

Miroslava Kačániová, Elena Horská, Peter Haščík, Soňa Felšöciová

**Využitie antimikrobiálnych vlastností včelích produktov proti vybraným
druhom mikroorganizmov**

Nitra 2015

Názov: Využitie antimikrobiálnych vlastností včelích produktov proti vybraným druhom mikroorganizmov

Autori: **prof. Ing. Miroslava Kačániová, PhD.**

Katedra mikrobiológie

Fakulta biotechnológie a potravinárstva

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

prof. Dr. Ing. Elena Horská

Katedra marketingu a obchodu

Fakulta ekonomiky a manažmentu

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

doc. Ing. Peter Haščík, PhD.

Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov

Fakulta biotechnológie a potravinárstva

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Ing. Soňa Felšöciová, PhD.

Katedra mikrobiológie

Fakulta biotechnológie a potravinárstva

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Recenzenti: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ing. Simona Kunová, PhD.

Schválil rektor Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre dňa 6. 7. 2015 ako vedeckú monografiu.

ISBN 978-80-552-1365-1

POĎAKOVANIE

Práca bola realizovaná a financovaná za podpory projektu **KEGA 013SPU-4/2012**.

Autori

OBSAH

Zoznam tabuliek	6
Zoznam skratiek a značiek	7
Úvod	9
1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí	10
1.1 Med	10
1.1.1 Chemické zloženie medu	12
1.1.1.1 Fenolové kyseliny v mede	15
1.1.1.2 Polyfenoly v nektári	16
1.1.1.3 Defenzín-1	16
1.1.1.4 Metylglýoxal	17
1.1.2 Mikroorganizmy v mede	18
1.1.3 Biologické účinky medu	19
1.1.3.1 Antimikrobiálne vlastnosti medu	19
1.1.3.2 Inhibičný účinok medu proti tvorbe biofilmu	22
1.1.3.3 Antioxidačné vlastnosti medu	23
1.1.3.4 Protizápalové účinky medu	25
1.2 Propolis	25
1.2.1 Pôvod propolisu	26
1.2.1.1 Zdroje propolisu v miernom pásme	26
1.2.1.2 Zdroje propolisu v tropickom pásme	26
1.2.1.3 Zdroje propolisu v subtropických oblastiach	27
1.2.1.4 Propolis bez žihadlových včiel	27
1.2.2 Chemické zloženie propolisu	28
1.2.2.1 Propolisový štandard	30
1.2.3 Biologické účinky propolisu	31
1.2.3.1 Antimikrobiálne vlastnosti propolisu	31
1.2.3.2 Inhibičný účinok propolisu proti tvorbe biofilmu	33
1.2.3.3 Antioxidačné vlastnosti propolisu	34
1.2.3.4 Protizápalový účinok propolisu	34
1.2.3.5 Imunomodulačné a protirakovinové vlastnosti propolisu	35
1.2.3.6 Hojivé účinky propolisu	35
2 Cieľ práce	37
3 Materiál a metodika	38
3.1 Charakteristika vzoriek včelích produktov	38
3.2 Príprava vzoriek	40
3.3 Príprava extraktov a roztokov pre biologické experimenty	40
3.3.1 Medové roztoky a extrakty	40
3.3.1.1 Medové roztoky	40
3.3.1.2 Medové extrakty	40
3.3.1.3 Príprava nepravého „umelého medu“, ako negatívnej kontroly	41
3.3.2 Propolisové extrakty	41
3.3.2.1 Príprava etanolového extraktu z propolisu a jeho frakcionácia	41
3.3.2.2 Príprava vodného extraktu z propolisu	42
3.4 Testované mikroorganizmy	42
3.5 Antimikrobiálna aktivita	43
3.6 Inhibícia biofilmu	45
3.7 HPLC analýza vzoriek propolisov	46
3.7.1 Príprava vzorky propolisu pre HPLC analýzu:	46

