

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



SIRNÉ SLOUČENINY „SLADKÉHO ČESNEKU“

(Tulbaghia violacea Harv.)

Bakalářská práce

Karolína Ranglová

Vedoucí práce: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

(katedra aplikované chemie, ZF JU)

České Budějovice 2012

Ranglová, K., 2012: Sírné sloučeniny „sladkého česneku“ (*Tulbaghia violacea* Harv.). [Sulfur compounds of „sweet garlic“ (*Tulbaghia violacea* Harv.). Bc. Thesis, in Czech.] – 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The theoretical part of the Bachelor thesis summarizes the formation pathways of sulfur compounds in plants of the genus *Allium* and shows the similarity between „regular“ garlic (*Allium sativum* L.) and „sweet“ garlic (*Tulbaghia violacea* Harv.).

In the experimental part, marasmicin was extracted from the rhizomes of *T. violacea* and allicin was synthesized from diallyl disulfide. Antimicrobial properties of both compounds were tested in two ways - by the disk diffusion method against several strains of bacteria and yeasts (*Clavibacter michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas axonopodis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Saccharomyces cerevisiae*) and by dilution method against three strains of bacteria (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*).

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 25.4.2012

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce, doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky a především za velikou ochotu a trpělivost.

Mé poděkování také patří Ing. Petře Krejčové za pomoc při práci s HPLC a při testování antimikrobiálních aktivit látek.

Dále děkuji Ing. Pavle Kružberské (Biologické centrum AV ČR) a Prof. RNDr. Janu Schramlovi, DrSc. (Ústav chemických procesů AV ČR) za jejich pomoc při identifikaci marasmicinu a allicinu pomocí spektrálních metod (MS, NMR). Poděkování patří také Grantové agentuře Jihočeské univerzity za finanční podporu tohoto projektu (GAJU 067/2010/Z).

Závěrečný veliký dík patří mé rodině, protože nebýt jí, tak bych neměla možnost psát tuto práci.

Cíle práce

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši se zaměřením na strukturu, tvorbu a biologické vlastnosti sirných sloučenin česnekovitých rostlin čeledi Alliaceae.

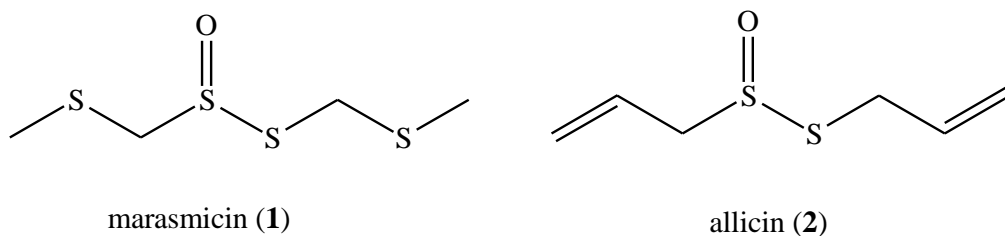
V experimentální části práce bylo cílem izolovat z rostliny *Tulbaghia violacea* thiosulfínát marasmicin (2,4,5,7-terathiaoktan-4-oxid) a porovnat jeho antimikrobiální aktivitu s allicinem, jenž je hlavní rozkladnou sirnou látkou v česneku.

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Rozkladné sírné látky v česneku	2
3.	<i>Tulbaghia violacea</i> Harv.....	3
3.1.	Charakteristika rostliny	3
3.1.1.	Rod <i>Tulbaghia</i>	4
3.2.	Léčivé účinky a antimikrobiální aktivita rostlin rodu <i>Tulbaghia</i>	6
3.3.	Sírné látky v <i>Tulbaghia violacea</i>	8
3.4.	Způsoby zjišťování antimikrobiální aktivity	10
3.4.1.	Disková difúzní metoda.....	10
3.4.2.	Mikrodiluční metoda	10
4.	Experimentální část.....	11
4.1.	Použité přístroje, chemikálie, rostlinný materiál a testované mikroorganismy	11
4.1.1.	Chemikálie	11
4.1.2.	Použité přístroje a zařízení	11
4.1.3.	Živné půdy	12
4.1.4.	Testované mikroorganismy	13
4.1.5.	Testovaná antibiotika	13
4.1.6.	Rostlinný materiál	13
4.2.	Extrakce rozkladných látek z <i>Tulbaghia violacea</i>	14
4.3.	Identifikace marasmicinu	14
4.3.1.	Analýza marasmicinu pomocí HPLC/DAD	14
4.3.2.	Identifikace marasmicinu pomocí HPLC/MS.....	16
4.3.3.	Identifikace marasmicinu pomocí NMR	16
4.4.	Izolace marasmicinu	18
4.5.	Syntéza allicinu (<i>S</i> -allyl-2-propenthiosulfínátu)	18
4.6.	Identifikace allicinu	19
4.6.1.	Analýza allicinu pomocí HPLC/DAD	19
4.6.2.	Identifikace allicinu pomocí HPLC/MS	20
4.7.	Izolace allicinu.....	21
4.8.	Zjišťování antimikrobiální aktivity marasmicinu.....	22
4.8.1.	Disková difúzní metoda.....	22
4.8.2.	Mikrodiluční metoda v bujónu	22
5.	Výsledky	24
6.	Diskuze	25
7.	Závěr	27
8.	Seznam použité literatury.....	28
9.	Přílohy	30

1. Úvod

Rostlina *Tulbaghia violacea* Harv. je drobná stálezelená česnekovitá rostlina řadící se do rodu *Tulbaghia*, jenž je taxonomicky velmi blízký rodu *Allium* s nejznámějším zástupcem česnekem setým (*Allium sativum* L.). Obě rostliny, ač každá pochází z jiného konce světa, produkují po narušení jejich pletiv silně aromatické sloučeniny. Majoritní rozkladná sírná sloučenina v rostlině *T. violacea* je 2,4,5,7-tetrathiaoktan-4-oxid, triviálním názvem marasmicin (1), a je strukturně velice podobná rozkladné sírné látce, allicinu (4,5-dithiaokta-1,7-dien-4-oxid) (2), vznikající v česneku. Chemické struktury obou látek jsou znázorněny na obr. 1.



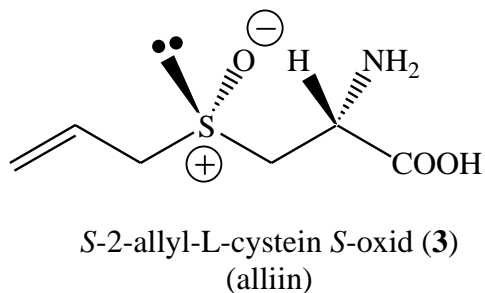
Obr. 1: Struktura marasmicinu (1) a allicinu (2).

Stejně jako někteří lidé v České republice konzumují česnek, aby si utužili zdraví a předcházeli různým onemocněním, tak domorodci v jižní Africe konzumují rostlinu *T. violacea* mj. při žaludečních problémech, virózách, tuberkulóze a dokonce i při rakovinném onemocnění. Tato podobnost tedy nemusí být jen čistě strukturní, co se chemického vzorce týče, ale i antimikrobiální vlastnosti by mohly být podobné a tím by mohl být, alespoň částečně, vyřešen problém nedostatečného množství léčivých prostředků v rozvojových zemích, jako je jižní Afrika, a možnost použití marasmicinu jako zdraví prospěšného doplňku stravy, jak tomu dosud je u česneku.

Nejjednodušším způsobem zjištění antimikrobiální aktivity látek, kdy se testuje citlivost kmene k antibiotiku, je určení pomocí diskového difúzního testu, který bude v této práci použit pro porovnání antimikrobiálních aktivit marasmicinu a allicinu.

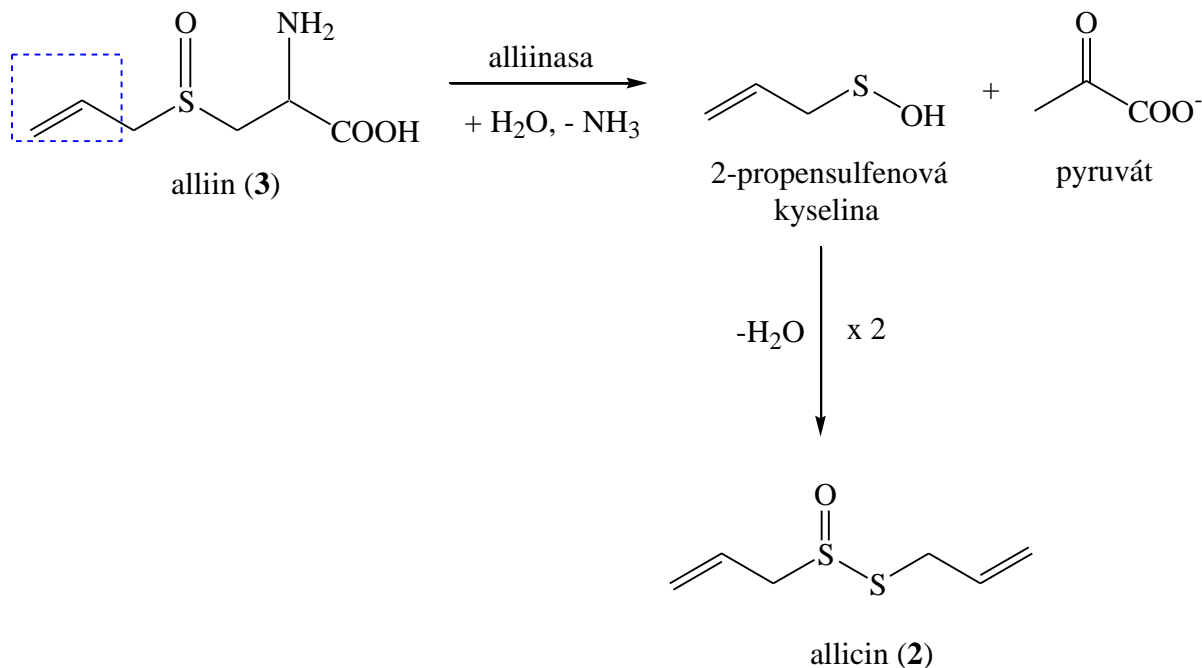
2. Rozkladné sirmé látky v česneku

Pronikavé a nezaměnitelné aroma česneku je výsledkem reakce enzymu allinasy (EC 4.4.1.4) a nebílkovinné aminokyseliny, alliinu (**3**) (obr. 2).



