



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ARONIE – ZDROJ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

ARONIA – THE SOURCE OF BIOACTIVE COMPOUNDS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Klára Štumarová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1120/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Klára Štumarová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **RNDr. Mária Veselá, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Aronie – zdroj biologicky aktivních látek

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární rešerši na téma biologicky aktivní látky obsažené v aronii.
2. Připravte extrakty z aronie a ověřte jejich účinky na vybrané druhy mikroorganismů.
3. Vyhodnoťte a zpracujte experimentální data.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

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

Klára Štumarová
student(ka)

RNDr. Mária Veselá, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je zkoumání možné antimikrobiální aktivity vodných a ethanolových extraktů z plodů arónie a čajové směsi obsahující arónii. Rovněž byla stanovena antioxidační aktivita a také koncentrace biologicky aktivních látek – polyfenolů, flavonoidů a anthokyanů.

Teoretická část obsahuje souhrn základních informací o rostlině *Aronia melanocarpa*, chemické složení, použití a zdravotní účinky látek obsažených v jejích plodech. V experimentální části je věnována pozornost účinnosti extraktů na mikroorganismy *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*. Dále byla spektrofotometricky stanovena antioxidační aktivita, polyfenolické látky, flavonoidy a anthokyaniny.

Z výsledků experimentu vyplývá, že extrakty mají téměř až zcela zanedbatelnou antimikrobiální schopnost s výjimkou extraktu čajové směsi v horké vodě, který měl inhibiční účinek na mikroorganismus *M. luteus*. Tento extrakt se naopak v případě mikroorganismu *B. subtilis* jevil jako růst podporující. Bylo zjištěno, že arónie i čajová směs jsou bohaté na polyfenoly a flavonoidy.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is to research the possible antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts of aronia berries and tea mixture containing aronia. Also, the antioxidant activity and the concentration of the biologically active substances – polyphenols, flavonoids and anthocyanins was determined.

Theoretical part contains a summary of basic information about *Aronia melanocarpa*, chemical composition, use and health effects of substances contained in its fruits. The experimental part focuses on the antimicrobial activity of the extracts on microorganisms *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* and *Micrococcus luteus*. Farther there is spectrophotometrical determination of antioxidant activity, polyphenolic compounds, flavonoids and anthocyanins. From the experiment results flow that the extracts have almost none antimicrobial ability except tea mixture extracted with hot water. This extract has inhibitory effect on *M. luteus* and growth supportive effect on *B. subtilis*. It has been found that aronia fruits and tea mixture are rich in polyphenols and flavonoids.

KLÍČOVÁ SLOVA

Arónie, *Aronia melanocarpa*, biologicky aktivní látky, antioxidační aktivita, antimikrobiální účinky, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*

KEY WORDS

Aronia, *Aronia melanocarpa*, bioactive compounds, antioxidant activity, antimicrobial effects, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*

ŠTUMAROVÁ, K. *Aronie – zdroj biologicky aktivních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 2017. 37 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ:

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Márii Veselé, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a čas věnovaný konzultaci, který mi poskytl během zpracovávání práce.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Arónie	8
2.1.1	Taxonomické zařazení	8
2.1.2	Historie	8
2.1.3	Použití.....	8
2.2	Látky obsažené v arónii	9
2.2.1	Polyfenolické látky	9
2.2.2	Ostatní přítomné látky	12
2.3	Antioxidační aktivita a metabolismus polyfenolů	12
2.3.1	Antioxidační aktivita	12
2.3.2	Metabolismus polyfenolických sloučenin	13
2.4	Vlivy na lidský organismus	13
2.4.1	Antimutagenní a antikarcinogenní účinky.....	13
2.4.2	Ochrana před kardiovaskulárními onemocněními.....	13
2.4.3	Další farmakologické účinky.....	14
2.5	Výrobky z arónie	14
2.5.1	Marmelády, džemy	14
2.5.2	Kompoty	15
2.5.3	Šťávy, sirupy, nektary	15
2.5.4	Víno	15
2.5.5	Čaje.....	15
2.5.6	Další výrobky	15
2.6	Mikrobiologické metody stanovení růstových faktorů a inhibitorů	15
2.6.1	Difúzní metody stanovení antimikrobiální aktivity	15
2.7	Antioxidační systémy	16
2.7.1	Stanovení celkové antioxidační aktivity.....	16
2.7.2	Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek.....	16
2.7.3	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	17
2.7.4	Stanovení celkového obsahu anthokyanů.....	17
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1	Použité vybavení a pomůcky	18

3.1.1	Přístroje	18
3.1.2	Chemikálie.....	18
3.1.3	Software.....	18
3.2	Analyzované vzorky	18
3.2.1	Použité vzorky	18
3.2.2	Příprava vzorků	19
3.3	Stanovení antimikrobiální aktivity difúzně jamkovou metodou	20
3.3.1	Použité mikroorganismy.....	20
3.3.2	Příprava živného média	20
3.3.3	Příprava agarových ploten a pipetování extraktů	20
3.4	Stanovení antioxidační aktivity	21
3.4.1	Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS ⁺	21
3.5	Stanovení celkové koncentrace vybraných skupin antioxidantů	21
3.5.1	Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek spektrofotometricky	21
3.5.2	Stanovení celkového obsahu flavonoidů spektrofotometricky	22
3.5.3	Stanovení celkového obsahu anthokyanů.....	23
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1	Antimikrobiální účinky extraktů.....	24
4.2	Stanovení celkové antioxidační aktivity	27
4.3	Stanovení celkového obsahu polyfenolů	28
4.4	Stanovení celkového obsahu flavonoidů	29
4.5	Stanovení celkového obsahu anthokyanů	31
5	ZÁVĚR.....	32
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	33
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	36
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	37

1 ÚVOD

V dnešní době je čím dál více oblíbené vracet se k tradičnímu přírodnímu průmyslu. Na trhu proto najdeme spoustu bylinných produktů, ať už určených k potravinářským, či kosmetickým účelům. K dostání jsou i vonné extrakty nebo dokonce přírodní čistící prostředky. Nejžádanějšími jsou ovšem přírodní rostlinné přípravky mající pozitivní vlivy na náš organismus, takzvané antioxidanty. Do této skupiny patří také přípravky z fialovo–černých plodů keřovité rostliny s latinským názvem *Aronia melanocarpa*.

V následujících odstavcích je charakterizována *Aronia melanocarpa* jak po botanické stránce, tak po stránce chemického složení plodů a obsahu látek, které by mohly podporovat zdraví člověka, pozitivní účinky jsou dále i konkretizovány.

Experimentální část se věnuje stanovení obsahu antioxidantních látek – polyfenolických sloučenin, flavonoidů a anthokyanů, je stanovena i celková antioxidační aktivita. Poslední experiment je zaměřen na mikrobiologické stanovení účinnosti extraktů, z plodů arónie a čajové směsi obsahující arónii. Pro stanovení byly vybrány mikroorganismy běžně se pohybující v okolním prostředí nebo v našich tělech – *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Arónie

Aronia melanocarpa, známá v České republice jako temnoplodec, nebo také černý jeřáb, je keřovitá rostlina 90–180 cm vysoká, ojediněle dorůstající až velikosti menších stromů. Jemně zoubkované listy jsou opadavé, avšak zůstávají zelené, na rozdíl od *Aronia arbutifolia*, jejíž listy se na podzim barví do oranžova až sytě červená. Květy, jež vykvétají v květnu, jsou malé růžovo–bílé s pěti okvětními a pěti kališními lístky, které jsou složeny v chocholičnatém květenství. Plody arónie narůstají v pozdním létě. Jsou to malé fialovo–černě zbarvené malvice o velikosti kolem 6 mm. Malvice narůstají na klastrech po osmi až čtrnácti na červené stopce. Anglický název *chokeberry* vznikl podle trpké a hořké chuti plodů, díky níž plody téměř nelze konzumovat syrové. [1] [2] [18]

2.1.1 Taxonomické zařazení

Říše: rostliny (*Plantae*)
Podříše: vyšší rostliny (*Cormobionta*)
Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)
Třída: vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)
Řád: růžotvaré (*Rosales*)
Čeleď: růžovité (*Rosaceae*)
Rod: temnoplodec (*Aronia*)
Druh: temnoplodec černý (*Aronia melanocarpa*)

2.1.2 Historie

Plody arónie byly původně užívány domorodým kmenem Potawatomi v Severní Americe na výrobu čajů a extraktů, které sloužily k léčbě nachlazení, a k přípravě nutričních pokrmů s názvem *pemmican*. Do Evropy se arónie dostala až v 18. století. Ve 20. století se stala oblíbenou plodinou v Sovětském svazu a státech východní Evropy, kde se její pěstování v sibiřských oblastech rozrostlo až na plochu 17 800 ha. Zde byla využívána k výrobě ovocných sirupů, šťáv, džemů a vín. Rozsáhlé použití měla i jako přírodní barvivo. V roce 1986 byla arónie ve Švédsku pěstovaná komerčně, za účelem zisku barevných pigmentů. V 80. letech se ze Sovětského svazu rozšířila až do Japonska. Dnes je velmi oblíbená ve Střední Evropě a na Ukrajině jako doplněk stravy pro zdravý životní styl. [1]

2.1.3 Použití

Nejvíce kultivarů arónie bylo zprvu vypěstováno pro zahradní výsadby, avšak dnes jsou již známé kultivary speciálně vyšlechtěné pro zisk větších plodů. Tyto kultivary nesou název „Viking“, „Nero“ a „Aron“. Pěstování arónie je relativně nenáročné a bezproblémové, jelikož se jedná o keř odolný vůči vážným chorobám, a právě kvůli hořké a trpké chuti malvic její plody nekonzumují ptáci. [1] [18]

Díky vysokému obsahu anthokyanů je arónie používána k výrobě zdraví podporujících šťáv, čajů a dalších přípravků s antioxidačními účinky. Ve farmaceutickém průmyslu jsou používány sirupy z arónie jako doplněk stravy. Vysoký obsah pektinů umožňuje použití plodů při výrobě džemů a marmelád ovocí s nízkým obsahem pektinu. V potravinářském průmyslu je dále využívána jako bezpečné přírodní barvivo. [1]

Jelikož je koncentrace anthokyanů náchylná na vyšší teplotu, používá se rychlá konzervační metoda, kdy jsou plody arónie usušeny. Jako stabilizátor se k arónii přidává *Scutellaria baicalensis*. Tento proces, známý jako kopigmentace, výrazně zlepšuje stabilitu barviv ve výrobcích a udržuje obsah anthokyanů. [1]

2.2 Látky obsažené v arónii

Arónie obsahuje důležité látky využitelné ve farmakologickém průmyslu. Mezi látky mající antioxidační účinky se řadí především polyfenolické látky, anthokyany a prokyanidiny. Tyto sloučeniny se nazývají jako biologicky aktivní látky a mají prokázané antioxidační účinky. Za nejvýznamnější polyfenolické látky jsou považovány flavonoidy. [1]

