, *E. coli* a *P. aeruginosa*. Esenciální oleje vykazují antimikrobiální aktivitu díky přítomnosti fenolových složek karvakrolu a thymolu. Studie naznačuje, že oba druhy mohou být cenným přírodním zdrojem s funkčními vlastnostmi při výrobě potravin a léčiv [61, 62].

Adansonia digitata L. (baobab) má četné biologické vlastnosti, včetně antimikrobiálních, antivirových a antioxidačních, působí proti malárii, průjmům, anémii, astmatu a má protizánětlivé účinky. Části stromu jako jsou semena, listy, kořeny, květy, ovocná dřevina a kůra jsou jedlé. V posledních letech se hledají přírodní alternativy ve formě rostlinných olejů jako přísady do potravin, kosmetiky a biopaliv [63].

Plody baobabu se ve formě ovocné dřeviny používá jako protihorečný prostředek či jako imunitní stimulant. Obsahují velké množství vitamínu C, téměř desetkrát více, než pomeranče. Plody se kromě lidového léčitelství využívají také jako hlavní přísady do omáček, kaší a nápojů [64, 65].

S ohledem na obavy spotřebitelů z obalových materiálů se výzkum soustředí na vývoj udržitelných obalových materiálů na bázi obnovitelných přírodních biopolymerů, jako jsou polysacharidy a proteiny [66]. Biologická rozložitelnost, výborná biokompatibilita, plasticita, přilnavost a nízké náklady jsou hlavními důvody pro široký rozsah aplikací. Touha spotřebitelů o přírodní látky a nepřítomnost chemických konzervačních činidel zvyšují popularitu přírodních antimikrobiálních látek [67]. Z tohoto důvodu, přidání látek z extraktů přírodních materiálů, které působí baktericidně, či bakteriostaticky se zdá být

zajímavou volbou. Tyto vlastnosti lze přičíst vysokému obsahu terpenových a fenolových sloučenin. Vodný extrakt těchto látek z rostlinných materiálů přidávaných do aktivních obalů tzv. želatinových filmů může působit antimikrobiálně [68].

Martucci a kol. připravili směsný extrakt pomocí vodní destilace z čerstvě usušených květů a listů oregana (*Origanum vulgare*) a levandule (*Lavandula officinalis*). Účinnost extraktů zkoumali z důvodu vývoje nových udržitelných obalových materiálů pro potraviny na bázi obnovitelných přírodních biopolymerů. Hlavní hnací silou růstu celosvětového potravinářského průmyslu je rozsah uchování a trvanlivost potravin [67]. Aktivní obaly si získávají čím dál větší pozornost výzkumníků vzhledem k jejich přínosu pro zachování zdravotní nezávadnosti potravin. Jsou navrhovány pro vzájemnou interakci s jejich obsahem a okolním prostředím. Mají schopnost pohlcovat kyslík, vlhkost, chutě či zápachy a také mohou vykazovat antimikrobiální a antioxidační aktivitu. Aktivní obalové materiály dokáží sledovat stav balených potravin nebo prostředí a zároveň poskytují informace o různých faktorech během přepravy a skladování [69].

Na zjištění antimikrobiální aktivity filmů Martucci a kol. použili metodu difúzních disků. Z želatinových filmů byl asepticky vyříznut disk o průměru 10 mm, který byl umístěn na agarové plotny předem naočkovaných 100 μ l inokula obsahující přibližně 10^5 až 10^6 CFU/ml testovaného kmene bakterie. Plotny byly inkubovány při teplotě 37 °C/24 h. Průměr inhibiční zóny kolem disků byl přesně změřen [70].

Zjistilo se, že oba extrakty inhibují růst testovaných mikroorganismů. Citlivější na tyto extrakty jsou pak grampozitivní bakterie. Extrakt z oregana oproti levanduli proti *Escherichia coli* je vyšší v důsledku většího obsahu fenolových sloučenin, které zároveň poskytují antioxidační účinek [70].

Gramnegativní bakterie mají vnější membránu obklopující buněčnou stěnu složenou z hydrofilních polysacharidů, které omezují difúzi hydrofobních sloučenin, jako je právě extrakt z oregana a jeho hlavních složek. Oba patogeny byly méně náchylné k působení levandulového extraktu a na jeho hlavní složku linalool, což naznačuje antibakteriální schopnost. Podobné výsledky byly zaznamenány u extraktu z bazalky a tymiánu [71]. Potenciální antagonistický nebo synergický efekt mezi jednotlivými extrakty byl experimentálně analyzován na směsích v poměru 50:50. Směs vykazovala nižší antimikrobiální aktivitu, než jednotlivé extrakty, což ukazuje jejich možný antagonistický účinek [72].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo připravit několika metodami alkoholové extrakty z jedlých květů a netradičních druhů ovoce. Tyto extrakty následně upravit a pomocí diskové difúzní metody stanovit jejich antimikrobiální účinky.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Pomůcky a nástroje

- laminární box (Clean Air, Nizozemsko)
- laboratorní inkubátor (Mettler, Německo)
- lednice (Electrolux, Německo)
- parní sterilizátor Varioklav 75S (Labortechnik AG, Německo)
- ultrazvukové tyčové ponorné zařízení Microson XL 2000 (Qsonica, USA)
- Densi-La-Meter (Erba Lachema, Česká republika)
- laboratorní třepačka Vortex (Heidolph, Německo)
- termoblok Bio TD (Biotech, Česká republika)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- digitální váha
- laboratorní sklo
- základní laboratorní pomůcky

5.2 Chemikálie a roztoky

- metanol (koncentrovaný p.a., 99,5%, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- etanol (absolutní bezvodý p.a., 99,87%, Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- fyziologický roztok
- Müller-Hinton agar (MHA, HiMedia Laboratories, Indie)
- masopeptonový bujón (MPB)

5.2.1 Příprava živné půdy MHA

Pro přípravu 1 litru živné půdy bylo naváženo 38 g dehydratované půdy, které bylo rozpuštěno v 1 000 ml destilované vody. Pro kontrolu bylo změřeno pH (pH 7,3±0,2) a následně proběhla sterilizace v parním autoklávu při 121 °C/15 min. Po zchlazení na 50 °C byla živná půda rozlita do Petriho misek.

5.2.2 Příprava živné půdy MPB

Masopeptonový bujón byl připraven navážením 3 g NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod), 3 g masového extraktu (HiMedia Laboratories, Indie) a 5 g peptonu (HiMedia Laborato-

ries, Indie). Navážky byly rozpuštěny v 1 000 ml destilované vody. Po kontrole pH (pH 7,2±0,2) byla provedena sterilizace v parním autoklávu při 121 °C/15 min.

5.2.3 Příprava fyziologického roztoku

Pro přípravu 1 litru fyziologického roztoku bylo naváženo 8,6 g NaCl, které bylo rozpuštěno v 1 000 ml destilované vody. Po úplném rozpuštění NaCl byla provedena sterilizace v parním autoklávu při 121 °C/15 min.

5.3 Vzorky jedlých květů a netradičních druhů ovoce

Vzorky jedlých květů dodala Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta. Sbírány byly v obci Lednice (nadmořská výška 173 m n. m.) v období května až července 2012. Vzorky netradičních druhů ovoce poskytla Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta. Sběr vzorků proběhl v obci Žabčice (nadmořská výška 182 m n. m.) v období května až července 2012. Vzorky byly po sběru ihned zmrazeny na -18 °C (Tab. 1.).

Tab. 1. Seznam vzorků.

Označení vzorku	Název vzorku
5	<i>Borago officinalis</i> (modrý)
6	<i>Salvia officinalis</i>
10	<i>Matricaria recutita</i>
11	<i>Salvia nemorosa</i> „Violet Queen“
13	<i>Salvia glutinosa</i>
14	<i>Salvia nemorosa</i>
15	<i>Hosta</i> „Golden Tiara“
19	<i>Hemerocallis fulva</i> „Buzz Bomb“
23	<i>Monarda didyma</i> „Scorpion“
34	<i>Phlox paniculata</i> „Eclairer“
35	<i>Hosta</i> „Ginko Craig“
6B	<i>Lonicera kamtschatica</i> „Sinoglaska“
10B	<i>Amelanchier</i> „Tišnovský velkoplodý“
13B	<i>Amelanchier</i> „Tišnovský“

5.4 Příprava extraktů

5.4.1 Příprava metanolových extraktů 1

Extrakty byly připraveny navážením 5 g zamraženého vzorku, který se homogenizoval společně s 50 ml metanolu v uzavíratelných skleněných nádobkách. Extrakce probíhala ve

tmě při teplotě 25 ± 2 °C/24 h. Po uplynutí této doby proběhla filtrace. Extrakty byly připraveny v červenci roku 2012 a uchovány v lednici při teplotě 4 ± 2 °C do doby testování, které proběhlo v únoru roku 2013.

Před testováním byly extrakty upraveny tak, že do mikrozkušavky typu Eppendorf byl odebrán 1 ml extraktu, ze kterého bylo pomocí termobloku při teplotě 40 °C odpařeno rozpouštědlo do objemu 250 μ l. Víčko mikrozkušavky bylo zajištěno parafilmem a takto připravený extrakt byl uchován v lednici při teplotě 4 ± 2 °C do vlastního stanovení.

5.4.2 Příprava metanolových extraktů 2

Tyto extrakty byly připraveny těsně před vlastním stanovením, aby byla zajištěna jejich čerstvost.

Extrakty byly připraveny navážením 1 g zamraženého vzorku, který se homogenizoval společně s 10 ml metanolu v uzavíratelných skleněných nádobkách. Extrakce probíhala ve tmě při teplotě 25 ± 2 °C/24 h.



Obr. 6. Příprava extraktů.

Po uplynutí této doby proběhla filtrace. Do mikrozkušavky typu Eppendorf byl odebrán 1 ml extraktu, ze kterého bylo pomocí termobloku při teplotě 40 °C odpařeno rozpouštědlo do objemu 250 μ l. Víčko mikrozkušavky bylo zajištěno parafilmem a takto připravený extrakt byl uchován v lednici při teplotě 4 ± 2 °C.