Obr. 2: Struktura *S*-2-allyl-L-cystein *S*-oxidu (allinu).

V neporušeném pletivu se tyto dvě látky vyskytují odděleně. Enzym allinasa je umístěný na vakuolách, zatímco alliin je umístěn v buněčné cytoplasmě. Enzymově katalyzovaným rozkladem alliinu vzniká thiosulfínát allicin (**2**) a následně několik desítek dalších sirmých sloučenin¹. Vznik rozkladných sirmých látek vznikajících v česneku při porušení pletiva je znázorněn na obr. 3.



Obr. 3: Schéma vzniku sirmých rozkladných sloučenin v česneku.

3. *Tulbaghia violacea* Harv.

3.1. Charakteristika rostliny

T. violacea je drobná česnekovitá rostlina původem z Natalu, Transvaalu a Východního Kapska v jižní Africe, kde roste na skalnatých pastvinách². Tato rostlina dorůstá výšky 30–120 cm dle podmínek, při kterých roste. Preferuje především suchá až vlhká místa v polostínu či na přímém slunci³. Její květenství tvoří přibližně 10 světle fialových květů (obr. 4)^{3,4}. Rostlina je známá pod několika názvy jako „společenský česnek“, „sladký česnek“ a „divoký česnek“ (angl. „society garlic“, „sweet garlic“ popř. „wild garlic“). Tyto lidové názvy vyjadřují přesvědčení, že navzdory svému česnekovému aroma nevzniká při její konzumaci v ústech nepříjemný pach jako při konzumaci česneku^{2,5}. Toto tvrzení je však mylné, neboť po požití listů či jiné části této rostliny se v ústech vytvoří velmi intenzivní česnekové aroma, které přetrvává několik hodin. *T. violacea* se taxonomicky řadí do stejné čeledi jako česnek, čeledi Alliaceae L. (česnekovité), avšak do rodu *Tulbaghia*.



a

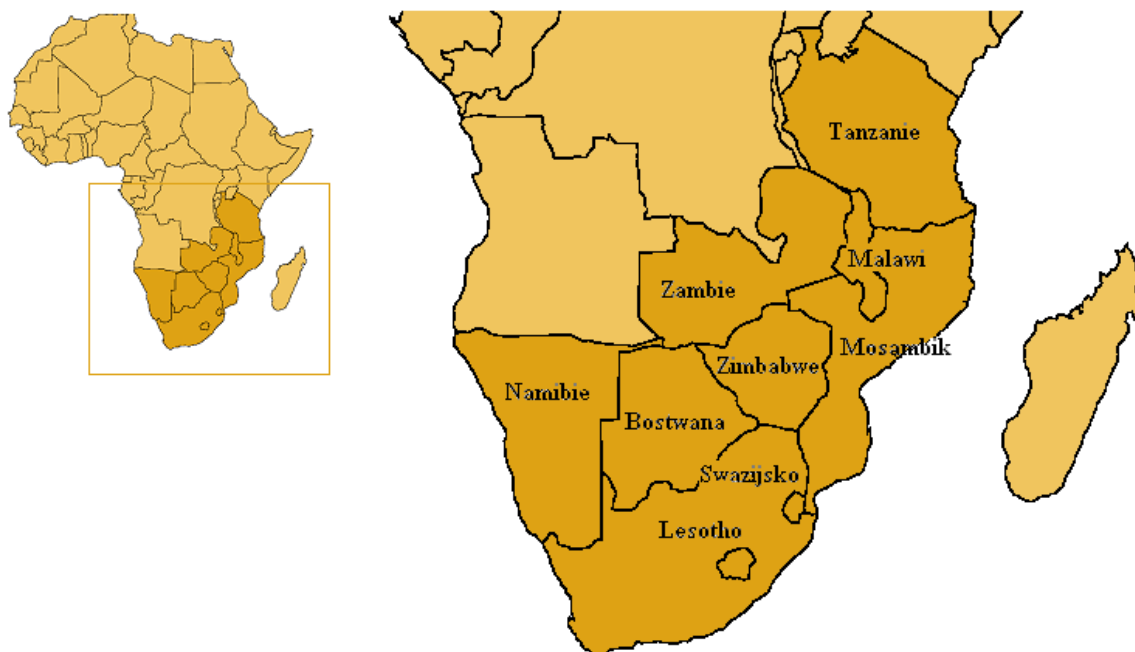


b

Obr. 4: *Tulbaghia violacea* **a**) celá rostlina **b**) detail květu⁶.

3.1.1. Rod *Tulbaghia*

Rod *Tulbaghia* L. je taxonomicky velice blízký rodu *Allium* L. a zahrnuje cca 30 druhů rostlin (tab. I), všechny původem z jižní Afriky (obr. 5). Území, na kterém rostou, se rozprostírá od jižní Tanzanie přes Malawi do Mosambiku, Zimbabwe až do Jihoafrické republiky, kde je centrum jejich výskytu. Tradičně jsou rostliny rodu *Tulbaghia* využívány v lidovém léčitelství na území jižní Afriky, kde jsou pro mnohé domorodé obyvatele jedněmi z hlavních léčivých rostlin³.



Obr. 5: Mapa ukazující přirozený výskyt rostlin rodu *Tulbaghia*.

Tab. I: Druhy rostlin rodu *Tulbaghia* s lidovými názvy.

Druh	Lidový název
<i>Tulbaghia pretoriensis</i> Vosa & Condy	divoký česnek
<i>Tulbaghia acutiloba</i> Harv.	divoký česnek, Wildeknoffel [afrikánština], lisela [Swazi]
<i>Tulbaghia aequinoctialis</i> Welw. ex Baker	divoký česnek
<i>Tulbaghia affinis</i> Link	divoký česnek
<i>Tulbaghia alliacea</i> L. f.	divoký česnek
<i>Tulbaghia bragae</i> Engl.	divoký česnek
<i>Tulbaghia calcarea</i> Engl. & K. Krause	divoký česnek
<i>Tulbaghia cameronii</i> Baker	divoký česnek
<i>Tulbaghia capensis</i> L.	divoký česnek, Wildeknoffel [afrikánština]
<i>Tulbaghia coddii</i> Vosa & Burb.	divoký česnek
<i>Tulbaghia cominsii</i> Vosa	divoký česnek
<i>Tulbaghia dregeana</i> Kunth	ajuin [afrikánština]
<i>Tulbaghia friesii</i> Suess.	divoký česnek
<i>Tulbaghia galpinii</i> Schltr.	divoký česnek
<i>Tulbaghia hypoxidea</i> Sm.	divoký česnek
<i>Tulbaghia leucantha</i> Baker	divoký česnek
<i>Tulbaghia ludwigiana</i> Harv.	voňavý divoký česnek, ingotjwa, sikwa [Swazi]
<i>Tulbaghia luebbertiana</i> Engl. & K. Krause	divoký česnek
<i>Tulbaghia macrocarpa</i> Vosa	divoký česnek
<i>Tulbaghia montana</i> Vosa	divoký česnek
<i>Tulbaghia natalensis</i> Baker	sladký divoký česnek
<i>Tulbaghia nutans</i> Vosa	divoký česnek
<i>Tulbaghia pauciflora</i> Baker	divoký česnek
<i>Tulbaghia rhodesica</i> R. E. Fr.	divoký česnek
<i>Tulbaghia simmleri</i> P. Beauv.	divoký česnek
<i>Tulbaghia tenuior</i> K. Krause & Dinter	divoký česnek
<i>Tulbaghia transvaalensis</i> Vosa	divoký česnek
<i>Tulbaghiaverdoornia</i> Vosa & Burb.	divoký česnek
<i>Tulbaghia violacea</i> Harv.	divoký česnek, Wildeknoffel [afrikánština]

3.2. Léčivé účinky a antimikrobiální aktivita rostlin rodu *Tulbaghia*

T. violacea je v lidovém léčitelství hojně užívanou rostlinou zejména v oblasti Východního Kapska pro léčbu horečky, astmatu, nachlazení, tuberkulózy, žaludečních problémů a dokonce i při léčbě rakoviny jícnu. K léčbě horečky, záchvatů, revma a obrny se zde užívá i *T. alliacea*. V Zimbabwe tato rostlina nachází uplatnění zejména v kuchyni, kde jsou její listy používány jako ochucovadlo a oddenek vařen s masem nebo pražen jako zelenina. Zaměnitelnou rostlinou s *T. violacea* a *T. alliacea* pro své zdraví prospěšné vlastnosti jsou *T. cepaea*³ a *T. simmeleri*⁴. Ovšem stejně tak jako nadměrné užívání běžných léčiv, může nadměrná konzumace těchto rostlin způsobit žaludeční problémy³.

Oddenky těchto rostlin obsahují vysoké koncentrace flavonoidů a mohou sloužit jako potenciální zdroj přírodních antioxidantů a jako prevence proti rakovině⁷.

Bungu et al.⁸ zjišťovali inhibiční schopnost methanolového extraktu listů a kořenů *T. violacea* proti buňkám způsobujících rakovinu jícnu a dospěl k závěru, že extrakt listů inhibuje 30 % rakovinotvorných buněk, tedy dvakrát více, než extrakt z kořenů této rostliny. K zajímavým zjištěním dospěli i při testování extraktů rostliny proti buňkám způsobujících rakovinu prsu a karcinom děložního hrdla. Oba extrakty inhibovaly přibližně stejné množství buněk způsobujících rakovinu prsu (~50 %) a při zjišťování inhibice buněk způsobujících karcinom děložního hrdla byla účinnost extraktu z kořenů znatelně vyšší než extraktu z listů (~55 % vs. 38 %). Nicméně bližší informace o chemické struktuře látek vykazujících tyto biologické účinky nejsou známy.

T. violacea je významnou rostlinou užívanou i při léčbě trombózy. Antitrombotické účinky zjištěné u této rostliny jsou dokonce vyšší než antitrombotické účinky česneku. Vodný extrakt kořínků rostliny prodloužil dobu sražení krve o ~44 s, zatímco vodný extrakt česneku pouze o ~5 s⁹.

Tato rostlina obsahuje také látky účinně snižující krevní tlak. Inhibiční schopnost vodného extraktu listů i kořenů rostliny proti angiotensinu (= hormon způsobující zvýšení systolického i diastolického krevního tlaku) je pozoruhodně vysoká, téměř 73 %¹⁰.

Rostlina je také výborným doplňkem pro podpoření tvorby testosteronu, čímž pomáhá udržovat a zlepšovat reprodukční schopnost¹¹.