2.2.1 Polyfenolické látky

Bobulovité plody představují jeden z nejvýznamnějších zdrojů polyfenolů jako zdraví prospěšných látek. Vyskytují se ve všech rostlinách a jejich orgánech jakožto sekundární metabolity. Polyfenolické sloučeniny jsou látky, které mají jeden nebo více benzenových kruhů substituovaných jednou nebo více hydroxylovými skupinami a jejich funkčními deriváty. Patří do heterogenní skupiny sloučenin, z nichž některé se uplatňují jako vonné látky (např. některé kumariny), senzorické látky (např. flavonoly) a přírodní barviva (např. anthokyany). Některé fenoly se rovněž vyznačují výraznými biologickými účinky, proto se řadí mezi přírodní antioxidanty, přirozené toxické složky potravin nebo také obranné látky rostlin. Mají známé fungicidní, baktericidní a virucidní účinky. [4]

Obecně jsou polyfenoly považovány za látky působící proti volným radikálům, mají preventivní účinky proti kardiovaskulárním a rakovinovým onemocněním a proti zánětům. Pomáhají tlumit proces přirozeného stárnutí, Parkinsonovu a Alzheimerovu chorobu a působí proti ucpávání cév. [2]

Existuje několik způsobů klasifikace polyfenolických sloučenin, avšak nejpřehlednějším je rozdělení dle struktury molekuly. [3]

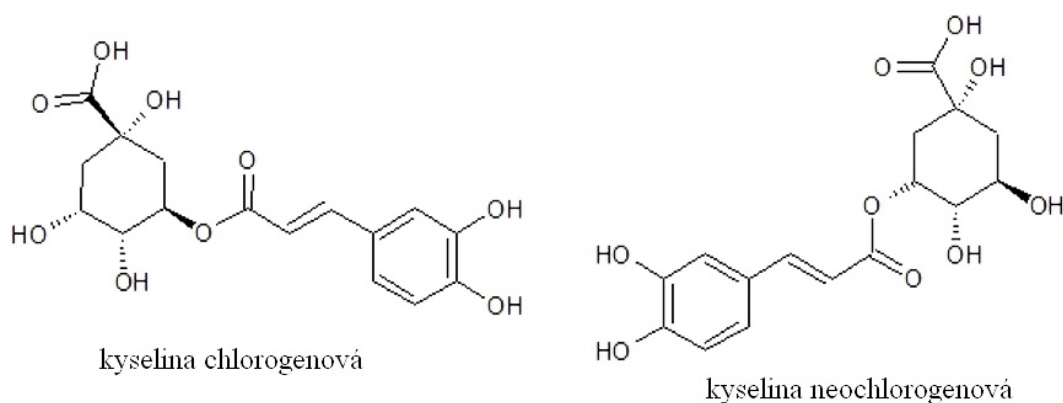
Tabulka 1: Rozdělení polyfenolických látek dle struktury [3]

Počet uhlíků	Základní skelet	Skupina fenolů
6	C ₆	jednoduché fenoly, benzochinony
7	C ₆ –C ₁	fenolické (benzoové) kyseliny
8	C ₆ –C ₂	acetofenony, fenyloctové kyseliny
9	C ₆ –C ₃	fenolové (skořicové) kyseliny, kumariny
10	C ₆ –C ₄	naftochinony
13	C ₆ –C ₁ –C ₆	xanthony
14	C ₆ –C ₂ –C ₆	antrachinony, stilbeny
15	C ₆ –C ₃ –C ₆	flavonoidy, isoflavonoidy
18	(C ₆ –C ₃) ₂	lignany, neolignany
30	(C ₆ –C ₃ –C ₆) ₂	biflavonoidy
n	(C ₆ –C ₃) _n	lignin
	(C ₆ –C ₃ –C ₆) _n	flavolany

Celkový obsah polyfenolů v plodech arónie závisí na podmínkách růstu a času sklizně, nejčastěji se pohybuje v rozmezí 2000–8000 mg ve 100 g sušiny. [1]

2.2.1.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny se v rostlinách nejčastěji vyskytují jako estery, v nichž se váží karboxylem na hydroxylové skupiny organických kyselin nebo sacharidů. Tyto kyseliny, mezi které patří kyselina skořicová a kyselina benzoová a jejich deriváty, vykazují účinky primárních antioxidantů. Antioxidační aktivita závisí na počtu funkčních hydroxylových skupin. V arónii se nachází kyselina chlorogenová (301,85 mg ve 100 g sušiny) a kyselina neochlorogenová (290,81 mg ve 100 g sušiny), které jsou deriváty kyseliny kávové a chininové. [1] [2]

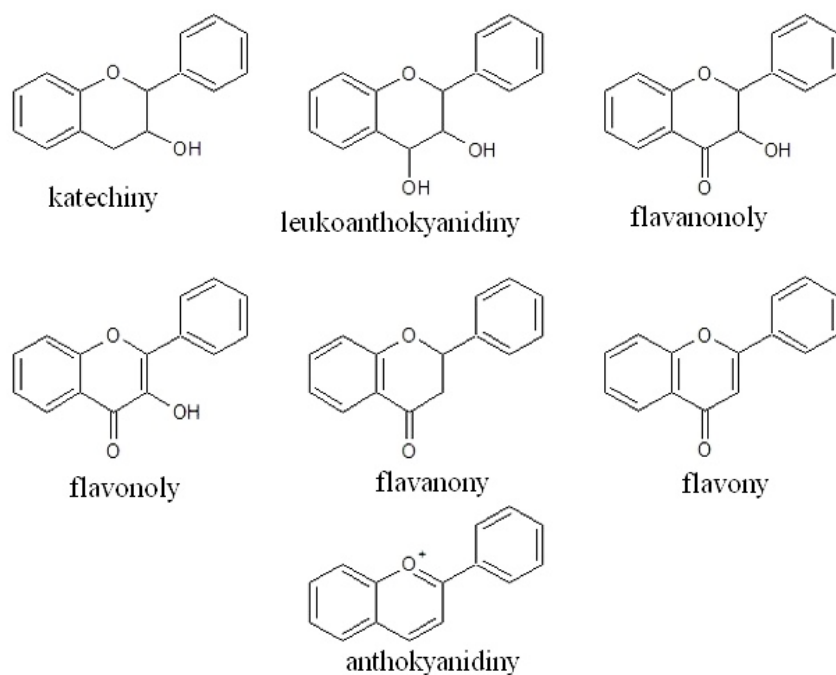


Obrázek 1: Chemická struktura fenolických kyselin v *A. melanocarpa* [1]

2.2.1.2 Flavonoidy

Tyto látky, jinak nazývané bioflavonoidy, jsou nejobsáhlejší skupinou polyfenolických látek v arónii. V dnešní době jsou často diskutovaným tématem právě kvůli svým pozitivním účinkům na lidský organismus. Do této skupiny se řadí asi 60 látek, rostlinných polyfenolů. Podle stupně oxidace na uhlíku C₃ se rozeznávají základní struktury uvedené na obr. 2. [1] [8]

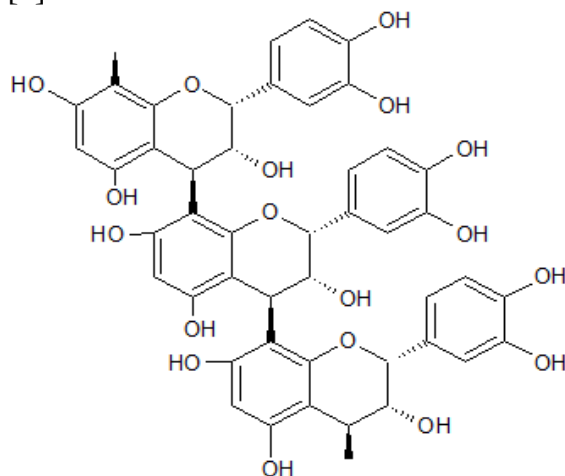
- katechiny (flavan–3–oly)
- leukoanthokyanidiny (flavan–3,4–dioly)
- flavanony
- flavanonoly
- flavony
- flavonoly
- anthokyanidiny



Obrázek 2: Základní struktury flavonoidů [1]

Nejvýznamnějšími flavonoidy jsou flavonoly, v arónii se vyskytují převážně prokyanidiny. Jejich obsah v sušině je v rozmezí 0,66–5,18 % čerstvé hmotnosti. Stupeň polymerizace se pohybuje mezi 2–23. [1][6]

Hlavním flavonolem je polymerní epikatechin. Ten je složen z několika podjednotek flavan-3-olu, který je běžně vázán vazbami 4→6 a 4→8, nejčastěji to je prokyanidin B. Volný epikatechin se v plodech arónie také objevuje, avšak jeho koncentrace se pohybuje kolem 0,015 % v sušině. [1]



Obrázek 3: Chemická struktura polymerního prokyanidinu s vazbou 4→8 [1]

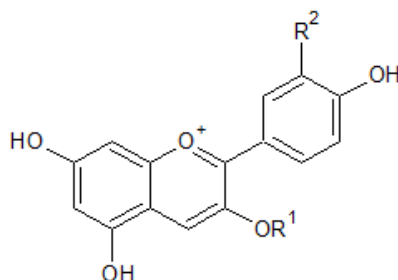
Dalším rovněž významným flavonoidem je rutin, známý jako vitamin P, a kvercetin, někdy psaný jako quercetin. Ten je nejsilněji zastoupen v barevných i zelených částech rostlin a plodů. Jeho výhodou je, že tepelnou úpravou nebo zmrazením nedegraduje. Jelikož pravidelná konzumace ovoce a zeleniny je v dnešní době problémem, můžeme kvercetin najít v řadě přírodních doplňků stravy. Do skupiny nejznámějších flavonoidů patří dále citrin, hesperidin, hesperin a eriodictyol. [8]

2.2.1.3 Anthokyany

Anthokyany patří mezi nejpočetnější a nejvýznamnější skupiny bezpečných přírodních barviv, nacházejících se v běžně konzumovaných potravinách. U oranžových, červených, modrých až tmavě fialových plodů jsou původci jejich charakteristického zabarvení, které je závislé na hodnotě pH. [3] [7] [14]

Obsahově patří do druhé největší skupiny polyfenolických látek přítomných v arónii, jejich koncentrace v sušině je 0,60–2,00 % (tedy zhruba 667 mg ve 100 g čerstvých plodů).