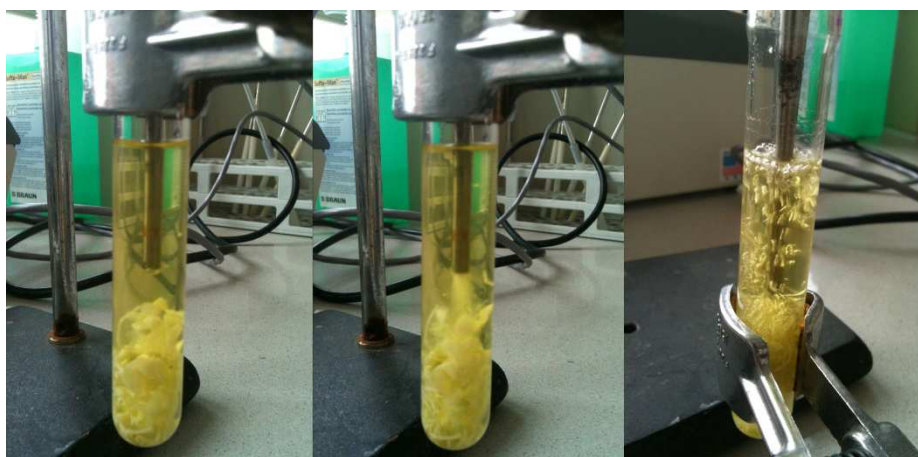
5.4.3 Příprava metanolových extraktů s kontinuálním působením ultrazvuku

Při přípravě těchto extraktů byl do kádinky navážen 1 g zamraženého vzorku. V kádince se vzorek homogenizoval spolu s 10 ml metanolu. Celý obsah kádinky byl přelit do silnostěnné zkumavky, která byla zachycena držákem na stojanu. Do zkumavky bylo ponořeno ul-

trazvukové tyčové ponorné zařízení Microson XL 2000. Doba působení ultrazvuku byla 15 minut kontinuálně při frekvenci 22,5 kHz.



Obr. 7. Aparatura se zařízením Microson XL 2000.



Obr. 8. Postupné působení ultrazvuku.

Poté byl celý obsah zkumavky slit do uzavíratelné skleněné nádoby, v níž proběhla extrakce vzorku při teplotě 25 ± 2 °C/24 h. Extrakce probíhala ve tmě, bez přístupu slunečního záření a umělého světla. Po uplynutí této doby byla heterogenní směs zfiltrována. Do mikrozkušavky typu Eppendorf byl odebrán 1 ml extraktu, ze kterého bylo pomocí termo-

bloku při teplotě 40 °C odpařeno rozpouštědlo do objemu 250 µl. Víčko mikrozkušavky bylo zajištěno parafilmem a takto připravený extrakt byl uchován v lednici při teplotě 4±2 °C.

5.4.4 Příprava metanolových extraktů s diskontinuálním působením ultrazvuku

Tyto extrakty byly připraveny navážením 1 g zamraženého vzorku do kádinky. V kádince byl vzorek homogenizován spolu s 10 ml metanolu. Celý obsah kádinky byl přelit do silnostěnné zkumavky, která byla zachycena držákem na stojanu. Do zkumavky se ponořilo ultrazvukové tyčové ponorné zařízení Microson XL 2000. Doba působení ultrazvuku činila 15 minut, přičemž po 30 sekundách působení bylo na 30 sekund působení ultrazvukem přerušeno. Frekvence byla 22,5 kHz.

Poté byl celý obsah zkumavky slit do uzavíratelné skleněné nádoby, v níž proběhla extrakce vzorku při teplotě 25±2 °C/24 h. Extrakce probíhala ve tmě, bez přístupu slunečního záření a umělého světla.

Po uplynutí této doby byla heterogenní směs zfiltrována. Do mikrozkušavky typu Eppendorf byl odebrán 1 ml extraktu, ze kterého bylo pomocí termobloku při teplotě 40 °C odpařeno rozpouštědlo do objemu 250 µl. Víčko mikrozkušavky bylo zajištěno parafilmem a takto připravený extrakt byl uchován v lednici při teplotě 4±2 °C.

5.4.5 Příprava etanolových extraktů

Etanolové extrakty byly připraveny stejně jako metanolové extrakty s tím rozdílem, že jako rozpouštědlo byl použit etanol. Extrakty byly připraveny těsně před vlastním stanovením.

5.4.6 Příprava etanolových extraktů s kontinuálním působením ultrazvuku

Při přípravě těchto extraktů se využil stejný postup jako při přípravě metanolových extraktů s kontinuálním působením ultrazvuku. Jako extrakční činidlo pro extrakci byl použit etanol.

5.5 Testované kmeny bakterií

Antimikrobiální aktivita extraktů byla testována na 25 kmenů gram pozitivních a gram negativních bakterií (Tab. 2.). Kmeny pochází buď z České sbírky mikroorganismů (CCM)

nebo ze sbírky Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí Fakulty technologické UTB ve Zlíně.

Tab. 2. Seznam kmenů bakterií.

Označení kmene	Název kmene
CCM 3954	<i>Escherichia coli</i>
CCM 7205	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. <i>Typhimurium</i>
PF	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CCM 3953	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
CCM 732	<i>Micrococcus luteus</i>
CCM 2010	<i>Bacillus cereus</i>
1A12	<i>Citrobacter freundii</i> (izolát z hmyzu)
1A13	<i>Klebsiella</i> sp. (izolát z hmyzu)
1M1	<i>Enterococcus faecalis</i> (izolát z hmyzu)
7BM1	<i>Lactobacillus brevis</i> (izolát z hmyzu)
7BA3	<i>Enterococcus thailandicus</i> (izolát z hmyzu)
7BA2	<i>Bacillus licheniformis</i> (izolát z hmyzu)
2A3	grampozitivní bakterie (izolát z hmyzu <i>Bombyx mori</i>)
2A6	<i>Staphylococcus sciuri</i> (izolát z hmyzu)
2M1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (izolát z hmyzu)
4A4a	<i>Kocuria rhizophila</i> (izolát z hmyzu)
3A1	<i>Morganella morganii</i> (izolát z hmyzu)
9BA5	<i>Kocuria palustris</i> (izolát z hmyzu)
6A2	<i>Leclercia adecarboxylata</i> (izolát z hmyzu)
7A2	<i>Sphingobacterium multivorum</i> (izolát z hmyzu)
8A1	<i>Providencia rettgeri</i> (izolát z hmyzu)
320	<i>Rothia</i> sp. (izolát ze syrového masa)
323	<i>Raoultella ornithinolytica</i> (izolát ze syrového masa)
324	<i>Ewingella</i> sp. (izolát ze syrového masa)
327	<i>Kocuria</i> sp. (izolát ze syrového masa)

5.5.1 Příprava inokula

Sterilní očkovací kličkou bylo odebráno několik bakteriálních kolonií určitého kmene kultivovaných na neselektivní živné půdě do sterilního masopeptonového bujónu. Podle druhu byly bakterie kultivovány při teplotě 37 °C/24 h nebo při teplotě 30 °C/24 h (*Micrococcus luteus* a *Pseudomonas fluorescens*). Po kultivaci bylo do plastové zkumavky pipetováno několik ml fyziologického roztoku, kam byla postupně přidávána tekutá půda do hodnoty zákalu 0,5 McF. Tento postup se využil pro přípravu inokula všech testovaných mikroorganismů.

5.6 Disková difúzní metoda

Tato metoda je jednou z nejčastěji využívaných metod pro vyhodnocení antimikrobiální aktivity. V laminárním boxu na Petriho misky s MH agarem byl pipetován 1 ml příslušného inokula, jehož hodnota zákalu se rovnala 0,5 McF. Tato suspenze bakterií byla po celé ploše agaru rozlita krouživým pohybem. Přebytek inokula byl odsán pomocí pipety a nanesen na další Petriho misku. Následně byly připraveny disky, na které bylo pipetováno 10 μ l extraktu. Stejným způsobem byly zhotoveny disky s metanolem a etanolem jako kontrola. Disky se nechaly zaschnout. Po zaschnutí disků a inokula na agaru byly disky nakladeny na půdu pomocí očkovacích jehel. Podle druhu bakterií proběhla inkubace v termostatu při teplotě 37 °C/24 h nebo 30 °C/24 h.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Bylo připraveno několik druhů extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce, jejichž antimikrobiální účinek byl testován pomocí diskové difúzní metody na 25 kmenů mikroorganismů. Stanovení bylo provedeno celkem třikrát. Na základě diskové difúzní metody bylo zjištěno, jaký druh extraktu má největší antimikrobiální účinek a jaká metoda přípravy extraktu je nejefektivnější.

Při prvním stanovení nebyly zjištěny žádné antimikrobiální účinky extraktů. Negativní výsledek byl dán nízkou koncentrací látek rozpuštěných v extraktu a tedy i obsažených na difúzních discích. Proto byly všechny extrakty upraveny postupem popsáním v kapitole 5.4.1. Po úpravě koncentrace extraktů bylo stanovení provedeno dvakrát.

6.1 Metanolové extrakty

Účinek metanolových extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce (Tab. 1.) byl testován proti čtrnácti grampozitivních a jedenácti gramnegativních mikroorganismů (Tab. 2.).

Nejdříve byly připraveny metanolové extrakty 1 (07/2012), jejichž antimikrobiální účinky byly testovány o 6 měsíců později (02/2013). Antimikrobiální účinek byl prokázán u vzorků 6, 11, 14 a 23. Extrakt ze vzorku 6 (*Salvia officinalis*) působil proti grampozitivním bakteriím *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Bacillus cereus*. Extrakty ze vzorků 11 (*Salvia nemorosa* „Violetkonigin“) a 23 (*Monarda didyma* „Scorpion“) antimikrobiálně působily proti grampozitivní bakterii *Bacillus cereus*. Extrakt ze vzorku 14 (*Salvia nemorosa*) vykazoval účinnost proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (Příloha P I).

