

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tina NOVAK

**PROTIBAKTERIJSKA IN ANTIOKSIDATIVNA
UČINKOVITOST IZVLEČKOV RASTLIN IZ
DRUŽINE USTNATIC (Lamiaceae)**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tina NOVAK

**PROTIBAKTERIJSKA IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST
IZVLEČKOV RASTLIN IZ DRUŽINE USTNATIC (Lamiaceae)**

MAGISTRSKO DELO

**ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS
FROM PLANT FAMILY Lamiaceae**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu Senata Univerze v Ljubljani z dne 25.1.2016 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja biotehnologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina in za somentorico prof. dr. Helena Abramovič.

Magistrsko delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil in na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Barbara JERŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Tjaša DANEVČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Iztok KOŠIR
Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tina NOVAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md
DK UDK 604.4:615.33:582.943.17(043.3)
KG protimikrobne snovi/antioksidanti/rastlinski izvlečki/Lamiaceae/izvlečki žajblja/
Salvia officinalis/fenolne kisline/*Staphylococcus aureus*/*Bacillus cereus*/*Salmonella*
Infantis/*Escherichia coli*/minimalna inhibitorna koncentracija/MIK/metoda
 razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrtski ploščici/metoda ugotavljanja
 sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala
AV NOVAK, Tina
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ABRAMOVIČ, Helena (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in
 biotehniških znanosti, področje biotehnologije
LI 2016
IN PROTIBAKTERIJSKA IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST
 IZVLEČKOV RASTLIN IZ DRUŽINE USTNATIC (Lamiaceae)
TD Magistrsko delo
OP XI, 69, [4] str., 12 pregl., 31 sl., 94 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V magistrski nalogi smo ugotavljali protibakterijsko delovanje izvlečkov žajblja (*Salvia officinalis* L.) v primerjavi z izvlečki drugih rastlin iz družine ustnatic (Lamiaceae) in čistimi fenolnimi kislinami na bakterije vrste *S. aureus* ATTC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370. Uporabili smo metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrtski ploščici z dodatkom barvila TTC ter metodo spremljanja kinetike rasti in odmiranja bakterij. Ugotovili smo, da imajo izvlečki iz žajblja v primerjavi z ostalimi izvlečki iz rastlin družine ustnatic najboljše protibakterijsko delovanje. Vsebujejo karnozolno kislino, ki je med čistimi fenolnimi kislinami protibakterijsko najbolj učinkovita. V nalogi smo žeeli preveriti tudi vpliv obdobja obiranja žajblja na protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izvlečkov. Dokazali smo, da obdobje obiranja žajblja vpliva na protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izvlečkov. Najučinkovitejši so bili izvlečki žajblja, ki je bil obran v spomladanskih in poletnih mesecih in sicer v mesecu maju, juniju in juliju. Žeeli smo določiti protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izbranih fenolnih kislin, ki so prisotne v izvlečkih ustnatic in podati primerjavo protibakterijske in antioksidativne učinkovitosti med testiranimi izvlečki žajblja v povezavi s sestavo fenolnih spojin v izvlečkih in aktivnostjo čistih fenolnih kislin. Ugotovili smo, da struktura fenolnih kislin vpliva na njihovo protimikrobno in antioksidativno učinkovitost. Kisline, ki v svoji strukturi vključujejo etilensko skupino, to so hidroksicimetne kisline, so protibakterijsko in antioksidativno učinkovitejše od fenolnih kislin, ki te skupine nimajo (hidroksibenzojske kisline). Po drugi strani so fenolne kisline z več hidroksi skupinami antioksidativno bolj učinkovite, protibakterijsko manj. Med protibakterijsko in antioksidativno učinkovitostjo izvlečkov iz žajblja, ki je bil obran v različnih obdobjih, in sestavo fenolnih spojin v izvlečkih ni videti povezave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
DC UDC 604.4:615.33:582.943.17(043.3)
CX antimicrobials/antioxidants/plant extracts/Lamiaceae/extracts from sage/*Salvia officinalis*/phenolic acids/*Staphylococcus aureus*/*Bacillus cereus*/*Salmonella Infantis*/*Escherichia coli*//minimal inhibitory concentration/MIC/agar dilution method/superoxid anion scavenging activity method
AU NOVAK, Tina
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ABRAMOVIČ, Helena (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
PY 2016
TI ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS FROM PLANT FAMILY LAMIACEAE
DT M.Sc. Thesis
NO XI, 69, [4] p., 12 tab., 31 fig., 94 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of this research was to investigate antibacterial activity of extracts from sage (*Salvia officinalis* L.) (Vitiva d.d., Markovci, Slovenija) in comparison with the extracts from other plants of the mint family (Lamiaceae) and pure phenolic acids against bacterial species *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. Infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370. We used broth microdilution method and time-kill analysis, which determine kinetics of antibacterial activity. We found out that the extracts from sage have in comparison with other plants of the mint family the best antibacterial activity. They contain carnosic acid, which was antimicrobially the most effective acid among pure phenolic acids. The next aim of this research was to check the impact of period of harvesting of sage on its antibacterial and antioxidative effectiveness. We proved that the time of harvest had an impact, the most effective were the extracts of sage, harvested in spring and summer, in May, June and July. We determined also the antibacterial and antioxidant effectiveness of selected phenolic acids, which are present in the extracts from the mint family and compared the antibacterial and antioxidant effectiveness of the tested extracts of sage in relation to the composition of phenolic compounds in extracts and activity of pure phenolic acids. We have found out that the structure of phenolic acids affects their anti-microbial and antioxidative efficiency. The acids with the ethylene group in their structure (hydroxycinnamic acids) are antibacterially and antioxidatively more effective than phenolic acids, which do not have this group (hydroxybenzoic acid). On the other hand, the phenolic acids with more hydroxy groups are more effective as antioxidants, but less effective against bacteria. Among the antibacterial and antioxidant effectiveness of extracts of sage, which was harvested at different times and composition of phenolic compounds in extracts we do not see the link.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI MAGISTRSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA UPORABE RASTLINSKIH IZVLEČKOV	3
2.2 PROTIBAKTERIJSKO IN ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE RASTLINSKIH IZVLEČKOV	4
2.2.1 Izvlečki iz rastlin družine ustnatic (Lamiaceae)	6
2.2.1.1 Melisa (<i>Melissa officinalis</i> L.).....	6
2.2.1.2 Meta (<i>Mentha piperita</i> L.)	7
2.2.1.3 Origano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	8
2.2.1.4 Sivka (<i>Lavandula angustifolia</i> L.).....	8
2.2.1.5 Timijan (<i>Thymus serpyllum</i> L.)	9
2.2.1.6 Žajbelj (<i>Salvia officinalis</i> L.).....	10
2.2.2 Fenolne kislina.....	11
2.2.2.1 Galna kislina	12
2.2.2.2 Protokatehajska kislina.....	12
2.2.2.3 Vanilinska kislina	12
2.2.2.4 Siringinska kislina	13
2.2.2.5 <i>p</i> -Kumarna kislina	13
2.2.2.6 Kavna kislina	13
2.2.2.7 Ferulna kislina	13
2.2.2.8 Rožmarinska kislina	14
2.2.2.9 Karnozolna kislina.....	15
2.3 BAKTERIJE VRSTE <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.4 BAKTERIJE VRSTE <i>Bacillus cereus</i>	16
2.5 BAKTERIJE RODU <i>Salmonella</i>	17
2.6 BAKTERIJE VRSTE <i>Escherichia coli</i>	17
2.7 METODE UGOTAVLJANJA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVITOSTI	18

2.7.1 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z dodatkom barvila TTC	19
2.7.2 Kinetika rasti ali odmiranja bakterij	19
2.8 METODE UGOTAVLJANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI	19
2.8.1 Določitev sposobnosti lovljenja radikala O₂⁻	20
3 MATERIAL IN METODE	21
3.1 POTEK DELA.....	21
3.2 MATERIAL	22
3.2.1 Bakterijski sevi.....	22
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	22
3.2.2.1 Tekoče gojišče MHB	22
3.2.2.2 Tekoče gojišče TSB	22
3.2.2.3 Trdno gojišče MHA	23
3.2.2.4 Trdno gojišče TSA.....	23
3.2.3 Raztopine in dodatki	23
3.2.3.1 Fiziološka raztopina.....	23
3.2.3.2 Dodatki	23
3.2.4 Reagenti	24
3.2.4.1 Fosfatni pufer (0,1 mol/L; pH 7,4)	24
3.2.4.2 Raztopina NBT (nitro tetrazol modro) (0,15 mmol/L).....	24
3.2.4.3 Raztopina NADH (β -nikotinamid adenin dinukleotid) (0,468 mmol/L)....	24
3.2.4.4 Raztopina PMS (fenazin metasulfat) (0,060 mmol/L)	24
3.2.5 Snovi s protibakterijskim in antioksidativnim delovanjem.....	24
3.2.5.1 Izvlečki iz rastlin družine ustnatic (Lamiaceae)	24
3.2.5.2 Izvlečki žajblja (<i>Salvia officinalis L.</i>).....	25
3.2.5.3 Fenolne kisline.....	27
3.2.6 Laboratorijska oprema	27
3.3 METODE.....	28
3.3.1 Oživitev bakterij	28
3.3.2 Priprava inokuluma	28
3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu.....	28
3.3.4 Priprava začetnih koncentracij izvlečkov iz rastlin družine ustnatic in čistih fenolnih kislin.....	29
3.3.5 Priprava začetnih koncentracij izvlečkov žajblja.....	29
3.3.6 Določitev živosti s pomočjo tetrazolijevih soli.....	30
3.3.7 Ugotavljanje kinetike rasti in odmiranja bakterij.....	30
3.3.8 Določitev antioksidativne učinkovitosti s spektrofotometrično metodo ugotavljanja sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala ...	30
3.3.9 Statistična analiza	31

4 REZULTATI.....	32
4.1 REZULTATI METODE RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU V MIKROTITRSKI PLOŠČICI Z DODATKOM BARVILA TTC.....	32
4.1.1 Protibakterijsko delovanje izvlečkov iz družine ustnatic	32
4.1.2 Protibakterijsko delovanje rastlinskih izvlečkov žajblja.....	33
4.1.3 Protibakterijsko delovanje fenolnih kislin	37
4.2 REZULTATI KINETIKE RASTI IN ODMIRANJA BAKTERIJ.....	38
4.2.1 Kinetika protibakterijskega delovanja izvlečkov žajblja	39
4.2.1.1 Kinetika protibakterijskega delovanja izvlečkov žajblja za bakterije vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926	39
4.2.1.2 Kinetika protibakterijskega delovanja izvlečkov žajblja za bakterije vrste <i>B. cereus</i> WSBC 10530	41
4.2.2 Kinetika protibakterijskega delovanja fenolnih kislin.....	43
4.2.2.1 Kinetika protibakterijskega delovanja fenolnih kislin za bakterije vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926	43
4.2.2.2 Kinetika protibakterijskega delovanja fenolnih kislin za bakterije vrste <i>B. cereus</i> WSBC 10530	44
4.3 DOLOČITEV SPOSOBNOSTI LOVLJENJA RADIKALA O₂^{•-}	46
4.3.1 Antioksidativno delovanje izvlečkov žajblja	46
4.3.2 Antioksidativno delovanje fenolnih kislin	50
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	54
5.1 RAZPRAVA.....	54
5.1.1 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z dodatkom barvila TTC.....	54
5.1.2 Kinetika rasti in odmiranja bakterij	56
5.1.3 Določitev sposobnosti lovljenja radikala O₂^{•-}	57
5.2 SKLEPI.....	58
6 POVZETEK (SUMMARY).....	59
6.1 POVZETEK	59
6.2 SUMMARY	60
7 VIRI	62
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Mesta in možni mehanizmi protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov v bakterijski celici (Cummings, 2006)	5
Slika 2: <i>Melissa officinalis</i> L. (Kundalunga, 2016).....	7
Slika 3: <i>Metha piperita</i> L. (Tovarna Organika, 2016).....	7
Slika 4: <i>Origanum vulgare</i> L. (Nordqvist, 2015)	8
Slika 5: <i>Lavandula angustifolia</i> L. (Favn Professional, 2011).....	9
Slika 6: <i>Thymus serpyllum</i> L. (Jørgensen, 2016)	9
Slika 7: <i>Salvia officinalis</i> L. (Bisa, 2016).....	10
Slika 8: Molekulska struktura fenolnih kislín (Liu in sod., 2014).....	11
Slika 9: Rožmarinska kislina (Petersen in Simmonds, 2003).....	14
Slika 10: Karnozolna kislina (Poeckel in sod., 2008).....	15
Slika 11: <i>Staphylococcus aureus</i> (Kunkel, 2009).....	16
Slika 12: <i>Bacillus cereus</i> (Sanchis, 2010)	16
Slika 13: <i>Salmonella Infantis</i> (Kunkel, 2007)	17
Slika 14: <i>Escherichia coli</i> (Kunkel, 2004)	18
Slika 15: Shema izvedbe eksperimentalnega dela.....	21
Slika 16: Vrednosti MIK izvlečkov iz rastlin družine ustnatic za bakterije vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926, <i>B. cereus</i> WSBC 10530, <i>S. Infantis</i> ŽMJ9 in <i>E. coli</i> ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC, preračunano na vsebnost fenolnih spojin (mg GAE/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0	33
Slika 17: Vrednosti MIK izvlečkov iz žajblja v odvisnosti od časa obiranja za bakterije vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926 in <i>B. cereus</i> WSBC 10530, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC, preračunano na vsebnost fenolnih spojin (mg GAE/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0.	35
Slika 18: Vrednosti MIK izvlečkov iz žajblja v odvisnosti od časa obiranja za bakterije vrste <i>S. Infantis</i> ŽMJ9 in <i>E. coli</i> ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC, preračunano na vsebnost fenolnih spojin (mg GAE/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0	36
Slika 19: Vrednosti MIK fenolnih kislín za bakterije vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926, <i>B. cereus</i> WSBC 10530, <i>S. Infantis</i> ŽMJ9 in <i>E. coli</i> ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC (mol/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0.....	38

Slika 20: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu maju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	39
Slika 21: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu juniju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	40
Slika 22: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu juliju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	40
Slika 23: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>B. cereus</i> WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu maju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	41
Slika 24: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>B. cereus</i> WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu juniju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	42
Slika 25: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>B. cereus</i> WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu juliju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	42
Slika 26: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami protokatehajske kisline (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	43
Slika 27: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami <i>p</i> -kumarne kisline (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	44
Slika 28: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>B. cereus</i> WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami protokatehajske kisline (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	45
Slika 29: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste <i>B. cereus</i> WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami <i>p</i> -kumarne kisline (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	45
Slika 30: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala izračunana s pomočjo nelinearne regresijske analize pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 0,10 mol GAE/mL za izvlečke iz žajblja. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	50
Slika 31: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala izračunana s pomočjo nelinearne regresijske analize pri koncentraciji fenolnih kislin v reakcijski zmesi 0,1 mol/mL za čiste fenolne kisline. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev ± sd	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Bakterijski sevi uporabljeni v eksperimentalnem delu naloge	22
Preglednica 2: Vsebnost karnozolne in rožmarinske kisline v izvlečkih družine ustnatic (Vitiva d.d., Markovci, Slovenija).....	24
Preglednica 3: Vsebnost skupnih fenolnih spojin, izražena kot ekvivalent galne kisline v mg galne kisline/g izvlečka (mg GAE/g), določena z metodo Folin-Ciocalteu (Katedra za biokemijo in kemijo živil, Oddelek za živilstvo, BF)	25
Preglednica 4: Vsebnost skupnih fenolnih spojin izražena kot ekvivalent galne kisline v mg galne kisline/mL raztopine izvlečka žajblja (mg GAE/mL) obranega v različnih obdobjih	26
Preglednica 5: Vsebnost izbranih fenolnih kislin (kavne, siringinske, <i>p</i> -kumarne in rožmarinske kisline) v izvlečkih iz žajblja, obranega v 12-ih različnih mesecih	26
Preglednica 6: Vrednosti MIK izvlečkov iz rastlin družine ustnatic za bakterije vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926, <i>B. cereus</i> WSBC 10530, <i>S. Infantis</i> ŽMJ9 in <i>E. coli</i> ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC (mg/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0	33
Preglednica 7: Vrednosti MIK izvlečkov iz žajblja v odvisnosti od časa obiranja za bakterije vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926, <i>B. cereus</i> WSBC 10530, <i>S. Infantis</i> ŽMJ9 in <i>E. coli</i> ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC (μ L/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0	34
Preglednica 8: Vrednosti MIK fenolnih kislin za bakterije vrste <i>S. aureus</i> ATTC 25926, <i>B. cereus</i> WSBC 10530, <i>S. Infantis</i> ŽMJ9 in <i>E. coli</i> ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC (mg/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0	37
Preglednica 9: Koeficient sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala ($\bar{K}_{SA(560)}$ \pm s (%)) za izvlečke žajblja, obranega v 12-ih mesecih pri štirih koncentracijah fenolnih spojin v reakcijski zmesi (<i>c</i>). Vrednosti absorbanc so podane v prilogi A	47
Preglednica 10: Vrednosti parametrov a in b ter koeficient determinacije (R^2) za odvisnost koeficiente sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala od koncentracije spojin v reakcijski zmesi za izvlečke iz žajblja obrane v različnih obdobjih	49
Preglednica 11: Koeficient sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala ($\bar{K}_{SA(560)}$ \pm s (%)) fenolnih kislin, testiranih pri štirih različnih koncentracijah v reakcijski zmesi (<i>c</i>). Vrednosti absorbanc so podane v prilogi B	51
Preglednica 12: Vrednosti parametrov a in b ter koeficient determinacije (R^2) za odvisnost koeficiente sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala od koncentracije fenolnih kislin v reakcijski zmesi za fenolne kisline.....	52

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	tipski sev zbirke American Type Culture Collection
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> WSBC-10530
CFU	kolonijska enota (angl. Colony Forming Units)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229, ŽM370
EtOH	etanol
FC	Folin-Ciocalteu
Mg GAE/mL	mg fenolnih spojin, izraženih kot ekvivalent galne kisline, na mL gojišča
MHA	trdno gojišče Mueller-Hinton
MHB	tekoče gojišče Mueller-Hinton
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. Minimal Inhibitory Concentration)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NBT	nitro tetrazol modro
O ^{•-}	superoksidni anionski radikal
PMS	fenazin metasulfat
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25926
<i>S. Infantis</i>	<i>Salmonella</i> Infantis ŽMJ9
TSA	gojišče triptični soja agar
TSB	gojišče triptični soja bujon
TTC	bakterijski rastni indikator: 2,3,5 trifenil-tetrazolijev klorid
WSBC	tipski sev zbirke Weihenstephan <i>B. cereus</i> Culture Collection
ŽMJ	mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete
c	masna koncentracija

1 UVOD

Vse bolj narašča skrb zaradi vedno večje odpornosti mikroorganizmov na antibiotike. Nekontrolirana uporaba le-teh in tudi drugih protimikrobnih snovi v živilski industriji lahko vodi v povečano odpornost bakterij in s tem ogrozi zdravljenje bakterijskih okužb pri ljudeh in živalih. Obstaja velika verjetnost prenosa odpornih mikroorganizmov na človeka neposredno s hrano ali posredno preko živalskih izločkov (Ghosh in Lapara, 2007; Hammerum in Heuer, 2009). Večja ozaveščenost ljudi glede porasta odpornosti mikroorganizmov na antibiotike je že v prejšnjem desetletju sprožila uvedbo bistveno strožje regulative glede uporabe slednjih pri proizvodnji rejnih živali v Evropski Uniji. S tem se je zelo povečala potreba po drugih načinih vplivanja na zdravje in prirast rejnih živali, vključno s protimikrobnimi snovmi naravnega izvora, kamor sodijo tudi številne rastlinske učinkovine.

Tudi v živilski industriji zaradi večje ozaveščenosti potrošnikov o pomenu zdrave prehrane za ohranjanje zdravja in zahtev po čim boljši kakovosti, svežini in obstojnosti živil narašča zanimanje za učinkovine, ki bi zmanjšale glavne vzroke kvarjenja, kot sta oksidacija in mikrobiološki kvar hrane. Oksidacija živil je kemijska spremembra, ki povzroči žarkost, poslabšanje prehrambene vrednosti in zmanjšanje senzoričnih lastnosti živila, medtem ko mikrobiološki kvar lahko vpliva tudi na zmanjšanje varnosti živil (Suhaj, 2006). Te procese lahko preprečimo oz. upočasnimo z uporabo konzervansov. Potrošniki so zaskrbljeni zaradi možne škodljivosti umetnih dodatkov, zato je iskanje novih, neškodljivih, predvsem učinkovitih naravnih sestavin ali njihovih kombinacij v izvlečkih ali drugih pripravkih različnih rastlinskih materialov temelj mnogih znanstvenih raziskav (Davidson in sod., 2015; Gyawali in sod., 2015a).