Anthokyany v arónii sestávají z glykosidů aglykonů: 3–galaktosid, 3–glukosid, 3–arabinosid a 3–xylosid, a na čtvrtém uhlíku jsou substituovány hydroxylovou skupinou. Mezi nejvýznamnější anthokyany patří pelargonidin, kyanidin, peonidin, delfinidin, malvidin a petunidin, dosud jich bylo identifikováno více jak 300. Dále se rozdělují podle počtu vázaných molekul cukru. [4]



Obrázek 4: Obecná chemická struktura anthokyanů [1]

2.2.2 Ostatní přítomné látky

Kromě polyfenolických látek obsahuje arónie také pektiny (0,6–0,7 %), cukry (10–18 %) – zejména glukózu (30–60 g/l), fruktózu (25–58 g/l), sacharózu a sorbitol, který se používá jako náhradní sladidlo pro diabetiky. Sušina je bohatá na vlákninu, která se skládá z neškrobových sacharidů a dalších složek rostlin jako je celulóza, hemicelulóza, ligniny, oligosacharidy; arónie obsahuje 5,5 g vlákniny ve 100 g čerstvých plodů. Naopak se v plodech nevyskytuje větší množství tuků (asi 0,14 g ve 100 g váhy zralého plodu). Semena obsahují hlavně glyceridy linolenové kyseliny a fosfolipidy – fosfatidylinositol, fosfatidylcholin a fosfatidylethanol. Ze skupiny sterolů bychom v arónii našli β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol a avanasterol. [1]

Co se týče minerální látek, arónie obsahuje významné množství draslíku, dále sodík, hořčík, vápník, železo, zinek a velké množství popelovin (až 0,44 %). Obsahuje i vitamíny B₁, B₂, B₆, vitamín C, niacin, kyselinu pantothenovou a listovou, vitamín K, α - a β -tokoferol, a karotenoidy, jako například β -karoten a β -kryptoxantin. [4]

2.3 Antioxidační aktivita a metabolismus polyfenolů

Již několik let se o arónii diskutuje jako o rostlině, resp. jejích plodech, které mají pozitivní vlivy na lidský organismus. Byly zjištěny antimutagenní, antikarcinogenní účinky, napomáhá i snižování tuku a tím i omezování vzniku kardiovaskulárních chorob. Nebyly prokázány žádné toxické účinky. [10]

2.3.1 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita je souhrnnou fyzikálně–chemickou vlastností, která je podmíněná oxidačně–redukčními aktivitami přírodních látek, a která se za přesně definovaných podmínek

projevuje redukčním (antioxidačním) účinkem. Ten má potenciálně značný biologický význam, neboť může jednak ve vlastním potravinovém prostředí a také *in vivo* po vstřebání v trávicím ústrojí odstraňovat nebo zmírňovat účinky oxidačních faktorů (zejména volných radikálů), které vznikají při mnoha fyziologických procesech a vnějších podnětech a mohou podporovat rozvoj nejrůznějších patologických procesů. [8]

U arónie byl zjištěn antioxidační potenciál, a to díky vysokému obsahu polyfenolických sloučenin. Ve srovnání s červeným a černým rybízem, angreštem a bezinkou je arónie, co se týče antioxidační aktivity, v popředí. [9]

Ve studii byla srovnána schopnost absorbovat volné radikály. Různé druhy extraktů arónie, například acetonový, methanolvý a další, vykazovaly antioxidační aktivitu *in vitro* na radikálech DPPH[•] a ABTS⁺. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena v sestupném pořadí pro oba radikály: výlisky, celé plody, šťáva, a to v methanolvém extraktu. [10]

2.3.2 Metabolismus polyfenolických sloučenin

Hlavním místem resorpce polyfenolů je tenké a tlusté střevo. Existují však důkazy, že některé polyfenoly se mohou částečně vstřebávat už v dutině ústní. [5]

Některé polyfenoly, převážně flavonoidy, se v tenkém střevě resorbují ve formě glykosidů, které jsou enzymem laktázou přeměněny na další produkty. Laktáza je nespecifická β -glykosidáza zodpovědná především za hydrolýzu mléčného cukru, disacharidu laktózy, avšak je schopna štěpit i flavonoidní mono- a diglukosidy. [5]

Polyfenoly, které nejsou resorbovány v tenkém střevě dále putují do tlustého střeva, kde jsou metabolizovány střevními bakteriemi. Flavonoidy jsou štěpeny na aglykony, které jsou dále rozštěpeny v místě pyranového cyklu na jednoduché fenolické kyseliny a ty dále podléhají dehydroxylačním reakcím, kdy je redukován hydroxyl v poloze *para* na aromatickém jádře. Po resorpci jsou polyfenoly konjugovány s kyselinou glukuronovou, kyselinou sírovou nebo glycinem v játrech, rovněž se mohou methylovat enzymem COMT v ledvinách. Vzniká tedy velké množství metabolitů. [5]

2.4 Vlivy na lidský organismus

2.4.1 Antimutagenní a antikarcinogenní účinky

V dnešní době je již nemožné vyhnout se mutagenům a karcinogenům, jelikož jsou přítomné volně v životním prostředí i v některých potravinách. Účinky těchto látek ovšem můžeme zmírňovat užíváním přírodních potravin s antioxidačními vlastnostmi. Ty mají za úkol zpomalovat spontánní a indukované mutace a enzymy za ně zodpovědné, stejně tak jako vychytávat volné radikály. Přílišná mutace vede ve většině případů ke vzniku karcinomu. Anthokyaniny a prokyanidiny vykazují antibakteriální vlastnosti a schopnost inhibovat adhezi bakterií na stěnách močových cest. Rovněž mají protizánětlivé účinky a chrání před hepatitidou A a B, stejně jako před hepatotoxicitou paracetamolu. Jsou schopné chelátovat kovové ionty např. železnaté a měďnaté. [7]

2.4.2 Ochrana před kardiovaskulárními onemocněními

V dlouholetých studiích bylo již potvrzeno, že arónie také napomáhá předcházet onemocnění srdce a cév. Přítomnost anthokyanů snižuje hladinu lipidů v krvi a krevní srážlivost, zabraňuje poškození cév volnými kyslíkovými radikály. Při pravidelné konzumaci výtažků z arónie

byl prokázán výrazný pokles celkového cholesterolu, LDL–cholesterolu a triglyceridů v krvi. Ten je zapříčiněn pravděpodobně tím, že konjugované polyfenoly se mohou díky své struktuře lokalizovat na povrchu LDL–chol. částic a účinně tak bránit jejich oxidační modifikaci. [4] [7]

2.4.3 Další farmakologické účinky

V následující tabulce, jsou uvedeny další vybrané účinky plodů *Aronia melanocarpa*.

Tabulka 2: Farmakologické účinky přípravků z arónie [1]

Účinek	Typ přípravku	Schéma experimentu	Nejvýznamnější zjištění
Antimutagenní	Suchý extrakt	Amesův test	Účinnost proti benzopyrenu a 2–aminfluorenu
Antikarcinogenní	Komerční extrakt	Pacienti s nádorem tlustého střeva	Inhibice rychlosti nárůstu rakovinotvorných buněk
Snižování obsahu lipidů	Šťáva	Pacienti s lehkou cholesterolémií	Snížení hladiny LDL–chol. a TG, nárůst HDL–chol. hladiny
Kardioprotektivní	Komerční suchý extrakt	Pacienti po infarktu myokardu	Snížení oxidace LDL–chol.
Antihypertenzní	Komerční suchý extrakt	Pacienti s poruchou metabolismu Pacienti po infarktu myokardu	Snížení arteriálního tlaku
Antibakteriální	Komerční suchá extrakt	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Bakteriostatická aktivita <i>in vitro</i>

2.5 Výrobky z arónie

Arónie je pro konzumaci výrobků z plodů i samotné rostliny zpracovávána převážně domácími pěstiteli. V současné době se však díky zjištěným pozitivním vlivům na lidské zdraví začínají produkty dostávat i na běžné trhy a do obchodních řetězců. Nacházíme výrobky jako marmelády, džemy, kompoty, šťávy, sirupy, nektary, čaje a vína, rovněž se s arónií můžeme setkat jakožto s dochucovadlem nebo přídavkem pro lepší pigmentaci finálního výrobku. Uplatnění najde i v kosmetickém průmyslu.

2.5.1 Marmelády, džemy

Pro výrobu těchto ovocných pomazánek je zapotřebí tepelná úprava, přídavek cukru a případně i želírujících látek. Džemy z arónie se nevyskytují příliš často, kvůli specifické trpké chuti. U marmelád bývá obsah složen z arónie a dalšího druhu nevýrazného ovoce (např. jablka) v poměru 1:1. Dále může být arónie přidávána díky vysokému obsahu pektinů jako želírovací složka, nebo pro kvalitnější pigmentaci produktu. [12]

2.5.2 Kompoty

Kompoty bývají připravovány klasickým způsobem s přidavkem cukerného roztoku, popřípadě ještě rumu nebo brandy. Plody arónie bývají také přidávány ke kompotům jiných druhů ovoce. [2]

2.5.3 Šťávy, sirupy, nektary

Tyto produkty mohou být získány teplou i studenou cestou, díky níž nedojde k degradaci zdraví prospěšných a barevných látek. Přidává se cukr a kyselina citrónová jako stabilizátor. [2]

2.5.4 Víno

Výroba vína z arónie probíhá obdobným způsobem jako u vína z hroznových bobulí. Po vylisování šťávy z plodů se přidává cukr a potravinářské kvasinky, mošt se nechá asi půl roku kvasit při 20 °C. Aróniové víno má specifickou chuť, proto se hodí k vybraným jídlům a přípitkům. Obsah alkoholu se pohybuje kolem 14 % obj. [13]

2.5.5 Čaje

K výrobě čajů se častěji nepoužívají plody arónie, ale její listy. Čaj pouze z arónie na trhu najdeme jen velmi ojediněle, ve většině případů se prodává jako směs s brusinkou, šípkem, černým rybízem, višní atd. K výrobě vlastního nápoje lze zakoupit sušené plody arónie, ze kterých je následně možné připravit čaj a další. [12]

2.5.6 Další výrobky

Na trhu je k dostání tinktura z pupenů arónie a další koncentrované šťávy. Ty mohou být následně použity k přípravě vlastních nápojů a pochutin. Rovněž se arónie využívá i v kosmetické průmyslu. [2] [15]

2.6 Mikrobiologické metody stanovení růstových faktorů a inhibitorů

Mikroorganismy vyžadují pro svůj růst mnohé růstové faktory. Pomocí mikroorganismů můžeme zjistit obsah těchto látek v materiálech. Celý proces probíhá tak, že mikroorganismy zaočkujeme do média, které má všechny potřebné živiny, ale neobsahuje růstový faktor, který chceme stanovit, a bez kterého mikroorganismus nemůže růst. Následně jsou přidávány limitní množství látek s růstovým faktorem a je sledován růst mikroorganismů. Po získání standardní křivky můžeme zjistit obsah růstového faktoru v jakémkoliv materiálu. [16]

Obdobného postupu se využívá i při stanovení mikrobiologických inhibitorů, kde se neměří růst, ale naopak jeho inhibice. Dále je takto možné sledovat citlivost mikroorganismů na antimikrobiální látky a spektra jejich účinnosti. Tato metoda nachází uplatnění zejména při stanovení antibiotik. [16]

2.6.1 Difúzní metody stanovení antimikrobiální aktivity

Difúzní metoda využívá tuhé agarové médium, do kterého je předem zaočkovaný mikroorganismus. Testovaná látka následně difunduje médiem a zapříčiňuje tak vznik tzv. inhibičních a stimulačních zón. Velikost těchto zón je závislá na koncentraci testované látky, vlastnostech média, pH média, inkubace a stability testované látky. [16]