Pro zjištění, zda účinnost extraktů ovlivňuje doba skladování, byly ze vzorků těsně před vlastním stanovením připraveny metanolové extrakty 2. Antimikrobiální aktivita byla prokázána u vzorků 6, 10, 11, 14, 15, 23, 34 a 13B. Extrakt ze vzorku 6 (*Salvia officinalis*) antimikrobiálně působil stejně jako metanolový extrakt 1 proti grampozitivním bakteriím *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Bacillus cereus*. Navíc však inhibiční zóny byly zaznamenány u grampozitivních bakterií *Kocuria rhizophila* a *Lactobacillus brevis*. Extrakt ze vzorku 10 (*Matricaria recutita*) antimikrobiálně působil proti grampozitivním bakteriím *Bacillus cereus* a *Lactobacillus brevis*. Antimikrobiální aktivita extraktu ze vzorku 11 (*Salvia nemorosa* „Violetkonigin“) byla prokázána proti grampozi-

tivním bakteriím *Bacillus cereus* a *Pediococcus pentosaceus*. Extrakt ze vzorku 14 (*Salvia nemorosa*) antimikrobiálně působil proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a *Pediococcus pentosaceus* a gramnegativní bakterii *Leclercia adecarboxylata*. U vzorku 15 (*Hosta* „Golden Tiara“) byla antimikrobiální aktivita prokázána proti gramnegativní bakterii *Leclercia adecarboxylata*. Vzorek 23 (*Monarda didyma* „Scorpion“) působil proti grampozitivním bakteriím *Bacillus cereus* a *Kocuria rhizophila* a gramnegativní bakterii *Morganella morganii*. Extrakt ze vzorku 34 (*Phlox paniculata* „Eclairer“) se antimikrobiálně projevil proti gramnegativní bakterii *Morganella morganii*. Jediným extraktem z netradičních druhů ovoce, který působil antimikrobiálně, byl vzorek 13B. U něj byla pozorována účinnost proti gramnegativní bakterii *Leclercia adecarboxylata* (Příloha P II).

K obdobným výsledkům ve své práci dospěl Quarengi a kol., kteří stanovovali antimikrobiální aktivitu metanolového extraktu z květů *Anthemis cotula*. Studie uvádí pozitivní účinky extraktu proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli* [73]. Mann a kol. stanovovali antimikrobiální účinky metanolového extraktu z červených jedlých květů *Bombax buonopozense*. Antimikrobiální účinek zaznamenali proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli* [74]. Duraipandiyan a Ignacimuthu ve své práci uvádí antimikrobiální účinky metanolového extraktu z jedlých květů *Cassia fistula* Linn. Účinky zaznamenali proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* a *Enterococcus faecalis* [75]. Sangetha a kol. prokázali antimikrobiální účinek metanolového extraktu z květů *Cassia surattensis* proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* spp. a *Bacillus subtilis* [76]. Sati a kol. stanovovali antimikrobiální účinek metanolového extraktu z květů *Valeriana wallichii* DC. Inhibiční zóny vznikly u grampozitivních bakterií *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* [77].

López-García a kol. zjistili antimikrobiální aktivitu metanolových extraktů z jedlých květů *Allium schoenoprasum*, *Salvia pratensis*, *Sambucus nigra* a *Taraxacum officinale*. Pomocí diskové difúzní metody zjistili významné účinky proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli* [50]. China a kol. připravili extrakt z jedlých květů *Sesbania grandiflora* pomocí extrakčního činidla metanolu a vody v poměru 80:20. Inhibiční účinek byl zaznamenán proti bakteriím *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* a *Vibrio cholerae*. Grampozitivní bak-

terie *Staphylococcus aureus* byla na účinky extraktu nejcitlivější, zatímco nejvyšší odolnost vykazovala gramnegativní bakterie *Vibrio cholerae* [52].

Shan a kol. připravili extrakt z jedlých květů *Chrysanthemum morifolium* pomocí 80% metanolu, který následně vykazoval antimikrobiální aktivitu proti grampozitivní bakterii *Bacillus cereus*. Stejného extrakčního činidla použili při přípravě extraktů z květů *Eugenia caryophyllata* a *Lonicera japonica*, které působily proti grampozitivním bakteriím *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus* [78]. Ushimaru a kol. využili při přípravě extraktů z květů *Eugenia caryophyllata* 70% metanol. Extrakt vykazoval antimikrobiální účinky proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus* spp. a gramnegativní bakterii *Salmonella Typhimurium* [79].

Antimikrobiální účinky jedlých květů léčivé rostliny *Salvia officinalis* zkoumali Aba-Elmageed a kol., kdy z usušených květů připravili extrakt pomocí 70% metanolu. Ten nejvíce působil proti růstu gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* [60]. Další studie uvádí antimikrobiální aktivitu metanolového extraktu z *Tamarix gallica* proti grampozitivním bakteriím *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus aureus* a gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* [55].

Při porovnání metanolových extraktů 1 a metanolových extraktů 2 bylo zjištěno, že metanolové extrakty 1 působí pouze proti grampozitivním bakteriím, kdežto metanolové extrakty 2 vykazují účinnost i proti gramnegativním bakteriím. Navíc působí na širší škálu mikroorganismů. Z toho vyplývá, že při skladování extraktů při chladírenských teplotách (2-8 °C) klesá jejich antimikrobiální účinek. Antimikrobiální účinek metanolových extraktů 2, které byly připraveny před vlastním stanovením, je podstatně vyšší.

V souhrnu u metanolových extraktů 2 byla prokázána antimikrobiální aktivita u sedmi vzorků jedlých květů a jednoho vzorku netradičního ovoce proti 8 kmenům bakterií. Z uvedených výsledků vyplývá, že nejvyšší antimikrobiální účinky má extrakt ze vzorku 6 (*Salvia officinalis*), který působil proti pěti grampozitivním bakteriím a to v případě obou metanolových extraktů. Proti dvěma grampozitivním bakteriím a jedné gramnegativní bakterii působil extrakt ze vzorku 14 (*Salvia nemorosa*) a 23 (*Monarda didyma* „Scorpion“).

6.2 Etanolové extrakty

Stanovení antimikrobiální aktivity etanolových extraktů připravených ze všech vzorků (Tab. 1.) bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 5.6. Antimikrobiální aktivita extraktů byla stanovena proti všem bakteriím uvedených v tabulce 2 (Tab. 2.). Stanovení u každého extraktu bylo provedeno opět dvakrát.

Antimikrobiální aktivita byla zjištěna u vzorků 6, 10, 15, 23, 6B a 13B. Etanolový extrakt ze vzorku 6 (*Salvia officinalis*) působil proti grampozitivním bakteriím *Micrococcus luteus*, grampozitivní bakterii izolátu z hmyzu *Bombyx mori*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus licheniformis*, *Kocuria palustris*, *Lactobacillus brevis*, *Staphylococcus sciuri* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. U vzorku 10 (*Matricaria recutita*) byla prokázána antimikrobiální aktivita proti grampozitivním bakteriím *Micrococcus luteus* a *Lactobacillus brevis*. Extrakt ze vzorku 15 (*Hosta* „Golden Tiara“) se vyznačoval antimikrobiální aktivitou proti grampozitivním bakteriím *Micrococcus luteus*, *Kocuria palustris* a *Lactobacillus brevis*. Inhibiční zóny byly zaznamenány u extraktu ze vzorku 23 (*Monarda didyma* „Scorpion“) proti grampozitivním bakteriím *Kocuria rhizophila*, *Lactobacillus brevis*, *Staphylococcus sciuri* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli* (Příloha P III).

Etanolový extrakt z jedlého plodu vzorku 6B (*Lonicera kamtschatica* „Sinoglaska“) působil proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli*. U vzorku jedlého plodu 13B (*Amelanchier* „Tišnovský“) byla antimikrobiální aktivita zaznamenána proti grampozitivním bakteriím *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a dvěma gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium (Příloha P III).

Sagdic a kol. prováděli studii na využití květů *Tulipa gesneriana* L. k jídlu a také zjišťovali jejich bioaktivní vlastnosti. K extrakci použili rozemleté květy sušených tulipánů a jako rozpouštědlo 99,8% etanol. Extrakce probíhala pomocí třepací vodní lázně při 35 °C po dobu jedné hodiny. Zbytky rozpouštědla se odpařili na rotační odparce při 50 °C. Metodou zjistili, že extrakty z květů byly účinné na grampozitivní bakterie *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a gramnegativní bakterii *Yersinia enterocolitica* [80].

Grewia asiatica L. (Blahokamýk asijský) je druh keře, který je pěstován pro jedlé plody. Silný antimikrobiální účinek etanolového extraktu z jedlých plodů byl pozorován proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Proteus vulgaris* [81].

V dalších studiích se zabývali antimikrobiální aktivitou etanolového extraktu z květu i plodu *Sambucus nigra* L. Bylo prokázáno, že tento extrakt působí proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus* sp. a *Bacillus cereus* a gramnegativním bakteriím *Salmonella poona* a *Pseudomonas aeruginosa* [82].

Obdobných výsledků dosáhl Gniewosz a kol., kteří zkoumali antimikrobiální aktivitu Pullulanu, do kterého přidali vodno-etanolový či etanolový extrakt z *Filipendulae ulmariae* (Tužebník jilmový). Pullulan je polysacharidový polymer vyráběný ze škrobu, který se používá ve formě jedlého tenkého filmu proti vysychání. Disková difúzní metoda ukázala zvýšenou aktivitu proti grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* a gramnegativním bakteriím *Salmonella enteritidis* a *Escherichia coli*. Více účinný byl extrakt připravený pomocí směsi vody a etanolu. Z výsledků také vyplývá, že film inhibuje růst přírodní mezofilní mikroflóry [83].

Gniewosz a kol. v další studii o Pullulanu zjišťovali jeho antimikrobiální aktivitu po přidavku etanolového extraktu z *Ocimum basilicum* [83]. Některé dřívější studie o použití extraktů z bazalky prokázaly významnou účinnost proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím [84]. Pullulanové filmy samy o sobě nevykazují antimikrobiální aktivitu. Z tohoto důvodu se do jedlého filmu přidávají antimikrobiální látky, jako je lysozym, sakacin A, thymol nebo extrakt z kmínu. Dřívější studie prokázaly inhibiční aktivitu filmů proti patogenním gramnegativním bakteriím *Escherichia coli* a *Salmonella enteritidis* a grampozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus* či *Listeria monocytogenes* [85]. U ochranného filmu s obsahem extraktu z bazalky byla zjištěna nízká aktivita proti mezofilním bakteriím. Grampozitivní bakterie, zejména *Staphylococcus aureus*, byly více náchylné, než kmeny gramnegativních bakterií. Čím větší množství extraktu film obsahoval, tím větší vznikly inhibiční zóny a tím víc docházelo k potlačení růstu bakterií [86].