Své opodstatnění má i její využití jako fungicidu. Fungicidní aktivita *T. violacea* proti patogenům *Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum* a *Rhizoctonia solani* je dokonce vyšší než fungicidní aktivita česneku. Vodný extrakt kořenů rostliny (50 mg/ml) má srovnatelnou aktivitu s fungicidním standardem (karbendazim/difenokonazol; 0,1 mg/ml)¹². Nepříjemným listovým patogenem způsobujícím plíseň či výskyt černých teček na hrachu setém (*Pisum sativum* L.) je i *Mycospharella pinodes*. Vodný extrakt rostliny zcela potlačil růst *M. pinodes* již při relativně nízkých koncentracích, při vyšších koncentracích byl extrakt dokonce účinnější než již výše zmíněný standardní fungicid. Díky těmto zjištěním lze rostlinu užívat k prevenci růstu nežádoucích plísní¹³. Významná je i aktivita *T. violacea* při léčbě infekce způsobené mikroorganismem *Candida albicans*. Kandidióza je nejběžnější orální infekce u HIV pozitivních pacientů projevující se od aftů až po dásňové zarudnutí¹⁴. *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* jsou zvláštní rostlinné patogeny, které způsobují mj. hnití kukuřice, arašídů a ořechů. Tyto plísně nejen že způsobují značnou ztrátu úrody, ale také produkují aflatoxiny. Vodný extrakt rostliny *T. violacea* zpomaloval růst těchto dvou plísní v závislosti na koncentraci extraktu. Extrakty rostliny tedy mohou být použity při antimykotické léčbě těchto dvou patogenů¹⁵. Extrakt celé rostliny také výrazně potlačuje růst hub jako *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Mycospharella pinodes*, *Botryosphaeria dothidea* a *Pythium ultimum*¹⁶.

Buwa a Afolayan¹⁷ uvádí (tab. II), že největší mikrobiální aktivitu (MIC = Minimum Inhibitory Concentration) proti mikroorganismům *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Mycobacterium aurum* A+ má dichlormethanový extrakt rostliny. *Mycobacterium aurum* je podobný kmenu *Mycobacterium tuberculosis*, který způsobuje tuberkulózu.

Tab. II: Antimikrobiální aktivita rostliny *Tulbaghia violacea*.

rostlina	část rostliny	rozpouštědlo	MIC [mg/ml]			
			<i>Bc</i>	<i>Ec</i>	<i>Sa</i>	<i>Ma</i>
<i>T. violacea</i>	kořínky	H ₂ O	4,166	3,125	2,600	-
		C ₂ H ₅ OH	3,125	1,560	1,560	3,125
		CH ₂ Cl ₂	0,780	0,780	0,780	0,780

Bc – *Bacillus cereus*, *Ec* – *Escherichia coli*, *Sa* – *Staphylococcus aureus*,

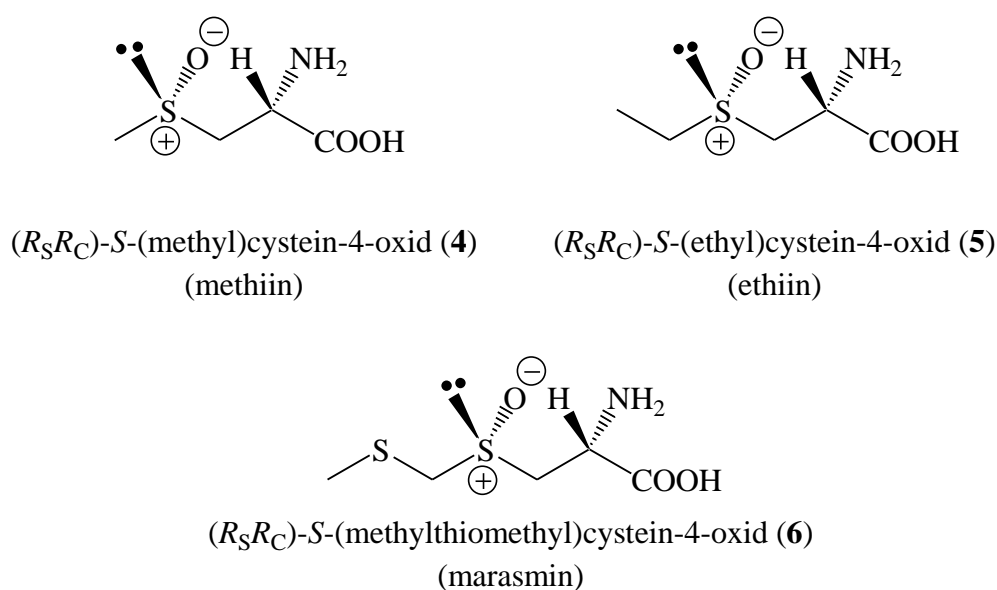
Ma – *Mycobacterium aurum*

Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací extraktů *T. violacea* proti *E. coli* zjištěnými Buwou a Afolayanem¹⁷ se však poněkud liší od hodnot, jež uvádí Ncube et al.¹⁸. Hodnota MIC vodného extraktu byla 12,5 mg/ml, ethanolového extraktu 3,125 mg/ml a dichlormethanového pak 3,125 mg/ml.

Extrakt *T. violacea* také výrazně potlačuje růst bakterií *Clavibacter michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* a *Xanthomona scampestris*¹⁵.

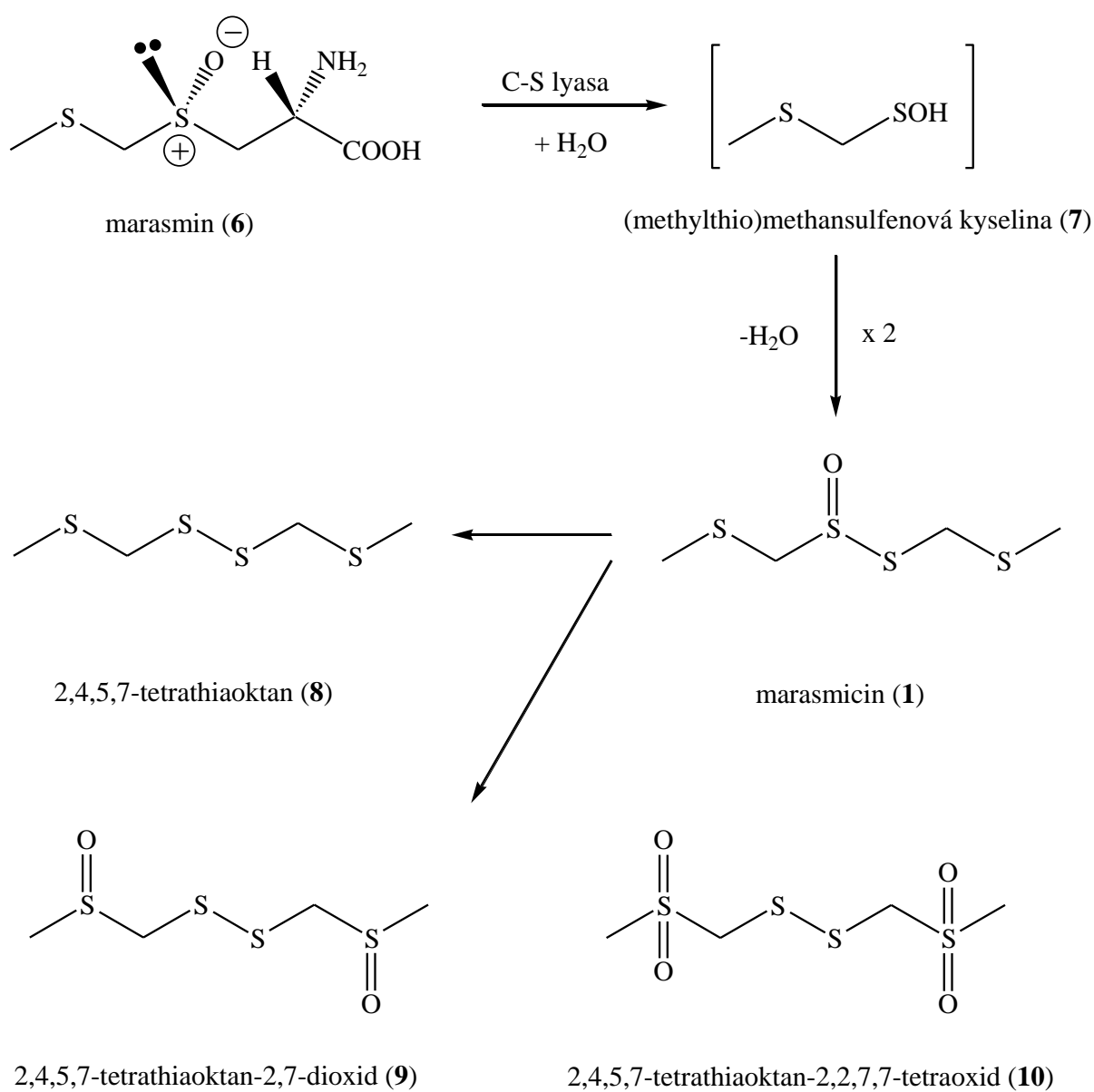
3.3. Sirné látky v *Tulbaghia violacea*

Kubec et al.^{2,5} identifikovali v rostlině *T. violacea* tři substituované deriváty cysteinu – *S*-methylcystein *S*-oxid (methiin) (4), *S*-ethylcystein *S*-oxid (ethiin) (5) a *S*-(methylthiomethyl)cystein *S*-oxid (marasmin) (6) (obr. 6). První dvě aminokyseliny byly však přítomny pouze ve stopovém množství, kdežto *S*-(methylthiomethyl)cystein *S*-oxid se vyskytuje jako majoritní složka. Struktura a absolutní konfigurace této látky byly určeny jako (*R*_S, *R*_C)-*S*-(methylthiomethyl)cystein-4-oxid (6). Tato látka, avšak s opačnou absolutní konfigurací sulfoxidové skupiny, (*S*_S, *R*_C)-*S*-(methylthiomethyl)cystein-4-oxid, byla poprvé izolována z několika hub rodu *Marasmius* Fr., proto se tato aminokyselina označuje triviálním názvem marasmin.



Obr. 6: Struktura *S*-substituovaných derivátů cysteinu v *Tulbaghia violacea* – methiin (4), ethiin (5) a marasmin (6).