Rastline iz družine ustnatic (Lamiaceae) (rožmarin, bazilika, meta, žajbelj, timijan in sivka) so najbolj poznana vrsta začimb z dobrimi protimikrobnimi in antioksidativnimi lastnostmi. Študije o kemijski sestavi njihovih izvlečkov so bile večinoma osredotočene na terpenoide, medtem ko se je zadnja leta pozornost preusmerila na hidrofilne sestavine rastlin, kot so fenolne spojine (Generalić Mekinić in sod., 2014). Večinski del fenolnih spojin v rastlinah iz družine ustnatic predstavljajo fenolne kisline, še posebej derivati kavne kisline (Kivilompolo in Hyötyläinen, 2007; Zgórka in Głowniak, 2001).

Kemijska sestava in biološka aktivnost rastlinskih izvlečkov sta odvisni od številnih biotskih in abiotiskih dejavnikov, kot so tla in podnebje rastišča ter letni čas nabiranja rastlinskega materiala. Rezultati nedavne študije, ki je bila izvedena na izvlečkih žajblja, kažejo, da obdobje leta, v katerem je bil rastlinski material nabran, vpliva na vsebnost kemijskih sestavin, vključno s fenolnimi spojinami (Generalić in sod., 2011). Te imajo pomembno vlogo in vpliv na biološko aktivnost rastlinskega materiala, vključno z antioksidativnim in protimikrobnim delovanjem, zato smo se temu posvetili tudi v tej magistrski nalogi.

1.1 CILJI MAGISTRSKE NALOGE

Cilji naloge so bili:

- Določiti protibakterijsko učinkovitost izvlečkov žajblja v primerjavi z izvlečki drugih rastlin iz družine ustnatic (meta, melisa, sivka, timijan, origano).
- Preveriti vpliv obdobja obiranja žajblja na protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izvlečkov.
- Določiti protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izbranih fenolnih kislin (galna, protokatehajska, vanilinska, siringinska, *p*-kumarna, kavna, ferulna, karnozolna in rožmarinska kislina), ki so po navedbah v literaturi prisotne v izvlečkih rastlin iz družine ustnatic.
- Podati primerjavo protibakterijske in antioksidativne učinkovitosti med testiranimi izvlečki žajblja v povezavi s sestavo fenolnih spojin v izvlečkih in aktivnostjo čistih fenolnih kislin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

- Izvlečki žajblja so med izvlečki iz rastlin družine ustnatic (Lamiaceae) protibakterijsko najbolj učinkoviti.
- Obdobje obiranja žajblja vpliva na protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izvlečkov. Najučinkovitejši bodo izvlečki žajblja, ki je bil obran v poletnih mesecih.
- Med izbranimi fenolnimi kislinami imajo hidroksicimetne kisline boljše protibakterijsko in antioksidativno delovanje od hidroksibenzojskih.
- Rezultati antioksidativne učinkovitosti žajblja bodo v korelaciji z rezultati protibakterijskega delovanja, saj molekulska struktura fenolnih spojin v izvlečku vpliva na prehod skozi fosfolipidni sloj celične membrane in njegovo sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA UPORABE RASTLINSKIH IZVLEČKOV

Ljudje so se že v prazgodovini zavedali, da lahko uporabljajo rastline tudi v zdravilne namene. Zgledovali so se po živalih. Opazili so, da bolne živali nagonsko poiščejo tiste rastline, ki jim pomagajo ozdraveti. V tisočletjih so se izkušnje o učinkovanju rastlin in posebne oblike rastlinskih pripravkov prenašale iz roda v rod. Mnogo kasneje se je bogata zakladnica znanja in izkušenj zlila v medicinske sisteme različnih kultur (Trošt, 2012).

Zgodovina zeliščarstva se začenja na ozemlju današnjega Iraka. 5000 let stari klinopisi na glinastih ploščicah opisujejo področja uporabe in načina priprave 250 različnih zdravil. Istočasno je že obstajala 7000 let stara indijska ajurveda, iz katere se je razvilo zeliščarstvo tradicionalne tibetanske in kitajske medicine. Skoraj sočasno z Babilonijo je nastalo staroegipčansko zdravilstvo, ki se je preneslo v medicinske veščine Hebrejcev, Arabcev, Perzijcev in Grkov (Trošt, 2012). Leta 750 pr. n. št. so v kraljevih vrtovih babilonskega kralja Mardukapaliddina II. gojili 64 različnih zelišč, med njimi tudi česen, koriander, koper, timijan in druge rastline (Baričevič, 1996).

S pokristjanjevanjem se je znanje, ki so ga imeli врачи in зdrавилci različnih ljudstev nekoliko porazgubilo, saj cerkev v začetku ni verjela v зdravilno učinkovitost zelišč. V 8. st. je Karel Veliki izdal v kapitularijah (*Capitulare de vilis imperialibus*) oz. državnih odredbah predpise in navodila o gojenju зdravilnih rastlin in dišavnic v samostanskih vrtovih. Priporočal je pridelovanje žajblja, rožmarina, luštrega, komarčka, koriandra, sleza, peteršilja, janeža in mnogih drugih zelišč (Baričevič, 1996).

V 13. stoletju se je v Salernu v Italiji uveljavila Salernska medicinska šola, ki je z znanstvenim delom, ki je temeljilo na Hipokratovi tradiciji, pridobila velik ugled in začela ločevati medicino od farmacije in zeliščarstva. Slednje so prevzeli apotekarji, ki so začeli snovati apotečne zeliščne vrtove. V tem obdobju je bilo veliko zeliščaric, ki so pod obtožbo, da so čarownice, končale na cerkvenih grmadah (Kuštrak, 2005).

V 15. stoletju je Saladin Asculo napisal prvo lekarniško knjigo *Compendium aromatorium*, v kateri so navedene znanstvene, praktične in etične zahteve do lekarnarjev, navodila za nabiranje, shranjevanje in pripravo zdravil. V tem obdobju je velik prispevek k naravnemu zdravilstvu dal Paracelsus (1493-1541) (Baričevič, 1996).

V 16. stoletju in kasneje se je gojenje zelišč razširilo med ljudi in nastale so številne oblike zeliščnih vrtov. Zelišča so postala del kmečkega vrta. Razvijali so se tudi cerkveni in samostanski vrtovi, kjer so intenzivno pridelovali različna zelišča (Baričevič, 1996). V začetku 19. stoletja se je uveljavljala znanstveno usmerjena medicina, ki je uporabljala izvlečke rastlinskih snovi in ne več celih rastlin (Trošt, 2012).

V zadnjih letih je prišlo do vse večjega zanimanja za alternativno terapijo in terapevtsko uporabo naravnih izdelkov, zlasti tistih, ki so pridobljeni iz rastlin. Razlogov je več. Običajna (konvencionalna) medicina je lahko neučinkovita, ker se pojavljajo stranski učinki zaradi nepravilne uporabe oziroma zlorabe sintetičnih zdravil. Poleg tega obstaja

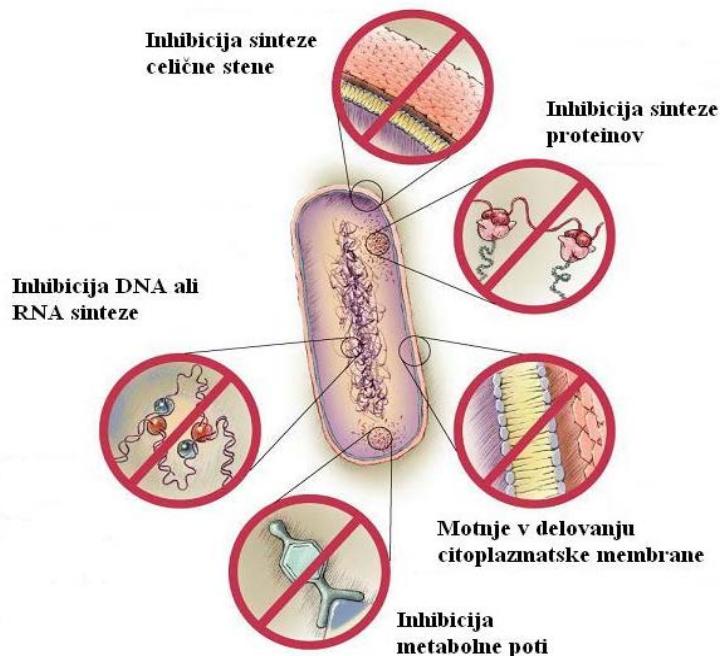
velik del populacije, ki nima dostopa do običajnega zdravljenja (Rates, 2001). Tudi tradicionalna medicina je vedno bolj dovetna za uporabo protimikrobnih učinkovin, izoliranih iz rastlin, kajti do sedaj uporabljeni antibiotiki postajajo vse bolj neučinkoviti proti novim odpornim sevom patogenih bakterij (Cowan, 1999). Istočasno se razvija trend zelenega potrošništva, ki si želi zmanjšati sintetične prehranske aditive in jih nadomestiti z naravnimi, ki imajo manjši vpliv na okolje (Burt, 2004).

2.2 PROTIBAKTERIJSKO IN ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE RASTLINSKIH IZVLEČKOV

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sinteze aromatskih spojin, med katerimi je največ fenolnih spojin in njihovih oksigeniranih derivatov. Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo v rastlinskih celicah in so jih do sedaj izolirali vsaj 12.000. V celici so bodisi v vakuoli ali vezani na strukturne elemente celične stene. Za rastlino so pomembne pri rasti in reprodukciji, predstavljajo zaščito pred zunanjimi stresnimi dejavniki (UV, mikrobi, insekti) in učinkujejo kot vizualni markerji v cvetovih in sadežih. Akumilirajo se v epidermalnem tkivu rastline. Vplivajo na senzorične lastnosti (barva, okus, aroma) živilskih izdelkov. Pripisujejo jim različne farmakološke učinke. Učinkovale naj bi protivirusno, protimikrobeno, protivnetno in protitumororno (Abramovič, 2011).

Način protimikrobnega delovanja fenolnih spojin je odvisen tudi od njihove koncentracije. Nychas (1995) meni, da v manjših koncentracijah vplivajo na encime, ki so povezani z oskrbo celice z energijo, medtem ko večje koncentracije lahko povzročijoobarjanje proteinov. Protimikrobeno delovanje fenolnih spojin je v povezavi z njihovo sposobnostjo da prodrejo v mikrobeno celico ter povzročijo prehod makromolekul iz notranjosti celice. Lahko vplivajo na funkcijo celične membrane (transport elektronov, privzem hranil), interakcije z membranskimi proteini lahko povzročijo spremembo strukture bakterijske membrane in njene funkcionalnosti (Tiwari in sod., 2009). Manjša izguba snovi iz bakterijske celice ne vpliva na celično sposobnost za življenje, medtem ko večja izguba celičnih sestavin oz. izguba določenih molekul in ionov povzroči celično smrt (Burt, 2004).

Protimikrobnna učinkovitost izvlečkov je odvisna od strukture in medsebojnih interakcij posameznih učinkovin. O sinergizemu govorimo, ko je učinek več sestavin izvlečka večji kot vsota posameznih učinkov (Burt, 2004). Delovanje polifenolov je lahko direktno zaviralno oz. destruktivno na določene mikroorganizme ali delujejo le kot sinergisti in povečajo učinek ostalih konzervansov. Na protimikrobeno aktivnost polifenolov vplivajo še prisotnost lipidov, soli, pH in temperatura. Soli delujejo sinergistično s polifenoli ter tako povečajo njihovo protimikrobeno učinkovitost (Davidson in Branen, 2005).



Slika 1: Mesta in možni mehanizmi protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov v bakterijski celici (Cummings, 2006)

Figure 1: Places and possible mechanisms of antimicrobial functioning of the plant extracts in bacterial cells (Cummings, 2006)

Da dosežemo v živilu enak protimikrobeni učinek kot v *in vitro* pogojih, je potrebna večja koncentracija izvlečka. Mnogo študij je potrdilo vpliv hrane na odpornost mikroorganizmov do fenolnih spojin, vendar ne opisujejo natančno vzrokov in mehanizma odpornosti. Večje količine hranil v živilih v primerjavi z gojiščem omogočajo bakterijam, da hitreje popravijo škodo, ki je nastala na celicah. Ne le intrinzični dejavniki hrane (maščoba, proteini, vsebnost vode, antioksidanti, konzervansi, pH, sol in ostali aditivi), tudi ekstrinzični dejavniki (temperatura, pakiranje v vakum/plin/zrak) vplivajo na bakterijsko občutljivost (Burt, 2004).

Antioksidanti so strukturno zelo raznolike spojine. So vodotopni (hidrofilni) ali topni v maščobah (lipofilni), polarni ali nepolarni, encimski ali neencimski. Izkazalo se je, da imajo lahko strukturno različni antioksidanti enak mehanizem delovanja. Za nekatere antioksidante je znano, da lahko učinkujejo celo preko več možnih mehanizmov. Antioksidanti delujejo bodisi tako, da neposredno reagirajo z reaktivnimi radikaliskimi zvrstmi ali tako, da preprečijo oz. upočasnijo njihov nastanek. Pri tem se molekule antioksidantov pretvarjajo v oblike, ki bodisi še vedno lahko učinkujejo antioksidativno ali ne (Abramovič, 2011).

Glede na način učinkovanja jih opredelimo kot primarne in sekundarne antioksidante. Primarni antioksidanti prekinjajo verižno radikalско reakcijo oksidacije lipidov tako, da reagirajo z radikali in jih pretvarjajo v termodinamsko stabilnejše zvrsti. Spojine, ki se uspešno vključujejo v reakcije lovljenja radikalov, vsebujejo hidroksilno skupino (fenolne spojine), sulfhidrilno skupino (cistein, glutation) ali aminske skupine (sečna kislina,

spermin, proteini). V živilstvu se kot najučinkovitejši lovilci radikalov v največji meri uporabljajo predvsem fenolne spojine, kamor uvrščamo fenolne kisline in njihove derivate.

Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin je posledica sposobnosti lovljenja radikalov, delujejo kot reducenti, vežejo kovinske ione v stabilne komplekse in deaktivirajo prooksidativne encime lipoksiogenaze. Fenolne spojine reagirajo z radikali preko prenosa vodikovega atoma ali preko prenosa elektrona (Huang, 2005).

2.2.1 Izvlečki iz rastlin družine ustnatic (Lamiaceae)

Družino ustnatic (Lamiaceae) sestavlja približno 252 rodov in več kot 6700 vrst. Številne vrste imajo velik gospodarski pomen pri proizvodnji številnih izdelkov, predvsem hrane, krme, zdravil, kozmetičnih izdelkov ali drugih izdelkov za nego in higieno (Kumar in sod., 2014). Rastline iz družine ustnatic so poznane po svoji močni protimikrobnih in antioksidativnih učinkovitosti (Generalić Mekinić in sod., 2014). Uporabljajo se pri preventivni in terapiji številnih bolezni, ki so povezane z nastankom prostih radikalov, kot so arteroskleroza, rak, srčno žilne bolezni, odpoved imunskega sistema, disfunkcija možganov in bolezni kože, hkrati delujejo kot učinkoviti zaviralci rasti patogenih mikroorganizmov in kvarjenja hrane (Alimpić in sod., 2015). Raziskave o kemijski zgradbi ustnatic so bile večinoma osredotočene na terpenoide (eterična olja), v zadnjih letih se je pozornost preusmerila na hidrofilne sestavine, kot so fenolne spojine. Večino fenolnih spojin predstavljajo fenolne kisline, še posebej kavna kislina in njeni derivati (Generalić Mekinić in sod., 2014).

Čeprav so bile rastlinske vrste v zadnjem času del številnih raziskav, rezultate težko primerjamo med seboj. Razlogov je več, npr. različni načini priprave vzorcev, izbira metode testiranja in izbor različnih sevov testiranih mikroorganizmov (Generalić Mekinić in sod., 2014).

2.2.1.1 Melisa (*Melissa officinalis* L.)

Melissa officinalis L., znana pod komercialnim imenom navadna melisa, je ena izmed najstarejših in še vedno najbolj uporabljenih zdravilnih rastlin. Listi melise se tradicionalno uporabljajo za pripravo melisinega čaja, za katerega je znano, da deluje na človeško telo zelo pomirjujoče. Farmacevtski zapisi razkrivajo najbolj poznane terapevtske učinke izvlečkov iz melise in sicer naj bi imeli ti izvlečki močno protimikrobsko, protivirusno, protivnetno in antioksidativno delovanje (Kamdem in sod., 2013). V tradicionalni medicini se uporablja za zdravljenje glavobolov, napenjanja, slabe prebave, slabosti, živčnosti, anemije, vrtoglavice, slabega počutja, astme, bronhitisa, srčnega popuščanja, aritmije, nespečnosti, epilepsije, depresije, psihoz, hysterije, pri zdravljenju razjed in ran (Dastmalchi in sod., 2008).

Glavne sestavine, odgovorne za terapevtske učinke melise, so derivati hidroksicimetnih kislin, predvsem rožmarinska in kavna kislina (Ersoy in sod., 2008). Zgórkova in Gówniak (2001) sta določala vsebnost fenolnih kislin v izvlečkih melise. Ugotovila sta, da je vsebnost rožmarinske kisline do 10 mg/g suhe snovi, kavne kisline pa manj kot 0,5 mg/g suhe snovi. V manjših koncentracijah so prisotne še gentiška, protokatehajska in *p*-

hidroksibenzojska kislina. Generalić Mekinić in sod. (2014) so ponovno testirali vzorce izvlečkov melise in ugotavljali vsebnost izbranih fenolnih kislin. Rezultati so bili sledeči: prevladujejo hidriksicimetne kisline in njihovi derivati, med njimi rožmarinska (72,4 mg/g) kislina, sledita ji ferulna (0,61 mg/g) in kavna (0,59 mg/g) kislina; med hidroksibenzojskimi kislinami prevladuje protokatehajska (0,43 mg/g) kislina, sledita ji vanilinska (0,16 mg/g) in galna (0,07 mg/g) kislina.



Slika 2: *Melissa officinalis* L. (Kundalunga, 2016)

Figure 2: *Melissa officinalis* L. (Kundalunga, 2016)

2.2.1.2 Meta (*Mentha piperita* L.)

Mentha piperita L., poznana pod imenom poprova meta, pripada družini Lamiaceae. Zdravilni deli rastline so eterična olja, pridobljena iz nadzemnih delov rastline, posušeni listi, sveži cvetovi in cela rastlina. Ugotovljena je bila nizka do srednja vsebnost fenolnih spojin z antioksidativnimi lastnostmi. Kemilska sestava eteričnih olj, pridobljenih iz mete, je zelo kompleksna in močno variira glede na podnebje, sorto in geografski položaj (Singh in sod., 2015). Meto pogosto gojijo za proizvodnjo olja za uporabo v slaščičarski industriji, za proizvodnjo arom, parfumov in tudi nekaterih zdravil. Metini listi, cvetovi in stebla se pogosto uporabljajo v zeliščni čajih ali kot dodatki v začimbnih mešanicah za boljšo aromo in okus. Delujejo kot blago poživilo. Poleg tega meto uporabljajo kot sredstvo za zdravljenje slabosti, bronhitisa, napenjanja, anoreksije in vnetja jeter. Dokazano je, da imajo eterična olja in izvlečki iz nekaterih vrst mete, vključno s poprovo meto, protimikrobne in antioksidativne lastnosti (Gulluce in sod., 2007).



Slika 3: *Mentha piperita* L. (Tovarna Organika, 2016)

Figure 3: *Mentha piperita* L. (Tovarna Organika, 2016)

Meta vsebuje do 2 mg/g suhe snovi rožmarinske kislina ter do 1 mg/g suhe snovi gentiške kislina, sledijo jima kavna, protokatehujska, *p*-hidroksibenzojska in vanilinska kislina (Zgórska in Głowniak, 2001). Rezultati raziskave, ki so jo izvedli Generalić Mekinić in sod. (2015), kažejo, da je bila v izvlečkih mete v največji meri prisotna rožmarinska kislina (51,8 mg/g), sledila ji je kavna (0,90 mg/g) in ostale fenolne kisline (*p*-hidroksibenzojska, siringinska in galna kislina).

2.2.1.3 Origano (*Origanum vulgare* L.)

Origanum vulgare (Lamiaceae) je trajnica, ki uspeva na območju Evrope, Severne Afrike, Amerike in Azije. Origano se pogosto uporablja kot začimba v prehrani in kot zdravilo za zdravljenje številnih bolezni, kot so prehlad, kašelj in prebavne težave. Rastlina je poznana po močni protimikrobnih in antioksidativnih učinkovitosti, kar pojasni njeno uporabo v tradicionalni medicini. Protimikroben delovanje origana pripisujejo predvsem visoki vsebnosti hlapnih olj. Te hlapne sestavine znatno prispevajo k aromi in okusu zelišča. Fenolne sestavine, ki vključujejo flavonoide in fenolne kislina, so odgovorne za njihovo antioksidativno učinkovitost. Poleg tega imajo ti fenolni antioksidanti številne biološke aktivnosti in sicer delujejo proti razjedam, sladkorni bolezni ter imajo protivirusno, protivnetno, citotoksično in protitumorsko delovanje (Zhang in sod., 2014).