Je důležité, aby vrstva kultivačního média byla rovnoměrná, mikroorganismy rovnoměrně naočkované a aby jednotlivé vzorky byly v dostatečném rozestupu, kvůli překrývání zón. [16]

2.6.1.1 Difúzně kapková metoda

Testovací látka se kape přímo na povrch naočkovaného tuhého agarového média. Tato metoda je ovšem nepřesná. [16]

2.6.1.2 Difúzně disková metoda

Disky z filtračního papíru o velikosti několika milimetrů jsou nasyceny testovanou látkou. Disky jsou poté pokládány na povrch naočkovaného agarového média. [16]

2.6.1.3 Difúzně komínková metoda

Do naočkovaného média se vtlačejí skleněné, porcelánové, nebo ocelové komínky, které se nedotýkají dna Petriho misky. Do komínků se následně pipetují roztoky testovaných látek. [16]

2.6.1.4 Difúzně jamková metoda

Do naočkovaného média jsou korkovrtem vyhloubeny otvory, do nichž se poté přímo pipetují roztoky testovaných látek. [16]

2.7 Antioxidační systémy

Aerobní mikroorganismy jsou existenčně závislé na kyslíku, zároveň jsou ale vystaveny negativním účinkům jeho reaktivních forem, např. volným radikálům a dalším sloučeninám, které vznikají jako vedlejší produkt oxidace. Živé organismy disponují komplexním systémem antioxidační ochrany. Rostlinné tkáně jsou bohaté na většinu typů antioxidantů, které jsou schopny si samy syntetizovat, a tím mohou posilovat i náš antioxidační systém. Rostlinné tkáně nám poskytují nízkomolekulární antioxidanty, jako např. polyfenolické a karotenoidní látky, kyselinu askorbovou a enzymatické antioxidační systémy. [17]

2.7.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Metoda spočívá v hodnocení schopnosti vzorku zhášet kation–radikál $ABTS^{+\cdot}$, což způsobují látky – antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku. Někdy je také označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), jelikož výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána se stejnou aktivitou syntetické standardní látky, derivátu vitamínu E, s názvem Trolox. Měření se provádí spektrofotometricky, výsledná antioxidační aktivita se sleduje na základě změn absorpčního spektra $ABTS^{+\cdot}$ při vlnové délce 734 nm v čase 0 a 10 minut. Jako kalibrační roztok se používá Trolox rozpuštěný v 60% ethanolu. [17]

2.7.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek

Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek se nejčastěji provádí Folin–Ciocalteuovou metodou (FCM). Metoda spočívá v reakci Folin–Ciocalteuova činidla (směs wolframanu sodného, molybdenanu sodného, 85% kyseliny fosforečné, koncentrované kyseliny chlorovodíkové a vody) s fenoly obsaženými v extraktu. Během procesu se redukují fenoly a vznikají modré produkty – chromogeny. Měření se provádí spektrofotometricky při vlnové délce 750 nm v kyvetách s dráhou paprsku 1 cm. Výsledná koncentrace polyfenolických látek se přepočítává na ekvivalentní množství kyseliny gallové, která rovněž slouží pro přípravu kalibrační křivky. Folin–Ciocalteuova metoda se někdy také nazývá metoda GAE (Gallic Acid Equivalent method). [17]

2.7.3 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Pro stanovení flavonoidů se nejčastěji používá Christ–Müllerova metoda, při níž se spektrofotometricky detekují barevné hlinité komplexy s hydroxylovou a karbonylovou skupinou v alkalickém prostředí. Roztok je v přítomnosti flavonoidů zbarvený žlutě. Měření se provádí při vlnové délce 510 nm. Výsledná koncentrace flavonoidů ve vzorku je přepočítána z kalibrační křivky katechinu. [17]

2.7.4 Stanovení celkového obsahu anthokyanů

Ke zjištění obsahu anthokyanů se mimo jiné používá metoda s použitím methanolu, kdy se anthokyanu uvolní do rozpouštědla. Intenzita zabarvení je přímo úměrná koncentraci anthokyanů ve vzorku. Jako kalibrační roztok je použit cyanin–chlorid. [17]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité vybavení a pomůcky

3.1.1 Přístroje

Laboratorní váhy – 440-43 (KERN, Česká republika)

Vortex – MS 3 Basic (IKA, Německo)

Třepačka – KS 130 Basic (IKA, Německo)

Spektrofotometr – S-220 UV/VIS Spectrophotometer (Boeco, Německo)

Autokláv – Vaposteri (BMT, Česká republika)

Mikropipety (Biohit Proline, Německo)

Centrifuga – MIKRO 120 (Hettich, Německo)

Biologický inkubátor (Binder, Německo)

Mobilní telefon s fotoaparátem (Lenovo, Čína)

Osobní počítač (Hewlett–Packard, Čína)

3.1.2 Chemikálie

Destilovaná voda

Folin–Ciocalteuovo činidlo (Sigma–Aldrich, s r.o.)

Uhličitan sodný (Lach–Ner, s r.o.)

Kyselina gallová (Sigma–Aldrich, s r.o.)

Dusitan sodný (PENTA s r.o.)

Chlorid hlinitý (PENTA s r.o.)

Hydroxid sodný (Lach–Ner, s r.o.)

Katechin (Sigma–Aldrich, s r.o.)

Peroxodisíran draselný (Lach–Ner, s r.o.)

Ethanol (absolutní) pro UV/VIS (VWR Chemicals)

Ethanol 96% (PENTA s r.o.)

Cyanin–chlorid (Sigma–Aldrich, s r.o.)

Kyselina chlorovodíková 36% (Lach–Ner, s r.o.)

Methanol (VWR Chemicals)

3.1.3 Software

Operační systém Windows 10 Home (Microsoft Corporation)

Word 2016 (Microsoft Office)

Excel 2016 (Microsoft Office)

ChemSketch (Advanced Chemistry Development)

3.2 Analyzované vzorky

3.2.1 Použité vzorky

3.2.1.1 Plody arónie

Plody arónie použité v experimentu byly nasbírány ve sklizňovém období v roce 2016 v malém rodinném sadu v Podbeskydí a uchovávány v mrazničce při teplotě -15 °C. [21]



Obrázek 5: Plody arónie použité v experimentu

3.2.1.2 Čajová směs

Čajová směs obsahující plody arónie, šípku a černého rybízu byla zakoupena v obchodě se zdravou výživou.



Obrázek 6: Čajová směs použitá v experimentu [19]

3.2.2 Příprava vzorků

3.2.2.1 Příprava vodného extraktu z arónie

Navážené množství 10 g bobulí arónie bylo zalito 100 ml studené a horké destilované vody a macerováno. Vzorky byly odebírány v časech 15, 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minut od začátku macerace. Maceráty byly poté centrifugovány a uchovávány v mrazničce při teplotě -15°C k dalšímu použití.

3.2.2.2 Příprava ethanolového extraktu z arónie

Navážené množství 10 g bobulí arónie bylo zalito 100 ml 96% ethanolu a macerováno. Vzorky byly odebírány v časech 15, 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minut od začátku macerace. Maceráty byly poté centrifugovány a uchovávány v mrazničce při teplotě -15°C k dalšímu použití.

3.2.2.3 Příprava vodného výluhu z čajové směsi

Navážené množství 10 g čajové směsi obsahující arónii bylo zalito 100 ml studené a horké destilované vody a ponecháno louhovat. Vzorky byly odebírány v časech 15, 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minut od začátku louhování. Výluhy byly poté centrifugovány a uchovávány v mrazničce při teplotě -15°C k dalšímu použití.

3.2.2.4 Příprava ethanolového výluhu z čajové směsi

Navážené množství 10 g čajové směsi obsahující arónii bylo zalito 100 ml 96% ethanolu a ponecháno louhovat. Vzorky byly odebírány v časech 15, 30, 60, 90, 120, 180 a 240 minut

od začátku louhování. Výluhy byly poté centrifugovány a uchovávány v mrazničce při teplotě -15 °C k dalšímu použití.

3.3 Stanovení antimikrobiální aktivity difúzně jamkovou metodou

3.3.1 Použité mikroorganismy

3.3.1.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis z čeledi *Bacillaceae* jsou gram–pozitivní rovné pohyblivé tyčinky s peritrichálně umístěnými bičíky, objevující se jednotlivě nebo v řetízcích. V nepříznivých podmínkách sporulují. Mají aerobní nebo fakultativně anaerobní metabolismus, zároveň fermentační nebo respirační. Buňky jsou běžně přítomné v prostředí, u člověka se vyskytuje na kůži nebo v intestinálním traktu. Produkují toxin subtilizin, který vyvolává alergickou reakci, amylázu, proteázy, látky vykazující fungicidní efekt a antibiotikum bacitracin. [20]

3.3.1.2 *Serratia marcescens*

Jedná se o pohyblivou gram–negativní bakterii z čeledi *Enterobacteriaceae*, o tvaru rovných tyčinek, které jsou peritrichálně obrvené. Mají chemoorganotrofní, fermentační i respirační metabolismus. Buňky se běžně vyskytují v půdě, ve vodě, na rostlinách a v zažívacím traktu živočichů, převážně hlodavců a hmyzu. U člověka vyvolávají meningitidu, infekce dýchacích i močových cest. Produkují pigment prodigiosin, který může vyvolávat zdání krve (např. ve stolici). [20]

3.3.1.3 *Micrococcus luteus*

Bakterie rodu *Micrococcus* z čeledi *Micrococcaceae* jsou nepohyblivé gram–pozitivní sférické buňky vyskytující se jednotlivě nebo ve shlucích. Jejich metabolismus může být chemoorganotrofní, mezofilní, nebo respirační. Vyskytují se v půdě, ve vodě, ve vzduchu a v potravinách, na kůži lidí a zvířat jako komenzálové. *M. luteus* produkuje žlutý karotenoidní pigment. [20]

3.3.2 Příprava živného média

Bylo použito živné médium Nutrient Agar No. 2 (CADERSKY-ENVITEK, s r.o.) o složení:

živočišná tkáň.....	10 g
hovězí extrakt.....	10 g
chlorid sodný (NaCl).....	5 g
agar.....	15 g
destilovaná voda.....	1000 ml
pH.....	7,2 ± 0,2

Do 1 litru destilované vody o teplotě 25 °C bylo naváženo 40 g živného média. Směs byla rozmíchána a sterilizována v autoklávu. Po ochlazení na vhodnou teplotu bylo do každých 150 ml média naočkováno 1,5 ml bujónu s kulturou, který byl připraven 24 hodin předem.

3.3.3 Příprava agarových ploten a pipetování extraktů

Živné médium s mikrobiologickou kulturou bylo rozlito do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí média byly do každé misky vyhloubeny 4 otvory korkovrtem. Do tří korkovrťů bylo napipetováno 100 µl extraktu, do čtvrtého, kontrolního, 100 µl vody, nebo ethanolu

v závislosti na rozpouštědle extraktu. Takto připravené Petriho misky byly uloženy do inkubátoru a inkubovány 48 hodin při teplotě 26 °C.