Bylo zjištěno, že proces enzymatického štěpení marasminu je analogický štěpení alliinu v česneku a v jiných česnekovitých druzích. Primární rozkladnou látkou marasminu, (*R_S*, *R_C*)-*S*-(methylthiomethyl)cystein-4-oxidu (6), je thiosulfinát 2,4,5,7-tetrathiaoktan-4-oxid (1). Tato sloučenina byla pojmenována triviálním názvem marasmicin (analogicky k názvu allicin vznikajícího z alliinu). Vzniká kondenzací dvou molekul (methylthio)methansulfenové kyseliny (7) po předchozím rozkladu marasminu (6) C-S lyasou^{2,5}. Stejně jako ostatní thiosulfináty je i marasmicin relativně nestálý a rozkládá se na další produkty. Výčet chemických sloučenin, které by mohly vznikat z marasminu, jsou znázorněny na obr. 7⁵.



Obr. 7: Schéma tvorby rozkladných sírných látek v rostlině *Tulbaghia violacea*.

3.4. Způsoby zjišťování antimikrobiální aktivity

Nejjednodušším způsobem zjištění antimikrobiální aktivity zkoumané látky (popř. extraktu) je její stanovení pomocí agarové difúzní metody nebo užitím mikrodilučních metod, jimiž lze určit minimální inhibiční koncentraci (MIC) stanovované látky zcela potlačující růst mikroorganismů. Standardním postupem posouzení antimikrobiální aktivity je disková difúzní metoda¹⁹.

3.4.1. Disková difúzní metoda

Při užití diskové difúzní metody k zjištění antimikrobiální aktivity stanovované látky je agarová půda naočkována rovnoměrnou vrstvou bakteriální suspenze o definované hustotě. Na tento agar je pak umístěn papírový disk s danou koncentrací sledované látky. Po specifické době inkubace jsou měřeny průměry inhibičních zón kolem každého disku¹⁹.

3.4.2. Mikrodiluční metoda

Pro zjištění nejnižší koncentrace antibiotika, které je schopno inhibovat růst daného mikroorganismu (minimální inhibiční koncentrace, angl. minimum inhibition concentration MIC), slouží diluční metoda. Do každé jamky je nanesena testovaná látka o různé koncentraci, jež je následně naočkována standardním množstvím bakteriální suspenze. Po určité době inkubace je zjišťováno zakalení roztoku a tím schopnost růstu mikroorganismu. Hodnota MIC je nejnižší koncentrace látky, která zcela inhibuje růst mikroorganismu¹⁹.

4. Experimentální část

4.1. Použité přístroje, chemikálie, rostlinný materiál a testované mikroorganismy

4.1.1. Chemikálie

Během experimentální práce byly použity dichlormethan (99,5 %), bezvodý síran hořečnatý čistý, hydroxid sodný (min. 98 %) a kyselina octová (99,8 %) od firmy LACH-NER (Neratovice, ČR), acetonitril (min. 99,8 %) od firmy J. T. BAKER (Dublin, Irsko), ethanol (min. 99,9 %) od firmy MERCK (Darmstadt, Německo), diallyldisulfid (80 %) od firmy SIGMA-ALDRICH (Německo), peroxid vodíku nestabilizovaný (30 %) a hydroxid sodný (min. 85 %) od firmy LACHEMA (Brno, ČR) a destilovaná, popř. redestilovaná voda.

4.1.2. Použité přístroje a zařízení

Kromě běžných laboratorních zařízení a laboratorního skla byly během experimentální práce použity biologický termostat BT 120, očkovací kličky Gama group a.s., mikrotitrační destičky FALCON 3077, antibiotické disky ampicilin 10 a gentamicin 10 BD Sensi-Disc (Německo), spektrofotometr TECAN SPECTRA, vyhřívaná a chlazená třepačka Biosan TS-100 C a systém pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s detektorem diodového pole (HPLC/DAD) a detekcí hmotnostním spektrometrem (HPLC/MS).

- **Chromatografický systém HPLC/DAD**

Součástí chromatografického systému byly vysokotlaká pumpa Varian ProStar 210, detektor diodového pole (DAD) Varian ProStar 210, analytická kolona Varian Microsorb-MV 1005 C-8 o rozměrech 250 × 4,6 mm (5 μm) a preparativní kolona Varian Dynamax Microsorb 1005 C-18 o rozměrech 250 × 21,4 mm (5 μm). Vzorek byl nanášen do dávkovací smyčky stříkačkou Hamilton Varian o objemu 25 μl, popř. jednorázovou injekční stříkačkou NORM-JECT o objemu 1 ml.

- **Chromatografický systém HPLC/MS**

Součástí HPLC/MS systému byl spektrometr Thermo LTQ XL připojený na automatický dávkovač vzorku ACCELA a kapalinový chromatograf ACCELA 600 od firmy THERMO SCIENTIFIC s detektorem UV 1000 od firmy THERMO FINNIGAN. Zapojena byla analytická kolona Varian Microsorb-MV 1005 C-8 o rozměrech 250 × 4,6 mm (5 μm).

4.1.3. Živné půdy

Při přípravě živných půd byly použity agar ST, živný agar č. 2 a kvasničný autolyzát od firmy IMUNA PHARM a.s. (Šarišské Michľany, SR), enzymový kaseinový hydrolyzát (trypton) od firmy SCHARLAU (Barcelona, Španělsko), sójový pepton od firmy FLUKA (Buchs, Švýcarsko), chlorid sodný (min. 99,9 %) od firmy PENTA (Praha, ČR) a glukosa od firmy LACHEMA (Brno, ČR). Bramboro-dextrózový agar byl zakoupen od firmy HIMEDIA (Mumbai, Indie).

Živná půda trypton sójového agaru (TSA), použitá při testování mikrobiální vlastností látek proti lidským bakteriím, byla připravena smícháním 3,75 g enzymatického kaseinového hydrolyzátu (tryptonu), 1,25 g sójového peptonu, 1,25 g chloridu sodného a 3,75 g agaru a doplněna na 250 ml destilovanou vodou. Hodnota pH byla upravena pomocí 1 M NaOH na hodnotu 7,2.

Živná půda masopeptonového agaru (MPAg), použitá při testování antimikrobiálních vlastností látek proti rostlinným bakteriím, byla připravena smícháním 10 g živného agaru č. 2, 2,5 g glukosy, 1,25 g kvasničného autolyzátu a 5 g agaru ST a doplněna na 250 ml destilovanou vodou. Hodnota pH byla upravena pomocí 1 M NaOH na hodnotu 7,2.

Živná půda bramboro-dextrózového agaru (PDA), použitá při testování mikrobiální vlastností látek proti kvasince, byla již zakoupena jako namíchaná směs. Množství 9,75 g bylo doplněno do 250 ml destilovanou vodou.

Všechny živné agary byly sterilizovány 20 min v autoklávu při teplotě 121°C.

4.1.4. Testované mikroorganismy

Seznam testovaných mikroorganismů a jejich stručná charakteristika jsou znázorněny v tab. III.

Tab. III: Souhrn a charakteristika testovaných mikroorganismů.

testovaný mikroorganismus	identifikační kód	G ⁺ /G ⁻	optimální teplota růstu [°C]
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 869 2/91	G ⁺	30
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954 03/11	G ⁻	37
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 1048 04/10	G ⁺	30
<i>Clavibacter michiganensis</i> *	RICP 1297/99	G ⁺	25
<i>Erwinia amylovora</i>	RICP 121A, 3901	G ⁻	25
<i>Xanthomonas axonopodis</i> **	LMG 931	G ⁻	25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	---	-	25

* *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*

** *Xanthomonas axonopodis pv. vesicatoria*

4.1.5. Testovaná antibiotika

Jako standardní antibiotika byly použity tetracyklin hydrát (99 %), gentamicin sulfát, chloramfenikol (min. 98 %) a ampicilin - sodná sůl (min. 98 %) od firmy SIGMA-ALDRICH (Německo).

4.1.6. Rostlinný materiál

Pro izolaci marasmicinu byly použity lyofilizované kořeny *T. violacea*. Tato rostlina byla získána od Liz Powney (NCCPG National Collection of *Tulbaghia*, Prime Perennials Nursery, Llanilar, Aberystwyth, UK) a dále pěstována v areálu Jihočeské univerzity.

4.2. Extrakce rozkladných látek z *Tulbaghia violacea*

Navážka 37 g lyofilizovaných kořínků byla rozmixována s 800 ml destilované vody a ponechána 30 minut stát při laboratorní teplotě. Směs byla přefiltrována za sníženého tlaku přes Büchnerovu nálevku opatřenou tkaninou a filtrační koláč byl znovu rozmixován se stejným objemem destilované vody a zfiltrován.

Filtrát byl extrahován dichlormethanem v poměru 1:2 (v:v). V důsledku vzniku emulze bylo nutno směs centrifugovat při 12 000 ot./min po dobu 4 minut. Po oddělení organické fáze byla vodná fáze znovu extrahována dichlormethanem v poměru 1:1 (v:v). Organické fáze byly spojeny, přesušeny bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědlo bylo následně odpařeno na rotační vakuové odparce při teplotě 26°C. Byl získán žlutý silně aromatický extrakt, který byl následně analyzován pomocí HPLC.

Pro získání dostatečného množství rozkladných látek z rostliny *T. violacea* byl tento postup několikrát opakován s průměrným výtěžkem rozkladných látek 1,68 %.

4.3. Identifikace marasmicinu

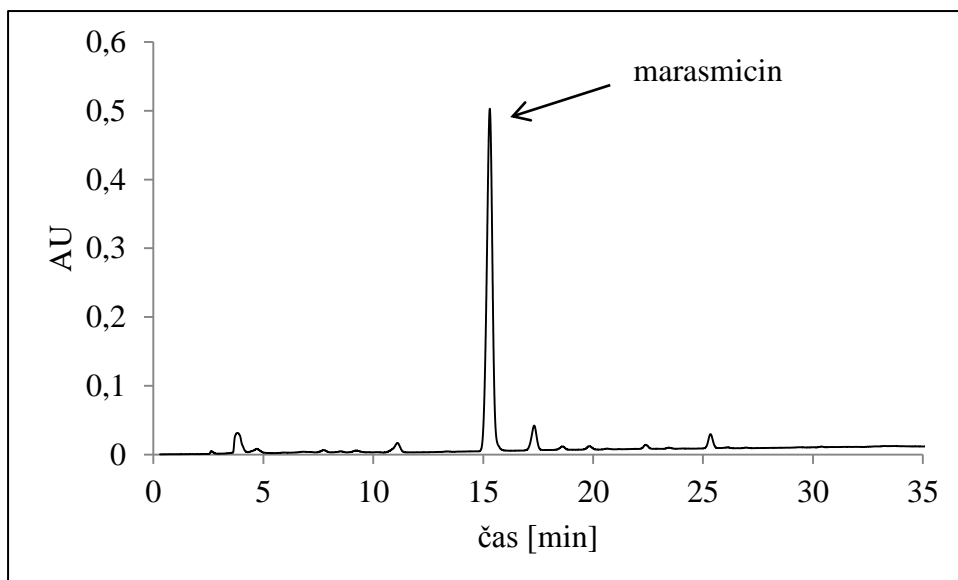
4.3.1. Analýza marasmicinu pomocí HPLC/DAD

Analýza získaného extraktu byla prováděna užitím vysokoúčinného kapalinového chromatografu připojeného na detektor diodového pole ($\lambda = 210$ nm). Eluce probíhala po dobu 35 min s nastaveným průtokem 0,9 ml/min (tab. IV). Do chromatografického systému byla zapojena analytická kolona C-8, na kterou byl nastříknut objem 20 μ l vzorku.