3.7.2 HPLC analýza.....	46
3.8 Matematické a štatistické spracovanie výsledkov	47
4 Výsledky práce a diskusia	48
4.1 Antimikrobiálna aktivita.....	48
4.1.1 Antimikrobiálna aktivita medov	48
4.1.1.1 Antimikrobiálna aktivita vzoriek druhových medov	48
4.1.1.2 Antimikrobiálna aktivita zmiešaných (lesných) medov na klinické izoláty a zbierkové kmene mikroorganizmov.....	55
4.1.1.3 Antimikrobiálna aktivita medových extraktov	58
4.1.2 Antimikrobiálna aktivita propolisov a frakcií.....	60
4.1.2.1 Antimikrobiálna aktivita propolisov.....	60
4.1.2.2 Antimikrobiálna aktivita propolisových frakcií a vodného propolisového extraktu	63
4.2 Inhibícia tvorby biofilmu.....	66
4.2.1 Inhibícia tvorby biofilmu vzorkami medov	67
4.2.1.1 Inhibícia tvorby biofilmu natívnym medom.....	67
4.2.1.2 Inhibícia tvorby biofilmu medovými extraktami	69
4.2.2 Inhibícia tvorby biofilmu propolisom	71
4.2.2.1 Inhibícia tvorby biofilmu propolisovými extraktami.....	71
4.2.2.2 Inhibícia tvorby biofilmu frakciami propolisu.....	74
4.3 HPLC analýza bioaktívnych zložiek propolisu	77
Záver	80
Abstrakt v slovenskom jazyku.....	83
Abstrakt v anglickom jazyku.....	84
Zoznam použitej literatúry.....	85

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Chemické zloženie medu (Čuboň et al., 2006).....	13
Tabuľka 2 Obsah minerálnych látok v mede v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Čuboň et al., 2006)	13
Tabuľka 3 Flavonoidy identifikované v mede (D'Arcy, 2005)	14
Tabuľka 4 Flavonoidy identifikované v kvetových nektároch (D'Arcy, 2005).....	16
Tabuľka 5 Faktory, vplývajúce na antimikrobiálne vlastnosti medu (Tysset a de Rautlin de la Roy, 1974; Molan, 1992a)	19
Tabuľka 6 Najrozšírenejšie typy propolisu, rastlinné zdroje a hlavné zložky (Bogdanov, 2009; Bankova, 2011)	28
Tabuľka 7 Zloženie surového topoľového (<i>Populus nigra</i>) propolisu (Bogdanov, 2009; Bankova, 2011).....	30
Tabuľka 8 Návrh štandardu pre topoľový propolis (Popova, 2007)	31
Tabuľka 9 Biologické účinky propolisov rôznych geografických oblastí a látky zodpovedné za ich účinky (Ahuja, 2011).....	36
Tabuľka 10 Miesto odberu vzoriek propolisu a obdobie odberu	38
Tabuľka 11 Miesto odberu vzoriek medu a obdobie odberu	39
Tabuľka 12 Vybrané druhy mikroorganizmov použitých v experimentoch	43
Tabuľka 13 Minimálna inhibičná koncentrácia v % (w/v) rôznych druhov vzoriek medov na baktérie a kvasinky	53
Tabuľka 13 Minimálna inhibičná koncentrácia v % (w/v) rôznych druhov vzoriek medov na baktérie a kvasinky (pokračovanie tabuľky č. 13).....	54
Tabuľka 14 Minimálna inhibičná koncentrácia v % (w/v) zmiešaných (lesných) medov na klinické izoláty a zbierkové kmene mikroorganizmov	57
Tabuľka 15 MIC medových extraktov v $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	59
Tabuľka 16 MIC propolisových extraktov v $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	61
Tabuľka 17 MIC propolisových frakcií v $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	64
Tabuľka 18 Inhibícia tvorby biofilmu natívnymi zmiešanými (lesnými) medmi	69
Tabuľka 19 Inhibícia tvorby biofilmu extraktami získanými z medu	70
Tabuľka 20 Inhibícia tvorby biofilmu propolisovými extraktami.....	72
Tabuľka 21 Inhibícia tvorby biofilmu propolisovými frakciami	75
Tabuľka 22 Obsah fenolových kyselín a flavonoidov detegovaných vo vzorkách propolisu ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	78