Podobných výsledků ve své práci dosáhl Dung a kol., který připravil extrakt z květů *Cleistocalyx operculatus* pomocí etanolu. Antimikrobiální účinek tohoto extraktu byl zaznamenán proti grampozitivním bakteriím *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecium* a gramnegativním bakteriím *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* [87]. Pomocí 40% etanolu extrahoval Szabó a kol. bioaktivní látky z květů *Cnicus benedictus*. Inhibiční zóny byly zaznamenány u grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a gramnegativních bakterií *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella enteritidis* a *Escherichia coli* [88].

Chouhan a Singh ve své práci potvrdili antimikrobiální účinky etanolového extraktu z květů *Crotalaria juncea* proti *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* [89].

Pomocí 95% etanolu ve své studii Stonsauvapak a kol. připravili extrakt z květů *Eugenia caryophyllata*, jehož antimikrobiální účinky zaznamenali proti *Escherichia coli* [90]. Etanolový extrakt z květů *Hibiscus sabdariffa* připravený Hamdanem a kol. antimikrobiálně působil proti grampozitivní bakterii *Bacillus cereus* [91]. Další studie uvádí antimikrobiální účinky etanolových extraktů připravených z květů *Satureja bachtiarica* a *Thymus daenensis* proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a gramnegativní bakterii *Escherichia coli* [92].

V souhrnu u etanolových extraktů byla prokázána antimikrobiální aktivita u čtyř vzorků jedlých květů a dvou vzorků netradičního druhu ovoce proti dvanácti kmenům bakterií. Nejvyšší antimikrobiální účinky měl, stejně jako u metanolových extraktů, extrakt ze vzorku 6 (*Salvia officinalis*), který působil proti sedmi grampozitivním bakteriím a jedné gramnegativní bakterii. Významnými antimikrobiálními účinky se pak projevil extrakt ze vzorku netradičního druhu ovoce 13B (*Amelanchier* „Tišnovský“), který působil proti třem grampozitivním bakteriím a dvěma gramnegativním bakteriím.

V porovnání s metanolovými extrakty je zřejmé, že etanolové extrakty vykazují významnější antimikrobiální účinky. Výsledky ukazují, že celková antimikrobiální aktivita metanolových i etanolových extraktů je více účinná proti růstu grampozitivních bakterií ve srovnání s gramnegativními bakteriemi. Ve skutečnosti jsou gramnegativní bakterie obvykle odolnější vůči antimikrobiálním látkám než grampozitivní bakterie. Je to z důvodu, že vnější propustnost buněčné stěny omezuje pronikání antimikrobiálních látek do buňky. Ke stejnému zjištění dospěli ve své práci Martins a kol. [93]. V literatuře to uvádí i Vaara [94].

6.3 Metanolové a etanolové extrakty ošetřené ultrazvukem

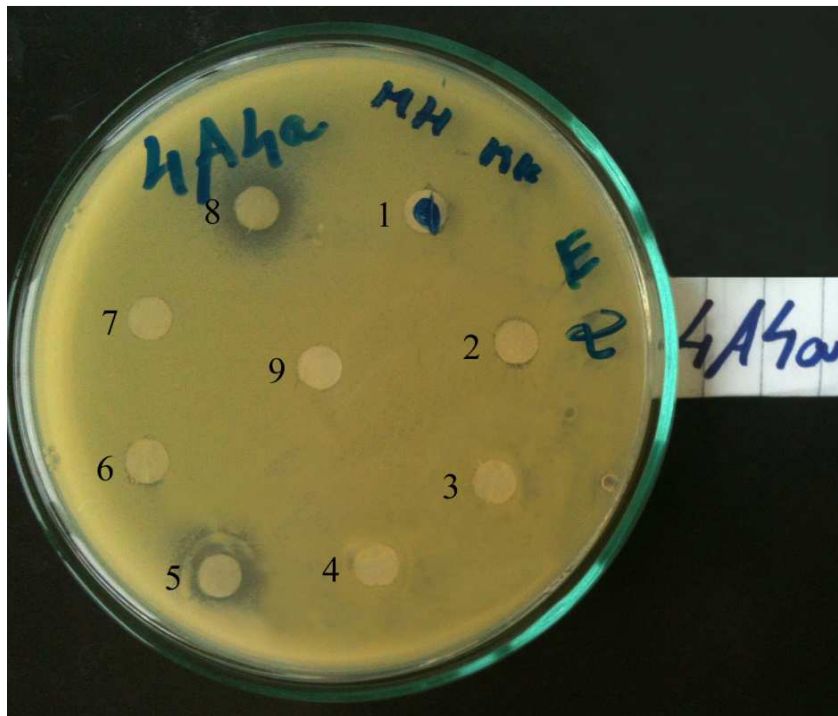
Při přípravě těchto extraktů bylo využito působení ultrazvuku a to ve dvou modifikacích. Nejprve byly zhotoveny extrakty s kontinuálním působením ultrazvuku popsaným v kapitole 5.4.3 a poté s diskontinuálním působením ultrazvuku podle kapitoly 5.4.4. Jako extrakční činidlo byl zvolen metanol a etanol. Tyto modifikované extrakce měly za cíl zvýšit výtěžnost metabolitů v extrakčním činidle.

Metanolové extrakty s kontinuálním působením ultrazvuku byly připraveny ze všech 14 vzorků jedlých květů a netradičních druhů ovoce. Jejich antimikrobiální účinek byl následně testován proti 25 kmenům bakteriím (Tab. 2.). Ze zjištěných výsledků však žádný extrakt nevykazoval antimikrobiální aktivitu (Příloha P IV).

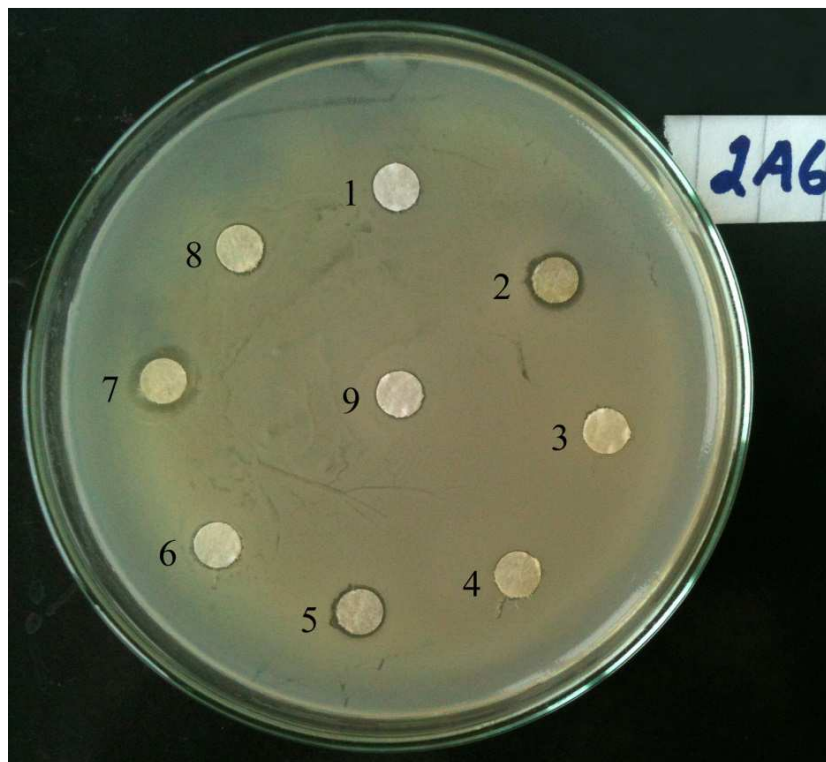
Antimikrobiální aktivita metanolových extraktů s diskontinuálním působením ultrazvuku se projevila u vzorků 6, 11, 13 a 14. Extrakt ze vzorku 6 (*Salvia officinalis*) působil proti grampozitivním bakteriím *Kocuria rhizophila* a *Staphylococcus sciuri*. Antimikrobiální účinek vzorku 11 (*Salvia nemorosa* „Violetkonigin“) se projevil pouze proti gramnegativní bakterii *Leclercia adecarboxylata*. U vzorku 13 (*Salvia glutinosa*) byly zaznamenány antimikrobiální účinky proti grampozitivní bakterii *Enterococcus faecalis* a gramnegativní bakterii *Leclercia adecarboxylata*. Vzorek 14 (*Salvia nemorosa*) se antimikrobiálně prokázal proti grampozitivním bakteriím *Kocuria palustris* a *Staphylococcus sciuri* a gramnegativní bakterii *Leclercia adecarboxylata* (Příloha P V).

Na základě negativních výsledků metanolových extraktů s kontinuálním působením ultrazvuku vůči testovaným 25 kmenům bakteriím (Tab. 2.) nebyly připraveny etanolové extrakty s kontinuálním působením ultrazvuku.

Při stanovení s využitím diskontinuálního ultrazvuku byly zaznamenány antimikrobiální účinky etanolových extraktů ze vzorků 6, 11, 13 a 14. Antimikrobiální aktivita vzorku 6 (*Salvia officinalis*) se projevila proti grampozitivním bakteriím *Kocuria rhizophila*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus sciuri* a grampozitivní bakterii izolátu z hmyzu *Bombyx mori*. Extrakt ze vzorku 11 (*Salvia nemorosa* „Violetkonigin“) působil proti grampozitivním bakteriím *Bacillus licheniformis* a *Lactobacillus brevis*. Antimikrobiální účinky byly zaznamenány také u extraktu ze vzorku 13 (*Salvia glutinosa*), který inhiboval růst grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* a extrakt ze vzorku 14 (*Salvia nemorosa*) působil proti grampozitivní bakterii *Kocuria* sp (Příloha P VI).