Slika 4: *Origanum vulgare* L. (Nordqvist, 2015)
Figure 4: *Origanum vulgare* L. (Nordqvist, 2015)

Med fenolnimi kislinami prevladujeta rožmarinska kislina (do 6 mg/g suhe snovi) in gentiška kislina (do 2 mg/g suhe snovi), sledijo kavna, protokatehujska, *p*-hidroksibenzojska, ferulna in vanilinska kislina (Zgórska in Głowniak, 2001). Generalić Mekinić in sod. (2014) so določili naslednje koncentracije fenolnih kislín v organu: rožmarinska (17,46 mg/g), siringinska (0,72 mg/g), vanilinska (0,42 mg/g), kavna (0,30 mg/g), *p*-kumarna (0,20 mg/g) in galna (0,05 mg/g) kislina.

2.2.1.4 Sivka (*Lavandula angustifolia* L.)

Sestava eteričnih olj sivke je bila zaradi komercialnih interesov v industriji arom, v aromaterapiji in v farmaciji natančno raziskana, predvsem zaradi njihovih številnih terapevtskih učinkov. Olja sivke namreč delujejo kot pomirjevala, antidepresivi, proti krčem ter imajo protivirusne, protimikrobe in antioksidativne lastnosti. V zadnjem času se

uporabljajo v prehrabeni industriji kot naravne arome pri proizvodnji napitkov, sladoledov, bombonov, peciva in žvečilnih gumijev (Da Porto in sod., 2009).

Zgórka in sod. (2001) so iz listov sivke izolirali gentiško (do 9 mg/g suhe snovi), rožmarinsko (do 2 mg/g suhe snovi) in klorogensko kislino (do 1,6 mg/g suhe snovi) ter kavno, *p*-kumarno, ferulno, protokatehujsko, *p*-hidroksibenzojsko in vanilinsko kislino.



Slika 5: *Lavandula angustifolia* L. (Favn Professional, 2011)

Figure 5: *Lavandula angustifolia* L. (Favn Professional, 2011)

2.2.1.5 Timijan (*Thymus serpyllum* L.)

Timijan ali materina dušica (*Thymus serpyllum* L.) spada v družino ustnatic. Razkuževalno moč timijana so poznali že Egipčani, ki so ga uporabljali za balzamiranje mrtvih. Pri velikih epidemijah kuge v Evropi je timijan upravičeno veljal za najboljšo zaščito pred okužbo. V fitoterapiji timijan uporabljajo proti kašlu, bronhitisu, pri obolenju želodca in črevesja. Izboljšuje prebavo in prežene vetrove. Spodbuja tudi izločanje urina (je diuretik) in hkrati deluje antiseptično na izločala (Galle-Toplak, 2002).



Slika 6: *Thymus serpyllum* L. (Jørgensen, 2016)

Figure 6: *Thymus serpyllum* L. (Jørgensen, 2016)

Med fenolnimi kislinami prevladujeta rožmarinska (do 6 mg/g suhe snovi) in gentiška kislina (do 1 mg/g suhe snovi), sledijo kavna, *p*-kumarna, siringična, protokatehujská, vanilinska in *p*-hidroksibenzojska kislina (Zgórka in Główniak, 2001). Generalić Mekinić in sod. (2015) so določili naslednje vrednosti fenolnih kislin v timijanu: rožmarinska (45,8 mg/g), ferulna (0,29 mg/g), *p*-hidroksibenzojska (0,24 mg/g), *p*-kumarna (0,21 mg/g), protokatehujská (0,13 mg/g), galna (0,13 mg/g) in kavna (0,09 mg/g) kislina.

Al-Bayati (2008) je ugotavljal protimikrobnoučinkovitost eteričnega olja timijana *in vitro* z mikrodilucijsko metodo proti devetim patogenim bakterijam. Rezultati so pokazali, da je bilo eterično olje timijana učinkovito proti vsem patogenim bakterijam razen bakterije *Pseudomonas aeruginosa*. Najbolj učinkovito je bilo proti bakteriji *Bacillus cereus* (MIK vrednost 15,6 g/mL), sledita bakteriji *Staphylococcus aureus* in *Proteus vulgaris* (MIK vrednost 31,2 g/mL).

2.2.1.6 Žajbelj (*Salvia officinalis* L.)

Rod *Salvia* je eden največjih in najpomembnejših rodov družine ustnatic (Lamiaceae) in vsebuje okoli 900 vrst. Številne vrste žajblja se uporabljajo v alternativni medicini po celem svetu za zdravljenje bakterijskih okužb, rakavih obolenj, malarije, vnetij in za razkuževanje prostorov. Žajbelj je med najbolj cenjenimi zelišči ravno zaradi vsebnosti eteričnih olj in njihovih številnih biološko aktivnih spojin. Eterična olja žajblja imajo močne protimikrobnne, protivirusne in antimutagene učinkovitosti, prav tako delujejo tudi proti plesnim. Ime rodu *Salvia* izvira iz latinščine in v prevodu pomeni "pozdraviti", ime vrste *officinalis* pomeni "medicinski", kar jasno nakazuje njegovo zgodovinsko pomembnost pri varovanju zdravja in preprečevanju zdravstvenih tegob. V starem Rimu so mu nadeli celo ime Sveta rastlina (Russo in sod., 2013).

Longaray Delamare in sod. (2007) so proučevali protimikrobnouaktivnost eteričnega olja žajblja z mikrodilucijsko metodo za 17 bakterijskih sevov. Ugotovili so, da žajbelj inhibira rast bakterij *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *A. hydrophila*, *A. sobria*, in *K. oxytoca*, medtem ko so opazili le blage učinke na bakteriji *E. coli* in *S. aureus*.



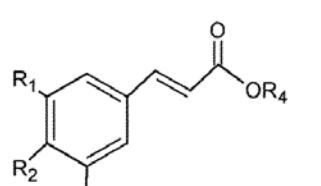
Slika 7: *Salvia officinalis* L. (Bisa, 2016)

Figure 7: *Salvia officinalis* L. (Bisa, 2016)

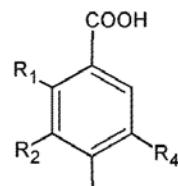
Med fenolnimi kislinami v žajblju prevladujeta rožmarinska kislina (do 6 mg/g suhe snovi) in gentiška kislina (do 1 mg/g suhe snovi), sledijo kavna, ferulna, protokatehajska, vanilinska in *p*-hidroksibenzojska kislina (Zgórska in Górnia, 2001). Generalić Mekinić in sod. (2014) so določili naslednje koncentracije fenolnih kislin v žajblju: rožmarinska (25,2 mg/g), siringinska (1,61 mg/g), *p*-hidroksibenzojska (1,04 mg/g), kavna (0,70 mg/g), vanilinska (0,58 mg/g), ferulna (0,20 mg/g), galna (0,09 mg/g) in *p*-kumarna (0,07 mg/g) kislina.

2.2.2 Fenolne kisline

Fenolne spojine vsebujejo vsaj en aromatski obroč, na katerem je ena ali več hidroksilnih skupin. Razvrstimo jih lahko na različne načine. Eden od njih je razvrstitev v naslednje skupine: enostavni fenoli ali benzokinoni, fenolne kisline, naftokinoni, ksantoni, stilbeni, flavonoidi, lignani, biflavonoidi, lignini, kumarini in kondenzirani tanini. Prehransko so najpomembnejše fenolne kisline, flavonoidi in tanini. Fenolne kisline so enostavne fenolne spojine, v katerih je na aromatski obroč vezana karboksilna skupina. Karboksilna skupina je lahko vezana neposredno (hidroksibenzojske kisline) ali posredno preko etilenske skupine (hidroksicimetne kisline). Med hidroksibenzojske kisline spadajo galna, protokatehajska, vanilinska, siringinska in kina kislina, med hidroksicimetne *p*-kumarna, kavna, ferulna in sinapinska kislina (Abramovič, 2011).



HIDROKSICIMETNE KISLINE



HIDROKSIBENZOJSKE KISLINE

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
KAVNA KISLINA	OH	OH	H	H	GALNA KISLINA	H	OH	OH	OH
FERULNA KISLINA	OCH ₃	OH	H	H	PROTOKATEHUJSKA KISLINA	H	OH	OH	H
SINAPINSKA KISLINA	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	VANILINSKA KISLINA	H	OCH ₃	OH	H
<i>p</i> -KUMARNA KISLINA	H	OH	H	H	SIRINGINSKA KISLINA	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
					<i>p</i> -HIDROKSIBENZOJSKA KISLINA	H	H	OH	H

Slika 8: Molekulska struktura fenolnih kislin (Liu in sod., 2014)
Figure 8: The molecular structure of phenolic acids (Liu et al., 2014)

Hidroksicimetne kisline so zaradi propenske stranske verige veliko manj polarne od hidroksibenzojskih kislin. Polarnost spojine določa njen topnost v danem mediju oz. porazdelitev med hidrofilno in hidrofobno fazo. Ta lastnost lahko pospeši prehod molekul skozi celično membrano in na ta način poveča njihov inhibicijski učinek (Rodriguez Vaquero in sod., 2007). Prav tako lahko na protimikrobnem delovanju vplivajo še druge strukturne lastnosti in okoljske razmere.

Na antioksidativno učinkovitost vplivajo okolje in pogoji, v katerih antioksidant deluje, snov, na katero učinkuje ter prisotnost drugih antioksidantov. Poleg tega na antioksidativno učinkovitost vplivajo številni dejavniki, ki se nanašajo na lastnosti antioksidanta. Med te dejavnike sodijo: strukture lastnosti (substitucija na aromatskem obroču), intramolekulske vodikove vezi, sterične prepreke, energija disociacije vezi H-O v hidroksilni skupini, redoks potencial, kislinsko bazne lastnosti, interakcije s topilom, topnost in porazdelitvene

lastnosti (porazdelitev med lipidno in vodno fazo), hlapnost, topotna stabilnost in koncentracija (Abramovič, 2011).

Biosinteza fenolnih spojin v rastlinah je kompleksen proces in je rezultat medsebojnega sodelovanja več različnih poti. Vse fenolne spojine, z izjemo flavonoidov, nastajajo iz fenilalanina ali njegovega prekurzorja šikimske kisline (Abram in Simčič, 1997). Na sintezo fenolov močno vplivajo različni dejavniki: svetloba, temperatura, vsebnost ogljikovih hidratov, mineralov in vode v celici.

Med fenolnimi kislinami, ki se po navedbah literurnih virov (Zgórska in Górska, 2001; Generalić Mekinić in sod., 2014) nahajajo v izvlečkih družine ustnatic, so najbolj zastopane: rožmarinska, *p*-hidroksibenzojska, galna, protokatehajska, vanilinska, siringinska, *p*-kumarna, kavna in ferulna kislina.

2.2.2.1 Galna kislina

Galna kislina (3,4,5-trihidroksibenzojska kislina) in njeni derivati so močno prisotni v rastlinskem svetu in predstavljajo veliko družino rastlinskih sekundarnih polifenolnih metabolitov. Nahajajo se v obliki metoksilirane galne kisline (npr. siringinska kislina) ali kot estri z glukozo, kina kislino ali glicerolom. So neizogibne sestavine živil in piča rastlinskega izvora. Derivati galne kisline so dobro poznani tudi v fitomedicini zaradi številnih bioloških in farmakoloških aktivnosti, vključno z lovljenjem prostih radikalov in indukcijo apoptoze rakavih celic. *In vivo* poskusi so pokazali, da so glavni metaboliti galne kisline produkti metilacije, dekarboksilacije in dehidroksilacije (Lu in sod., 2006). Leta 2007 so Chanwitheesuk in sod. iz etanolnega ekstrakta vrste *Caesalpinia mimosoides* uspešno izolirali protimikrobnno sestavino, galno kislino. Galna kislina je inhibirala rast bakterij *S. typhi* in *S. aureus*, vrednost MIK je bila 2500 µg/mL in 1250 µg/mL.

2.2.2.2 Protokatehajska kislina

Protokatehajska kislina (3,4-dihidroksibenzojska kislina) je bel prah, je slabo topna v vodi in dobro topna v etanolu. V naravi je prisotna v mnogih rastlinah in rastlinskih smolah, še posebno veliko protokatehajske kisline lahko najdemo v hibiskusu (*Hibiscus sabdariffa*), japonskem kosmičju (*Lonicera japonica*), ožepku (*Hyssopus officinalis*), baziliki (*Ocimum basilicum*) in origanu (*Origanum majorana*) (Zgórska in Górska, 2001). Številne *in vitro* študije so pokazale, da je protokatehajska kislina sposobna inhibirati rast številnih bakterij in plesni. Vendar ostaja neznanka, ali lahko ta kislina zavre rast bakterijske vrste *Campylobacter* (predvsem na antibiotik odpornih vrst) (Yin in Chao, 2008).

2.2.2.3 Vanilinska kislina

Vanilinska kislina (4-hidroksi-3-metoksibenzojska kislina) je oksidirana oblika vanilina, v katerem je karbonilna skupina nadomeščena s karboksilno skupino. Dobimo jo v obliki belih ali rumenih kristalov. Je najpomembnejša sestavina vanilije, ki je v svetu ena najbolj cenjenih naravnih arom. Derivati vanilinske kisline se v Evropi uporabljajo kot blago poživilo (Ghosh in sod., 2006).

Vanilinska kislina je glavni proizvod ki nastane pri β -oksidativni cepitvi stranske verige ferulne kisline, ki jo povzročajo mikrobne vrste *Rhodotorula*, *Bacillus*, *Pseudomonas* in *Streptomyces*. Kot taka je vanilinska kislina izhodna spojina, ki je na voljo za biokatalitično sintezo drugih aromatskih spojin, kot sta vanilin in vanilil alkohol (Dhar in sod., 2007). Največ vanilinske kisline so izolirali iz listov rožmarina (od 120 do 160 $\mu\text{g/g}$ suhe snovi) in timijana (od 40 do 50 $\mu\text{g/g}$ suhe snovi) (Zgórska in Górska, 2001).

2.2.2.4 Siringinska kislina

Čista siringinska kislina (4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojska kislina) se nahaja v obliki belih kristalov. V vodi je slabo topna, prav tako tudi v etanolu. Je prevladujoča komponenta v rdečem grozdju, najdemo jo tudi v borovnicah, lubenici, breskvah, zelenem grozdju, grenivki in rdečem vinu (Mattila in sod., 2006). Največ siringinske kisline so izolirali iz timijana (od 70 do 90 $\mu\text{g/g}$ suhe snovi) (Zgórska in Górska, 2001). Raziskave so pokazale, da je siringinska kislina neučinkovita proti bakterijam *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes* in *S. enterica* (Friedman in sod., 2003).

2.2.2.5 *p*-Kumarna kislina

p-Kumarna kislina (4-hidroksicimetna kislina) je hidroksi derivat cimetne kisline. Obstajajo trije izomeri kumarne kisline in sicer *o*-kumarna, *m*-kumarna in *p*-kumarna kislina, ki se razlikujejo po mestu vezave hidroksi skupine na fenilni obroč. Najpogosteje zastopan izomer v naravi je *p*-kumarna kislina. Prosto ali vezano v obliki estra ali glikozida najdemo *p*-kumarno kislino v številnih užitnih delih rastlin, kot so arašidi, paradižnik, korenje, zelje in česen. Največ *p*-kumarne kisline (od 100 do 200 $\mu\text{g/g}$ suhe snovi) so izolirali iz cvetov sivke in timijana ter listov ožepka in rožmarina, medtem ko je bila vrednost za šetrnj nad 2000 $\mu\text{g/g}$ (0,2 %) suhe snovi (Zgórska in Górska, 2001). Čista *p*-kumarna kislina se nahaja v obliki kristalov, ki so slabo topni v vodi, vendar zelo dobro topni v etanolu in dietil etru (Ayaz in sod., 2008).

2.2.2.6 Kavna kislina

Čista kavna kislina (3,4-dihidroksicimetna kislina) je rjavkast prah. Topna je v vroči vodi in alkoholu. Kavno kislino so našli v številnih rastlinah kot metabolni produkt. Močno vpliva na topnost rastlinskih proteinov. Kavna kislina je prevladujoča fenolna komponenta v sončničnih semenih. Našli so jo tudi v paradižniku; njena koncentracija je večja v lupini paradižnika kot v mesu. Te fenolne komponente so odgovorne za encimsko porjavenje, v paradižniku delujejo predvsem kot antioksidanti (Chen in Ho, 1997). Znano je, da kavna kislina zmanjša tveganje za nastanek kroničnih bolezni, kot so razna vnetja, srčno-žilne bolezni in rakava obolenja (Park, 2008).

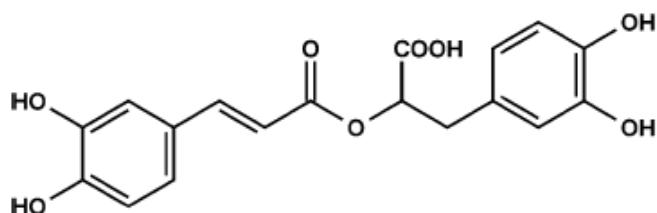
2.2.2.7 Ferulna kislina

Čista ferulna kislina (4-hidroksi-3-metoksicimetna kislina) je svetlo rumen kristaliničen prah. Topna je v vodi, etanolu, dietil etru, etil acetatu in acetonu. Najdemo jo v listih in semenih številnih rastlin, še posebej pa v žitaricah, kot so riž, koruza in oves. Poleg tega je tudi v kavi, jabolkih, artičoki, arašidih, ananasu in pomaranči (Zhao in Moghadasian,

2008). V pomarančnem soku je odgovorna za nespremenjeno aroma med skladiščenjem. Prav tako je eden najpomembnejših antioksidantov v pivu. Alkoholni estri kavne in ferulne kisline se nahajajo tudi v propolisu oz. zadelavini, ki ima znano protimikrobnno delovanje in se že stoletja uporablja kot protivnetno sredstvo v ljudski medicini (Chen in Ho, 1997). Ferulna kislina velja zaradi svojih številnih fizioloških funkcij (antioksidativno, protimikrobnno, protivnetno delovanje) za eno od najpomembnejših fenolnih kislin. Prav tako ščiti pred srčno-žilnimi boleznimi, znižuje raven holesterola v krvi in jetrih ter poveča preživelost spermijev (Mussatto in sod., 2007).

2.2.2.8 Rožmarinska kislina

Rožmarinska kislina je ester kavne in 3-(3,4-dihidroksi fenil) mlečne kisline. Zgrajena je iz dveh fenolnih obročev, med katerima sta karbonilna in karboksilna skupina. Vsak obroč vsebuje po dve hidroksilni skupini (Chen in Ho, 1997).



Slika 9: Rožmarinska kislina (Petersen in Simmonds, 2003)
Figure 9: Rosmarinic acid (Petersen and Simmonds, 2003)

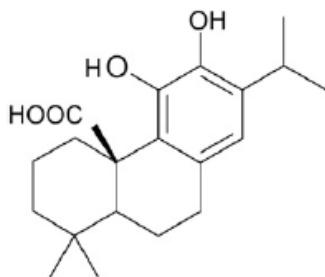
Je derivat fenolnih kislin in je poleg karnozolne kisline in karnozola najbolj odgovorna za protimikrobnno delovanje rožmarinovega ekstrakta (Moreno in sod., 2006). Rožmarinska kislina je vodotopna in jo pridobivajo z vodno ekstrakcijo. Čista ima dober protimikroben učinek na grampozitivne bakterije, medtem ko na gramnegativne bakterije čista spojina nima protimikrobnega učinka in je verjetno aktivna le v prisotnosti karnozolne kisline (Petersen in Simmonds, 2003). Rožmarinska kislina ima številne zanimive biološke aktivnosti - protivirusno, protibakterijsko, protivnetno in antioksidativno aktivnost. Prisotnost rožmarinske kisline v zdravilnih rastlinah, zeliščih in začimbah je koristno in ugodno vpliva na zdravje. Fenolne spojine, kot je rožmarinska kislina, lahko prispevajo k antioksidativni aktivnosti rastlin, uporabljenih v kozmetični industriji, kot naprimer rožmarin (*Rosmarinus officinalis*) in žanikelj (*Sanicula europaea*) (Petersen in Simmonds, 2003).

Rezultati raziskav kažejo, da je rožmarinska kislina prevladujoča fenolna spojina v vseh rastlinskih tkivih družine usnatic (Laminaceae) (Zgórska in Górska, 2001). Visoke koncentracije rožmarinske kisline so določili v šetraju (*Satureja officinalis*) (1,2 % suhe teže) in baziliki (*Ocimum basilicum*) (1,1% suhe snovi), kot tudi v listih melise (*Melissa officinalis*) (1 % suhe teže) in v rožmarinu (*Rosmarinus officinalis*) (0,7 % suhe snovi).

2.2.2.9 Karnozolna kislina

Karnozolna kislina je glavna sestavina izvlečkov rožmarina (*Rosmarinus officinalis*) in žajblja (*Salvia officinalis*). Obe zelišči imata močno protimikrobnno in protivnetno delovanje. Posušena zelišča rožmarina in žajblja vsebujejo približno od 0,2 do 1 % karnozolne kisline, v komercialno dostopnih izvlečkih je koncentracija karnozolne kisline lahko mnogo večja (npr. izvleček rožmarina vsebuje 10,3 % karnozolne kisline). Za karnozolno kislino je bilo dokazano, da ima antioksidativne, protivnetne in protirakave učinke (Poeckel in sod., 2008).