3.4 Stanovení antioxidační aktivity

3.4.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity pomocí ABTS⁺.

3.4.1.1 Pracovní postup

ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 7 mM. Radikálový kationt z ABTS byl získán reakcí s 2,45mM peroxodisíranem draselným. Roztok by ponechám stát ve tmě při pokojové teplotě přibližně 12 hodin. Před použitím byl ABTS⁺ zředěn ethanolem pro UV/VIS tak, aby jeho absorbance byla $0,70 \pm 0,02$ při vlnové délce 734 nm. Jako slepý vzorek byl použit ethanol pro UV/VIS. Do zúžené kyvety byl napipetován 1 ml ABTS⁺ a byla změřena absorbance v čase 0 minut. Poté bylo přidáno 10 µl extraktu a po 10 minutách byl změřen pokles absorbance.

Každý vzorek extraktu byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Pro výpočet celkové antioxidační aktivity byla použita kalibrační křivka Troloxu.

3.4.1.2 Příprava standardu a kalibrační křivky

Kalibrační křivka byla připravena z pěti koncentrací roztoku Troloxu v rozmezí 50–400 µg/ml. Trolox byl rozpuštěn v 60% ethanolu. Výsledky byly vztaženy na ekvivalentní množství Troloxu. Absorbance byla měřena rovněž při vlnové délce 734 nm.

Rovnice kalibrační křivky: $y = 0,00137x$.

3.5 Stanovení celkové koncentrace vybraných skupin antioxidantů

3.5.1 Stanovení celkového obsahu polyfenolických látek spektrofotometricky

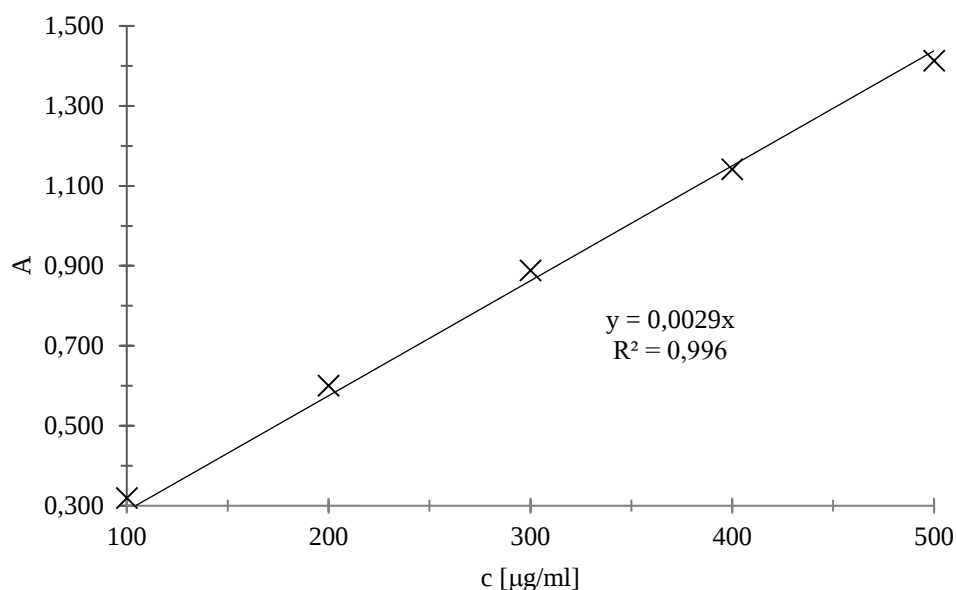
3.5.1.1 Pracovní postup

Do zkumavky byl vždy napipetován 1 ml zředěného Folin–Ciocalteuova činidla v poměru 1:9, 1 ml destilované vody a 100 µl extraktu vzorku. Roztok ve zkumavkách byl promíchán a ponechán stát. Po pěti minutách bylo do každé zkumavky k roztoku přidáno po 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného a opět bylo vše dobře promícháno. Po 15 minutách byla změřena absorbance pomocí UV/VIS spektrofotometru při vlnové délce 750 nm. Slepý vzorek namísto extraktu obsahoval 100 µl destilované vody nebo ethanolu.

Každý vzorek extraktu byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Obsah celkových polyfenolů v extraktu byl vypočten dosazením průměrné hodnoty absorbance vzorku do rovnice kalibrační křivky.

3.5.1.2 Příprava standardu a kalibrační křivky

Kalibrační křivka byla připravena z pěti koncentrací roztoku kyseliny gallové v rozmezí 100–500 mg/l. Dále bylo postupováno stejně jako při stanovení vzorků extraktu z arónie a čajové směsi. Absorbance byla měřena rovněž při vlnové délce 750 nm.



Obrázek 7: Kalibrační křivka kyseliny gallové

3.5.2 Stanovení celkového obsahu flavonoidů spektrofotometricky

Stanovení celkového množství flavonoidů v přírodních extraktech se provádí spektrofotometrickou metodou reakcí s hlinitou solí a dusitanem.

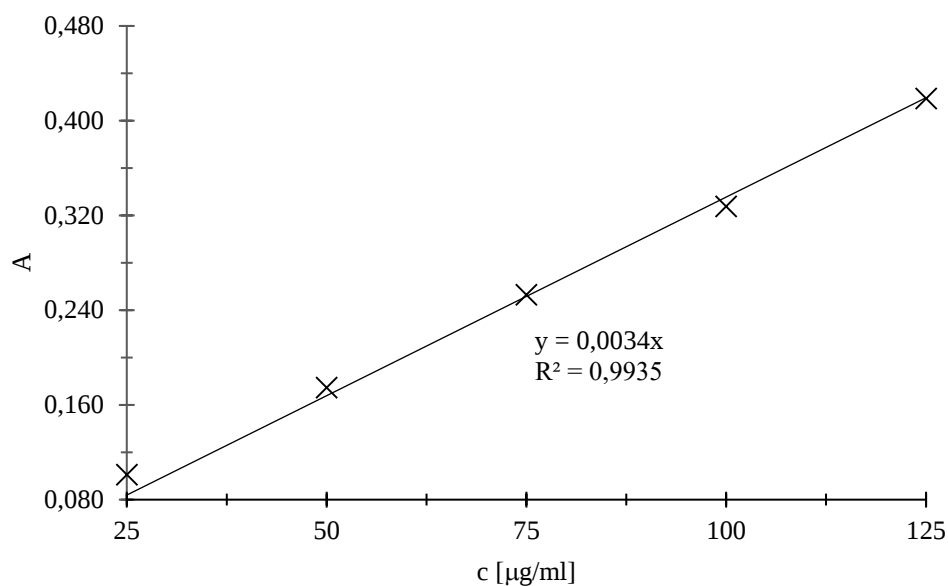
3.5.2.1 Pracovní postup

Do zkumavek bylo vždy pipetováno 0,5 ml extraktu vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml 5% roztoku dusičnanu sodného. Roztok ve zkumavkách byl důkladně promíchán a ponechán stát 5 minut. Poté bylo do zkumavek přidáno 0,2 ml 10% roztoku chloridu hlinitého, opět bylo vše řádně promícháno a odloženo na dalších 5 minut. Nakonec bylo přidáno 1,5 ml roztoku hydroxidu sodného a 1 ml destilované vody. Po 15 minutách byly vzorky analyzovány pomocí UV/VIS spektrofotometru při vlnové délce 510 nm. Slepý vzorek byl připraven z 0,5 ml extraktu a 4,4 ml destilované vody.

Každý vzorek extraktu byl analyzován ve třech paralelních stanoveních. Obsah celkových flavonoidů v extraktu byl stanoven dosazením průměrné hodnoty absorpance vzorku do rovnice kalibrační křivky. Ta byla sestrojena pomocí roztoku katechinu.

3.5.2.2 Příprava standardu a kalibrační křivky

Kalibrační křivka byla připravena z pěti koncentrací roztoku katechinu v rozmezí 25–125 mg/l. Dále bylo postupováno stejně jako při stanovení vzorků extraktu z arónie a čajové směsi. Absorbance byla měřena rovněž při vlnové délce 510 nm.



Obrázek 8: Kalibrační křivka katechinu

3.5.3 Stanovení celkového obsahu anthokyanů

3.5.3.1 Pracovní postup

Množství 10 g aronie a 10 g čajové směsi bylo extrahováno methanolem s přidavkem 0,1% kyseliny chlorovodíkové do pH 2–3 na třepačce po dobu 15 minut. Směs byla následně filtrována přes filtrační papír a centrifugována při rychlosti 10 000 otáček za minutu po dobu 5 minut. Supernatanty byly zředěny tak, aby jejich absorbance byla menší než 1,000, a měřeny při vlnové délce 528 nm. Jako slepý vzorek byl použit okyselený methanol.

Stejně množství aronie a čajové směsi bylo extrahováno okyselenou destilovanou vodou. Dále bylo postupováno obdobně jako při extrakci methanolem. Jako slepý vzorek byla použita okyselená destilovaná voda.

Každý vzorek byl stanovován ve třech paralelních stanoveních. Pro výpočet celkového obsahu anthokyanů byla použita kalibrační křivka cyanin–chloridu.

3.5.3.2 Příprava standardu a kalibrační křivky

Kalibrační křivka byla sestavena z pěti koncentrací cyanin–chloridu v rozmezí 1–20 $\mu\text{g/ml}$.

Rovnice kalibrační křivky: $y = 59,61x$.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Antimikrobiální účinky extraktů

V experimentu byly stanoveny účinky extraktů z plodů arónie a čajové směsi na mikroorganismy *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*.

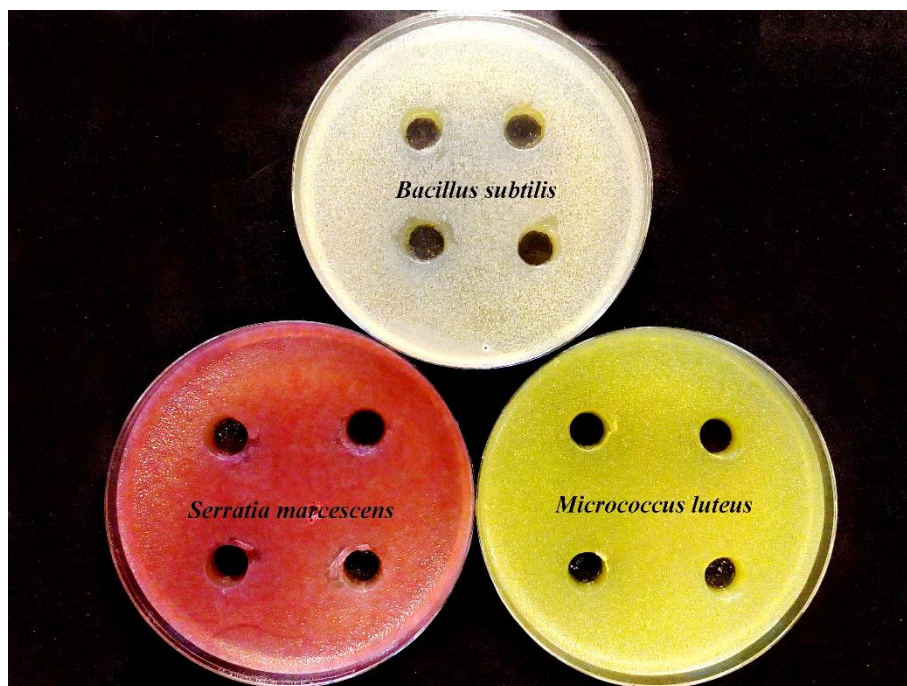
Pro experiment byly použity vždy extrakty s nejvyššími koncentracemi polyfenolických látek z arónie a čajové směsi.