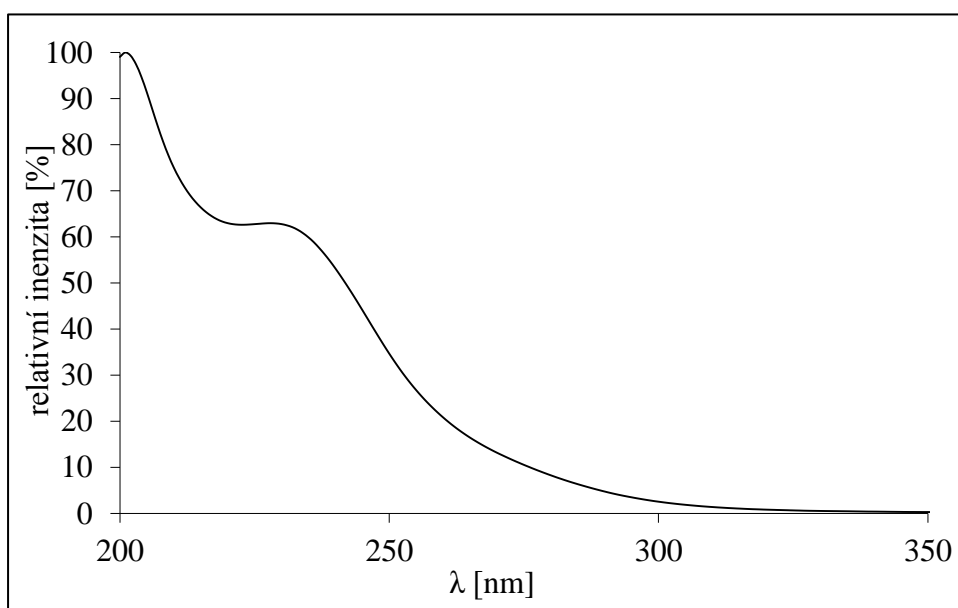
Tab. IV: Eluční gradient mobilních fází.

mobilní fáze [%]	čas [min]				
	0	16	20	30	35
H ₂ O	80	61	15	15	80
CH ₃ CN	20	39	85	85	20

Po skončení nastavené analytické metody byl získán chromatogram rozkladných látek v rostlině *T. violacea* (obr. 8) a UV spektrum marasmicinu (obr. 9).



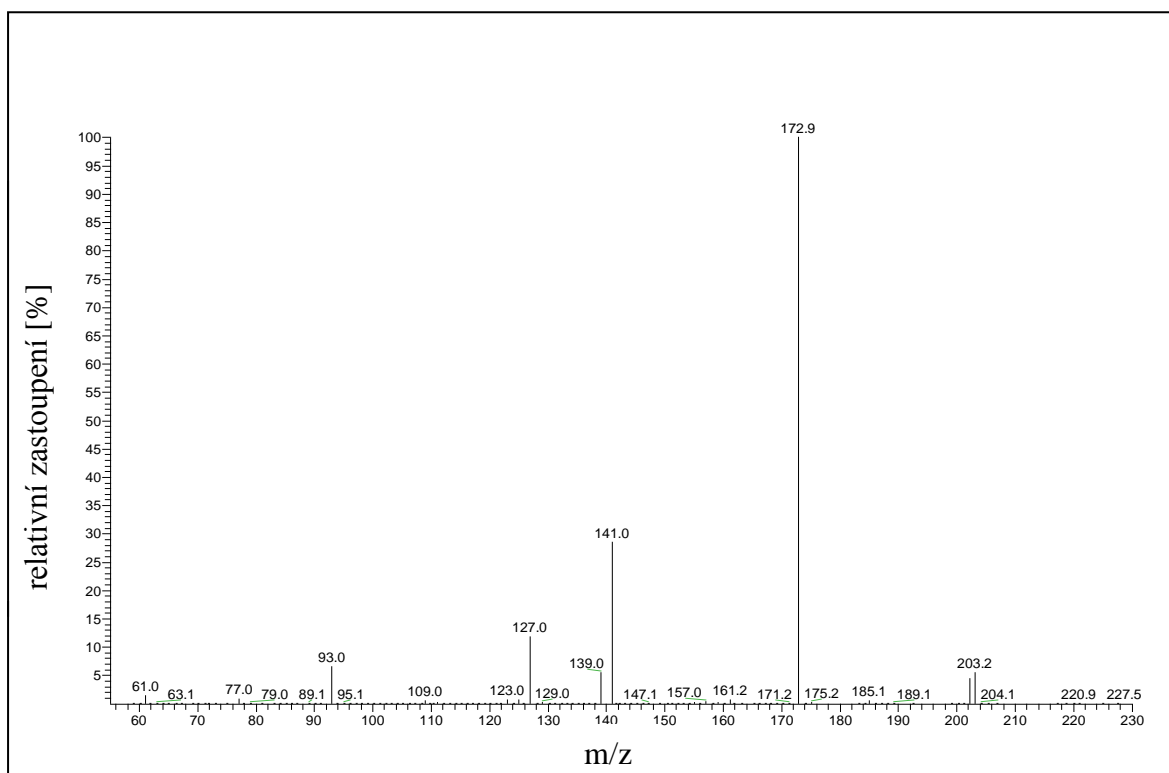
Obr. 8: Chromatogram rozkladných látek v *Tulbaghia violacea*.



Obr. 9: UV spektrum marasmicinu.

4.3.2. Identifikace marasmicinu pomocí HPLC/MS

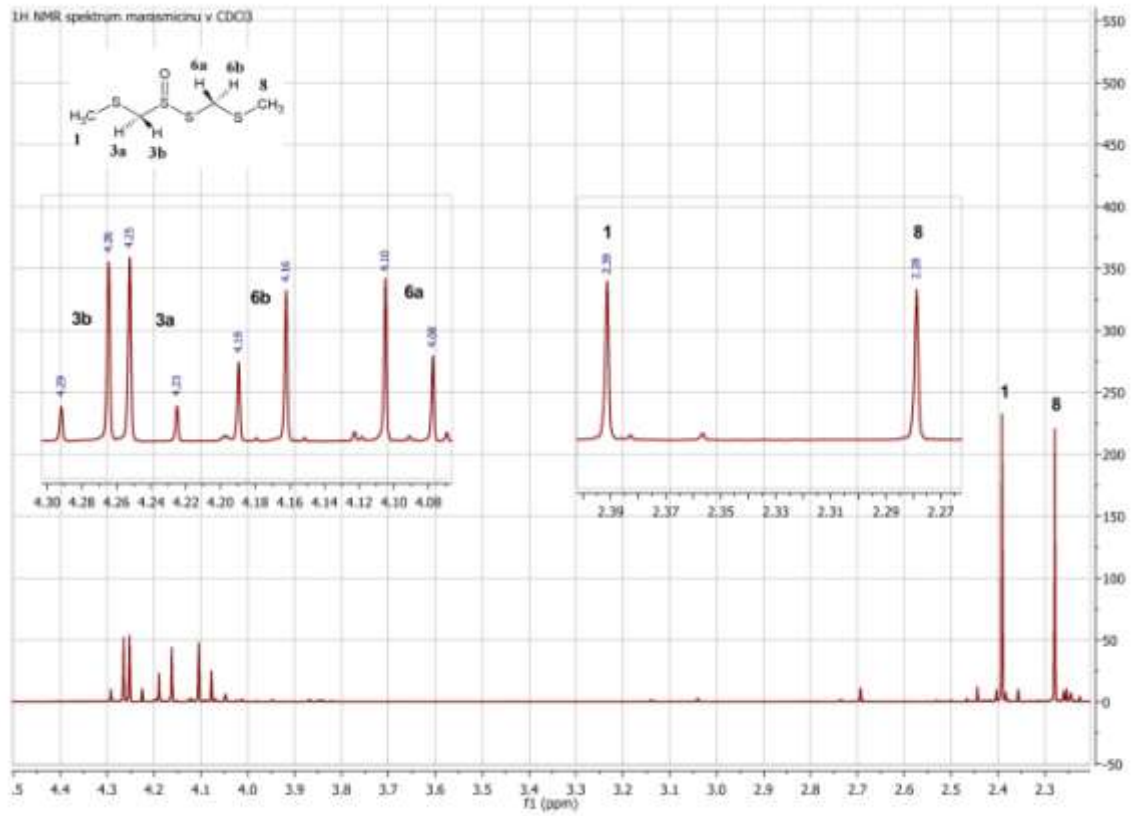
Ve směsi rozkladných látek byl marasmicin identifikován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s následnou detekcí hmotnostním spektrometrem (HPLC/MS), jež byla prováděna Ing. Pavlou Kružberskou (Biologické centrum AV ČR). Molekuly rozkladných látek byly ionizovány a děleny dle odpovídajícího poměru hmotnosti a náboje (m/z). Potvrzení struktury marasmicinu bylo provedeno analýzou vzniklých fragmentů při MS/MS (obr. 10).