Topna je v metanolu, etanolu, acetonu in deloma tudi v vodi (Rižner Hraš in sod., 2000). Fenolni diterpeni so glavna komponenta nepolarne frakcije v izvlečku rožmarina in predvidevajo, da sta karnozol in karnozolna kislina odgovorna za protimikrobnno delovanje ekstraktov rožmarina. Karnozol je lakton karnozolne kisline. Zaradi tega imata podobno protimikrobnno delovanje, vendar ima sam karnozol manjši protimikrobni učinek (Del Campo in sod., 2000).



Slika 10: Karnozolna kislina (Poeckel in sod., 2008)
Figure 10: Carnosic acid (Poeckel et al., 2008)

2.3 BAKTERIJE VRSTE *Staphylococcus aureus*

Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* so grampozitivni koki, ki se povezujejo v značilne grozdaste skupke, za katere je znano, da povzročajo zastrupitve s hrano, saj so nekateri njihovi patogeni sevi sposobni proizvajati topotno stabilne enterotoksine. Ta fakultativno anaerobna bakterija ima številne virulentne lastnosti, vključno s tvorbo izvenceličnih proteinov, kot so adhezini, invazini, hemolizini, eksotoksini itd. (Huong in sod., 2009).

Okužbe s sevi *S. aureus*, ki izločajo toksine, se kažejo s klinično sliko zastrupitve s hrano in sindroma toksičnega šoka. Druge vrste stafilokokov, ki se od bakterije *S. aureus* ločijo po tem, da ne sintetizirajo koagulaze (koagulazno negativni stafilokoki), so del normalne bakterijske flore kože in nekaterih sluznic (Seme, 2002a). Približno 20 do 30 % odraslih oseb je zdravih nosilcev teh bakterij, največkrat v nosni votlini (Seme, 2002b).

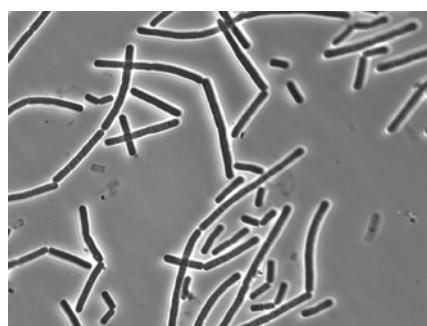


Slika 11: *Staphylococcus aureus* (Kunkel, 2009)
Figure 11: *Staphylococcus aureus* (Kunkel, 2009)

Bakterije vrste *S. aureus* povzročajo okužbe kože in mehkih tkiv, okužbe osrednjega živčnega sistema, okužbe zgornjih in spodnjih dihal, okužbe sečil in okužbe, ki so posledica delovanja toksinov. Stafilokokni enterotoksini, zaužiti z okuženim živilom pri ljudeh povzročijo drisko, želodčne krče, slabost in bruhanje. Pri težjih oblikah zastrupitve nastopijo mišični krči, glavobol, sprememba krvnega tlaka in srčnega ritma (Seme, 2002b). Najpogostejši viri okužbe z živili so meso in mesni izdelki, jajca in jajčni izdelki, kremne sladice, razne solate, sladoled, surovo mleko in mlečni izdelki (Seme, 2002b).

2.4 BAKTERIJE VRSTE *Bacillus cereus*

Rod *Bacillus* je sestavljen iz raznolike skupine po Gramu pozitivnih, sporogenih, aerobnih ali fakultativno anaerobnih bakterij, ki so paličaste oblike in so zelo razširjene v naravi. Zaradi sporogenosti so zelo odporne na različne okoliščine (From in sod., 2005).



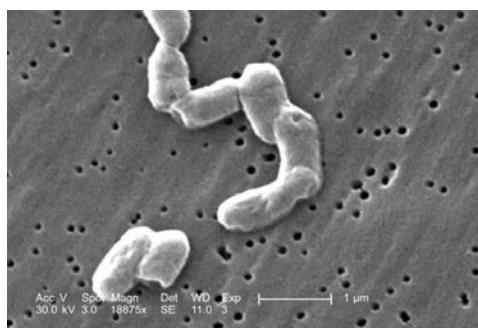
Slika 12: *Bacillus cereus* (Sanchis, 2010)
Figure 12: *Bacillus cereus* (Sanchis, 2010)

V živilstvu so bacili lahko povzročitelji kvara. Izvor onesnaženja so številne surovine (riž, žita, mleko, voda, začimbe), oprema in okolje (prah, zemlja). Razloga za njihovo številčnost v živilih sta vsesplošna razširjenost teh mikroorganizmov in izredna sposobnost spor, da preživijo pasterizacijo, sušenje, zamrzovanje in sanitacijo s kemičnimi sredstvi. Težave pri sušenih in zmrznjenih živilih lahko nastopijo pri pripravi gotove jedi, ker ob tem nudimo ugodne pogoje za kaljenje spor v vegetativne celice in njihovo rast. Pri toplotno obdelanih živilih kaljenje spor nastopi, če živila ne ohladimo takoj pod 6 °C oz. če ga pustimo na sobni temperaturi do naslednjega dne (Andersson in sod., 1995).

Bacillus cereus povzroča dva sindroma, emetični sindrom in diarealni sindrom. Emetični sindrom spremišča bruhanje, ki se pojavi v nekaj urah po zaužitju kontaminirane hrane. Pri zastrupitvi z enterotoksini se simptomi pokažejo v osmih do šestnajstih urah po zaužitju in se kažejo v obliki trebušnih bolečin, krčev in diareje (Granum, 2003).

2.5 BAKTERIJE RODU *Salmonella*

Rod *Salmonella* so gramnegativne, gibljive, fakultativno anaerobne palčke, ki lahko preživijo v makrofagih gostiteljev in povzročajo dolgotrajne okužbe (Lahiri in sod., 2009).



Slika 13: *Salmonella* Infantis (Kunkel, 2007)
Figure 13: *Salmonella* Infantis (Kunkel, 2007)

Salmoneloza je ena najpomembnejših bakterijskih črevesnih bolezni, ki povzročajo obolenja milijonov ljudi in živali ter znatne gospodarske izgube po vsem svetu. Prevladujoča serotipa, ki povzročita skupaj 90 % vseh obolenj s salmonelozo, sta *S. enteritidis* in *S. typhimurium*. V zadnjih letih je *S. Infantis* postala najbolj razširjena in je odgovorna za približno 5 % vseh bolezni (Nógrády in sod., 2008).

Najpomembnejši dejavniki patogeneze pri salmonelah so: sposobnost preživetja nizkega pH v želodcu, sposobnost preživetja visokega pH v dvanajstniku, sposobnost kolonizacije tankega črevesja in izločanje toksinov. Salmonele lahko pri otrocih in starejših in bolnikih s slabim imunskim sistemom preidejo skozi črevesno steno v kri in nato po krvi potujejo v organe, kjer povzročajo vnetja (Mastroeni in Sheppard, 2004).

2.6 BAKTERIJE VRSTE *Escherichia coli*

Escherichia coli je gramnegativna, fakultativno anaerobna patogena bakterija. Spada v družino Enterobacteriae (Chen in Frankel, 2005). Bakterije vrste *E. coli* naseljujejo tudi prebavni trakt človeka. Večina sevov ni patogenih, vendar lahko postanejo patogeni takrat, ko človeku pade imunska odpornost. Poleg nepatogenih poznamo še patogene seve.

Vsi patogeni sevi povzročajo drisko, le redki med njimi tudi bruhanje. Najpomembnejša dejavnika patogenosti sta sposobnost bakterij, da izločajo endotoksine in dobra sposobnost pritrjevanja na črevesno steno (Nataro in Kaper, 1998).



Slika 14: *Escherichia coli* (Kunkel, 2004)
Figure 14: *Escherichia coli* (Kunkel, 2004)

2.7 METODE UGOTAVLJANJA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVITOSTI

Odpornost je definirana kot začasna ali trajna sposobnost mikroorganizma in njegovih potomcev, da ohrani živost in se razmnožuje pod pogoji, ki bi uničili oz. ustavili razvoj ostalih mikroorganizmov (Cloete, 2003). Najpogosteje uporabljeno merilo odpornosti mikroorganizmov proti protimikrobnim sredstvom je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). MIK je najnižja koncentracija protimikrobnega agensa, ki popolnoma zavre rast bakterij (Burt, 2004).

Določanje MIK je uporabno za vrednotenje relativne stopnje občutljivosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem in za primerjanje relativnih aktivnosti agensov proti različnim vrstam mikroorganizmov (Burt, 2004). Tarče delovanja protimikrobnih sredstev so ponavadi celična stena, proteini v membrani, sinteza folne kisline, metabolizem nukleinskih kislin, genetski material, encimi, itd. (Gilbert in McBain, 2003). Za določanje MIK-a rastlinskih izvlečkov za bakterije in glive se najpogosteje uporablajo agar difuzijski in agar dilucijski testi (Muraina in sod., 2009). Tehnika je uspešna pri točno določenih inhibitorjih. Pri testiranju izvlečkov, ki vsebujejo neznane sestavine, lahko pride do lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov. Protimikrobna učinkovitost je lahko inhibirana ali povečana zaradi zunanjih dejavnikov. Tip agarja, koncentracija soli, temperatura inkubacije in velikost molekul protimikrobnih sestavin lahko vplivajo na rezultate, pridobljene z difuzijsko metodo v agarju. Ta metoda prav tako ne loči med baktericidnim in bakteriostatičnim učinkom (Eloff, 1998).

Metode razredčevanja v tekočem gojišču se uporabljajo za določanje minimalne koncentracije (najpogosteje izražene v $\mu\text{g/mL}$) protimikrobnega agensa, ki je potreben, da ubije ali inhibira mikroorganizem. Protokoli za določanje protimikrobne inhibitorne aktivnosti so izpeljani z metodami v tekočih ali na trdnih gojiščih. Če protimikrobeni agens razredčimo v trdnem gojišču, govorimo o metodi razredčevanja v agarju, če testirani agens razredčimo v tekočem gojišču, govorimo o metodi razredčevanja v tekočem gojišču (Woods in Washington, 1999).

2.7.1 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z dodatkom barvila TTC

Hitra in občutljiva metoda z uporabo tetrazolij rdečega ali tiazol modrega barvila kot indikatorja bakterijske presnove, ki jo je razvil Eloff (1998), je široko uporabljena tehnika, ki deluje dobro na hitro rastoče bakterije, kot so *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. Prav tako je učinkovita pri testiranju človeških in rastlinskih glivnih patogenov in majhnih mikroaerofilnih, acidogenih bakterij (Muraina in sod., 2009).

Za merjenje metabolne aktivnosti se pogosto uporablja tetrazolijkeve soli (2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid (TTC)). TTC je lahko prejemnik elektronov v reakcijah, ki vključujejo različne dehidrogenaze kot tudi encime, ki vsebujejo flavin. Ti encimi reducirajo TTC v netopni 1,3,5-trifeniltetrazolijev formazan (TTF). Kristali slednjega se kopijo v aktivnih celicah, zato ga je potrebno ekstrahirati iz bakterijskih celic z organskimi topili (npr. aceton, metanol) in meriti spektrofotometrično. Pri redukciji TTC v TTF pride do spremembe barve iz rumene v vijolično. Količina nastalega formazana je merilo za celokupno metabolno aktivnost mikroorganizmov (Danevčič in Mandić-Mulec, 2007).

Metoda je zanesljiva, poceni, daje ponovljive rezultate in je približno 30-krat bolj občutljiva od drugih metod, potrebuje majhne količine vzorcev, lahko se uporablja za veliko število vzorcev, ne zahteva visoke ravni usposobljenosti in ne zahteva veliko časa (Eloff, 1998).

2.7.2 Kinetika rasti ali odmiranja bakterij

Bakteriocidni ali bakteriostatični učinek v odvisnosti od kontaktnega časa protimikrobnega sredstva lahko podamo s krivuljo inhibirane rasti ali krivuljo odmiranja. Najpogosteje uporabljena metoda za določanje teh učinkov je merjenje optične gostote kot merila koncentracije celic v tekočem gojišču in štetje kolonijskih enot po nacepljanju in inkubaciji na trdnem gojišču (Burt, 2004).

2.8 METODE UGOTAVLJANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI

Za ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin imamo na voljo hitre, enostavne in zanesljive metode. Poznanih je več različnih načinov, s katerimi lahko določimo antioksidativno učinkovitost. V splošnem razvrstimo metode določitve v dve skupini (Abramovič, 2011):

- ✓ testi, kjer spremljamo učinek dodanega antioksidanta na napredovanje oksidacije v lipidnem sistemu
- ✓ testi, kjer v modelnem sistemu merimo, kako je antioksidant sposoben učinkovati na izbrano tarčo (radikal, kovinski ion)

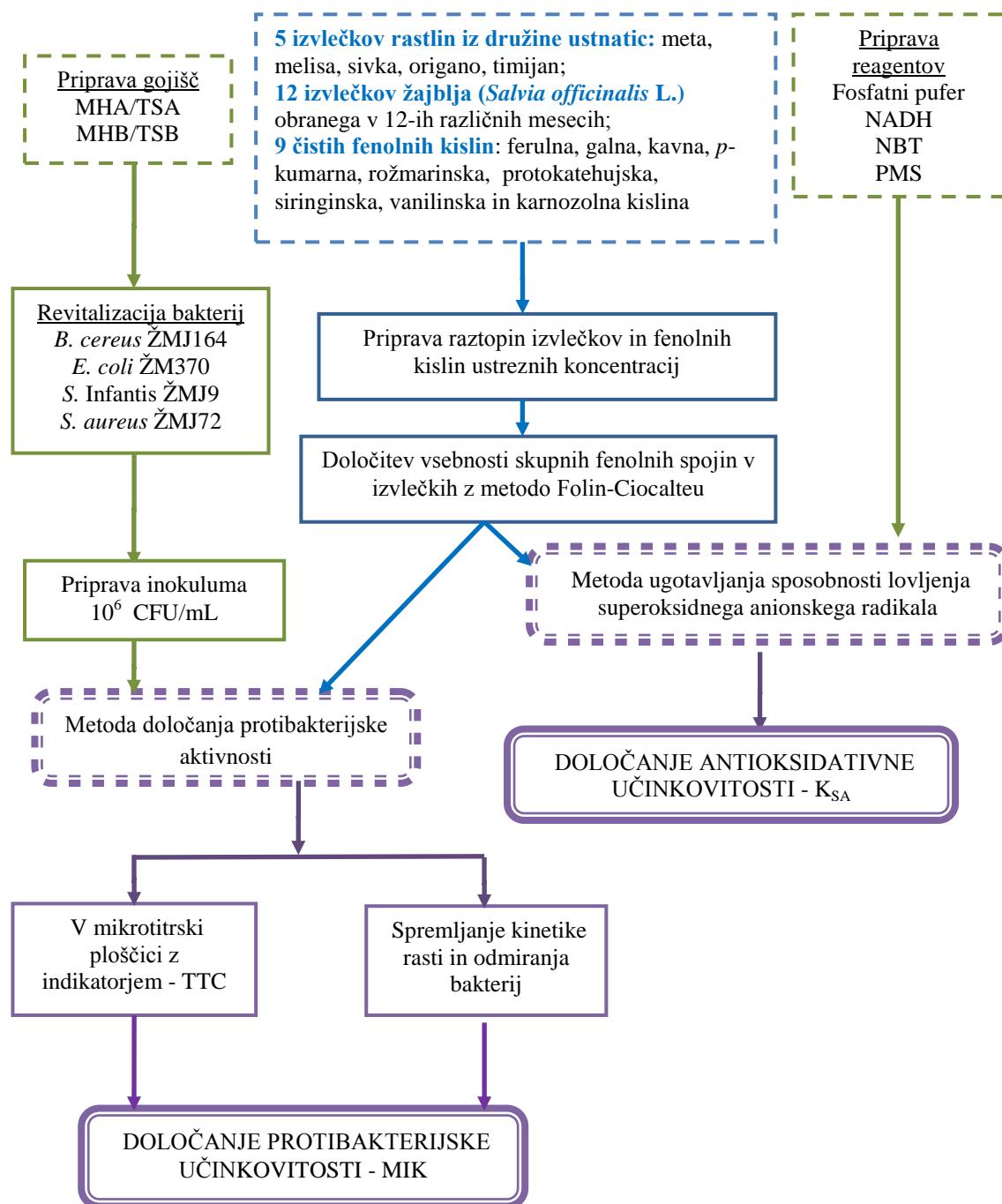
2.8.1 Določitev sposobnosti lovljenja radikala $O_2^{\cdot-}$

Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin lahko merimo preko njihove sposobnosti lovljenja prostih radikalov (Neo in sod., 2010). Pri fenolnih kislinah antioksidativna učinkovitost narašča s številom hidroksilnih skupin na benzenovem obroču in se zmanjša, če hidroksilno skupino na tretjem in petem C-atomu v benzenovem obroču nadomesti metoksilna skupina (Balasundram in sod., 2006).

V bioloških sistemih je superoksidni anionski radikal ($O_2^{\cdot-}$) med bolj reaktivnimi kisikovimi zvrstmi in je odgovoren za iniciacijo oksidativnega procesa v lipidnem matriksu. Vključuje se v reakcije oksidacije, tako da vzdržuje kovinske ione v reaktivnejšem stranu, tj. v njihovi reducirani obliki. Določitev sposobnosti spojine za lovljenje $O_2^{\cdot-}$ temelji na redukciji tarčne molekule s strani $O_2^{\cdot-}$. Vsebnost reducirane tarčne molekule pri različnih koncentracijah antioksidanta zasledujemo spektrofotometrično pri ustreznih valovnih dolžinah. Nižja absorbanca pomeni manjšo vsebnost reducirane tarčne molekule. Manjša vsebnost reducirane tarčne molekule je posledica znižanja vsebnosti superoksidnega anionskega radikala v reakcijski zmesi, kar pokaže na učinkovitost antioksidanta za lovljenje omenjenega radikala (Abramovič, 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 15: Shema izvedbe eksperimentalnega dela
Figure 15: Scheme implementation of experimental work

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterijski sevi

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili seve bakterij *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Infantis* in *Staphylococcus aureus*.

Preglednica 1: Bakterijski sevi uporabljeni v eksperimentalnem delu naloge
Table 1: Bacterial strains used in experimental part of the thesis

Oznaka seva	Vir seva
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ164	WSBC 10530, klinični izolat
<i>Escherichia coli</i> ŽM370	ATCC 11229
<i>Salmonella Infantis</i> ŽMJ9	piščanče meso
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ72	ATTC 25923, klinični izolat

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Tekoče gojišče MHB

Priprava: 10,5 g osnovnega medija Mueller-Hinton (Oxoid, CM0405, Anglija) smo natehtali v 1000 mL steklenico in ga raztopili v 500 mL dH₂O. V epruvete smo odpipetirali 4 mL in 5 mL tako pripravljenega gojišča, preostanek pa prelili v 250 mL steklenico. Epruvete in steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C. Gojišče smo ohladili na sobno temperaturo in ga nato do nadaljnje uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Uporaba: Gojišče v epruvetah po 4 mL smo uporabili za revitalizacijo kultur *B. cereus* WSBC 10530, *S. aureus* ATTC 25926 in *S. Infantis* ŽMJ9. Epruvete po 5 mL smo uporabili za pripravo inokuluma kultur *B. cereus* WSBC 10530, *S. aureus* ATTC 25926 in *S. Infantis* ŽMJ9. Tekoče gojišče, pripravljeno v steklenici, smo uporabili za pripravo potrebnih koncentracij izvlečkov in fenolnih kislin in kot gojišče pri mikrodiluciji z izvedbo v mikrotitrski ploščici.

3.2.2.2 Tekoče gojišče TSB

Priprava: 15 g osnovnega medija Tryptone Soya (Oxoid, CM0129, Anglija) smo natehtali v 1000 mL steklenico in ga raztopili v 500 mL dH₂O. V epruvete smo odpipetirali 4 mL in 5 mL tako pripravljenega gojišča, preostanek pa prelili v 250 mL steklenico. Epruvete in steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C. Gojišče smo ohladili na sobno temperaturo in ga nato do nadaljnje uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Uporaba: Gojišče v epruvetah po 4 mL smo uporabili za revitalizacijo kultur *E. coli* ŽM370. Epruvete po 5 mL smo uporabili za pripravo inokuluma kultur *E. coli* ŽM370. Tekoče gojišče pripravljeno v steklenici smo uporabili za pripravo potrebnih koncentracij

izvlečkov in fenolnih kislin in kot gojišče pri mikrodiluciji z izvedbo v mikrotitrski ploščici.

3.2.2.3 Trdno gojišče MHA

Priprava: 19 g osnovnega medija agarja Mueller-Hinton (Oxoid, CM0337, Anglija) smo natehtali v 1000 mL steklenico in ga raztopili v 500 mL dH₂O. Steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo hranili v inkubatorju, da se je ohladilo na temperaturo 45 °C, nato smo ga aseptično prelili v sterilne petrijeve plošče. Ohlajene petrijevke smo do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Uporaba: Gojišče smo uporabili za precepljanje kultur *B. cereus* WSBC 10530, *S. aureus* ATTC 25926 in *S. Infantis* ŽMJ9 s cepilno zanko in za določanje koncentracije celic v inokulumu.