Obrázek 9: Antimikrobiální účinky extraktu z arónie ve studené vodě



Obrázek 10: Antimikrobiální účinky extraktu z arónie v horké vodě



Obrázek 11: Antimikrobiální účinky extraktu z arónie v ethanolu

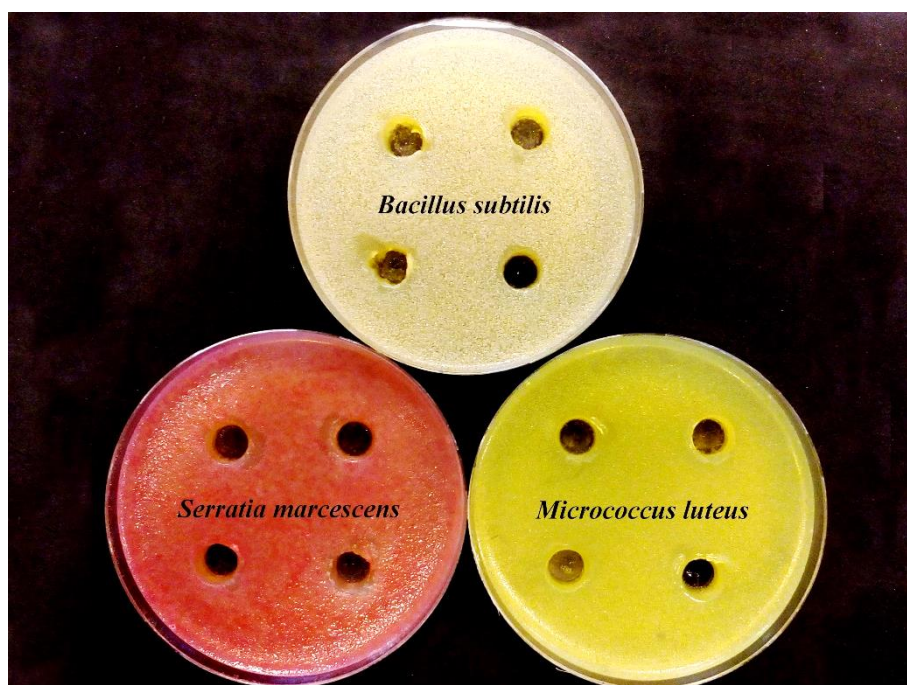


Obrázek 12: Antimikrobiální účinky extraktu z čajové směsi ve studené vodě



Obrázek 13: Antimikrobiální účinky extraktu z čajové směsi v horké vodě

Na obr. 13 je patrná inhibiční zóna mikroorganismu *M. luteus* o velikosti 2,5 cm. Rovněž zde lze pozorovat zónu u *B. subtilis* o velikosti 3 cm. V tomto případě se však zóna jeví jako růstová, jelikož nárůst mikroorganismů kolem korkovrtu s extraktem byl znatelně vyšší než u korkovrtu s vodou. Detailnější zobrazení obou zón je přiloženo na straně 37 na obr. 23 a 24.



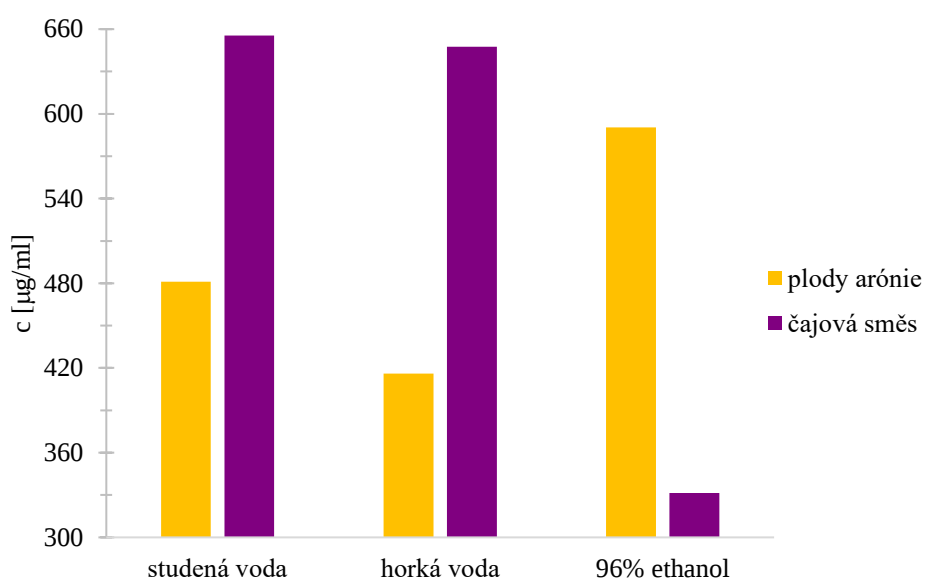
Obrázek 14: Antimikrobiální účinky extraktu z čajové směsi v ethanolu

Při vyhodnocení byly zjištěny téměř zanedbatelné až negativní inhibiční účinky extraktu z aronie a čajové směsi na testované mikroorganismy, s výjimkou extraktu čajové směsi v horké vodě. V tomto případě byla zpozorována inhibiční zóna u mikroorganismu *M. luteus*

a růstová zóna u *B. subtilis*. Vzniklé inhibiční a růstové zóny byly pravděpodobně zapříčiněny jinou složkou čajové směsi, např. šípkem nebo černým rybízem. Koncentrace polyfenolických látek v extraktu z čajové směsi v horké vodě byla nejvyšší ze všech extraktů, což mohlo rovněž přispět vzniku zón. Z vybraných testovaných mikroorganismů je *M. luteus* pravděpodobně nejcitlivější. V čajové směsi se zřejmě nacházejí látky, které *B. subtilis* využívá k růstu. Je pravděpodobné, že extrakty nebyly, i přes nejvyšší hodnoty koncentrací v jednotlivých experimentech, dostatečně koncentrované. Na mikroorganismy by mohly působit extrakty o větším objemu, nebo extrakty, k jejichž přípravě bylo použito větší množství arónie, nebo čajové směsi, aby byla celková koncentrace extraktu vyšší.

4.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla stanovena u vzorků s nejvyšší koncentrací látek z arónie a čajové směsi.



Obrázek 15: Celková antioxidační aktivita extraktů

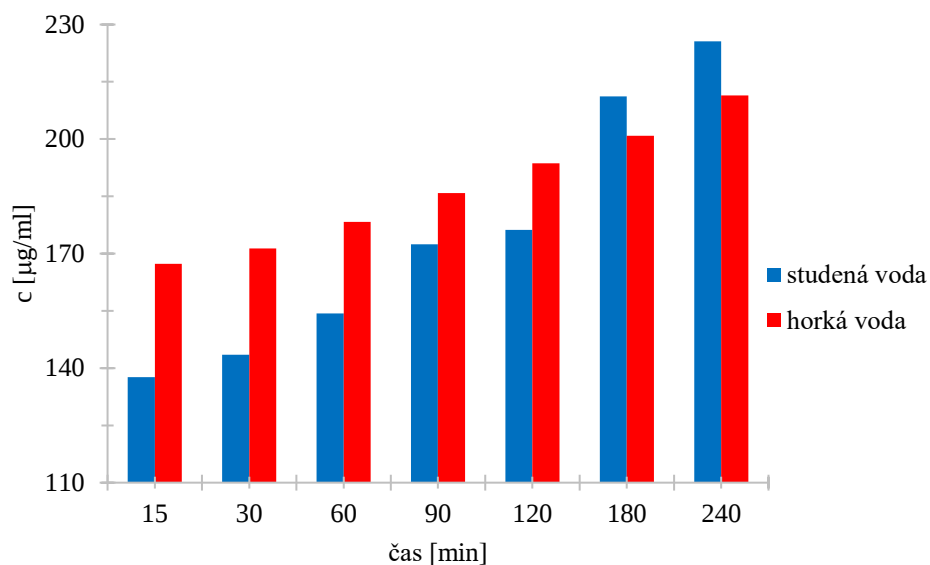
Extrakty v horké vodě vykazovaly nižší hodnoty antioxidační aktivity, pravděpodobně kvůli tepelné degradaci způsobené teplotou varu rozpouštědla. Extrakty čajové směsi ve vodě byly naopak vyšší hodnotu antioxidační aktivity než extrakty z arónie, jelikož nebyly ředěny jako v případě stanovení celkových polyfenolů a flavonoidů, které je uvedeno v dalších bodech. Extrakty z čaje rovněž obsahovaly i další plody, které mohly být bohatší o polyfenolické látky, což způsobilo vzrůst antioxidační aktivity oproti extraktům z plodů arónie.

Ve studii je zjištěna antioxidační aktivita v jednotkách TEAC ($\mu\text{mol/ml}$). Stanovení probíhalo u šťávy z arónie a byla naměřena antioxidační aktivita v rozmezí 65–70 $\mu\text{mol/ml}$. [11]

V další studii jsou uvedeny hodnoty antioxidační aktivity na radikál ABTS^+ , a to 439 $\mu\text{mol TEAC}$ na 100 g plodů arónie a 103,2 mg TEAC v 1 ml aróniové šťávy. [22]

4.3 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

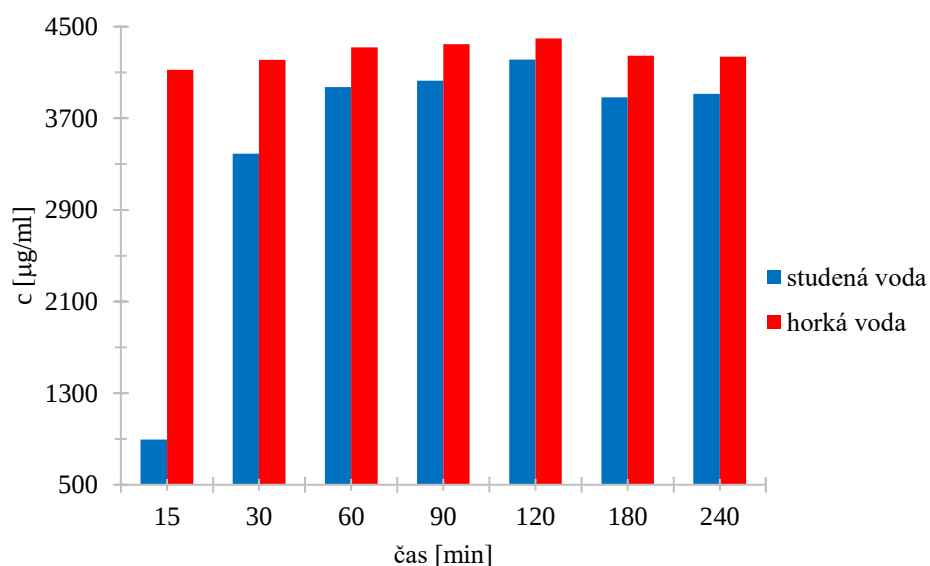
Vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Pro výpočet obsahu polyfenolů byla použita průměrná hodnota naměřených absorbancí.