Obr. 9. Antimikrobiální aktivita extraktů připravených působením diskontinuálního ultrazvuku proti grampozitivní bakterii *Kocuria rhizophila* pomocí diskové difúzní metody. 1 – etanolvá kontrola, 2 – metanolvý extrakt ze *Salvia glutinosa*, 3 – metanolvý extrakt ze *Salvia nemorosa*, 4 – metanolvý extrakt ze *Salvia nemorosa* „Violetkonigin“ 5 – metanolvý extrakt ze *Salvia officinalis* (inhibiční zóna), 6 – etanolvý extrakt ze *Salvia glutinosa*, 7 – etanolvý extrakt ze *Salvia nemorosa*, 8 – etanolvý extrakt ze *Salvia officinalis* (inhibiční zóna), 9 – metanolvá kontrola.



Obr. 10. Antimikrobiální aktivita extraktů připravených působením diskontinuálního ultrazvuku proti grampozitivní bakterii *Staphylococcus sciuri* pomocí diskové difúzní metody. 1 – etanolová kontrola, 2 – etanolový extrakt ze *Salvia officinalis* (inhibiční zóna), 3 – etanolový extrakt ze *Salvia nemorosa*, 4 – etanolový extrakt ze *Salvia glutinosa*, 5 – metanolový extrakt ze *Salvia officinalis* (inhibiční zóna), 6 – metanolový extrakt ze *Salvia nemorosa* „Violetkonigin“, 7 – metanolový extrakt ze *Salvia nemorosa* (inhibiční zóna), 8 – metanolový extrakt ze *Salvia glutinosa*, 9 – metanolová kontrola.

Podle předešlých studií se očekávalo, že použití ultrazvuku bude mít za následek zvýšení výnosu bioaktivních látek z jedlých květů a netradičních druhů ovoce. Také se předpokládalo širší antimikrobiální pole působnosti a tudíž vyhodnocení této metody jako nejúčinnější pro extrakci bioaktivních látek z rostlinných materiálů. To se však v této studii neprokázalo.

Důvodem negativních výsledků při metodě extrakce s kontinuálním působením ultrazvuku může být to, že při tomto procesu vzniká velké množství tepla. Při teplotě nad 50 °C dochází k denaturaci bílkovinných molekul a denaturaci bioaktivních látek a tedy i ke ztrátě jejich aktivitě. Ke vzniku tepla v ultrazvukovém poli dochází v důsledku transformace

akustické energie v průběhu absorpce [95]. Khan a kol. uvádí, že optimální teplotou pro extrakci z rostlinných materiálů je 40 °C. Vyšší teploty pak mohou negativně ovlivnit účinnost jednotlivých látek [95].

Díky mechanickým vlivům, především akustické kavitaci, která zvyšuje pronikání extrakčního činidla do rostlinného materiálu, dochází k narušení buněčné stěny a k intracelulárnímu uvolnění bioaktivních látek [96].

Ve své práci Jianyong Wu a kol. extrahovali pomocí metanolu saponiny z kořene ženšenu přímým působením tyčové sondy a nepřímým působením ultrazvuku v ultrazvukové lázni. Opět zde teplota extrakce nepřesáhla 40 °C. Tyčová sonda působila při 20 kHz a množství produkovaného tepla eliminovali ponořením zkumavky do ledu. Teplota při extrakci se pak pohybovala mezi 25-27 °C. Doba extrakce byla prodloužena z 15 min na 45 min. Dále bylo zjištěno, že ultrazvuková extrakce je třikrát rychlejší než Soxhletova extrakce a může se provádět při nižších teplotách, takže nedochází k destrukci termolabilních bioaktivních látek. Výťažky saponinu byly srovnatelné, dokonce u dvou vzorků byly vyšší, než hodnoty získané osmihodinovou Soxhletovou extrakcí [97].

V ultrazvukové lázni je možné zpracovat několik vzorků najednou, kdežto tyčová ultrazvuková sonda umožňuje zpracovat jeden vzorek po druhém. Při využití tyčové ultrazvukové sondy je možné zanesení kontaminace do vzorku a také určitá ztráta extraktu. Kromě toho je ultrazvuková lázeň v provozu mnohem tišší než tyčová ultrazvuková sonda [97].

U extraktů 6 (*Salvia officinalis*), 11 (*Salvia nemorosa* „Violetkonigin“), 13 (*Salvia glutinosa*) a 14 (*Salvia nemorosa*) připravených pomocí diskontinuálního působení ultrazvuku za použití metanolu jako extrakčního činidla se podle výsledků prokázal antimikrobiální účinek proti pěti kmenům bakterií. Při použití etanolu jako extrakčního činidla se u stejných extraktů a při stejné metodě prokázal antimikrobiální účinek proti sedmi kmenům bakterií. Z výsledků je tedy zřejmé, že účinnějším extrakčním činidlem je, tak jako u prosté macerace, etanol.

Na rozdíl od metody s kontinuálním působením ultrazvuku, kdy se působilo tyčovou sondou nepřetržitě 15 minut, se při přípravě extraktů s diskontinuálním působením ultrazvuku působilo 15 minut, avšak s 30sekundovými pauzami. Tyto pauzy zapříčinily pokles teploty v průběhu extrakce, tudíž nedošlo tak k výrazné destrukci termolabilních bioaktivních látek.

Tuto skutečnost ve své práci uvádí Atchley a kol., kteří provedli vodní extrakci bioaktivních látek z *Crocus sativa*. Také zjistili, že čím je časový interval mezi dvěma pulsy kratší, tím je extrakce účinnější. Doba mezi dvěma pulsy působí v pulzním poli jako doba odpočinku, během níž se malé bublinky a nestabilní dutiny zhroutí a tím se obnoví počáteční stav kapaliny [98].

Diskontinuální působení ultrazvuku je účinnější i proto, že při implozi bubliny se v jejím jádru vytváří vyšší tlak. Dalším důvodem oproti kontinuálnímu působení ultrazvuku je, že v pulzním poli dochází k rozpadu shluků kavitačních bublin či předcházení jejich vzniku [99].

Flynn a Curch ve své studii uvádějí, že bubliny uvnitř shluku jsou v ultrazvukovém poli zastíněny bublinami na vnější vrstvě shluku. Tato teze pak snižuje účinnost rozpadu bublin. Působení diskontinuálního ultrazvuku zabraňuje shlukování bublin a to může být favorizujícím vyjasněním kavitačních zón a tím i maximalizací samotné extrakce [100].

Destrukce bublin při diskontinuálním působení ultrazvuku v blízkosti rostlinných membrán způsobuje silné smykové síly, které následně způsobují mikro-trhliny v rostlinných buňkách. To má za následek vyšší výtěžnost, uvádí Vinatoru a kol. [101].

ZÁVĚR

Jedlé květy a netradiční druhy ovoce z okrasných, pěstěných či divoce rostoucích rostlin mají vysoký potenciál z pohledu přírodních zdrojů antimikrobiálních látek. Zkoumání těchto nedostatečně využitých květů a ovoce poskytuje vědecké důkazy o zvýšení pravděpodobnosti nálezu nových přírodních antimikrobiálních látek, které by mohly být vhodnou alternativou k syntetickým antimikrobiálním látkám či antibiotikům.

Další studie poukazují na stále se rozvíjející metody extrakce bioaktivních látek z jedlých květů a ovoce, které umožňují maximalizaci účinných látek z rostlinných materiálů.

Tato práce prokázala antimikrobiální účinky alkoholových extraktů z jedlých květů a netradičních druhů ovoce proti vybraným grampozitivním a gramnegativním mikroorganismům.

U metanolových extraktů byl prokázán antimikrobiální účinek proti osmi mikroorganismům, přičemž nejvyšší antimikrobiální účinky byly zaznamenány u extraktu ze vzorku *Salvia officinalis*. Z netradičních druhů ovoce inhibičně působil extrakt ze vzorku *Amelanchier* „Tišnovský“. Nicméně metanol může být pro člověka a zvířata vysoce toxický a z pohledu potravinářství je nepoužitelný.

Extrakty připravené pomocí etanolu vykazovaly významné antimikrobiální účinky. Etanolové extrakty jsou považovány za bezpečné a mohou být prospěšné pro potravinářský a farmaceutický průmysl. U etanolových extraktů byla prokázána antimikrobiální aktivita proti dvanácti mikroorganismům. Největší antimikrobiální účinky byly zjištěny, stejně tak jako u metanolového extraktu, u extraktu z květů *Salvia officinalis*. Z netradičních druhů ovoce inhibičně působil extrakty ze vzorků *Lonicera kamtschatica* „Sinoglaska“ a *Amelanchier* „Tišnovský“.

Také bylo zjištěno, že při dlouhodobém skladování při chladírenských teplotách podstatně klesají antimikrobiální účinky alkoholových extraktů.

Antimikrobiální aktivita etanolových a metanolových extraktů připravených kontinuálním působením ultrazvuku nebyla prokázána. Důvodem je vznik vysoké teploty během extrakce a následná destrukce bioaktivních látek. Při diskontinuálním působení ultrazvuku nedošlo k tak zásadní destrukci biologicky aktivních látek. Nejvýznamnější antimikrobiální aktivita při využití této extrakční metody byla prokázána u metanolového extraktu ze vzorku *Salvia nemorosa* a u etanolového extraktu ze vzorku *Salvia officinalis*. Ve srovnání

s prostou macerací bez působení ultrazvuku je tato metoda méně účinná. I přes krátké, pravidelné přerušování ultrazvuku během extrakce nedošlo k dostatečnému poklesu teploty. Tato teplota pak zapříčinila destrukci termolabilních bioaktivních látek.