3.2.2.4 Trdno gojišče TSA

Priprava: V 1000 mL steklenico smo natehtali 20 g osnovnega medija agarja Tryptone Soya (Oxoid, CM0129, Anglija), 1,25 g K₂HPO₄, 1,25 g D-(+)-glukoze (Kemika, 070557, Hrvaška) in 3 g kvasnega ekstrakta (Biolife, 412220, Italija) ter sestavine raztopili v 500 mL dH₂O. Steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C. Tako pripravljeno gojišče smo hranili v inkubatorju, da se je ohladilo na temperaturo 45 °C, nato smo ga aseptično prelili v sterilne petrijevke. Ohlajene petrijevke smo do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

Uporaba: Gojišče smo uporabili za precepljanje kultur *E. coli* ŽM370 s cepilno zanko in za določanje koncentracije celic v inokulumu.

3.2.3 Raztopine in dodatki

3.2.3.1 Fiziološka raztopina

Priprava: 0,85 g NaCl smo raztopili v 1000 mL destilirane vode ter tako dobili osnovno raztopino, ki smo jo razdelili v dve steklenici po 500 mL ter sterilizirali 15 min na 120 °C.

3.2.3.2 Dodatki

- bakterijski rastni indikator: 2,3,5 trifenil-tetrazolium klorid = TTC (Biolife, Italija)
- metanol (Merck, Nemčija)
- etanol 96 % (Merck, Nemčija)
- bdestilirana voda

3.2.4 Reagenti

3.2.4.1 Fosfatni pufer (0,1 mol/L; pH 7,4)

Priprava: Natehtali smo 3,38 g KH₂PO₄ (Kemika, Hrvaška) in 3,53 g Na₂HPO₄ (Kemika, Hrvaška) ter zatehte prenesli v 1 L čašo in raztopili v cca 900 mL bidestilirane vode. Z NaOH (Merck, Nemčija) smo uravnali pH na 7,4 in prelili v 1000 mL bučko ter z bidestilirano vodo dopolnili do oznake.

3.2.4.2 Raztopina NBT (nitro tetrazol modro) (0,15 mmol/L)

Priprava: S pinceto smo prenesli 5,27 mg tabletke NBT (Sigma, Nemčija) v čašo in jo raztopili v 17,84 mL fosfatnega pufra.

3.2.4.3 Raztopina NADH (β -nikotinamid adenin dinukleotid) (0,468 mmol/L)

Priprava: Natehtali smo 8,3 mg NADH (Sigma, Nemčija) in jo prenesli v 25 mL bučko ter s fosfatnim pufrom dopolnili do oznake.

3.2.4.4 Raztopina PMS (fenazin metasulfat) (0,060 mmol/L)

Priprava: Natehtali smo 0,46 mg PMS (Sigma, Nemčija) in jo prenesli v 25 mL bučko ter s fosfatnim pufrom dopolnili do oznake.

3.2.5 Snovi s protibakterijskim in antioksidativnim delovanjem

3.2.5.1 Izvlečki iz rastlin družine ustnatic (Lamiaceae)

Za analize smo uporabili komercialne izvlečke iz rastlin družine ustnatic (melisa, meta, origano, sivka, timijan in žajbelj). Izvlečki so bili v trdnem stanju (prah), shranjeni v plastični embalaži, oviti v aluminijasto folijo, pri 4 °C v hladilniku (Vitiva d.d., Markovci, Slovenija).

Preglednica 2: Vsebnost karnozolne in rožmarinske kisline v izvlečkih družine ustnatic (Vitiva d.d., Markovci, Slovenija)

Table 2: The content of carnosic and rosemary acid in the mint family extracts (Vitiva d.d. Markovci, Slovenia)

Izvleček	Karnozolna kislina (%)	Rožmarinska kislina (%)
melisa	-	7,80
meta	-	2,71
origano	-	5,64
sivka	-	-
timijan	-	4,25
žajbelj	13,48	0,03

Priprava raztopin za mikrobiološko analizo:

Za pripravo izhodne raztopine izvlečkov smo natehtali ustrezeno maso rastlinskega izvlečka in ga raztopili v etanolu. Nato smo nadaljevali z razredčevanjem izhodne raztopine v ustreznem gojišču.

Preglednica 3: Vsebnost skupnih fenolnih spojin, izražena kot ekvivalent galne kisline v mg galne kisline/g izvlečka (mg GAE/g), določena z metodo Folin-Ciocalteu (Katedra za biokemijo in kemijo živil, Oddelek za živilstvo, BF)

Table 3: The content of total phenolic compounds, expressed as gallic acid equivalent in mg of gallic acid/g of extract (mg GAE/g), determined by the method of Folin-Ciocalteu (Department of Biochemistry and Food Chemistry, Department of Food Science, BF)

Izvlečki družine ustnatic	Vsebnost fenolnih spojin (mg GAE/g izvlečka)
melisa	294,50
meta	170,05
origano	271,36
sivka	/
timijan	179,94
žajbelj	123,77

3.2.5.2 Izvlečki žajblja (*Salvia officinalis* L.)

Za analize smo uporabili izvlečke listov žajblja (*Salvia officinalis* L.), ki so bili obrani v 12-ih različnih mesecih in sicer januarja, februarja, marca, aprila, maja, junija, julija, avgusta, septembra, oktobra, novembra in decembra 2013 na ekološko čistem območju Vranskega jezera (naravni park, Dalmacija, Hrvaška). Listi žajblja so bili sušeni na sobni temperaturi, na zraku, v temi in nato zmleti v prah, ki je bil kasneje uporabljen za ekstrakcijo. Za pripravo rastlinskih izvlečkov je bilo k 1 g homogeniziranih listov dodano 15 mL 50 % (V/V) etanola. Po ekstrakciji je sledila filtracija in odparevanje topila z vakuumskim evaporatorjem pri temperaturi 60 °C. Postopek ekstrakcije je potekal ob konstantnem mešanju, 2 uri, na mehanskem mešalu, pri hitrosti 600 obr/min. Po končani ekstrakciji so bili vzorci shranjeni pri temperaturi 4 °C do analize. Izvlečki so bili pripravljeni po metodi, ki so jo opisali Generalić in sodelavci (2013), na Fakulteti za kemijo in tehnologijo, Univerza v Splitu.

Izvlečke so pripravili in kemijsko okarakterizirali na Fakulteti za kemijsko tehnologijo v Splitu. Izvlečki so bili raztopljeni v 50 % (V/V) etanolu.

Priprava raztopin za mikrobiološko analizo:

Željeno koncentracijo skupnih fenolnih spojin (mg GAE/mL) v gojišču smo dosegli tako, da smo dobljene izvlečke razredčili z etanolom in odpipetirali določen volumen tako pripravljene raztopine v gojišče.

Priprava raztopin za določitev antioksidativne učinkovitosti:

Ustrezen volumen izvlečkov smo odpipetirali v epruveto in razredčili z etanolom do željene molarne koncentracije (mol GAE/L) v reakcijski zmesi.

Preglednica 4: Vsebnost skupnih fenolnih spojin izražena kot ekvivalent galne kisline v mg galne kisline/mL raztopine izvlečka žajblja (mg GAE/mL) obranega v različnih obdobjih

Table 4: The content of the total phenolic compounds expressed as the equivalent of gallic acid in mg gallic acid/mL of the sage extract solution (mg GAE /mL) harvested at different times

Izvlečki žajblja – čas obiranja	Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/mL raztopine izvlečka)
januar	1,55
februar	1,73
marec	2,27
april	2,66
maj	3,40
junij	2,57
julij	3,65
avgust	3,08
september	3,67
oktober	2,63
november	2,96
december	3,32

Preglednica 5: Vsebnost izbranih fenolnih kislin (kavne, siringinske, *p*-kumarne in rožmarinske kisline) v izvlečkih iz žajblja, obranega v 12-ih različnih mesecih

Table 5: The content some phenolic acids (caffeic, syringic, *p*-coumaric and rosmarinic acids) found in extracts of sage harvested in 12 different months

Izvlečki žajblja – čas obiranja	Vsebnost fenolnih kislin (mg/L izvlečka)			
	Kavna kislina	Siringinska kislina	<i>p</i> -Kumarna kislina	Rožmarinska kislina
januar	6,88	10,89	6,53	48,42
februar	17,00	15,79	5,97	66,92
marec	29,40	16,09	13,90	206,72
april	23,39	11,88	7,16	20,59
maj	41,72	20,29	13,73	636,68
junij	28,28	21,04	7,84	71,22
julij	46,27	27,88	12,67	345,06
avgust	29,93	25,52	13,30	126,96
september	43,93	30,11	21,70	362,90
oktober	22,39	20,60	11,58	307,92
november	41,32	21,09	10,23	300,78
december	45,68	23,17	9,85	272,60

Meritve določanja fenolnih spojin niso bile izvajane istočasno. Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/mL raztopine izvlečka) je bila določena ob vzorčenju, vsebnost posameznih fenolnih kislin - kavne, siringinske, *p*-kumarne in rožmarinske (mg/L izvlečka) pa je bila testirana naknadno.

3.2.5.3 Fenolne kisline

Analizirali smo komercialno dostopne fenolne kisline različnih proizvajalcev:

- rožmarinska in karnozolna kislina (Vitiva, Slovenija)
- ferulna in *p*-kumarna kislina (Merck Schuchardt, Nemčija)
- kavna kislina (Sigma – Aldrich Chemie, Švica)
- galna, vanilinska in protokatehajska kislina (Sigma – Aldrich Chemie, Nemčija)
- siringinska kislina (Fluka, Sigma – Aldrich Chemie, Nemčija)

Priprava raztopin za mikrobiološko analizo:

Izhodno raztopino kisline smo pripravili tako, da smo natehtali ustrezeno količino čiste fenolne kisline in jo raztopili v etanolu. Nato smo nadaljevali z razredčevanjem v ustreznem gojišču MHB/TSB do željene razredčitve.

Priprava raztopin za določitev antioksidativne učinkovitosti:

Natehtali smo ustrezeno maso fenolne kisline in jo raztopili v etanolu, tako da smo dobili željeno molarno koncentracijo kisline v reakcijski zmesi.

3.2.6 Laboratorijska oprema

- avtoklav (tip 500x700, Sutjeska, Jugoslavija)
- avtoklav (tip 1-61-137, Sutjeska, Jugoslavija)
- digitalna tehnica (PB1502-S, Mettler-Toledo, Švica)
- hladilnik (LAE, Slovenija)
- hladilnik (LTH, Slovenija)
- inkubator (I-115C, Kambič, Slovenija)
- inkubator (SP190, Kambič, Slovenija)
- mikrovalovna pećica (Cook n'grill 1300, Sanyo, Japonska)
- plinski gorilnik
- stresalnik (Vibromix 314 EVT, Tehnica, Slovenija)
- sušilnik (SO-250, Elektromedicina, Slovenija)
- tehnica (Sartorius analytic, Nemčija)
- tehnica AT201 (Mettler Toledo, Švica)
- vrtinčnik (Yellowline, TTS2, Slovenija)
- zaščitna mikrobna komora (PIO SMBC 122AV, Iskra, Slovenija)

Poleg navedenih aparatur smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo:

avtomatske pipete (Gilson, Francija; Eppendorf, Nemčija), bele mikrotitrskne ploščice z ravnim dnom Nunc (Sigma – Aldrich Chemie, Švica), cepilne zanke, mikrocentrifugirke (Eppendorf, Nemčija), digestorij (TIP382, Medilab Rauh, Slovenija), epruvete, laboratorijske steklenice (250 mL, 500 mL, 1000 mL, Duran), ladvice za tehtanje, magnetno mešalo 550 M (Tehnica Železniki, Slovenija), merilnik časa (Eppendorf, Nemčija), merilni valji (Plastibrand, Nemčija), mikrodilucijske ploščice, nastavke za pipete 10 µL, 100 µL in 1000 µL (Eppendorf, Nemčija; Plastibrand, Nemčija), pH-meter (Mettler Toledo, Švica), petrijeve plošče (Labortehnika Golias, Slovenija), plastične kivete (Eppendorf easypet, Nemčija), plastične lončke (Labortehnika Golias, Slovenija),

spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, ZDA), stojala in vrečke za smeti, pipetor (Eppendorf easypet, Nemčija), rokavice, vodna kopel (Kambič, Slovenija), zmrzovalnik (LTH, Slovenija)

3.3 METODE

3.3.1 Oživitev bakterij

Izolate bakterij *S. aureus* ATTC 25926, *B. cereus* WSBC 10530 in *S. Infantis* ŽMJ9, shranjene pri temperaturi – 80 °C, smo s cepilno zanko ob ognju prenesli na sterilne plošče s trdnim gojiščem MHA, *E. coli* ŽM370 na gojišče TSA, da smo ohranili čisto kulturo in čim večjo živost celic. Plošče smo po 24 h inkubacije pri temperaturi 37 °C uporabili za pripravo inokuluma, nato smo jih hrаниli v hladilniku pri temperaturi 4 °C do nadaljnje uporabe.

3.3.2 Priprava inokuluma

Po 24-urni inkubaciji (opisano v poglavju 3.3.1) smo preverili rast in ugotavljali prisotnost značilnih kultur. Posamezne kolonije smo s cepilno zanko prenesli v 4 mL tekočega gojišča MHB (*S. aureus* ATTC 25926, *B. cereus* WSBC 10530 in *S. Infantis* ŽMJ9) oz. gojišča TSB (*E. coli* ŽM370), premešali na vrtinčniku in gojili čez noč na stresalniku pri temperaturi 37 °C in 100 obr./min. Za pripravo inokuluma pri metodah razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici smo odpipetirali 75 µL namnožene kulture v 5 mL gojišča MHB/TSB, tako da je bila končna koncentracija celic v gojišču 10^6 - 10^7 CFU/mL. Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču v bujonu smo odpipetirali 0,15 mL namnožene kulture v 10 mL gojišča MHB.

3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

Za določanje števila bakterij smo uporabili metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003).

Iz epruvet, ki smo jih pripravili kot inokulum (opisano v poglavju 3.3.2), smo aseptično odpipetirali 100 µL ustrezne kulture v 900 µL fiziološke raztopine in razredčevali po Kochu do 10^{-7} in 10^{-8} pri bakterijah *S. aureus* ATTC 25926, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370 oziroma do 10^{-6} in 10^{-7} pri bakteriji *B. cereus* WSBC 10530. Trdno gojišče MHA/TSA smo razdelili na 4 enake dele in na vsak razdelek odpipetirali 3 x 10 µL razredčenega vzorca. Počakali smo, da se je tekočina vpila v gojišče in nato petrijevke inkubirali pri temperaturi 37 °C, 24 ur. Pri bacilih smo petrijevko inkubirali na sobni temperaturi in tako upočasnili rast kolonij ter si s tem olajšali štetje. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali koncentracijo bakterij (N) pri posamezni razredčitivi.

Za izračun povprečne koncentracije smo uporabili enačbo (1):

$$N = \Sigma C / (n_1 + 0,1 * n_2) * R \quad \dots (1)$$

Legenda:

- N koncentracija bakterij (cfu/mL)
- ΣC seštevek vseh kolonij, na vsakem števnem razdelku, preštejemo vse kolonije
- n_1 število števnih paralelk na prvem razdelku, pri prvi razredčitvi
- n_2 število števnih paralelk na drugem razdelku, pri drugi razredčitvi
- R faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi

3.3.4 Priprava začetnih koncentracij izvlečkov iz rastlin družine ustnatic in čistih fenolnih kislin

Vzorce rastlinskih izvlečkov oz. fenolne kisline smo raztopili v etanolu in nato razredčili do ustreznih koncentracij v gojišču MHB/TSB po spodaj opisanem postopku.

Najprej smo pripravili 16 % izhodne raztopine izvlečkov rastlin družine ustnatic oz. fenolnih kislin v etanolu (0,08 g izvlečka/fenolne kisline smo raztopili v 0,5 mL etanola. Tako pripravljenim raztopinam rastlinskih izvlečkov oz. fenolnih kislin smo dodali ustrezen volumen (enak volumnu raztopine izvlečka oz. kisline, torej 0,5 mL) gojišča TSB, ter tako dobili 8 % koncentracijo raztopine izvlečka oz. fenolne kisline v gojišču. Končne koncentracije (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,25 %, 0,125 %, 0,0625 %) smo dobili z 2-kratnim razredčevanjem z bakterijsko kulturo na mikrotitrski plošči.

Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici smo v sterilno mikrotitrsko ploščico v prvo vrstico aseptično odpipetirali 100 μ L začetne koncentracije izvlečka oz. fenolne kisline, v vse ostale luknjice v naslednjih vrsticah pa 50 μ L sterilnega gojišča MHB. Nato smo iz prve vrstice odpipetirali 50 μ L izvlečka oz. fenolne kisline in vsebino prenesli v drugo vrstico ter s pipeto 8 x premešali. Tako smo nadaljevali serijske razredčitve do konca ploščice, kjer smo v zadnji vrsti po 8-kratnem mešanju 50 μ L vsebine zavrgli. V vse luknjice smo na koncu dodali 50 μ L pripravljenega inokuluma posamezne kulture. Ta način priprave razredčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija izvlečka oz. fenolne kisline zmanjševala za polovico po kolonah navzdol.

Pripravili smo tudi kontrole, in sicer v eno luknjico smo odpipetirali 100 μ L gojišča MHB; v drugo luknjico 50 μ L gojišča in 50 μ L pripravljenega izvlečka oz. fenolne kisline; v tretjo pa 50 μ L gojišča in 50 μ L inokuluma. Nato smo mikrotitrski ploščice prekrili s pokrovom in jih dali za 20 s na mešalo za mikrotitrski ploščice, kjer se je vsebina temeljito premešala. Ploščice smo inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C.

3.3.5 Priprava začetnih koncentracij izvlečkov žajblja

V prvo luknjico na mikrotitrski ploščici smo odpipetirali 100 μ L raztopine izvlečka žajblja, ter nato naredili razredčitve (v drugi luknjici je bilo tako 250 μ L izvlečka, v tretji 125 μ L izvlečka, v četrtri 62,5 μ L, v peti 31,3 μ L, nato 15,6 μ L, 7,8 μ L in 3,9 μ L izvlečka). V vse vrstice (razen v prvo) smo odpipetirali po 50 μ L gojišča MHB ter na koncu dodali še 50 μ L

kulture (*S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. Infantis* ŽMJ9, *E.coli* ŽM370) do končnega volumna 100 µL v vsaki luknjici. Kontrole smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.3.4.

3.3.6 Določitev živosti s pomočjo tetrazolijevih soli

Po pripravi začetnih koncentracij izvlečkov iz rastlin družine ustnatic in čistih fenolnih kislin, opisani v poglavju 3.3.4 ter po pripravi izvlečkov žajblja, opisani v poglavju 3.3.5 smo mikrotitrsko ploščice prekrili s pokrovom in jih dali za 20 s na mešalo za mikrotitrsko ploščico, kjer se je vsebina temeljito premešala. Ploščice smo nato inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo v vsako luknjico v temnem prostoru odpipetirali 10 µL bakterijskega rastnega indikatorja TTC s koncentracijo 20 mg/mL in dali ploščice inkubirati še za 30 min pri temperaturi 37 °C, da se je barva lepo razvila.

Po 30 min smo odčitali rezultate. Luknjice, ki so bile obarvane roza, so predstavljale negativen rezultat, torej izvleček oz. fenolna kislina ni imel vpliva na zmanjšano rast mikroorganizma. Prva neobarvana luknjica je predstavljala MIC, torej minimalno inhibitorno koncentracijo, pri kateri je naša koncentracija izvlečka oz. fenolne kisline inhibirala rast testne vrste bakterij (Eloff, 1998; Klančnik in sod., 2009; Klančnik in sod., 2010).

3.3.7 Ugotavljanje kinetike rasti in odmiranja bakterij

Pri določanju protimikrobnega učinka rastlinskih izvlečkov je pomembno tudi spremeljanje kinetike preživetja oz. odmiranja bakterij v odvisnosti od časa. Metode niso standardizirane za določanje učinkovitosti rastlinskih izvlečkov, kar predstavlja problem pri primerjavi rezultatov posameznih učinkovin ali objavljenih študij (Burt, 2004).

Koncentracijo dodanega izvlečka oz. fenolne kisline, ki smo ga dodali v gojišče, smo izbrali na podlagi rezultatov dilucijskih metod v agarju.

3.3.8 Določitev antioksidativne učinkovitosti s spektrofotometrično metodo ugotavljanja sposobnosti lovlijenja superoksidnega anionskega radikala

V steklene epruvete smo odpipetirali reagente v naslednjem zaporedju:

- 325 µL ustrezno razredčenega vzorca (izvlečki žajblja oz. fenolne kisline)
- 325 µL raztopine NBT
- 325 µL raztopine NADH
- 325 µL raztopine PMS

Vsebino smo premešali na vrtinčniku in po določenem času inkubacije (po dodatku raztopine PMS) pomerili absorbanco pri 560 nm (A_{560}).

Vzporedno z vsakim vzorcem smo pripravili še slepi vzorec in absorbanco slepega vzorca odšteli od izmerjene absorbance vzorca (A_{560}) in dobili absorbanco vzorca ($A_{vz\ 560}$). Tako smo preprečili morebitne napake zaradi obarvanosti vzorcev, predvsem izvlečkov žajblja.