Obrázek 16: Celkový obsah polyfenolů v extraktech z aronie

Vodné extrakty z plodů aronie vykazují postupný nárůst obsahu polyfenolických látek. Horká voda extrahovala polyfenoly ve větším množství při prvních měřeních, v delších časech však docházelo jen k mírnému nárůstu.

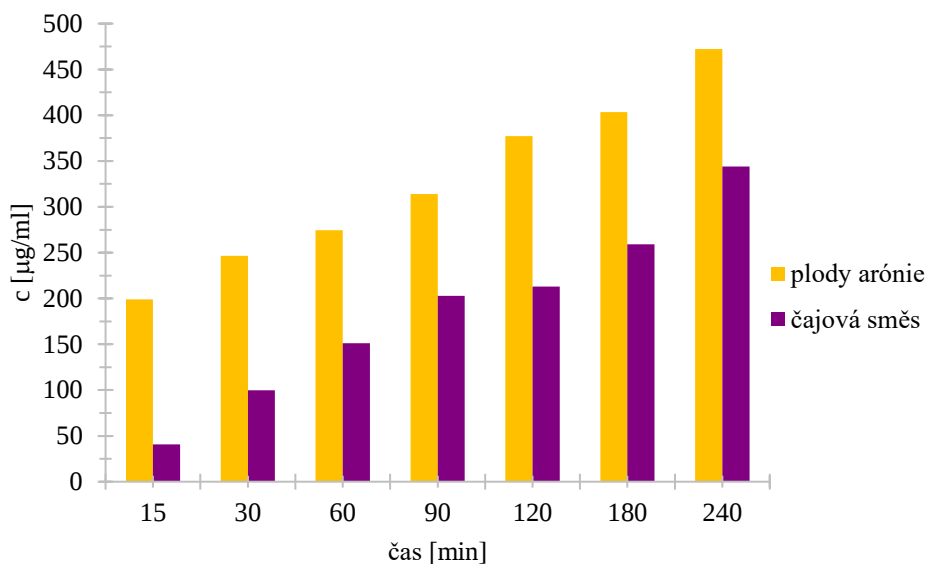
V následujícím grafu jsou uvedeny hodnoty celkového obsahu polyfenolů v extraktech z čajové směsi. Za použití studené i horké vody jako rozpouštědla bylo nutné vzorky 20× naředit, aby měřená absorbance byla pod hranicí $A < 1,000$.



Obrázek 17: Celkový obsah polyfenolů v extraktech z čajové směsi

Oproti extraktům z arónie obsah polyfenolů kontinuálně nevzrůstal. Nejvyšší koncentrace bylo dosaženo v čase 120 minut. V poslední dvou časech došlo k poklesu koncentrace polyfenolů.

Obr. 18 znázorňuje hodnoty celkového obsahu polyfenolů v extraktech z arónie a čajové směsi, za použití 96% ethanolu jako rozpouštědla. V případě plodů arónie se ethanol jeví jako účinnější rozpouštědlo.

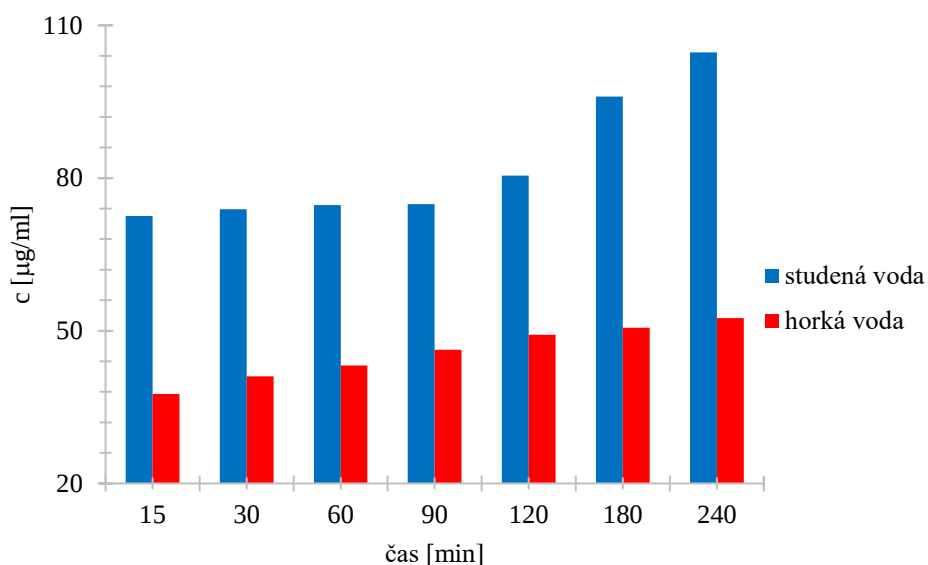


Obrázek 18: Celkový obsah polyfenolů v ethanolových extraktech

Ve studii byl zjištěn obsah polyfenolů v rozmezí 2010–6902 mg ve 100 g čerstvých plodů a 3760–7849 mg ve 100 g usušených plodů. [11]

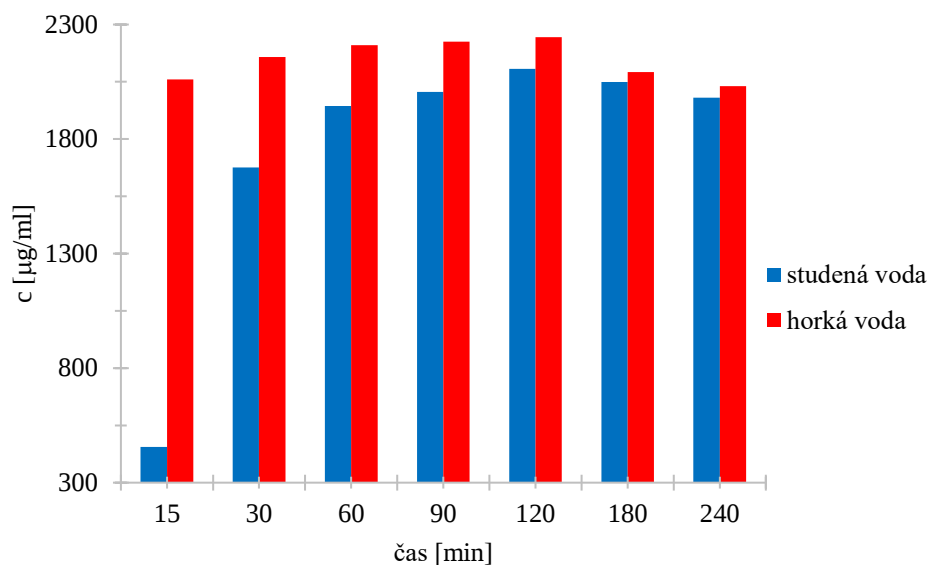
4.4 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Pro výpočet obsahu flavonoidů byla použita průměrná hodnota naměřených absorbancí.



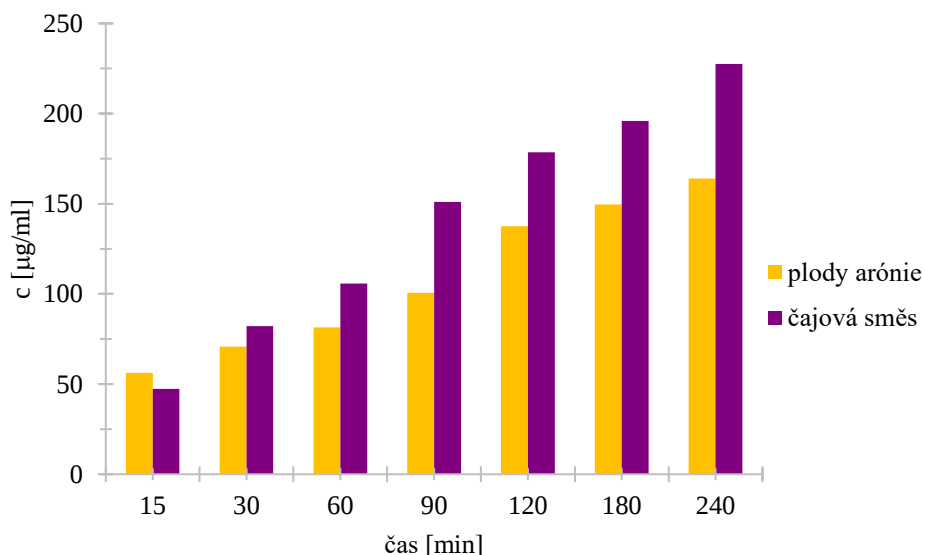
Obrázek 19: Celkový obsah polyfenolů v extraktech z arónie

Vodné extrakty z čajové směsi opět vykazovaly postupný nárůst obsahu látek. Horká voda extrahovala flavonoidy v menším množství než studená voda.



Obrázek 20: Celkový obsah flavonoidů v extraktech z čajové směsi

V grafu na obr. 20 jsou uvedeny výsledky obsahu flavonoidů v čajové směsi. V případě použití studené i horké vody jako rozpouštědla bylo nutné vzorky 20× naředit, aby měřená absorpance byla pod hranicí $A < 1,000$. Extrakce studenou vodou měla prudký nárůst koncentrace v začátku. Jako v předchozím experimentu, nejvyšší koncentrace látek byla naměřena v čase 120 minut.

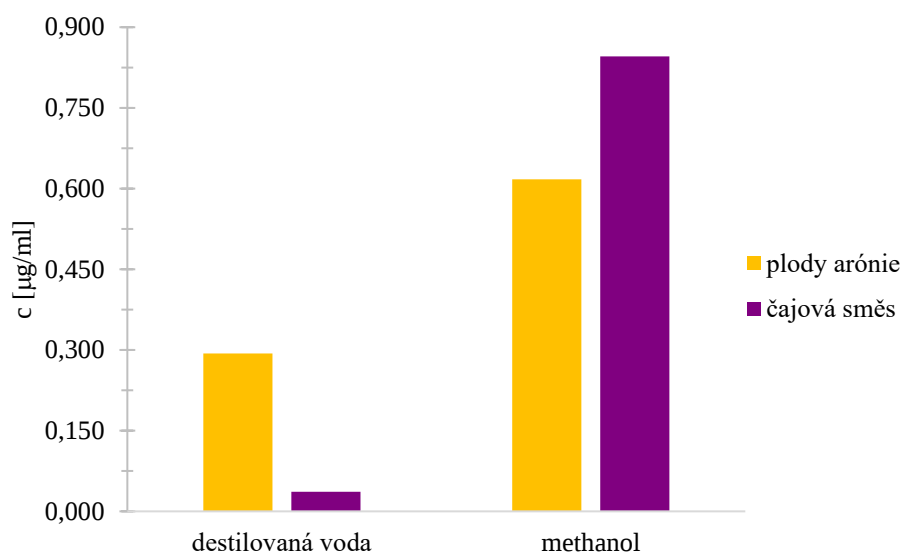


Obrázek 21: Celkový obsah flavonoidů v ethanolových extraktech

Ethanolový extrakt čajové směsi vykazoval vyšší hodnoty obsahu flavonoidů. Čajová směs obsahuje i jiné složky než pouze arónii, které mohou zvyšovat obsah uvolněných látek.