Extrakce pomocí ultrazvuku není tak časově náročná jako příprava extraktů macerací a jeví se jako zajímavá extrakční metoda vhodná k dalším studiím. Při této metodě je však nutné zavést patřičná opatření, která zabrání destrukci biologicky aktivních látek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [6] ČERNOHORSKÝ, Zdeněk. *Základy rostlinné morfologie*. 5. vyd. Praha: státní pedagogické nakladatelství, 1964. ISBN 16-904-65.
- [2] PAŠTÉKA, Konstantín. *Botanika*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1972. ISBN 08-038-72.
- [3] KUBÁT, Karel. *Botanika*. 2. vyd. Praha: Scientia, 2003, 231 s., [12] s. barev. obr. příl. ISBN 80-718-3266-9.
- [4] BALOUN, Jan, Karel BENEŠ a Jan MINAŘÍK. *Farmaceutická botanika*. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, 1978, 231 s., [12] s. barev. obr. příl. ISBN 08-039-78.
- [5] MAKUŠOVÁ, Zorka. *Botanika I.: Obecná botanika*. Praha: Vysoká škola zemědělská, 1981.
- [6] PROCHÁZKA, Stanislav. *Botanika: morfologie a fyziologie rostlin*. Vyd. 3., nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 242 s. ISBN 978-80-7375-125-8.
- [7] In: Pedagogická fakulta MU [online]. [cit. 2015-05-28]. Dostupné z: http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/images/vybaveni_laboratore/soxhlet/004.jpg.
- [8] HODGE, Geoff. *Praktická botanika pro milovníky rostlin: více než 3000 botanických termínů: objevujte a pozorujte*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, 224 s. ISBN 978-80-247-5249-5.
- [9] In: Mendelova univerzita v Brně [online]. [cit. 2015-05-28]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/obrazky/organologie/velke_hroznovita_kvetenstvi.jpg.
- [70] PROCHÁZKA, Stanislav. *Botanika: morfologie a fyziologie rostlin*. 1. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998, 242 s. ISBN 80-715-7313-2.
- [81] SLAVÍKOVÁ, Zdeňka. *Morfologie rostlin: morfologie a fyziologie rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002, 218 s. ISBN 80-246-0327-6.

- [92] SARKER, Satyajit D, Zahid LATIF a Alexander I GRAY. *Natural products isolation*. 2nd ed. / . Totowa, N.J.: Humana Press, 2005, xii, 515 p. ISBN 15-925-9955-9.
- [103] KLOUDA, Pavel, Zahid LATIF a Alexander I GRAY. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [114] ROMANIK, G., E. GILGENAST, A. PRZYJAZNY a M. KAMIŃSKI. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2007, 70(2): 253-261. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.09.012.
- [125] ADAM, Martin, Petr DOBIÁŠ, Aleš EISNER a Karel VENTURA. Extraction of antioxidants from plants using ultrasonic methods and their antioxidant capacity. *Journal of Separation Science*. 2009, 32(2): 288-294. DOI: 10.1002/jssc.200800543.
- [16] VOON, Han Ching, Rajeev BHAT a Gulam RUSUL. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012, 11(1), 34-55. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x. ISSN 15414337.
- [17] DAI, Jin a Russell J. MUMPER. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 2010, 15(10), 7313-7352. DOI: 10.3390/molecules15107313. ISSN 1420-3049.
- [18] JONES, William P. a A. Douglas KINGHORN. Extraction of Plant Secondary Metabolites: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Natural Products Isolation*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005, 15(10), 323. DOI: 10.1385/1-59259-955-9:323. ISBN 978-1-58829-447-0. ISSN 1420-3049.
- [19] ROBARDS, Kevin a A. Douglas KINGHORN. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Journal of Chromatography A*. Totowa, NJ: Humana Press, 2003, 1000(1-2), 657-691. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00058-X. ISBN 978-1-58829-447-0. ISSN 00219673.
- [20] TAKAHASHI, Hironobu, Sachiyo HIRATA, Hiroyuki MINAMI, Yoshiyasu FUKUYAMA, Shakhnoza S. AZIMOVA a Anna I. GLUSHENKOVA. Triterpe-

- ne and flavanone glycoside from *Rhododendron simsii*. *Phytochemistry*. 2001, 56(8): 351-351. DOI: 10.1007/978-0-85729-323-7_1067.
- [21] BART, Hans-Jörg a Stephan PILZ. *Industrial scale natural products extraction*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2011, xvii, 296 p. ISBN 35-273-2504-2.
- [22] HANDA, Sukhdev Swami, Suman Preet Singh KHANUJA, Gennaro LONGO a Dev Dutt RAKESH. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *International Centre for Science and High Technology*. Trieste, Italy, 2008, 93-106.
- [23] ŠAFAŘÍK, Ivo. Fyzikální způsoby dezintegrace mikrobiálních buněk. *Chem. listy* 77, 1983, 337-356.
- [24] MOHAGHEGHZADEH, Abdolali, Thomas J. SCHMIDT a A. Wilhelm ALFERMANN. Arylnaphthalene Lignans from in Vitro Cultures of *Linum austriacum*. *Journal of Natural Products*. 2002, 65(1): 69-71. DOI: 10.1021/np0102814.
- [25] LIU, E-Hu, Lian-Wen QI, Jun CAO, Ping LI, Chang-Yin LI, Yong-Bo PENG a William R. LACOURSE. Advances of Modern Chromatographic and Electrophoretic Methods in Separation and Analysis of Flavonoids. *Molecules*. 2008, 13(10): 905-946. DOI: 10.1016/s0301-4770(02)80050-1.
- [26] CSEKE, Leland J. *Natural products from plants*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC/Taylor, 2006, 611 p., [4] p. of plates. ISBN 978-084-9329-760.
- [27] In: Glenmills [online]. 2007 [cit. 2015-06-07]. Dostupné z: <http://www.glenmills.com/wp-content/uploads/2011/06/GLEN-MILLS-INC.-FRENCH-PRESS-Operating-Manual-Feb-2007-Rev-11.pdf>.
- [28] BERSET, J. D., M. EJEM, Ruth HOLZER a Peter LISCHER. Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta*. 1999, 383(3): 263-275. DOI: 10.1016/s0003-2670(98)00817-4.
- [29] In: Pedagogická fakulta MU [online]. 2007 [cit. 2015-06-07]. Dostupné z: http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/images/vybaveni_laboratore/soxhlet/004.jpg.

- [30] RICHTER, Bruce E., Brian A. JONES, John L. EZZELL, Nathan L. PORTER, Nebojsa AVDALOVIC, Chris POHL, B. E. RICHTER, D. RAYNIE, M. D. Luque de CASTRO, et al. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*. 1996, 68(6): 131-189. DOI: 10.1016/b978-0-444-54319-6.00006-2.
- [31] WANG, Lijun, Curtis L. WELLER, M Angela A. MEIRELES, Anja HOHTOLA, L. A. MITSCHER, John C. MITCHELL, L. A. MITSCHER, John C. MITCHELL, Jose MARTÍNEZ, et al. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants: Recent Developments and Future Prospectives. *Trends in Food Science*. 2006, 17(6): 300-312. DOI: 10.1201/b13736-13.
- [32] MENDIOLA, José A., Miguel HERRERO, Alejandro CIFUENTES, Elena IBAÑEZ, L. RAMOS, Michael ROTHaupt a Michael J. LICHON. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1152(1-2): 3-24. DOI: 10.1002/9780470027318.a1026.
- [33] DAWIDOWICZ, Andrzej L., Dorota WIANOWSKA a Barbara BARANIAK. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT - Food Science and Technology*. 2006, 39(3): 308-315. DOI: 10.1016/j.lwt.2005.01.005.
- [34] RIEGER, Gudrun, Maria MÜLLER, Helmut GUTTENBERGER a Franz BUCAR. Influence of Altitudinal Variation on the Content of Phenolic Compounds in Wild Populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56(19): 9080-9086. DOI: 10.1021/jf801104e.
- [35] WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M., D. WIANOWSKA, A. ONISZCZUK a A. DAWIDOWICZ. Effect of sample-preparation methods on the quantification of selected flavonoids in plant materials by high performance liquid chromatography. *Acta Chromatographica*. 2008, 20(3): 475-488. DOI: 10.3403/30136182u.
- [36] SALVADOR, Ângelo C., Sílvia M. ROCHA a Armando J. D. SILVESTRE. Lipophilic phytochemicals from elderberries (*Sambucus nigra* L.): Influence of ripening, cultivar and season. *Industrial Crops and Products*. 2015, 71, 15-23. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.03.082. ISSN 09266690.

- [37] SZAKIEL, Anna, Cezary PAĆZKOWSKI, Flora PENSEC a Christophe BERTSCH. Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids: Influence of ripening, cultivar and season. *Phytochemistry Reviews*. 2012, 11(2-3), 263-284. DOI: 10.1007/s11101-012-9241-9. ISSN 1568-7767.
- [38] VANMIERLO, T., C. HUSCHE, H. F. SCHÖTT, H. PETTERSSON a D. LÜTJOHANN. Plant sterol oxidation products – Analogs to cholesterol oxidation products from plant origin?: Influence of ripening, cultivar and season. *Biochimie*. 2013, 95(3), 464-472. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.09.021. ISSN 03009084.
- [39] ESPÍN, Juan Carlos, María Teresa GARCÍA-CONESA, Francisco A. TOMÁS-BARBERÁN, H. PETTERSSON a D. LÜTJOHANN. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Biochimie*. 2013, 95(3), 464-472. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 03009084.
- [40] HAWTHORNE, Steven B., Yu. YANG, David J. MILLER, Steven B. HAWTHORNE a Arnaud J. LAGADEC. Extraction of Organic Pollutants from Environmental Solids with Sub- and Supercritical Water. *Analytical Chemistry*. 1994, 66(18): 2912-2920. DOI: 10.2172/778429.
- [41] ONG, Eng Shi, Jane Si Han CHEONG, David GOH, José Rodrigo VERGARA-SALINAS, José CUEVAS-VALENZUELA a José R. PÉREZ-CORREA. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1112(1-2): 63-101. DOI: 10.1002/9781118733103.ch3.
- [42] OLLANKETO, Maarit, Anna PELTOKETO, Kari HARTONEN, Raimo HILTUNEN a Marja-Liisa RIEKKOLA. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *European Food Research and Technology*. 2002, 215(2): 158-163. DOI: 10.1007/s00217-002-0545-7.
- [43] CONDE, Enma, Jarl HEMMING, Annika SMEDS, Beatriz Díaz REINOSO, Andrés MOURE, Stefan WILLFÖR, Herminia DOMÍNGUEZ a Juan C. PARAJÓ. Extraction of low-molar-mass phenolics and lipophilic compounds from *Pinus pinaster* wood with compressed CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2013, 81: 193-199. DOI: 10.1016/j.supflu.2013.04.018.