Slepe vzorce smo pripravili tako, da smo odpipetirali reagente v naslednjem zaporedju:

- 325 µL ustrezno razredčenega vzorca
- 325 µL raztopine NBT
- 325 µL raztopine NADH
- 325 µL fosfatnega pufra

Kontrolni vzorec smo pripravili tako, da smo odpipetirali reagente v naslednjem zaporedju:

- 325 µL ustreznega topila
- 325 µL raztopine NBT
- 325 µL raztopine NADH
- 325 µL raztopine PMS

Vsebino smo premešali na vrtinčniku in po določenem času inkubacije (po dodatku raztopine PMS) pomerili absorbanco pri 560 nm ($A_{k\ 560}$).

Vzorec za umeritev spektrofotometra smo pripravili tako, da smo odpipetirali reagente v naslednjem zaporedju:

- 325 µL ustreznega topila
- 325 µL raztopine NBT
- 325 µL raztopine NADH
- 325 µL fosfatnega pufra

Vse reagente smo morali med celotnim postopkom priprave in analize hraniti na ledu.

3.3.9 Statistična analiza

Analize smo delali v dveh paralelkah, vrednosti so podane kot povprečje \pm standardni odklon. Povprečne vrednosti meritev (\bar{x}) znotraj posamezne metode smo izračunali v skladu z naslednjo enačbo (Košmelj, 2007):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (2)$$

n – število vzorcev

x_i – vrednosti i -te meritve

Standardni odklon (s) smo izračunali v skladu z naslednjo enačbo (Košmelj, 2007):

$$s = \sqrt{s^2} \quad \dots (3)$$

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n ([x_i - \bar{x}])^2 \quad \dots (4)$$

Linerno in nelinearno regresijsko analizo smo izvedli z uporabo programske opreme (Microsoft office, Excel).

4 REZULTATI

Cilj te raziskave je bil določiti protibakterijsko učinkovitost izvlečkov žajblja v primerjavi z izvlečki drugih rastlin iz družine ustnatic. Poleg tega nas je zanimal tudi vpliv različnih obdobjij obiranja žajblja na protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izvlečkov. Določali smo tudi antioksidativno in protibakterijsko učinkovitost izbranih fenolnih kislin (galna, protokatehajska, vanilinska, siringinska, *p*-kumarna, kavna, ferulna, karnozolna in rožmarinska kislina), ki so po navedbah v literaturi prisotne v izvlečkih žajblja in drugih rastlin družine ustnatic. Želeli smo potrditi, da so izvlečki žajblja v primerjavi s čistimi fenolnimi kislinami učinkovitejše protibakterijske in antioksidativne snovi od čistih kemijskih spojin. Zanimalo nas je tudi, kako na učinkovitost vplivata struktura fenolnih kislin in vrsta testnih bakterij.

4.1 REZULTATI METODE RAZREDČEVANJA V TEKOČEM GOJIŠČU V MIKROTITRSKI PLOŠČICI Z DODATKOM BARVILA TTC

Z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici smo testirali 8 različnih koncentracij za vsak izvleček in fenolno kislino. Primerjali smo učinkovitost izvlečkov in fenolnih kislin med grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami. Grampozitivni bakteriji, ki smo ju testirali, sta bili *S. aureus* ATTC 25926 in *B. cereus* WSBC 10530, gramnegativni bakteriji *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370.

4.1.1 Protibakterijsko delovanje izvlečkov iz družine ustnatic

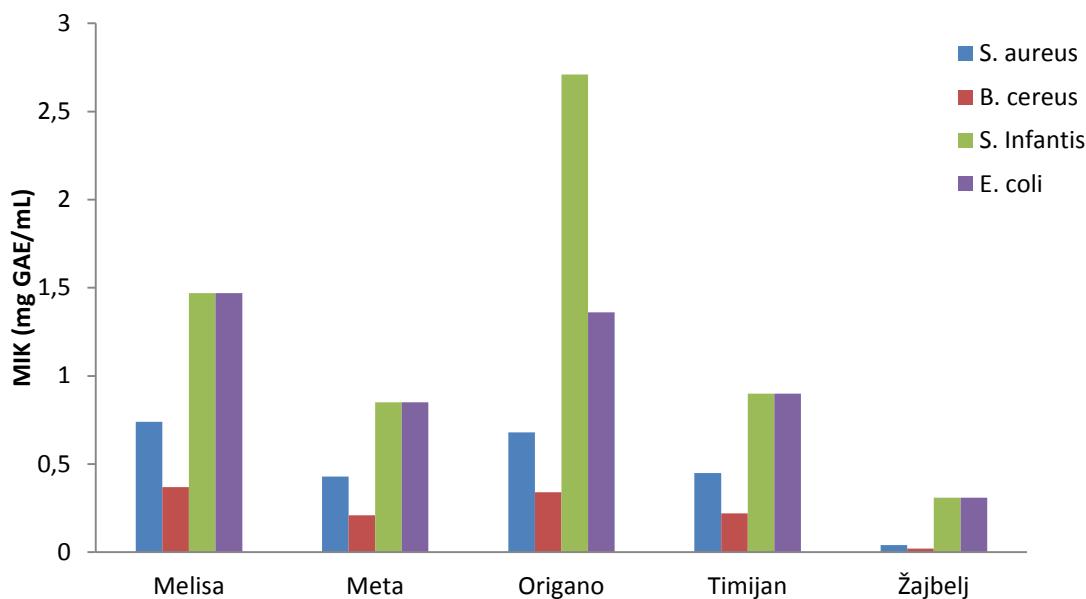
MIK smo določili po 24-urni inkubaciji z barvilo TTC. Za to barvilo je značilno, da veže elektrone metabolično aktivnih celic. Pri tej reakciji se sicer brezbarvna raztopina TTC reducira v rožnatoobarvan produkt. Čim večja je koncentracija živih celic, tem bolj je intenzivna barva (Klančnik in sod., 2009). Za MIK smo določili tisto najnižjo koncentracijo protimikrobne snovi, pri kateri ni bilo več rožnatoobarvanega produkta s celicami bakterij. Meritve so bile opravljene v vsaj dveh paralelnih ponovitvah tako, da podatki v preglednicah predstavljajo povprečne vrednosti.

Preglednica 6: Vrednosti MIK izvlečkov iz rastlin družine ustnatic za bakterije vrste *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC (mg/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0

Table 6: MIC values of extracts from plants of the family Lamiaceae for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370 obtained by the dilution method in liquid TSB medium in a microtiter plate, with the addition of TTC (mg/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd; sd = 0

Izvleček	MIK (mg/mL)			
	<i>S. aureus</i> ATTC 25926	<i>B. cereus</i> WSBC 10530	<i>S. Infantis</i> ŽMJ9	<i>E. coli</i> ŽM370
melisa	2,5	1,25	5	5
meta	2,5	1,25	5	5
origano	2,5	1,25	10	5
sivka	>10	>10	>10	>10
timijan	2,5	1,25	5	5
žajbelj	0,31	<0,16	2,5	2,5

Za boljšo primerjavo so vrednosti za rastlinske izvlečke preračune na mg GAE/mL. Vrednosti so bile določene s Folin – Ciocalteu metodo (Katedra za biokemijo in kemijo živil, Oddelek za živilstvo, BF). Rezultati so podani na sliki 16.



Slika 16: Vrednosti MIK izvlečkov iz rastlin družine ustnatic za bakterije vrste *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC, preračunano na vsebnost fenolnih spojin (mg GAE/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0

Figure 16: : MIC values of extracts from plants of the family Lamiaceae for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370, obtained by the method of dilution in liquid TSB medium in a microtiter plate, with the addition of TTC calculated to the content of phenolic compounds (mg GAE/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd; sd = 0

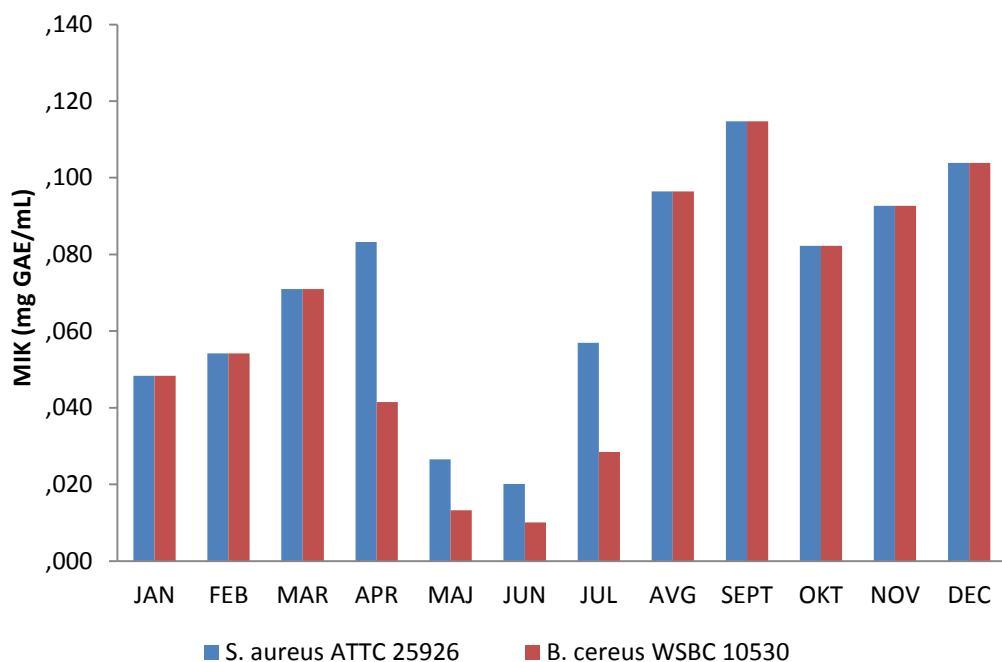
Iz rezultatov je razvidno, da sta med izvlečki rastlin iz družine ustnatic najbolj učinkovita izvlečka žajblja in mete, najslabšo protimikrobnu učinkovitost smo določili pri izvlečku sivke. Iz preglednic 6 in slike 16 je razvidno tudi, da sta grampozitivni bakteriji vrste *S. aureus* ATTC 25926 in *B. cereus* WSBC 10530 bolj občutljivi na testirane izvlečke kot gramnegativni bakteriji *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370.

4.1.2 Protibakterijsko delovanje izvlečkov žajblja

Preglednica 7: Vrednosti MIK izvlečkov iz žajblja v odvisnosti od časa obiranja za bakterije vrste *S. aureus* ATTC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC ($\mu\text{L}/\text{mL}$). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev $\pm \text{sd}$; $\text{sd} = 0$

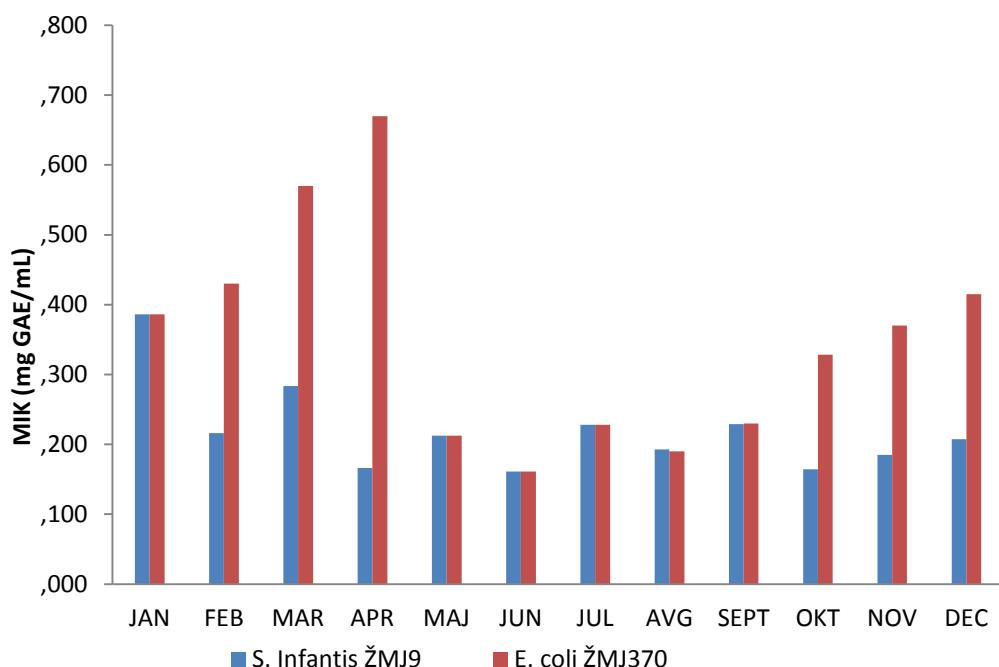
Table 7: MIC values of extracts from sage depending on the time of harvesting for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370, obtained by the dilution method in liquid TSB medium in a microtiter plate, with the addition of TTC ($\mu\text{L}/\text{mL}$). Results are obtained as avarage value of two paralels $\pm \text{sd}$; $\text{sd} = 0$

Izvlečki žajblja – čas obiranja	MIK ($\mu\text{L}/\text{mL}$)			
	<i>S. aureus</i> ATTC 25926	<i>B. cereus</i> WSBC 10530	<i>S. Infantis</i> ŽMJ9	<i>E. coli</i> ŽM370
januar	31,3	31,3	250	250
februar	31,3	31,3	125	250
marec	31,3	31,3	125	250
april	31,3	15,6	62,5	250
maj	7,83	3,91	62,5	62,5
junij	7,83	3,91	62,5	62,5
julij	15,7	7,83	62,5	62,5
avgust	31,3	31,3	62,5	62,5
september	31,3	31,3	62,5	62,5
oktober	31,3	31,3	62,5	125
november	31,3	31,3	62,5	125
december	31,3	31,3	62,5	125



Slika 17: Vrednosti MIK izvlečkov iz žajblja v odvisnosti od časa obiranja za bakterije vrste *S. aureus* ATTC 25926 in *B. cereus* WSBC 10530, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC, preračunano na vsebnost fenolnih spojin (mg GAE/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0.

Figure 17: MIC values of extracts from sage depending on the time of harvesting for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926 and *B. cereus* WSBC 10530, obtained by the dilution method in liquid TSB medium in a microtiter plate, with the addition of TTC calculated to the content of phenolic compounds (mg GAE/mL). Results are obtained as average value of two parallels \pm sd; sd = 0.



Slika 18: Vrednosti MIK izvlečkov iz žajblja v odvisnosti od časa obiranja za bakterije vrste *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC, preračunano na vsebnost fenolnih spojin (mg GAE/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0

Figure 18: MIC values of extracts from sage depending on the time of harvesting for bacterial species *S. Infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370, obtained by the dilution method in liquid TSB medium in a microtiter plate, with the addition of TTC calculated to the content of phenolic compounds (mg GAE/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd; sd = 0

Med izvlečki iz žajblja, obranega v 12-ih različnih mesecih, sta bila najbolj učinkovita izvlečka, ki sta bila obrana v mesecu maju in juniju. Pri izvlečku žajblja, obranem v mesecu maju, smo dobili vrednosti MIK v gojišču TSB pri bakteriji *S. aureus* ATTC 25926 0,03 mg GAE/mL, pri bakteriji *B. cereus* WSBC 10530 0,01 mg GAE/mL, pri gramnegativnih bakterijah *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370 0,21 mg GAE/mL. Pri izvlečku žajblja, obranem v mesecu juniju, so bile vrednosti MIK v gojišču TSB najnižje in sicer pri bakteriji *S. aureus* ATTC 25926 0,02 mg GAE/mL, pri bakteriji *B. cereus* WSBC 10530 0,01 mg GAE/mL, pri obeh gramnegativnih bakterijah 0,16 mg GAE/mL. To so izjemno nizke vrednosti, ki kažejo na zelo dobro protibakterijsko aktivnost.

Protimikrobnne snovi v izvlečkih žajblja imajo boljši učinek na grampozitivne bakterije vrste *S. aureus* ATTC 25926 in *B. cereus* WSBC 10530 kot na gramnegativne bakterije *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370 (preglednica 7 ter sliki 17 in 18).

4.1.3 Protibakterijsko delovanje fenolnih kislin

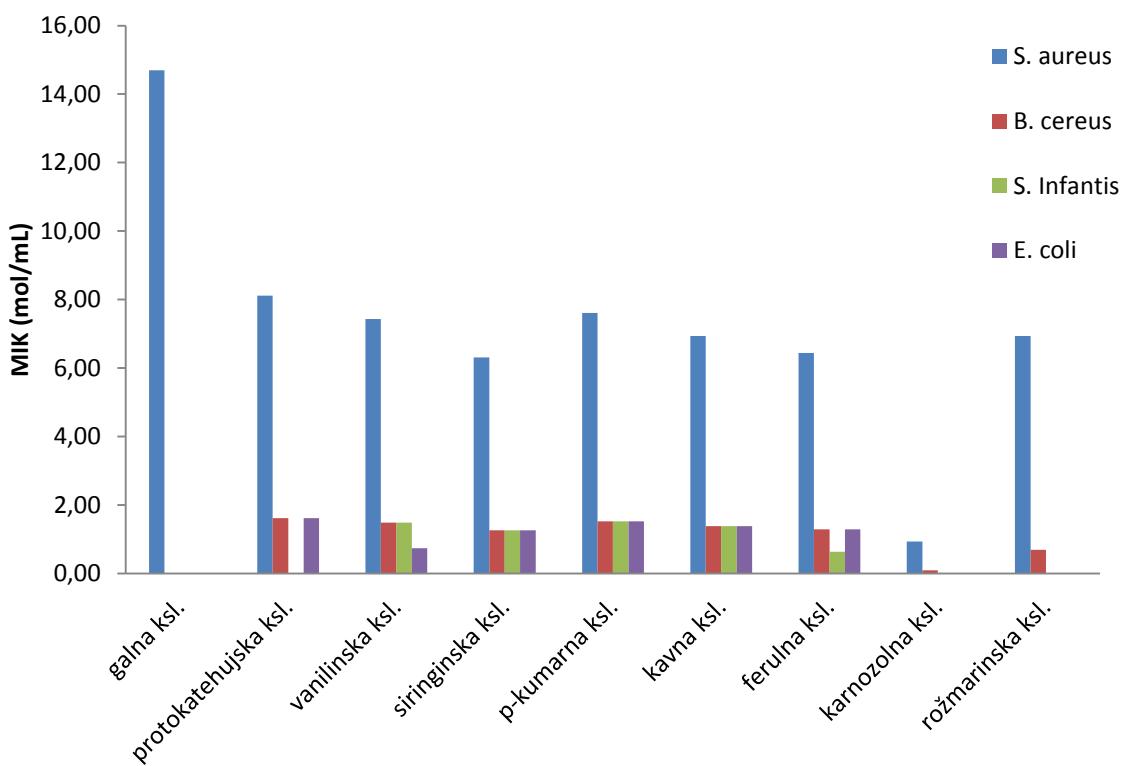
Preglednica 8: Vrednosti MIK fenolnih kislin za bakterije vrste *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC (mg/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0

Table 8: MIC values of phenolic acids for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370 obtained by the dilution method in liquid TSB medium in a microtiter plate, with the addition of TTC (mg/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd; sd = 0

Fenolna kislina	MIK (mg/mL)			
	<i>S. aureus</i> ATTC 25926	<i>B. cereus</i> WSBC 10530	<i>S. Infantis</i> ŽMJ9	<i>E. coli</i> ŽM370
galna kislina	>2,5	>2,5	>2,5	>2,5
protokatehajska kislina	1,25	2,5	>2,5	2,5
vanilinska kislina	1,25	2,5	2,5	1,25
siringinska kislina	1,25	2,5	2,5	2,5
p-kumarna kislina	1,25	2,5	2,5	2,5
kavna kislina	1,25	2,5	2,5	2,5
ferulna kislina	1,25	2,5	1,25	2,5
karnozolna kislina	0,31	0,31	>2,5	>2,5
rožmarinska kislina	2,5	2,5	>2,5	>2,5

Iz preglednice 8 je razvidno, da je karnozolna kislina najbolj učinkovita proti grampozitivnim bakterijam. Pri galni kislini nismo dobili vrednosti MIK pri nobeni gramnegativni in grampozitivni bakteriji. Najvišja koncentracija galne kisline 2,5 mg/mL v gojišču TSB ni delovala protimikrobnno. V tem primeru bi morali testirati višje koncentracije od 2,5 mg/mL, vendar to ni bilo mogoče, saj galna kislina ni bila topna v etanolu pri višjih koncentracijah. Vrednosti MIK za karnozolno kislino so znašale 0,31 mg/mL v gojišču TSB za grampozitivni bakteriji in >2,5 mg/mL v gojišču TSB za gramnegativni bakteriji. Zopet so bile vrednosti MIK za gramnegativne bakterije višje od vrednosti za grampozitivne bakterije.

Za boljšo primerjavo protimikrobne učinkovitosti med fenolnimi kislinami so vrednosti MIK izražene kot množinska koncentracija (mol/mL). Rezultati so podani na sliki 19.



Slika 19: Vrednosti MIK fenolnih kislin za bakterije vrste *S. aureus* ATTC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC (mol/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd; sd = 0

Figure 19: MIC values of phenolic acids for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370 obtained by the dilution method in liquid TSB medium in a microtiter plate, with the addition of TTC (mol/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd; sd = 0

Iz preglednice 8 in slike 19 je razvidno, da je najbolj učinkovita proti gramnegativnim bakterijam karnozolna kislina, najslabše učinkovite kisline so galna, protokatehajska in *p*-kumarna.