Zoznam skratiek a značiek

AGE	koncové produkty neenzýmovej glykácie (Advanced glycation end products)
ATCC	Americká zbierka mikroorganizmov (American Type Culture Collection)
Apal	apalbumín
a_w	vodná aktivita (water activity)
CAPE	fenylester kyseliny kávovej (Caffeic acid phenyl ester)
CCM	Česká zbierka mikroorganizmov (Czech Collection of Microorganisms)
CF ₃ COOH	kyselina trifluóroctová
DMSO	dimetylsulfoxid
fr.	frakcia
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMF	hydroxymetylfurfural
HPLC	vysoko účinná kvapalinová chromatografia (high performance liquid chromatography)
HSV-1	herpes simplex vírus-1
KTJ	kolónie tvoriace jednotky
kDa	kilo Dalton
LC-DAD-MS	kvapalinová chromatografia s diódovým detektorom a hmotnostným spektrometrom (Liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry)
LasA, B	proteázy produkované mikroorganizmom <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
M	mol.dm ⁻³
McF	McFarland
MeOH	metanol
MGO	metylglyoxal
MHB	Mueller Hinton Broth
MIC	Minimálna inhibičná koncentrácia
MRJP-1	Major Royal Jelly Protein-1
MRSA	metecilín rezistentný <i>Staphylococcus aureus</i>
ND	nedetegovaný
NF- κB	nukleárny faktor kapa B
OD	optická denzita
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> oportunistický patogén 1

PK SR	Potravinový kódex Slovenskej republiky
PTFE	polytetrafluóretylén
SBB	Sabouraud Broth
sub-MIC	koncentrácia nižšia ako minimálna inhibičná koncentrácia
TNF α	tumor nekrotizujúci faktor α
TROLOX	kyselina 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchróman-2-karboxylová
TSB	trypticase soy broth
UMF	Unique Manuka Factor
λ	vlnová dĺžka
vz.	vzorka
QS	Quorum sensing

Úvod

V súčasnej dobe sa moderná medicína zameriava na použitie prírodných produktov. Hlavnými argumentmi pre zavádzanie prírodných produktov do terapie sú nízke náklady na liečbu a absencia rezistencie na antibiotiká. Tu sa nám ponúka možnosť využitia včelích produktov, ktoré sa oddávna využívajú v alternatívnej medicíne ako liečebné prostriedky proti mnohým ochoreniam. Liečením včelími produktmi sa zaoberá vedecký medicínsky odbor apiterapia. Propolis a med spĺňajú všetky kritériá a sú ideálnymi kandidátmi na liečbu nehojajúcich sa infikovaných rán a iných ochorení, spôsobených mikroorganizmami. Tieto produkty nachádzajú uplatnenie pri potláčaní multirezistentných patogénnych mikroorganizmov bez rizika vzniku antimikrobiálnej rezistencie a zabráneniu tvorby, prípadne narúšaniu už vytvoreného biofilmu.

Med je viskózna sladká a lepkavá kvapalina, ktorú pretvárajú včely (*Apis mellifera*) zberom a zahusťovaním sladkých štiav, predovšetkým nektáru kvetov a medovice. Med zaradujeme medzi čisté prírodné produkty. Je to takmer jediná potravina, ktorej zložky hneď po požití prechádzajú priamo do krvi človeka. Zvyšuje prirodzenú odolnosť organizmu a tým znižuje riziko ochorenia. Faktory, ktoré ovplyvňujú a inhibujú vývoj a rast mikroorganizmov sú: nízka disponibilná vlhkosť, hodnota pH medzi 3,5 až 4,5 pre medy nektárové a 4,5 až 5,5 pre medy medovicové, absencia základných zložiek vhodných pre rast a vývin mikroorganizmov, zvýšená koncentrácia redukujúcich cukrov, viskozita obmedzujúca výmenu kyslíka, peroxidázová aktivita a prítomnosť peroxidu vodíka, prítomnosť chemických látok, proteínov a enzýmov zabraňujúcich rastu mikroorganizmov.

Propolis (včelí tmel) je produkt včely medonosnej využívaný v ľudovej medicíne v mnohých krajinách. Propolis je lepkavá živica chrániaca púčiky mnohých rastlín a stromov, alebo vytekajúca z kôry stromov predovšetkým ihličnatých. Včely prinesené živice a výlučky premiešavajú s výlučkami slinných žliaz a s voskom vylučovaným z voskotvorných žliaz. Včely používajú propolis na zatmelenie štrbín a rôznych otvorov v úli. Slúži aj na obalenie vnútra buniek plástov a povrchovú dezinfekciu úľového prostredia. Je veľmi dôležitá zložka „biokozmetiky“ a „funkčných potravín“. Mechanizmus antimikrobiálnej aktivity propolisu je komplexný a mohol by byť znakom synergickej aktivity medzi fenolickými a inými zlúčeninami hlavne flavonoidmi ako sú pinocembrín, galangín a pinobanksín.