- [44] YANG, Chun, Yan-Rong XU, Wei-Xi YAO, Mari MANNILA, Qingyong LANG, Chien M. WAI, Yanyan CUI a Catharina Y. W. ANG. Extraction of Pharmaceutical Components from *Ginkgo biloba* Leaves Using Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50(4): 130-144. DOI: 10.1021/bk-2003-0860.ch009.
- [45] BROGLE, H. CO₂ as a solvent – its properties and applications. *Chemistry & Industry*. 1982, (12): 385-390. ISSN 2047-6329.
- [46] In: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [online]. 2014 [cit. 2015-06-08]. Dostupné z: http://tresen.vscht.cz/kot/wp-content/uploads/2010/01/SFE_2014-podklady-3x2.pdf.
- [47] JEREZ, María, Ariadna SELGA, Jorge SINEIRO, Josep Lluís TORRES a María José NÚÑEZ. A comparison between bark extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus radiata*: Antioxidant activity and procyanidin composition. *Food Chemistry*. 2007, 100(2): 439-444. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.064.
- [48] VOON, Han Ching, Rajeev BHAT a Gulam RUSUL. Flower Extracts and Their Essential Oils as Potential Antimicrobial Agents for Food Uses and Pharmaceutical Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2011, 11(1): 34-55. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x.
- [49] NAJJAA, Hanen, Emna AMMAR a Mohamed NEFFATI. Antimicrobial activities of proteic extracts of *Allium roseum* L., a wild edible species in North Africa. *Journal: Food, Agriculture and Environment*. 2009, 7(3, 4), 150-154. ISSN 1459-0263.
- [50] LÓPEZ-GARCÍA, Jorge, Zdenka KUČEKOVÁ, Petr HUMPOLÍČEK, Jiří MLČEK a Petr SÁHA. Polyphenolic Extracts of Edible Flowers Incorporated onto Atelocollagen Matrices and Their Effect on Cell Viability. *Molecules*. 2013, 18(11): 13435-13445. DOI: 10.3390/molecules181113435.
- [51] SHAFAGHAT, Ali, Kambiz LARIJANI a Farshid SALIMI. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Chrysanthemum parthenium* Flower from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2009, 12(6): 708-713. DOI: 10.1080/0972060x.2009.10643779.
- [52] CHINA, Ratna, Sayani MUKHERJEE, Sauradip SEN, Sreedipa BOSE, Sanjukta DATTA, Hemanta KOLEY, Santinath GHOSH a Pubali DHAR. Antimicrobial

- activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiological Research*. 2012, 167(8): 500-506. DOI: 10.1016/j.micres.2012.04.003.
- [53] ALMAJANO, M. Pilar, Rosa CARBÓ, J. Angel López JIMÉNEZ a Michael H. GORDON. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*. 2008, 108(1): 55-63. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.040.
- [54] BOONYAPRAPATSARA, N. *Thai traditional herbal medicine plant*. Thailand: Prachachon Publishers. 2000, vol. 1 a 4.
- [55] KSOURI, Riadh, Hanen FALLEH, Wided MEGDICHE, Najla TRABELSI, Baya MHAMDI, Kamel CHAIEB, Amina BAKROUF, Christian MAGNÉ a Chedly ABDELLY. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, 47(8): 2083-2091. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.040.
- [56] BAYDAR, Nilgün Göktürk, Gülcan ÖZKAN a Osman SAĞDIÇ. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*. 2004, 15(5): 335-339. DOI: 10.1016/s0956-7135(03)00083-5.
- [57] VAQUERO, M. J. Rodríguez, M. R. ALBERTO a M. C. Manca de NADRA. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 2007, 18(2): 93-101. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.08.010.
- [58] SCALBERT, Augustin. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991, 30(12): 3875-3883. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83426-1.
- [59] WANG, Jihua, Jingfeng LOU, Chao LUO, Ligang ZHOU, Mingan WANG a Lan WANG. Phenolic Compounds from *Halimodendron halodendron* (Pall.) Voss and Their Antimicrobial and Antioxidant Activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, 13(12): 11349-11364. DOI: 10.3390/ijms130911349.
- [60] ABD-ELMAGEED, MA a BA HUSSEIN. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Salvia officinalis* L. flowers. *Sudan Journal of Medical Sciences*. 2008, 3(2). DOI: 10.4314/sjms.v3i2.38526.
- [61] SARIKURKCU, Cengiz, Gokhan ZENGİN, Mustafa OSKAY, Sengul UYSAL, Ramazan CEYLAN a Abdurrahman AKTUMSEK. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies

- (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils: Facts and fiction. *Industrial Crops and Products*. 2015, 70(3), 178-184. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.03.030. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 09266690.
- [62] BÉJAOUÏ, Afef, Hédia CHAABANE, Maroua JEMLI, Abdennacer BOULILA a Mohamed BOUSSAÏD. Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at Different Phenological Stages. *Journal of Medicinal Food*. 2013, 16(12), 1115-1120. DOI: 10.1089/jmf.2013.0079. ISSN 1096-620x.
- [63] RAHUL, Jitin, Manish Kumar JAIN, Shishu Pal SINGH, Rakesh Kant KAMAL, Ramazan ANURADHA, Aliya NAZ, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. *Adansonia digitata* L. (baobab): a review of traditional information and taxonomic description. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015, 5(1), 79-84. DOI: 10.1016/S2221-1691(15)30174-X. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 22211691.
- [64] DE CALUWÉ, Emmy, Kateřina HALAMOVÁ, Patrick VAN DAMME, Rakesh Kant KAMAL, Ramazan ANURADHA, Aliya NAZ, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Baobab (*Adansonia digitata* L.): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015, 5(1), 51. DOI: 10.1021/bk-2009-1021.ch004. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 22211691.
- [65] CHADARE, F. J., A. R. LINNEMANN, J. D. HOUNHOÏGAN, M. J. R. NOUT, M. A. J. S. VAN BOEKEL, Aliya NAZ, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Baobab Food Products: A Review on their Composition and Nutritional Value. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, 49(3), 254-274. DOI: 10.1080/10408390701856330. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 1040-8398.
- [66] GÓMEZ-ESTACA, J., A. LÓPEZ DE LACEY, M. E. LÓPEZ-CABALLERO, M. C. GÓMEZ-GUILLÉN, P. MONTERO, Aliya NAZ, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation: A Review on their Composition and Nutritional Value. *Food Microbiology*. 2010, 27(7), 889-896. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.012. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 07400020.

- [67] SADAKA, Faten, Christelle NGUIMJEU, Claire-Hélène BRACHAIS, Isabelle VROMAN, Lan TIGHZERT, Jean-Pierre COUVERCELLE, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. WITHDRAWN: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Innovative Food Science*. 2013, 20(7), 350-. DOI: 10.1016/j.ifset.2013.01.004. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 14668564.
- [68] GÓMEZ-ESTACA, J., L. BRAVO, M.C. GÓMEZ-GUILLÉN, A. ALEMÁN, P. MONTERO, Jean-Pierre COUVERCELLE, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Food Chemistry*. 2009, 112(1), 18-25. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.05.034. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 03088146.
- [69] PEREIRA DE ABREU, D. A., J. M. CRUZ, P. PASEIRO LOSADA, A. ALEMÁN, P. MONTERO, Jean-Pierre COUVERCELLE, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Active and Intelligent Packaging for the Food Industry: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Food Reviews International*. 2012, 28(2), 146-187. DOI: 10.1080/87559129.2011.595022. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 8755-9129.
- [70] MARTUCCI, J. F., L. B. GENDE, L. M. NEIRA, R. A. RUSECKAITE, P. MONTERO, Jean-Pierre COUVERCELLE, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Industrial Crops and Products*. 2015, 71(2), 205-213. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.03.079. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 09266690.
- [71] BAGAMBOULA, C. F, M UYTTENDAELE, J DEBEVERE, R. A. RUSECKAITE, P. MONTERO, Jean-Pierre COUVERCELLE, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Food Microbiology*. 2004, 21(1), 33-42. DOI:

- 10.1016/S0740-0020(03)00046-7. ISBN 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. ISSN 07400020.
- [72] CANILLAC, N., A. MOUREY, J DEBEVERE, R. A. RUSECKAITE, P. MONTERO, Jean-Pierre COUVERCELLE, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Food Microbiology*. 2004, 21(1), 33-42. DOI: 10.1006/fmic.2000.0397. ISBN 10.1006/fmic.2000.0397. ISSN 07400020.
- [73] QUARENGHI, M, A. MOUREY, J DEBEVERE, R. A. RUSECKAITE, P. MONTERO, Jean-Pierre COUVERCELLE, Anup Kumar GUPTA a Sujeet Kumar MRITYUNJAY. Antimicrobial activity of flowers from *Anthemis cotula*: Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Fitoterapia*. 2004, 71(6), 710-712. DOI: 10.1016/S0367-326X(00)00229-X. ISBN 10.1006/fmic.2000.0397. ISSN 0367326x.
- [74] MANN, Abdullahi, F Buhari SALAWU a I ABDULRAUF. Antimicrobial Activity of *Bombax Buonopozense* P. Beauv. (Bombacaceae) Edible Floral Extracts. *European Journal of Scientific Research*. 2011, 48(4), 627-630. ISSN 1450-216X.
- [75] DURAI PANDIYAN, V. a S. IGNACIMUTHU. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L: An ethnomedicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007, 112(3), 590-594. DOI: 10.1016/j.jep.2007.04.008. ISSN 03788741.
- [76] SANGETHA, Sanduran Nehru, Zuraini ZAKARIA, Sreenivasan SASIDHARAN a Sutarjo SURYANI. Antimicrobial Activities of *Cassia surattensis* and *Cassia fistula*. *J Molecular Biol Biotechnol*. 2008, 1, 1-4.
- [77] SATI, S.C., K. KHULBE a S. JOSHI. Antibacterial Evaluation of the Himalayan Medicinal Plant *Valeriana wallichii* DC. (*Valerianaceae*). *Research Journal of Microbiology*. 2011-3-1, 6(3), 289-296. DOI: 10.3923/jm.2011.289.296. ISSN 18164935.
- [78] SHAN, Bin, Yi-Zhong CAI, John D. BROOKS a Harold CORKE. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, 117(1), 112-119. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.03.003. ISSN 01681605.