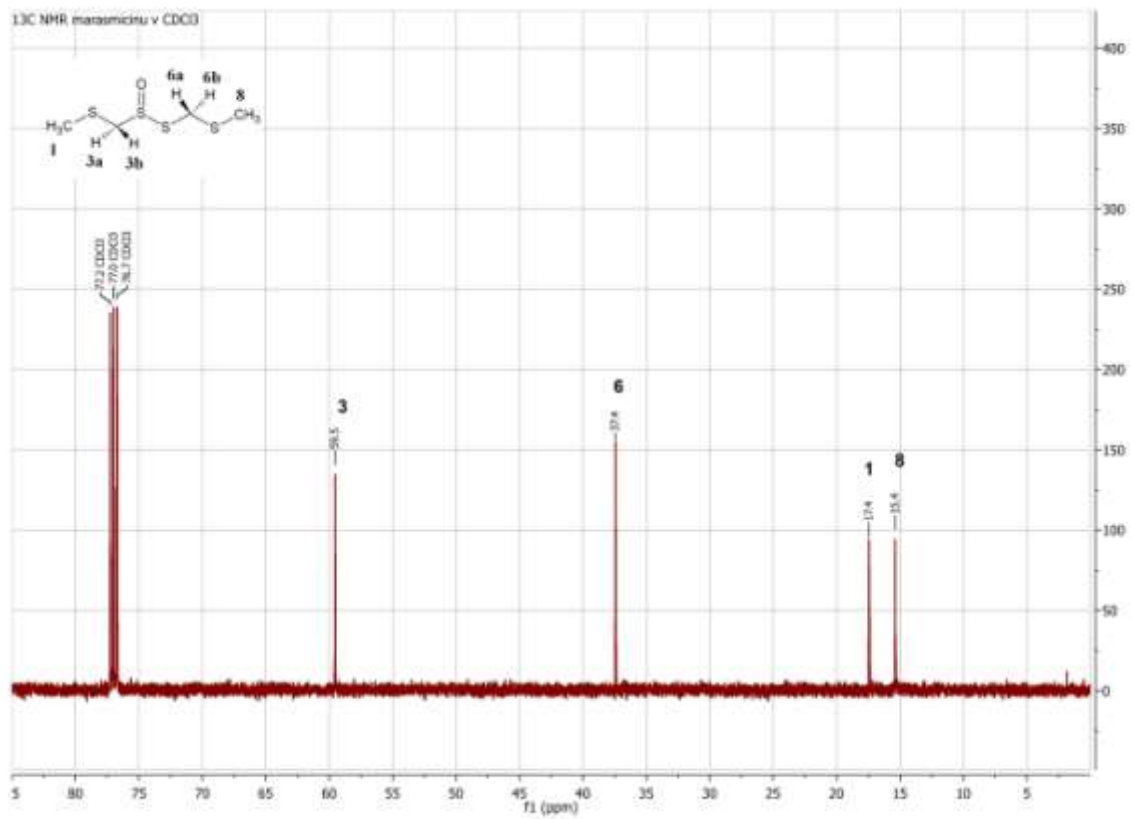
Obr. 10: MS/MS spektrum marasmicinu.

4.3.3. Identifikace marasmicinu pomocí NMR

Předpokládaná struktura izolovaného marasmicinu byla jednoznačně potvrzena pomocí NMR spektrometrie. ^1H a ^{13}C NMR spektra marasmicinu byla změřena Prof. RNDr. Janem Schramlem, DrSc. (Ústav chemických procesů, AV ČR). Spektra byla měřena v CDCl_3 na NMR spektrometru Varian INOVA (500 MHz). NMR spektra marasmicinu jsou uvedena na obr. 11 a 12.



Obr. 11: ¹H NMR spektrum marasmicinu.



Obr. 12: ¹³C NMR spektrum marasmicinu.

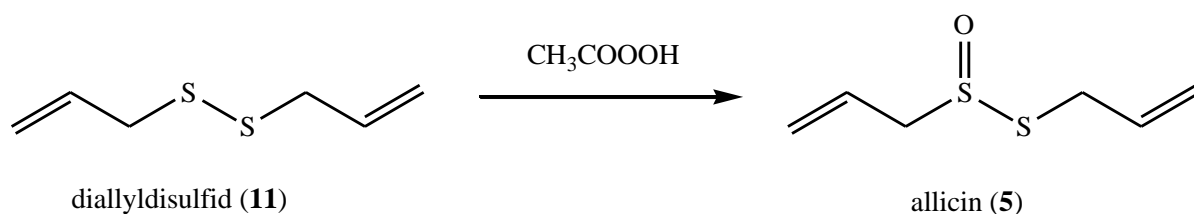
4.4. Izolace marasmicinu

Pro izolaci marasmicinu ze směsi rozkladných látek byl použit stejný HPLC gradient jako při jeho identifikaci, avšak s nastaveným průtokem 18 ml/min. Do chromatografického systému byla zapojena preparativní kolona C-18, na kterou byl vždy nastříkovan objem 1 ml vzorku, následně byla jímána látka s retenčním časem 15,4 minut, jež byla identifikována jako marasmicin.

Z najímaných frakcí byl pomocí rotační vakuové odparky odstraněn acetonitril při 30°C a vzniklý vodný roztok byl dvakrát extrahován dichlormethanem v poměru 1:0,75 (v:v). Spojené organické fáze byly přesušeny bezvodým síranem hořečnatým a organické rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce při 26°C. Byla získána žlutá viskózní silně aromatická kapalina, u které byla následně zjišťována antimikrobiální aktivita.

4.5. Syntéza allicinu (*S*-allyl-2-propenthiosulfinátu)

V roztoku 10 ml acetonitrilu a 10 ml kyseliny octové bylo rozpuštěno 7,3 ml 0,05 M ($3,7 \times 10^{-4}$ mol) diallyldisulfidu (**11**). Za stálého míchání při 0°C byla přikapávána peroxyoctová kyselina (do bílého zakalení roztoku), která byla připravena smícháním 4,5 ml 30 % peroxidu vodíku (0,15 mol) a 7 ml kyseliny octové. Reakční schéma syntézy allicinu je znázorněno na obr. 13. Po 5 hodinách míchání byla hodnota pH reakční směsi upravena roztokem hydroxidu draselného na hodnotu 5,0. Vzniklá směs byla extrahována 4 × 50 ml dichlormethanu. Organická fáze byla přesušena bezvodým síranem hořečnatým a organické rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce.



Obr. 13: Syntéza allicinu pomocí kyseliny peroxyoctové.

4.6. Identifikace allicinu

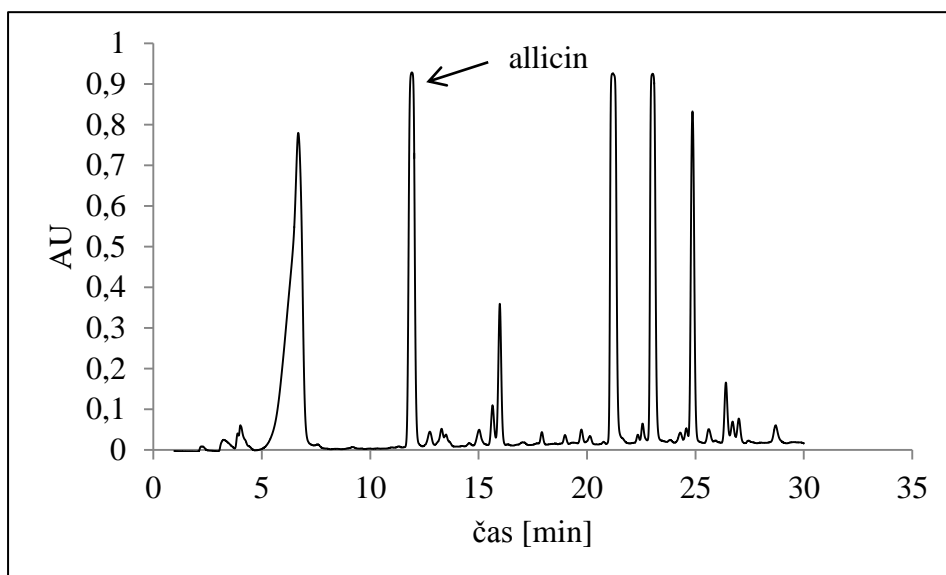
4.6.1. Analýza allicinu pomocí HPLC/DAD

Identifikace allicinu v získané reakční směsi byla prováděna užitím vysokoúčinného kapalinového chromatografu připojeného na detektor diodového pole ($\lambda = 210 \text{ nm}$). Separace probíhala po dobu 22 min s nastaveným průtokem 0,9 ml/min (tab. V). Do chromatografického systému byla zapojena analytická kolona C-8, na kterou byl nastříknut objem 20 μl vzorku.

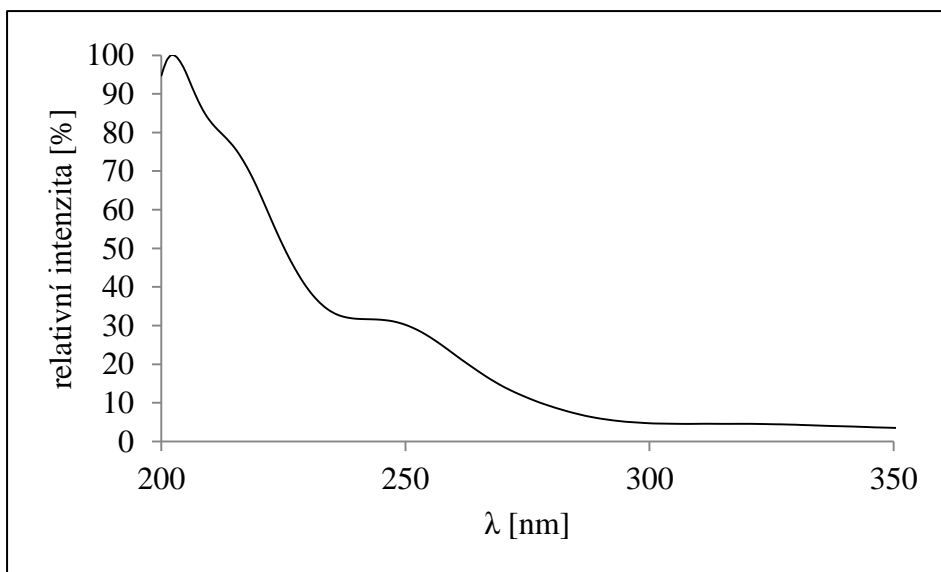
Tab. V: Eluční gradient mobilních fází.

mobilní fáze [%]	čas [min]				
	0	15	17	20	22
H ₂ O	85	30	10	10	85
CH ₃ CN	15	70	90	90	15

Pomocí této analytické metody byl získán chromatogram všech látek přítomných v reakční směsi (obr. 14) a po identifikaci allicinu bylo získáno jeho UV spektrum (obr. 15).