4.2 REZULTATI KINETIKE RASTI IN ODMIRANJA BAKTERIJ

Metoda razredčevanja v tekočem gojišču je zelo natančna, saj z njo natančno določimo število živih celic v tekočem gojišču. S to metodo smo preverjali MIK izvlečkov žajblja in fenolnih kislin, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici. Hkrati smo testirali tudi višjo in nižjo koncentracijo od MIK. Z dobljenimi rezultati smo narisali rastne krivulje, ki so vsebovale meritve ob časih 0 h, 4 h in 24 h. Iz krivulj smo lahko razbrali, katere koncentracije so zavrle razmnoževanje bakerij in katere ne, ter hkrati primerjali ujemanje rezultatov vseh testiranih metod.

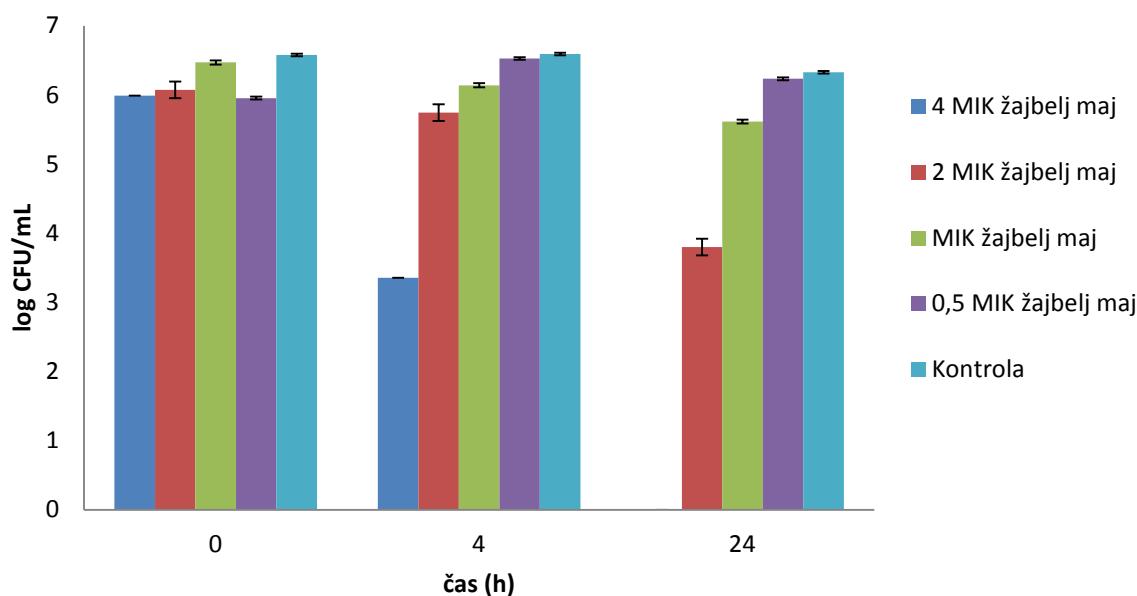
Meritve so bile opravljene v dveh neodvisnih ponovitvah, podatki predstavljajo povprečne vrednosti. Koncentracije izvlečkov žajblja in fenolnih kislin so preračunane v mg protimikrobne snovi/mL gojišča TSB, zato, da so rezultati primerljivi med metodami. MIK

je tista koncentracija, pri kateri se število bakterij zmanjša za eno logaritemsko enoto v primerjavi s številom bakterij v kontrolnem vzorcu po 24-ih urah (Burt, 2004).

4.2.1 Kinetika protibakterijskega delovanja izvlečkov žajblja

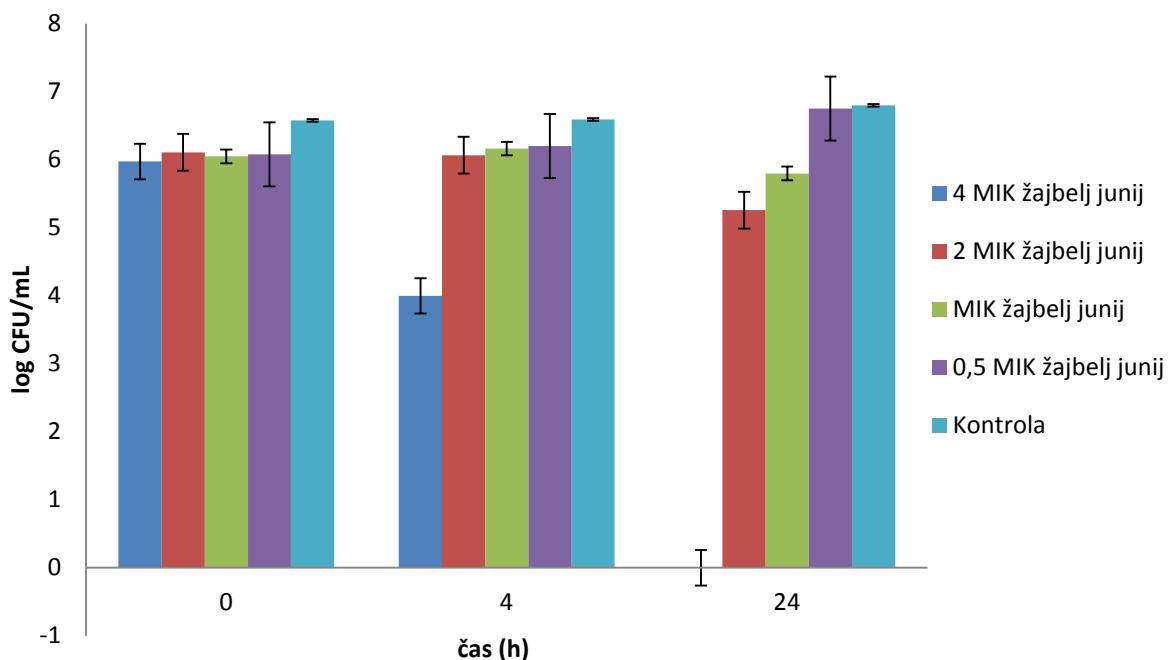
4.2.1.1 Kinetika protibakterijskega delovanja izvlečkov žajblja za bakterije vrste *S. aureus* ATCC 25926

Na slikah 20, 21 in 22 so zbrani rezultati rasti oz. njene inhibicije bakterij vrste *S. aureus* ATCC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečkov žajblja, obranega v poletnih mesecih maju, juniju in juliju.



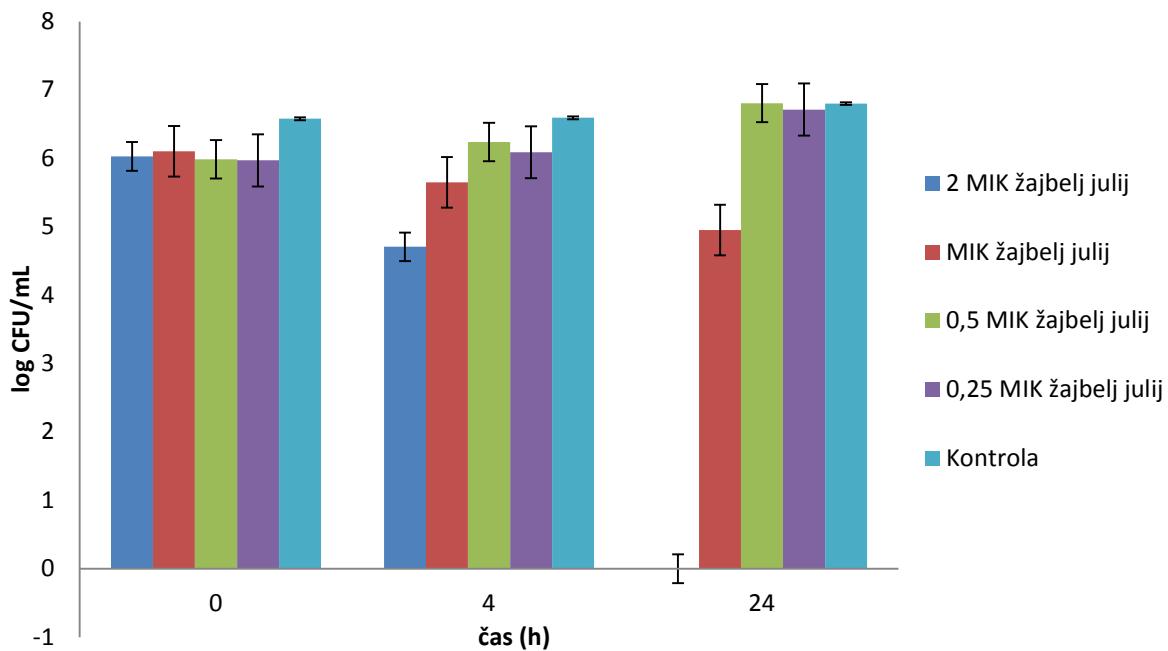
Slika 20: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *S. aureus* ATCC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu maju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 20: Growth/inhibition of growth for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926 in TSB medium with different concentrations of the extract of sage harvested in May (log CFU/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd



Slika 21: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *S. aureus* ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu juniju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 21: Growth/inhibition of growth for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926 in TSB medium with different concentrations of the extract of sage harvested in June. Results are obtained as average value of two parallels \pm sd



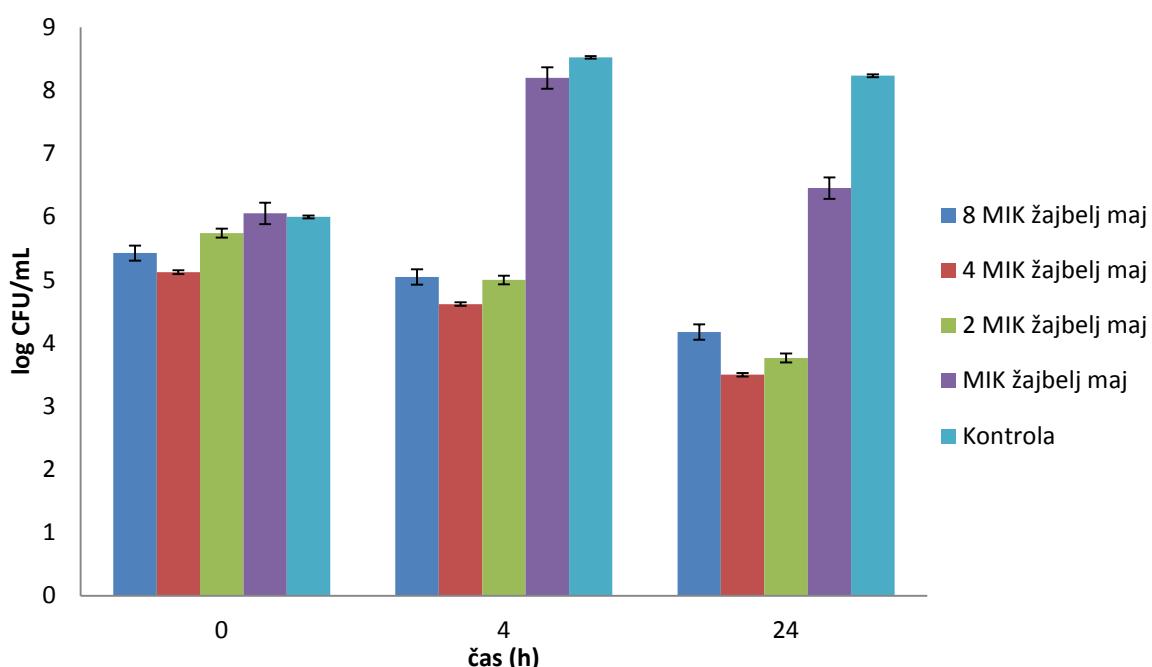
Slika 22: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *S. aureus* ATCC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu juliju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 22: Growth/inhibition of growth for bacterial species *S. aureus* ATCC 25926 in TSB medium with different concentrations of the extract of sage harvested in July (log CFU/mL). Results are obtained as average value of two parallels \pm sd

Rezultati v vseh treh primerih potrjujejo MIK, določeno z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC. Na slikah 20, 21 in 22 lahko vidimo da se je pri MIK koncentracijah izvlečka žajbla število bakterij zmajšalo za 1 log enoto ali več v primerjavi s številom bakterij v kontrolnem vzorcu. Najvišje koncentracije dodanih izvlečkov žajbla pa so bile v vseh primerih baktericidne, to pomeni, da bakterije pri teh koncentracijah ne rastejo več, ne zrastejo pa niti po precepitvni na sveže trdno gojišče.

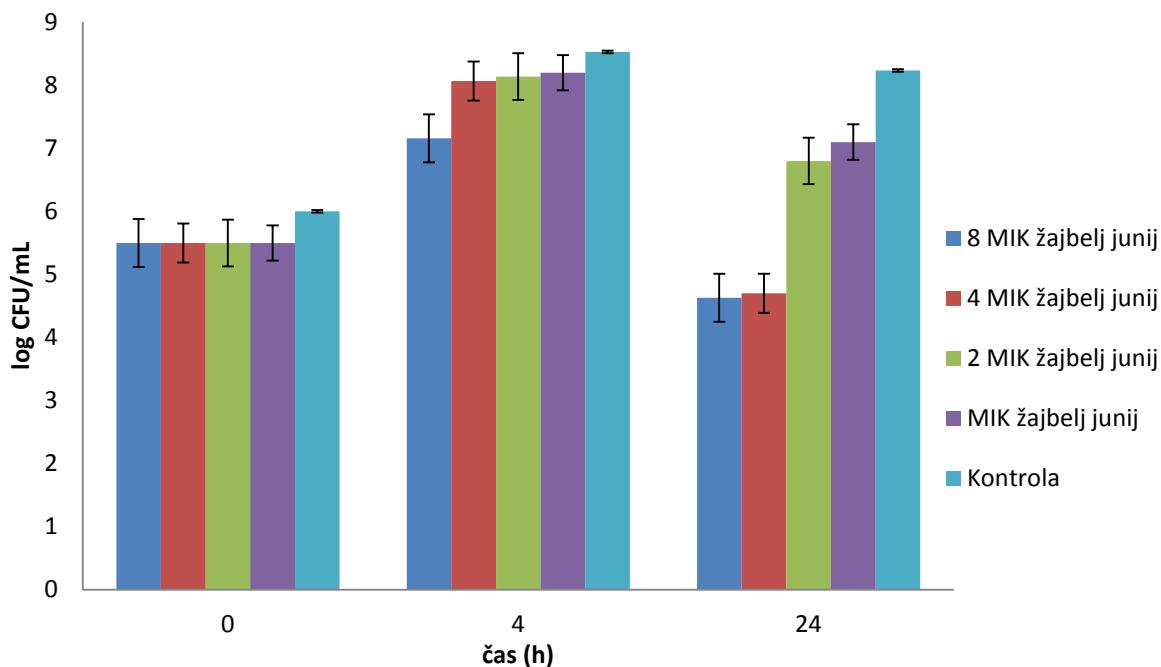
4.2.1.2 Kinetika protibakterijskega delovanja izvlečkov žajbla za bakterije vrste *B. cereus* WSBC 10530

Na slikah 23, 24 in 25 so zbrani rezultati rasti oz. njene inhibicije bakterij vrste *B. cereus* WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečkov žajbla, ki so bili obrani v mesecih maju, juniju in juliju.



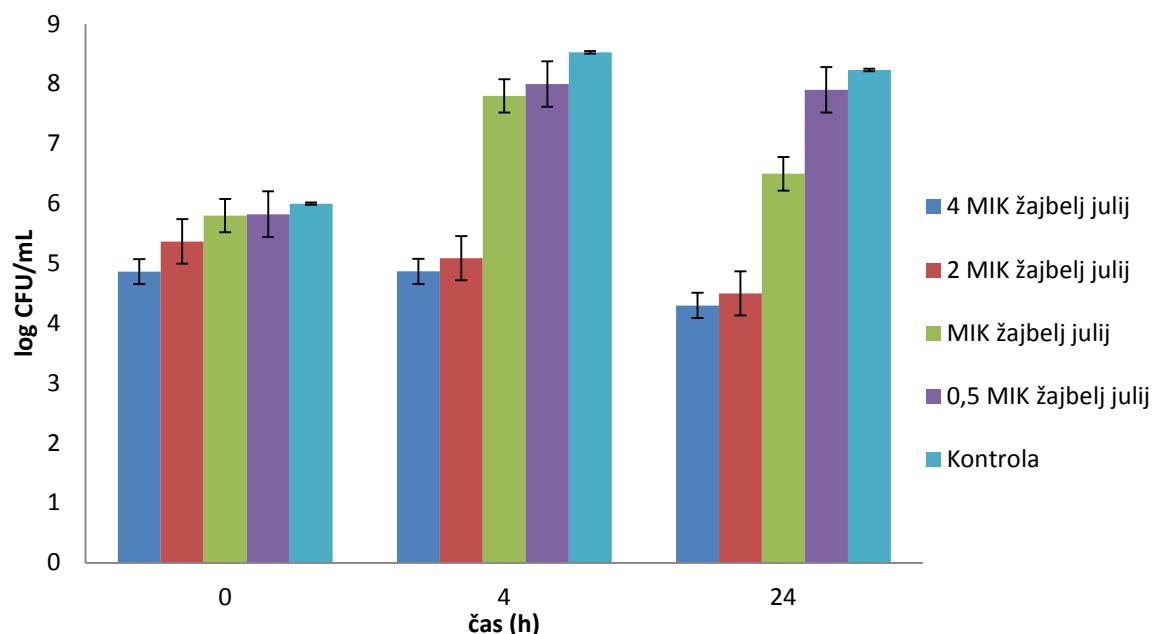
Slika 23: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *B. cereus* WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajbla, obranega v mesecu maju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 23: Growth/inhibition of growth for bacterial species *B. cereus* WSBC 10530 in TSB medium with different concentrations of the extract of sage harvested in May (log CFU/mL). Results are obtained as average value of two parallels \pm sd



Slika 24: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *B. cereus* WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu juniju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 24: Growth/inhibition of growth for bacterial species *B. cereus* WSBC 10530 in TSB medium with different concentrations of the extract of sage harvested in July (log CFU/mL). Results are obtained as average value of two parallels \pm sd



Slika 25: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *B. cereus* WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami izvlečka žajblja, obranega v mesecu juliju (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

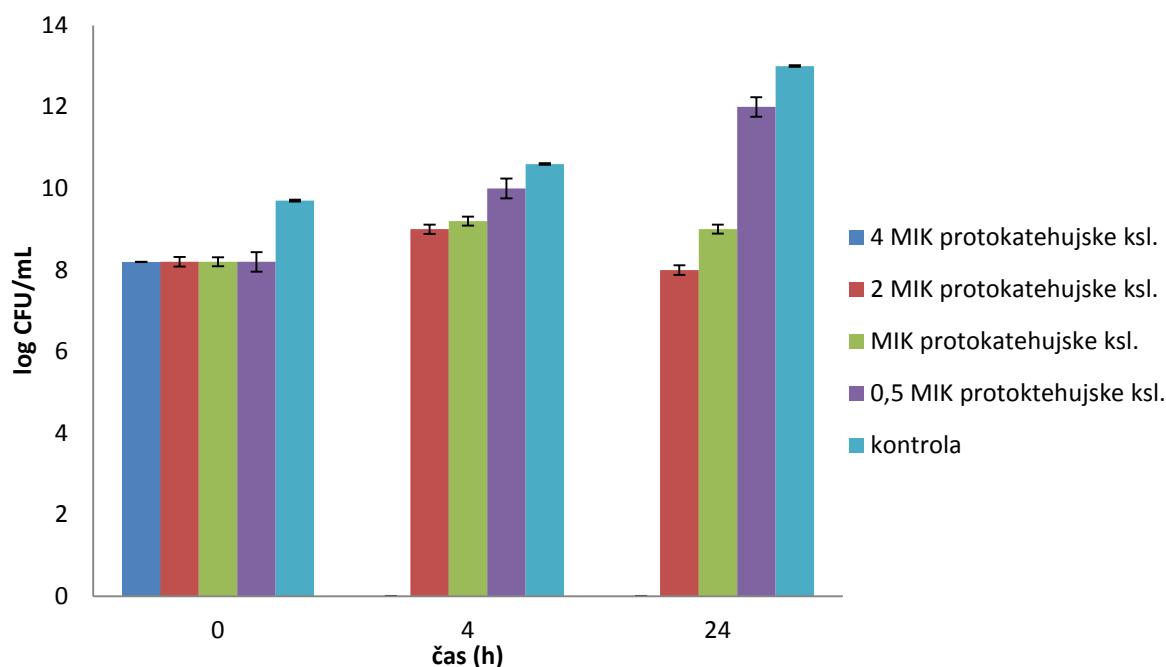
Figure 25: Growth/inhibition of growth for bacterial species *B. cereus* WSBC 10530 in TSB medium with different concentrations of the extract of sage harvested in June (log CFU/mL). Results are obtained as average value of two parallels \pm sd

Na slikah 23, 24 in 25 vidmo da se je pri MIK koncentracijah število bakterij zmanjšalo za 1 log enoto ali več v primerjavi s številom bakterij v kontrolnem vzorcu, kar pomeni da je MIK vrednost izvlečka žajblja, obranega v mesecu maju in juniju 0,39 mg/mL TSB, v mesecu juliju pa 0,78 mg/mL TSB. Baktericidne vrednosti pri bakteriji *B. cereus* WSBC 10530 nismo dosegli.