- [79] USHIMARU, Priscila Ikeda, Mariama Tomaz Nogueira da SILVA, Luiz Claudio DI STASI, Luciano BARBOSA a Ary FERNANDES JUNIOR. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007, 38(4), 717-719. DOI: 10.1590/S1517-83822007000400024. ISSN 1517-8382.
- [80] SAGDIC, Osman, Lutfiye EKICI, Ismet OZTURK, Turgay TEKINAY, Busra POLAT, Bilge TASTEMUR, Okan BAYRAM a Berna SENTURK. Cytotoxic and bioactive properties of different color tulip flowers and degradation kinetic of tulip flower anthocyanins. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, 58(4), 432-439. DOI: 10.1016/j.fct.2013.05.021. ISSN 02786915.
- [81] ZIA-UL-HAQ, Muhammad, Milan STANKOVIĆ, Komal RIZWAN, Vincenzo FEO, Busra POLAT, Bilge TASTEMUR, Okan BAYRAM a Berna SENTURK. *Grewia asiatica* L., a Food Plant with Multiple Uses. *Molecules*. 2013, 18(3), 2663-2682. DOI: 10.3390/molecules18032663. ISSN 1420-3049.
- [82] HEARST, Caroline, Graham MCCOLLUM, David NELSON, et al. Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010, 4(17), 1805-1809. DOI: 10.5897/JMPR10.147. ISSN 1996-0875.
- [83] GNIEWOSZ, Małgorzata, Alicja SYNOWIEC, Karolina KRAŚNIEWSKA, Jarosław L. PRZYBYŁ, Katarzyna BĄCZEK a Zenon WĘGLARZ. The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae* flos) on postharvest quality of apples. *Food Control*. 2014, 37, 351-361. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.09.049. ISSN 09567135.
- [84] ADIGÜZEL, Ahmed, Meryem SENGÜL, Hatice OGÜTCÜ, Fikrettin SAHIN, Isa KARAMAN a Medine GÜLLÜCE. Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (*Labiatae*) extract. *Turkish Journal of Biology*. 2005, 29, 155-160.
- [85] GNIEWOSZ, Małgorzata, Karolina KRAŚNIEWSKA a Alicja SYNOWIEC. The effect of agitation on pullulan production by a white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 in batch culture. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. 2013, 16(2), 3-3. ISSN 1505-0297.
- [86] SYNOWIEC, Alicja, Małgorzata GNIEWOSZ, Karolina KRAŚNIEWSKA, Jarosław Leon PRZYBYŁ, Katarzyna BĄCZEK a Zenon WĘGLARZ. Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film containing sweet basil extract and

- an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions. *Innovative Food Science*. 2014, 23(2), 171-181. DOI: 10.1016/j.ifset.2014.03.006. ISSN 14668564.
- [87] DUNG, Nguyen Thi, Jung Min KIM, Sun Chul KANG, Jarosław Leon PRZYBYŁ, Katarzyna BĄCZEK a Zenon WĘGLARZ. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46(12), 3632-3639. DOI: 10.1016/j.fct.2008.09.013. ISSN 02786915.
- [88] SZABÓ, Ildikó, Annamaria PALLAG a Cristian-Felix BLIDAR. The antimicrobial activity of the *Cnicus benedictus* L. extracts. *Analele Universitatii din Oradea. Fascicula Biologie Tom*. 2009, 16(1), 126-128. ISSN 1224-5119.
- [89] CHOUHAN, Hemendra S. a Sushil K. SINGH. Antibacterial activity of seed and flower parts of *Crotalaria juncea* Linn. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 2010, 5(3), 212-215. ISSN 1818-6785.
- [90] STONSAOVAPAK, Siriporn, Pornthip CHAREONTHAMAWAT a Malai BOONYARATANAKORNKIT. Inhibitory effects of selected Thai spices and medicinal plants on *Escherichia coli* O157: H7 and *Yersinia enterocolitica*. *Kasetsart Journal: Natural Sciences*. 2000, 34(4), 510-517. ISSN 0075-5192.
- [91] HAMDAN, Mahmoud, Khalid AL-ISMAIL a Khalaf AL-DELAIFY. The Antibacterial Activity of Selected Edible Plant Extracts against *Bacillus Cereus*. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*. 2007, 3(2), 148-155.
- [92] GHASEMI PIRBALOUTI, Abdollah, Fatemeh MALEKPOOR, Shokofeh ENTESHARI, Mehdi YOUSEFI, Hasan MOMTAZ a Behzad HAMED. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by Bakhtiari tribal in Southwest Iran. *International Journal of Biology*. 2010, 2(2), -. DOI: 10.5539/ijb.v2n2p55. ISSN 1916-968x.
- [93] MARTINS, Silvia, Elba L.C. AMORIM, Tadeu J.S. Peixoto SOBRINHO, Antonio M. SARAIVA, Maria N.C. PISCIOTTANO, Cristóbal N. AGUILAR, José A. TEIXEIRA a Solange I. MUSSATTO. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and*

- Products*. 2013, 41(2), 306-311. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.04.037. ISSN 09266690.
- [94] VAARA, Martti. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*. 1992, 56(3), 395-411.
- [95] KHAN, Muhammad Kamran, Maryline ABERT-VIAN, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER, Olivier DANGLES a Farid CHEMAT. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. 2010, 119(2), 851-858. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.08.046. ISSN 03088146.
- [96] MASON, T. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 1996, 3(3), S253-S260. DOI: 10.1016/S1350-4177(96)00034-X. ISSN 13504177.
- [97] WU, J, Maryline ABERT-VIAN, Anne-Sylvie FABIANO-TIXIER, Olivier DANGLES a Farid CHEMAT. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2010, 8(4), 347-352. DOI: 10.1016/S1350-4177(01)00066-9. ISSN 13504177.
- [98] ATCHLEY, A. A., L. A. FRIZZELL, R. E. APFEL, C. K. HOLLAND, S. MADANSHETTY a R. A. ROY. Thresholds for cavitation produced in water by pulsed ultrasound. *Ultrasonics*. 1988, 26(5), 280-285. DOI: 10.1016/0041-624X(88)90018-2. ISSN 0041624x.
- [99] KADKHODAEI, R., A. HEMMATI-KAKHKI, R. E. APFEL, C. K. HOLLAND, S. MADANSHETTY a R. A. ROY. ULTRASONIC EXTRACTION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM SAFFRON. *Ultrasonics*. 1988, 26(5), 280-285. DOI: 10.17660/ActaHortic.2007.739.55. ISBN 10.17660/ActaHortic.2007.739.55. ISSN 0041624x.
- [100] FLYNN, H. G. Transient pulsations of small gas bubbles in water. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1988, 84(3), 985-. DOI: 10.1121/1.396614. ISSN 00014966.
- [101] VINATORU, Mircea. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2001, 8(3), 303-313. DOI: 10.1016/S1350-4177(01)00071-2. ISSN 13504177.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CO ₂	oxid uhličitý
MAE	extrakce mikrovlnami
PFE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
SWE	extrakce subkritickou vodou
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce pevnou fází
SPME	mikroextrakce pevnou fází
CCM	Česká sbírka mikroorganismů

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Stavba květu [7].</i>	14
<i>Obr. 2. Velká hroznovitá květenství [9].</i>	15
<i>Obr. 3. Základní princip pro extrakci pevná látka-kapalina [21].</i>	23
<i>Obr. 4. Frenchův lis [27].</i>	25
<i>Obr. 5. Soxhletův extraktor [29].</i>	26
<i>Obr. 6. Příprava extraktů.</i>	39
<i>Obr. 7. Aparatura se zařízením Microson XL 2000.</i>	40
<i>Obr. 8. Postupné působení ultrazvuku.</i>	40
<i>Obr. 9. Antimikrobiální aktivita extraktů připravených působením diskontinuálního ultrazvuku proti grampozitivní bakterii Kocuria rhizophila pomocí diskové difúzní metody. 1 – etanolová kontrola, 2 – metanolový extrakt ze Salvia glutinosa, 3 – metanolový extrakt ze Salvia nemorosa, 4 – metanolový extrakt ze Salvia nemorosa „Violetkonigin“ 5 – metanolový extrakt ze Salvia officinalis (inhibiční zóna), 6 – etanolový extrakt ze Salvia glutinosa, 7 – etanolový extrakt ze Salvia nemorosa, 8 – etanolový extrakt ze Salvia officinalis (inhibiční zóna), 9 – metanolová kontrola.</i>	51
<i>Obr. 10. Antimikrobiální aktivita extraktů připravených působením diskontinuálního ultrazvuku proti grampozitivní bakterii Staphylococcus sciuri pomocí diskové difúzní metody. 1 – etanolová kontrola, 2 – etanolový extrakt ze Salvia officinalis (inhibiční zóna), 3 – etanolový extrakt ze Salvia nemorosa, 4 – etanolový extrakt ze Salvia glutinosa, 5 – metanolový extrakt ze Salvia officinalis (inhibiční zóna), 6 – metanolový extrakt ze Salvia nemorosa „Violetkonigin“, 7 – metanolový extrakt ze Salvia nemorosa (inhibiční zóna), 8 – metanolový extrakt ze Salvia glutinosa, 9 – metanolová kontrola.</i>	52

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Seznam vzorků.</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 2. Seznam kmenů bakterií.....</i>	<i>42</i>

SEZNAM PŘÍLOH

- P I metanolové extrakty 1
- P II metanolové extrakty 2
- P III etanolové extrakty
- P IV metanolové extrakty ošetřené kontinuálním ultrazvukem
- P V metanolové extrakty ošetřené diskontinuálním ultrazvukem
- P VI etanolové extrakty ošetřené diskontinuálním ultrazvukem