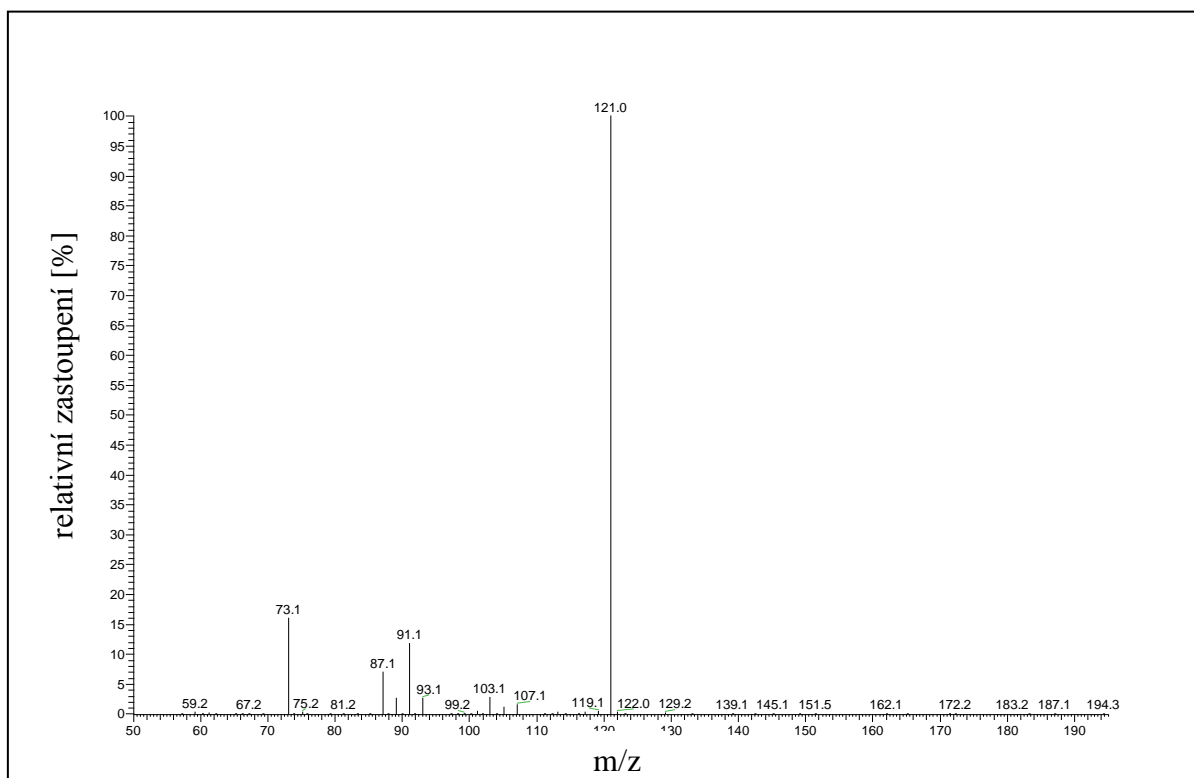
Obr. 14: Chromatogram syntetizovaných látek.



Obr. 15: UV spektrum allicinu.

4.6.2. Identifikace allicinu pomocí HPLC/MS

Identifikace allicinu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s následnou detekcí hmotnostním spektrometrem byla prováděna stejným způsobem jako identifikace marasmicinu (viz kap. 4.3.2). Potvrzení struktury allicinu bylo provedeno pomocí vzniklých fragmentů při MS/MS (obr. 16).



Obr. 16: MS/MS spektrum allicinu.

4.7. Izolace allicinu

Pro izolaci allicinu z reakční směsi byla použita stejná metoda jako při jeho identifikaci, avšak s nastaveným průtokem 18 ml/min. Do chromatografického systému byla zapojena preparativní kolona C-18, na kterou byl vždy nastříkovan objem 1 ml vzorku a následně byla jímána látka s retenčním časem 12,0 minut, jež byla pomocí HPLC/MS identifikována jako allicin.

Z této frakce byl na rotační vakuové odparce odpařen acetonitril při 30°C a vodný roztok byl dvakrát extrahován dichlormethanem v poměru 1:0,75 (v:v). Spojené organické fáze byly přesušeny bezvodým síranem hořečnatým a organické rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce při 26°C. Byla získána silně aromatická kapalina, u které byla následně zjišťována antimikrobiální aktivita, s níž byla porovnávána antimikrobiální aktivita marasmicinu.

4.8. Zjišťování antimikrobiální aktivity marasmicinu

4.8.1. Disková difúzní metoda

Byla zkoumána antimikrobiální aktivita marasmicinu proti rostlinným (*Clavibacter michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas axonopodis*) a živočišným (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*) bakteriím a proti kvasince (*Saccharomyces cerevisiae*) a porovnána s antimikrobiální aktivitou allicinu. Antimikrobiální aktivity obou látek byly dále porovnány se standardními antibiotiky (ampicilin, gentamicin) o koncentraci 2 mg/ml. Optimálně narostlé bakterie na živném agaru byly odebrány do sterilní demineralizované vody a byla připravena bakteriální suspenze o hustotě 10^9 CFU/ml. Na Petriho misky s živným agarem bylo nanášeno 0,5 ml této suspenze, rovnoměrně rozetřeno a ponecháno cca 3 hodiny, aby došlo k jejímu zapaštění. Na papírové disky o průměru 6 mm bylo nanášeno 5 μ l roztoku látky, u níž byla zjišťována antimikrobiální aktivita proti mikroorganismům. Byly nanášeny vždy koncentrace 8, 4, 2 a 1 mg/ml roztoku v ethanolu. Napuštěné disky byly ponechány několik minut, aby se ethanol odpařil a pak byly pokládány na živný agar se zapaštěnou bakteriální suspenzí.

4.8.2. Mikrodiluční metoda v bujónu

Minimální inhibiční koncentrace marasmicinu (MIC) byla zjišťována proti živočišným bakteriím (*E. coli*, *M. luteus* a *B. cereus*) a porovnána s MIC allicinu. Tyto hodnoty uvedené v tab. VII byly dále porovnány s MIC standardních antibiotik (ampicilin, gentamicin, tetracyklin, chloramfenikol). Testování bylo prováděno užitím mikrodiluční metody na mikrotitračních destičkách s 96 jamkami vždy dvakrát po třech měřeních. Byl připraven roztok látky v ethanolu, u níž byla testována antimikrobiální aktivita, o koncentraci 5120 mg/ml, roztok byl $10\times$ zředěn živným bujónem a do první jamky bylo nanášeno 200 μ l. Testovaná látka byla ředěna v mikrotitrační destičce od koncentrace 512 do 1 μ g/ml živným bujónem tak, aby ve všech jamkách byl celkový objem 100 μ l (antibiotika byla ředěna od koncentrace 64 do 0,25 μ g/ml a v případě testování tetracyklinu proti *B. cereus* bylo antibiotikum ředěno od koncentrace 16 do 0,0625 μ g/ml). Následně bylo přidáno 5 μ l bakteriální suspenze o koncentraci 10^7 CFU/ml, obsah destičky byl promísen na třepačce a byla změřena absorbance při vlnové délce 405 nm. Mikrotitrační destička s roztoky byla

ponechána 23 hodin v termostatu při optimální teplotě růstu daného mikroorganismu. Po inkubaci byly směsi v jednotlivých jamkách opět promíchány a zakalení roztoku (a tím i nárůst mikroorganismu) bylo změřeno spektrofotometrem při vlnové délce 405 nm. Z rozdílu absorbancí a ze znalosti absorbance roztoku bujónu s bakterií (kontrola nárůstu odpovídající hodnotě 100 %), bylo spočteno % nárůstu bakterie v dané jamce a určena MIC. Kvůli časové náročnosti a nutnosti pravidelného měření zakalení roztoku tuto metodu z větší části prováděla Ing. Petra Krejčová (ústav aplikované chemie, ZF JU).

5. Výsledky

Po odečtení velikostí inhibičních zón vytvořených kolem papírového disku po optimální době růstu každého z mikroorganismů byly tyto hodnoty zprůměrovány a zaznamenány v tab. VI.

Tab. VI: Velikost inhibičních zón [mm] při testování mikrobiální aktivity marasmicinu proti mikroorganismům v porovnání s mikrobiální aktivitou allicinu a standardních antibiotik [mg/ml].

MO*	marasmicin				allicin				ampicilin	gentamicin
	8	4	2	1	8	4	2	1	2	2
<i>Bc</i>	10	8	-	-	7	-	-	-	-	11
<i>Ec</i>	12	11	10	8	12	12	10	9	11	18
<i>Ml</i>	9	7	-	-	10	-	-	-	35	14
<i>Cm</i>	22	18	14	10	28	19	13	10	35	21
<i>Xa</i>	12	10	8	7	18	14	10	8	24	26
<i>Ea</i>	11	10	7	-	18	12	7	-	8	8
<i>Sc</i>	13	10	10	7	16	12	9	7	-	-

*MO=testovaný mikroorganismus

Bc – *Bacillus cereus*, *Ec* – *Escherichia coli*, *Ml* – *Micrococcus luteus*, *Cm* – *Clavibacter michiganensis*, *Xa* – *Xanthomonas axonopodis*, *Ea* – *Erwinia amylovora*, *Sc* – *Sacharomyces cerevisiae*

Po změření absorbance roztoků v jednotlivých jamkách byla zjištěna MIC marasmicinu a porovnána s MIC allicinu a standardními antibiotiky (tab. VII).

Tab. VII: Hodnoty MIC marasmicinu a allicinu proti živočišným bakteriím porovnána s MIC standardních antibiotik.

mikroorganismus/MIC[μ g/ml]	all*	mar*	amp*	gen*	tet*	chl*
<i>Escherichia coli</i>	32	64	8	2	1	4
<i>Micrococcus luteus</i>	32	32	0,25	2	0,25	1
<i>Bacillus cereus</i>	32	32	32	1	0,03125	4

*all=allicin, mar=marasmicin, amp=ampicilin, gen=gentamicin, tet=tetracyklin, chl=chloramfenikol

6. Diskuze

Diskovou difúzní metodou bylo zjištěno, že marasmicin vykazoval velice podobné antimikrobiální vlastnosti proti testovaným mikroorganismům jako allicin. Zároveň nebyly pozorovány jednoznačné rozdíly v aktivitě proti Gram-negativním a Gram-positivním bakteriím.