4.5 Stanovení celkového obsahu anthokyanů

Vzorky byly měřeny ve třech paralelních stanoveních. Pro výpočet obsahu anthokyanů byla použita jejich průměrná hodnota absorbancí. Pro přesnější měření byly vzorky nejprve naředěny tak, aby měřená absorbance byla menší než 1,000.



Obrázek 22: Celkový obsah anthokyanů v extraktech

Ve studené destilované vodě se anthokyaniny z čajové směsi uvolňovaly jen málo, naopak v methanolu byla barviva (všech plodů přítomných ve směsi) extrahována velmi dobře. Methanol se z použitých dvou rozpouštědel jeví jako výrazně účinnější.

Ve studii byl zjištěn obsah anthokyanů v rozmezí 307–1480 mg ve 100 g čerstvých plodů arónie a 641–1959 mg ve 100 g usušených plodů. [11]

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo teoreticky charakterizovat rostlinu *Aronia melanocarpa*, její plody a popsat možnosti využití těchto plodů. Zpracovány byly rovněž i poznatky o biologicky aktivních látkách, antioxidační aktivitě, a konečně o vlivech těchto látek na lidský organismus. Experimentální část se zabývá mikrobiologickým stanovením antioxidační aktivity za použití mikroorganismů *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus*. Jako vzorky byly použity extrakty z plodů arónie a čajové směsi obsahující plody arónie, šípku a černého rybízu. Nárůst inhibičních zón se projevil jen u mikroorganismu *M. luteus*, kde v případě extraktu z čajové směsi v horké vodě narostla zóna o velikosti 2,5 cm. U mikroorganismu *B. subtilis* také narostla zóna o velikosti 3 cm, ovšem růstová, jelikož nárůst mikroorganismů kolem korkovrtu s extraktem byl znatelně vyšší než u korkovrtu s vodou. Čajová směs tedy pravděpodobně obsahuje látky, které podporují růst mikroorganismu *B. subtilis*.

V další části experimentu byl stanoven celkový obsah antioxidačních látek, jako jsou polyfenoly, flavonoidy a anthokyany, stanovena byla i celková antioxidační aktivita. Tyto parametry byly stanovovány pro plody arónie. Ta byla extrahována vodou o laboratorní teplotě, horkou vodou a 96% ethanolem. Byly měřeny absorbance extraktů v různých časech a na základě kalibračních křivek vypočteny obsahy příslušných látek. Jako nejkoncentrovanější se ukázaly extrakty s nejvyšším časem odběru – 240 minut, kdy v případě extrakce vodou o laboratorní teplotě byl stanoven obsah celkových polyfenolů na 255,80 µg/ml, obsah celkových flavonoidů na 104,68 µg/ml, antioxidační aktivita byla změřena na 481,02 µg/ml. Extrakce horkou vodou měla následující výsledky – obsah polyfenolů 211,39 µg/ml, obsah flavonoidů 52,48 µg/ml a antioxidační aktivita 416,06 µg/ml. Při extrakci 96% ethanolem bylo dosaženo výsledku obsahu polyfenolů 472,20 µg/ml, obsahu flavonoidů 163,90 µg/ml a antioxidační aktivity 590,51 µg/ml.

Celkový obsah antioxidačních látek se stanovoval i v čajové směsi, a to se stejným postupem jako v případě stanovování u plodů arónie. V případě extrakce vodou byla nejvyšší koncentrace látek stanovena při čase 120 minut, při extrakci ethanolem byla nejvyšší koncentrace opět v nejdelším čase, 240 minut. Při extrakci vodou o laboratorní teplotě byl stanoven obsah celkových polyfenolů na 4 213,05 µg/ml, obsah celkových flavonoidů na 2 106,77 µg/ml, antioxidační aktivita byla změřena na 655,47 µg/ml. Extrakce vroucí vodou měla následující výsledky – obsah polyfenolů 4 396,29 µg/ml, obsah flavonoidů 2 244,19 µg/ml a antioxidační aktivita 647,45 µg/ml. Při extrakci 96% ethanolem bylo dosaženo výsledku obsahu polyfenolů 343,93 µg/ml, obsahu flavonoidů 227,54 µg/ml a antioxidační aktivity 331,39 µg/ml.

Posledním úkolem bylo stanovit anthokyany v arónii a čajové směsi. Anthokyany byly stanovovány ve vodném a methanolovém extraktu. Pro arónii ve vodném extraktu byl stanoven obsah anthokyanů na 0,294 µg/ml, v methanolovém extraktu na 0,617 µg/ml. Vodný extrakt čajové směsi vykazoval obsah anthokyanů 0,036 µg/ml, methanolový extrakt 0,845 µg/ml.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOKOTKIEWICZ, Adam, Zbigniew JAREMICZ a Maria LUCZKIEWICZ. Aronia Plants: A Review of Traditional Use, Biological Activities, and Perspectives for Modern Medicine. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2010, **13**(2), 255-269 [cit. 2017-04-02]. DOI: 10.1089/jmf.2009.0062. ISSN 1096620x. Dostupné z: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jmf.2009.0062>
- [2] KABELKOVÁ, P. *Stanovení aromaticky aktivních látek v netradičních typech drobného ovoce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií, 2013. 46 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.
- [3] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 9788086659176.
- [4] HEINRICH, Jan, Irena ŠVARCOVÁ a Kateřina VALENTOVÁ. Plody *Lonicera caerulea*: Perspektivní funkční potraviny a zdroj biologicky aktivních látek. *Chemické listy*. 2008, **102**(4), 245-254. ISSN 1213-7103, 0009-2770.
- [5] SLANINA, Jiří a Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. 2004, **98**(5), 239-245.
- [6] OSZMIANŃSKI, Jan a Aneta WOJDYLO. Aronia melanocarpa phenolics and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology* [online]. 2005, **221**(6), 809-813 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1007/s00217-005-0002-5. ISSN 14382377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-005-0002-5>
- [7] GAŚSIOROWSKI, Kazimierz, Katarzyna SZYBA, Barbara BROKOS, Beata KOZ.XL; LACZYŃSKA, Magda JANKOWIAK-WZ.XL; LODARCZYK a Jan OSZMIANŃSKI. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from Aronia melanocarpa fruits. *Cancer Letters* [online]. 1997, **119**(1), 37-46 [cit. 2017-01-29]. DOI: 10.1016/S0304-3835(97)00248-6. ISSN 03043835. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383597002486>
- [8] HEIM, Kelly E, Anthony R TAGLIAFERRO a Dennis J BOBILYA. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2002, **13**(10), 572-584 [cit. 2017-04-01]. DOI: 10.1016/S0955-2863(02)00208-5. ISSN 09552863. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286302002085>
- [9] ZLOCH, Zdeněk, Jan ČELAKOVSKÝ a Anna AUJEZDSKÁ. Posuzování biologické hodnoty potravin na základě jejich antioxidační aktivity. *Česká a slovenská hygiena*. 2004, **1**(3), 82-87. ISSN 1214-6722.

- [10] RICE-EVANS, Catherine, Nicholas MILLER a George PAGANGA. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* [online]. 1997, 2(4), 152-159 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1016/S1360-1385(97)01018-2. ISSN 13601385. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138597010182>
- [11] KULLING, Sabine a Harshadai RAWEL. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) – A Review on the Characteristic Components and Potential Health Effects. *Planta Medica* [online]. 2008, 74(13), 1625-1634 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1055/s-0028-1088306. ISSN 00320943. Dostupné z: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0028-1088306>
- [12] Aronie – Černý jeřáb. *BioRenesance: obchod s přírodními produkty* [online]. 2003 [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://www.biorenesance.cz/biorenesance/eshop/386-1-Aronie-Cerny-Jerab/0/5/2187-ARONIE-CERNY-JERAB-plod-50g-1kg>.
- [13] *Víno z aronie – Aroniové víno* [online]. Horšice: Ing. Josef Mašek, 1998 [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://vino.dobry.cz/>
- [14] BALÍK, Josef. *Anthokyaninová barviva v hroznech a vínech: Anthocyanin pigments in grapes and wines*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 9788073754129.
- [15] Aronia Cosmetics: *Aronia Original* [online]. Tanvald: H 4 H, 2012 [cit. 2017-03-18]. Dostupné z: <http://www.aroniaoriginal.cz/aronia/eshop/8-1-ARONIA-COSMETICS>
- [16] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. ISBN 8021425679.
- [17] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. ISBN 9788021447882.
- [18] *Aronia melanocarpa – Aronie černá – temnoplodec. Garten* [online]. Jevišovice: Ing. Miloš Vymazal, 2001 [cit. 2017-03-01]. Dostupné z: <https://www.garten.cz/a/cz/545-aronia-melanocarpa-aronie-cerna-temnoplodec/>
- [19] Aronie & Šípek & Černý rybíz: Ovocný čaj. *Grešík Valdemar: Vítejte ve světě bylin a čajů* [online]. Děčín: Valdemar Grešík – Natura, 2017 [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: <http://www.gresik.cz/eshop/ovocne-caje-porcovane/aronie-sipek-cerny-rybiz-porcovany.html>
- [20] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 9788021079236.

- [21] Aronie z Podbeskydí. *Aronie pro zdraví* [online]. Štramberk: Lubomír Janhuba, 2014 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.aronieprozdravi.cz/o-nas>
- [22] DENEV, Petko N., Christo G. KRATCHANOV, Milan CIZ, Antonin LOJEK a Maria G. KRATCHANOVA. Bioavailability and Antioxidant Activity of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Polyphenols: *in vitro* and *in vivo* Evidences and Possible Mechanisms of Action. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2012, **11**(5), 471-489 [cit. 2017-04-22]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2012.00198.x. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2012.00198.x>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DPPH	2,2–difenyl–1–pikrylhydrazyl
ABTS	2,2'–azinobis–(3–ethylbenzothiazolin–6–sulfonová kyselina)
COMT	katechol–O–methyltransferáza
TG	triglycerid
LDL–chol.	cholesterol o nízké hustotě (low–density cholesterol)
HDL–chol.	cholesterol o vysoké hustotě (high–density cholesterol)

8 SEZNAM PŘÍLOH



Obrázek 23: Růstové zóny mikroorganismu *B. subtilis*



Obrázek 24: Inhibiční zóny mikroorganismu *M. luteus*