Proti kmenu *B. cereus*, který je původcem průjmů a nevolností vyvolaných po požití kontaminované potravy,²⁰ působí marasmicin dokonce jako silnější antibiotikum než allicin. Při koncentraci marasmicinu 8 mg/ml se kolem papírového disku vytvořila inhibiční zóna o průměru 10 mm, zatímco při testování allicinu jako antibiotika byla velikost inhibiční zóny pouze 7 mm. Při koncentracích 4 mg/l a menší se inhibiční schopnost allicinu vůbec neprojevila oproti marasmicinu, který při koncentraci 4 mg/ml inhiboval růst bakterie v zóně o průměru 8 mm od místa nanesení.

Při léčbě či prevenci močových infekcí a cestovatelských průjmů, které jsou často způsobeny bakterií *E. coli*,²⁰ vykazují marasmicin i allicin podobné biologické vlastnosti.

Lepší antimikrobiální aktivitu proti *M. luteus*, který je u osob s oslabenou imunitou spojován s bakteriemiemi, projevoval roztok marasmicinu o koncentraci 4 mg/ml inhibiční schopnost, zatímco stejně koncentrovaný roztok allicinu nikoliv.

Při testování proti mikroorganismům *C. michiganensis* (bakterie způsobující vadnutí a rakovinu rajčat²¹), *X. axonopodis* (způsobuje bakteriální skvrnitost listů²²), *E. amylovora* (původce spály růžokvětých rostlin²³) a *S. cerevisiae* (kvasnice užívaná při kvasných procesech v pivovarnictví a pekařství) vykazoval allicin nepatrně vyšší schopnost inhibice než marasmicin.

Při porovnání antimikrobiální aktivity marasmicinu se standardními antibiotiky lze říct, že marasmicin vykazoval velice podobnou inhibiční schopnost proti *E. coli* jako stejně koncentrovaný roztok ampicilinu. Inhibiční schopnost marasmicinu proti *E. amylovora* byla téměř shodná s inhibičními schopnostmi standardních antibiotik gentamicinu a ampicilinu.

Koncentrace roztoku allicinu, která je schopna inhibovat růst *E. coli*, je 2× nižší než koncentrace marasmicinu. Inhibiční schopnost zcela potlačit růst *M. luteus* a *B. cereus* byla dosažena při použití stejně koncentrovaných roztoků marasmicinu a allicinu (32 µg/ml).

Zjištěné hodnoty MIC marasmicinu proti testovaným mikroorganismům (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia amylovora* a *Sacharomyces cerevisiae*) nelze jednoduše porovnávat s již publikovanými výsledky, protože dosud byla zjišťována pouze MIC extraktu *T. violacea* (nikoliv čistého marasmicinu) proti *E. coli*. Zjištěná hodnota MIC marasmicinu proti *E. coli* byla rovna 0,064 mg/ml a ta se velice liší od hodnot uváděných autory Ncube et al.¹⁸ (MIC=3,1 mg/ml) a Buwou a Afolayanem¹⁷ (MIC=1,56 mg/ml). Důvodem neshodnosti mezi naměřenou a publikovanými hodnotami je již dříve zmíněný, že v uvedených pracích^{17,18} nebyl testován čistý marasmicin, který je s vysokou pravděpodobností hlavní antimikrobiální složkou rostlin *Tulbaghia*, ale pouze nepřečištěný extrakt. Odlišnost hodnot MIC uváděných autory Ncube et al.¹⁸ a Buwou a Afolayanem¹⁷ může být způsobená tím, že velikost hodnot MIC extraktů závisí na tom, v jakém ročním období byla rostlina sbírána. Například na jaře, v létě a v zimě jsou hodnoty MIC extraktu rostliny proti *E. coli* shodné (MIC=3,13 mg/ml), avšak při extrakci rostliny sbírané na podzim klesne hodnota MIC na hodnotu 1,56 mg/ml²⁴.

7. Závěr

Z rostliny *T. violacea* byla vyextrahována majoritní rozkladná látka, marasmicin, jejíž struktura byla potvrzena pomocí spektrálních metod (MS, NMR). Zároveň se podařilo syntetizovat a přečistit allicin, hlavní sirnou sloučeninu česneku. Antimikrobiální vlastnosti marasmicinu i allicinu byly testovány proti živočišným mikroorganismům (*B. cereus*, *E. coli*, *M. luteus*), bakteriálním škůdcům rostlin (*C. michiganensis*, *X. axonopodis*, *E. amylovora*) a kvasince (*S. cerevisiae*) pomocí diskové difúzní metody proti všem mikroorganismům, zatímco mikrodiluční metoda, z důvodu časové tísně, byla provedena pouze u živočišných bakterií. Naměřené hodnoty antimikrobiální aktivity marasmicinu byly porovnány s antimikrobiální aktivitou allicinu a standardních antibiotik. Bylo zjištěno, že antimikrobiální aktivity marasmicinu a allicinu jsou velice podobné, v případě testování marasmicinu proti kmeni *B. cereus* diskovou difúzní metodou vyšší než hodnoty získané u allicinu. Na základě výsledků měření lze konstatovat, že rostlinu *T. violacea* je možné využívat jako alternativní léčivý prostředek v rozvojových zemích a jako doplněk stravy.

8. Seznam použité literatury

1. Shimon, L. J. W., Rabinkov, A., Shin, I., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Frolow, F., *Journal of Molecular Biology* **366**, 611 (2007).
2. Kubec, R., Velíšek, J., Musah, A. R., *Phytochemistry* **60**, 21 (2002).
3. Lyantagaye, S. L., *Tanzania Journal of Science* **37**, 58 (2011).
4. van Wyk, B-E., van Oudtshoorn, B., Gericke, N., *Medicinal plants of South Africa*, 304 pp., 2nd edition. Briza Publications, Pretoria (2000).
5. Kubec, R., Kim, S., Velíšek, J., Musah, R. A., 2002b. *The 10th Weurman Flavour Research Symposium*, Beaune, France, 409 (2002).
6. Slatner, K., *Society garlic*. In: "Tropical plant library online" [online]. © 1997-2012 [accessed 2012-02-12]. Available at: <http://www.mgonlinestore.com/SocietyG/>
7. Olorunnisola, O. S., Bradley, G., Afolayan, A. J., *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **5**, 2490 (2011).
8. Bungu, L., Frost, C. L., Brauns, C., van de Venter, M., *African Journal of Biotechnology* **5**, 1936 (2006).
9. Bungu, L., Venter, M., Frost, C., *African Journal of Biotechnology* **7**, 681 (2008).
10. Duncan, A. C., Jäger, A. K., Van Staden, J., *Journal of Ethnopharmacology* **68**, 63 (1999).
11. Ebrahim, M., Pool, E. J., *Journal of Ethnopharmacology* **132**, 359 (2010).
12. Lindsey, K. L., Van Staden, J., *South African Journal of Botany* **70**, 671 (2004).
13. Nteso, L. Pretorius, J. C., *Australian Journal of Agricultural Research* **57**, 517 (2006).
14. Thamburan, S., Klaasen, J., Mabusela, W. T., Cannon, J. F., Folk, W., Johnson, Q., *Phytotherapy Research* **20**, 844 (2006).
15. Somai, B. M., Belewa, V., *Journal of Food Protection* **74**, 1007 (2011).
16. Nteso, L. Pretorius, J. C., *Australian Journal of Agricultural Research* **57**, 511 (2006).
17. Buwa, L. V., Afolayan, A. J., *African Journal of Biotechnology* **8**, 6683 (2009).
18. Ncube, B., Ngunge, V. N. P., Finnie, J. F., Van Staden, J., *Journal of Ethnopharmacology* **134**, 775 (2011).
19. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P., *Brock biology of microorganisms*, 1168 pp., 12th edition. Benjamin Cummings, San Francisco (2008).

20. Voltava, M., Černohorská, L., Heroldová, M., Holá, V., Majzlíková, L., Ondrovčík, P., Růžička, F., Dvořáčková, M., Woznicková, V., Zahradníček, O., *Lékařská mikrobiologie speciální*, 495 pp., 1. vydání, Neptun, Brno (2003).
21. Savidor, A., Teper, D., Gartemann, K-H., Eichenlaub, R., Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Barash, I., Tews, H., Mayer, K., Giannone, R. J., Hettich, R. L., Sessa, G., *Journal of Proteome Research* **11**, 736 (2012).
22. Li, B., Yu, R., Shi, Y., Su, T., Wang, F., Ibrahim, M., Xie, G., Wang, Y., Sun, G., *Plant Pathology Journal* **27**, 360 (2011).
23. Khan, M., A., Zhao, Y. F., Korban, S. S., *Plant Molecular Biology Reporter* **30**, 247 (2012).
24. Ncube, B., Finnie, J. F., Van Staden, J., *South African Journal of Botany* **77**, 387 (2011).

9. Přílohy

Fotografie inhibičních zón allicinu a marasmicinu při testování antimikrobiálních aktivit proti jednotlivým mikroorganismům užitím diskové difúzní metody. Čísla u jednotlivých disků znamenají koncentraci nanášené látky v mg/ml.

Testování proti *Bacillus cereus*



allicin



marasmicin

Testování proti *Escherichia coli*



allicin



marasmicin

Testování proti *Micrococcus luteus*



allicin



marasmin

Testování proti *Clavibacter michiganensis*

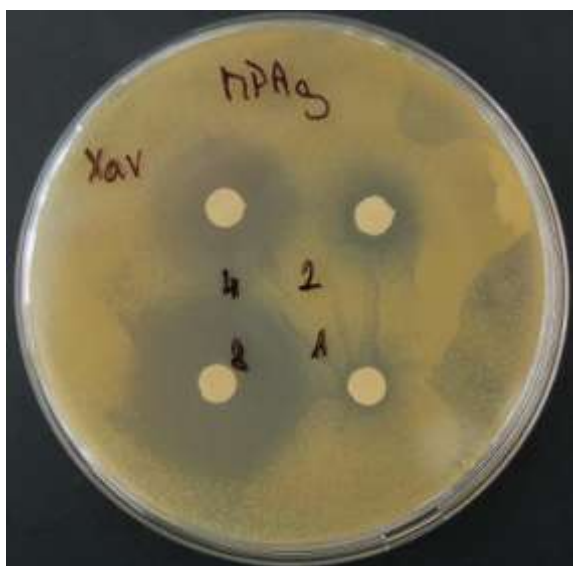


allicin



marasmin

Testování proti *Xanthomonas axonopodis*



allicin



marasmicin

Testování proti *Erwinia amylovora*



allicin



marasmicin

Testování proti *Saccharomyces cerevisiae*



allicin



marasmicin