4.2.2 Kinetika protibakterijskega delovanja fenolnih kislin

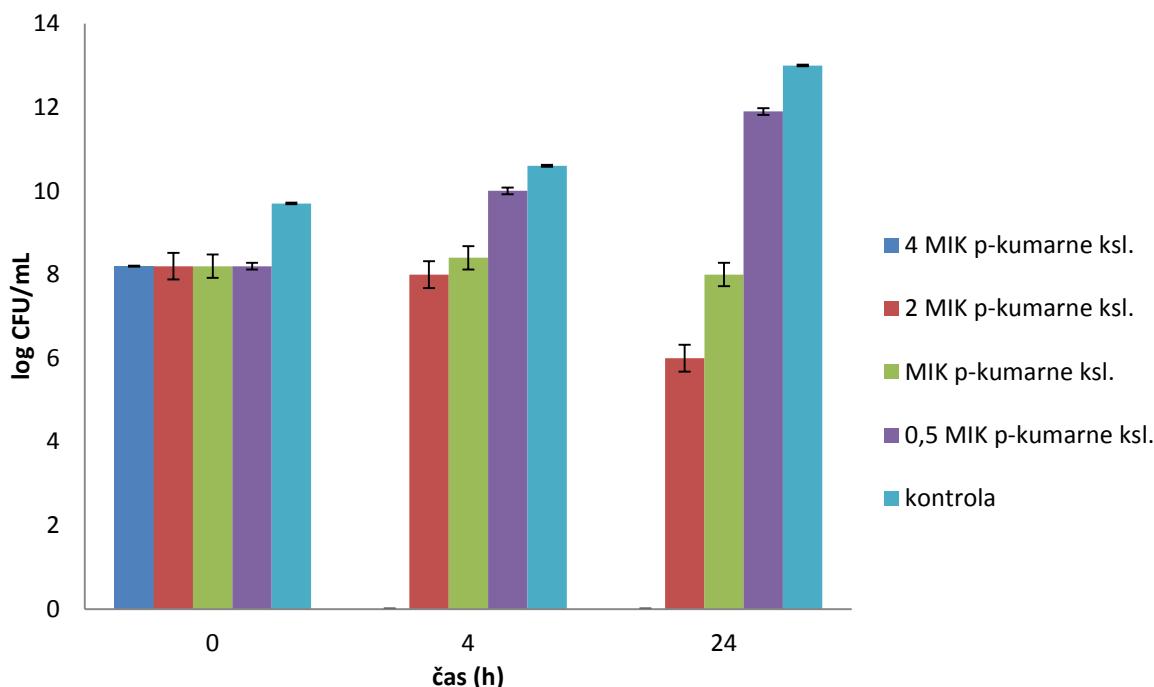
4.2.2.1 Kinetika protibakterijskega delovanja fenolnih kislin za bakterije vrste *S. aureus* ATTC 25926

Na slikah 26 in 27 so zbrani rezultati rasti bakterij vrste *S. aureus* ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami dveh fenolnih kislin – ene izmed hidroksibenzojskih kislin (protokatehajska kislina) in druge izmed hidroksicimetnih kislin (*p*-kumarna kislina).



Slika 26: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *S. aureus* ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami protokatehajske kisline (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 26: Growth/inhibition of growth for bacterial species *S. aureus* ATTC 25926 in TSB medium with different concentrations of the Protocatechuic acid (log CFU/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd



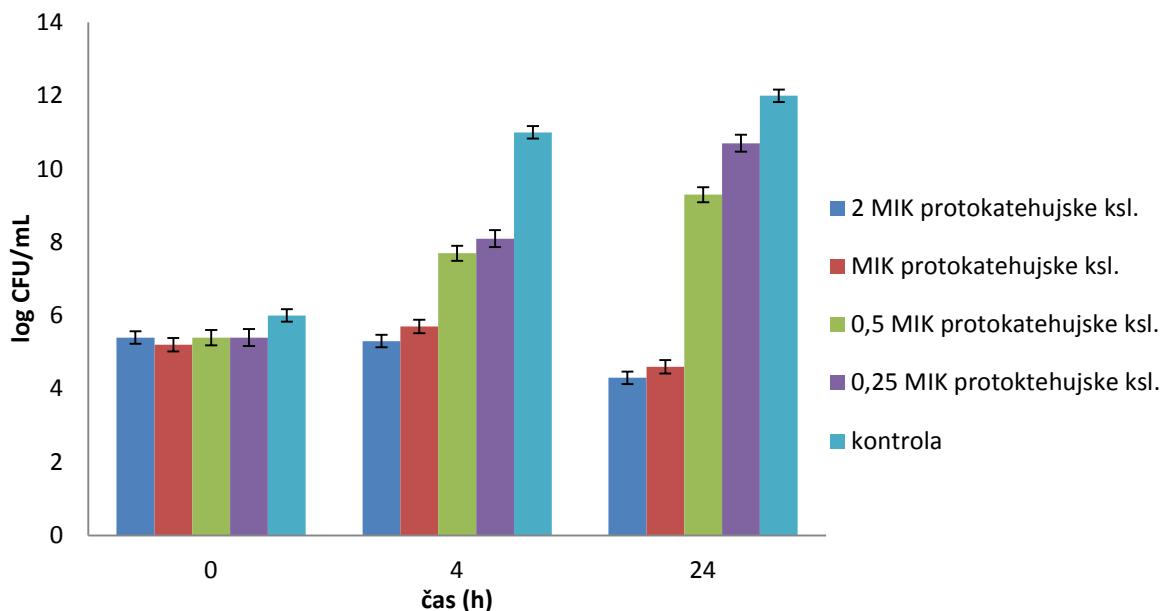
Slika 27: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *S. aureus* ATTC 25926 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami *p*-kumarne kisline (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 27: Growth/inhibition of growth for bacterial species *S. aureus* ATTC 25926 in TSB medium with different concentrations of the *p*-Coumaric acid (log CFU/mL). Results are obtained as average value of two parallels \pm sd

Na slikah 26 in 27 vidimo, da se je pri koncentracijah MIK (1,25 mg/mL TSB), ki so bile določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z dodatkom barvila TTC, število bakterij zmanjšalo za 1 log enoto v primerjavi s številom bakterij v kontrolnem vzorcu. Iz obeh slik lahko razberemo tudi minimalno baktericidno koncentracijo (MBC), ki je v obeh primerih 5 mg/mL TSB oz. 4 MIK.

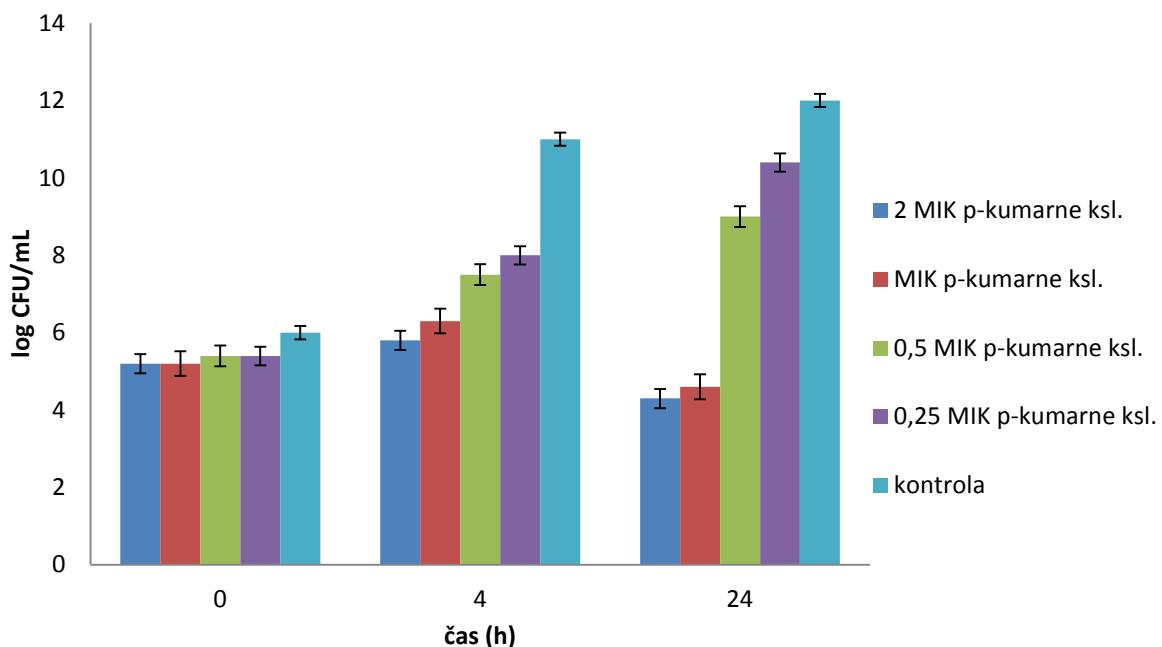
4.2.2.2 Kinetika protibakterijskega delovanja fenolnih kislin za bakterije vrste *B. cereus* WSBC 10530

Na slikah 28 in 29 so zbrani rezultati rasti bakterij vrste *B. cereus* WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami dveh fenolnih kislin – ene izmed hidroksibenzojskih kislin (protokatehajska kislina) in druge izmed hidroksicimetnih kislin (*p*-kumarna kislina).



Slika 28: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *B. cereus* WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami protokatehajske kisline (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 28: Growth/inhibition of growth for bacterial species *B. cereus* WSBC 10530 in TSB medium with different concentrations of the Protocatechuic acid (log CFU/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd



Slika 29: Rast/inhibicija rasti bakterij vrste *B. cereus* WSBC 10530 v gojišču TSB z različnimi koncentracijami p-kumarne kisline (log CFU/mL). Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 29: Growth/inhibition of growth for bacterial species *B. cereus* WSBC 10530 in TSB medium with different concentrations of the p-Coumaric acid (log CFU/mL). Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd

Na slikah 28 in 29 vidimo, da se je pri koncentracijah MIK (2,5 mg/mL TSB) število bakterij zmanjšalo za 1 log enoto ali več v primerjavi s številom bakterij v kontrolnem vzorcu. Na ta način lahko potrdimo rezultate metode razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z dodatkom barvila TTC.

4.3 DOLOČITEV SPOSOBNOSTI LOVLJENJA RADIKALA $O_2^{\cdot-}$

Antioksidativno učinkovitost izvlečkov žajblja, obranega v 12-ih mesecih in čistih fenolnih spojin smo določili z metodo določanja sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala.

Superoksidni anionski radikal ($O_2^{\cdot-}$) je reducirana oblika molekularnega kisika. Nastaja pri mnogih presnovnih procesih, lahko nastane tudi kot posledica aktivacije kisika s sevanjem (Magalhaes in sod., 2008). Je prekurzor za nastanek aktivnih prostih radikalov, ki lahko reagirajo z biološkimi makromolekulami in s tem povzročajo poškodbe tkiv (Halliwell in Gutteridge, 1984). Pri metodi, ki smo jo izvedli, nastaja $O_2^{\cdot-}$ radikal v reakciji med fenazin metasulfatom (PMS) in nikotinamid adenindinukleotidom (NADH). Nastali $O_2^{\cdot-}$ reducira nitrotetrazol modro (NBT) do formazana, kar smo merili sprektofotometrično pri valovni dolžini 560 nm po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi. Vrednosti izmerjenih absorbanc so podane v preglednicah 12 in 13.

4.3.1 Antioksidativno delovanje izvlečkov žajblja

Določali smo antioksidativno učinkovitost izvlečkov žajblja s sprektofotometrično metodo ugotavljanja sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala.

Pri tej metodi reagent NTB in spojine z antioksidativno učinkovitostjo v vzorcih tekmujejo za superoksidni anionski radikal. Bolj kot je antioksidant učinkovit, več $O_2^{\cdot-}$ radikala bo ujel in manj NBT se bo reduciralo. Posledica tega je nižja vrednost absorbance pri 560 nm kot v primeru, če v reakcijski zmesi ni lovilca $O_2^{\cdot-}$ radikala. Znižanje absorbance je sorazmerno sposobnosti antioksidanta za lovljenje $O_2^{\cdot-}$ radikala.

Sposobnost izvlečkov žajblja za lovljenje $O_2^{\cdot-}$ smo izrazili kot koeficient sposobnosti lovljenja radikala $O_2^{\cdot-}$ (K_{SA}). Izračunali smo ga z naslednjo zvezo:

$$K_{SA} = (1 - A_{vz\ 560} / A_{k\ 560}) \times 100\% \quad \dots (5)$$

$A_{vz\ 560}$ - absorbanca vzorca pri valovni dolžini 560 nm ob času $t = 5$ min

$A_{k\ 560}$ - absorbanca kontrolnega vzorca pri valovni dolžini 560 nm ob času $t = 5$ min

K_{SA} najbolj zanesljivo določimo ob času, ko se vsebnost radikala v reakcijski zmesi ne spreminja več. Vrednost K_{SA} je obratno sorazmerna razmerju med koncentracijo reducirane tarčne molekule ob prisotnosti antioksidanta glede na koncentracijo reducirane tarčne molekule v vzorcu brez antioksidanta (kontrolni vzorec). Večja K_{SA} vrednost pomeni, da je antioksidant učinkovito prestregel radikal $O_2^{\cdot-}$.

V preglednici 9 so podane vrednosti K_{SA} za preiskovane vzorce, ki smo jih določili pri različnih koncentracijah fenolnih spojin izvlečkov žajblja v reakcijski zmesi. Koncentracija je izražena v ekvivalentih galne kisline in sicer kot mol GAE/mL.

Preglednica 9: Koeficient sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala ($\bar{K}_{SA(560)} \pm s (\%)$) za izvlečke žajblja, obranega v 12-ih mesecih pri štirih koncentracijah fenolnih spojin v reakcijski zmesi (c). Vrednosti absorbanc so podane v prilogi A

Table 9: Coefficient of superoxide anion scavenging activity ($\bar{K}_{SA(560)} \pm s (\%)$) to extracts of sage harvested in 12 months in four concentrations of phenolic compounds in the reaction mixture (c). The values of absorbances are seen in appendix A

Čas obiranja	c (mol GAE/mL)	$K_{SA1(560)} (\%)$	$K_{SA2(560)} (\%)$	$\bar{K}_{SA(560)} \pm s (\%)$
januar	0,05	25,0	24,1	24,6 ± 0,7
	0,07	35,0	35,1	35,1 ± 0,1
	0,10	37,0	37,0	37,0 ± 0,0
	0,13	42,2	41,5	41,8 ± 0,5
	0,26	51,5	49,2	50,4 ± 1,6
februar	0,05	39,2	37,6	38,4 ± 1,2
	0,07	51,5	51,9	51,7 ± 0,3
	0,10	62,1	62,5	62,3 ± 0,3
	0,13	68,6	70,6	69,6 ± 1,5
marec	0,05	42,2	42,1	42,1 ± 0,1
	0,07	58,3	59,9	59,1 ± 1,1
	0,10	62,1	62,8	62,4 ± 0,5
	0,13	71,2	71,8	71,5 ± 0,4
april	0,05	45,5	45,2	45,4 ± 0,2
	0,07	54,7	54,9	54,8 ± 0,6
	0,10	57,6	57,3	57,4 ± 0,3
	0,13	64,1	64,0	64,0 ± 0,1
maj	0,025	23,7	18,7	21,2 ± 3,5
	0,0375	38,9	41,0	39,9 ± 1,5
	0,05	61,3	60,7	61,0 ± 0,5
	0,07	72,1	72,5	72,3 ± 0,3
	0,10	79,9	78,1	79,0 ± 1,2
	0,13	81,3	81,4	81,4 ± 0,1
junij	0,025	23,4	19,0	21,2 ± 3,1
	0,0375	42,1	40,9	41,5 ± 0,8
	0,05	60,4	58,8	59,6 ± 1,6
	0,07	70,0	71,1	70,6 ± 0,8
	0,10	79,9	79,5	79,7 ± 0,3
	0,13	80,5	82,2	81,4 ± 1,2

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 9

Čas obiranja	c (mol GAE/mL)	K _{SA1 (560)} (%)	K _{SA2 (560)} (%)	$\bar{K}_{SA(560)} \pm s$ (%)
julij	0,025	22,1	19,1	20,6 ± 2,1
	0,0375	35,6	39,3	37,4 ± 2,7
	0,05	52,5	52,4	52,4 ± 0,1
	0,07	68,9	68,8	68,9 ± 0,1
	0,10	70,0	71,1	70,6 ± 0,8
	0,13	73,5	72,5	73,0 ± 0,7
avgust	0,025	25,6	25,2	25,4 ± 0,3
	0,0375	39,0	39,6	39,3 ± 0,4
	0,05	56,9	56,3	56,6 ± 0,4
	0,07	64,3	61,4	62,8 ± 2,0
	0,10	66,8	65,0	65,9 ± 1,3
	0,13	71,1	71,4	71,3 ± 0,2
september	0,025	19,1	20,8	20,0 ± 1,2
	0,0375	32,0	28,0	30,0 ± 2,8
	0,05	51,5	51,9	51,7 ± 0,3
	0,07	65,8	65,1	65,5 ± 0,5
	0,10	73,5	72,5	73,0 ± 0,7
	0,13	79,9	79,7	79,8 ± 0,1
oktober	0,025	39,0	41,3	40,2 ± 1,6
	0,0375	45,5	41,2	43,4 ± 3,0
	0,05	48,2	45,2	46,7 ± 2,1
	0,07	58,5	57,3	57,9 ± 0,9
	0,10	60,5	60,2	60,3 ± 0,2
	0,13	73,1	72,5	72,8 ± 0,4
november	0,05	45,5	45,2	45,4 ± 0,2
	0,07	50,7	50,2	50,4 ± 0,3
	0,10	56,9	56,8	56,8 ± 0,1
	0,13	61,1	62,0	61,6 ± 0,6
december	0,05	36,7	35,9	36,3 ± 0,5
	0,07	48,2	45,9	46,7 ± 2,1
	0,10	50,7	50,2	50,4 ± 0,3
	0,13	58,5	57,3	57,9 ± 0,2

Iz preglednice 9 je razvidno, da K_{SA} s koncentracijo učinkovin v reakcijski zmesi po pričakovanju narašča.

Da bi nazorneje predstavili primerjavo sposobnosti izvlečkov žajblja za lovjenje O₂^{•-} radikala, smo na sliki 30 podali vrednosti K_{SA}, ki smo jih določili pri koncentraciji fenolnih spojin izvlečkov žajblja v reakcijski zmesi 0,10 mol GAE/mL. V ta namen smo odvisnost K_{SA} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi opisali z relacijo 6 in s pomočjo nelinearne regresijske analize določili parametre a in b.

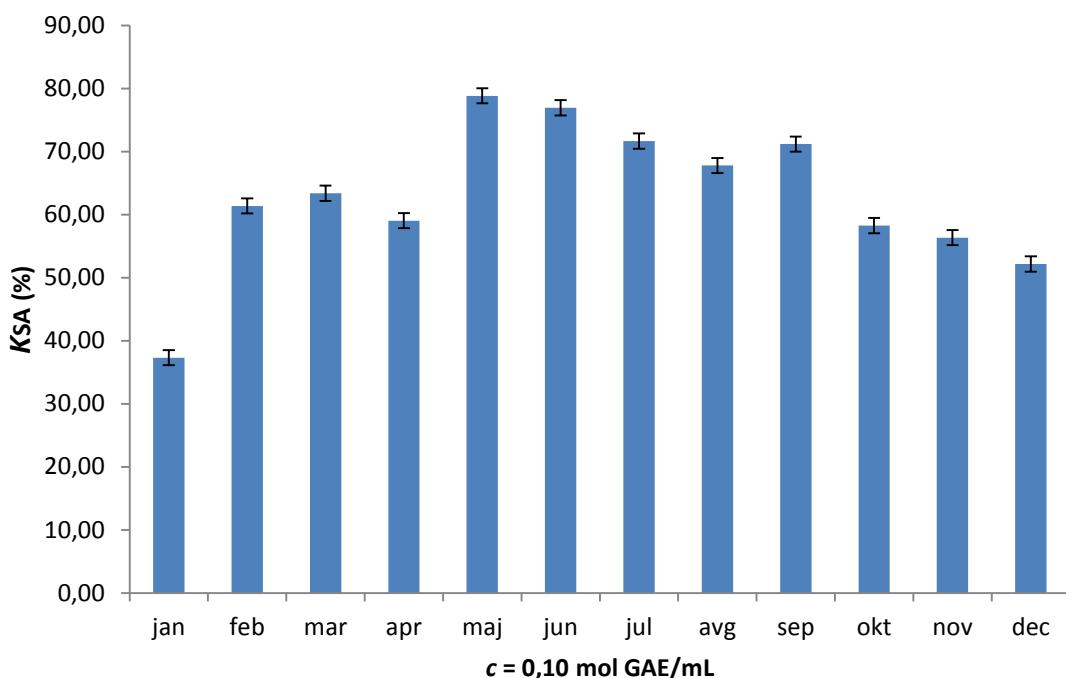
$$K_{SA} = a \cdot \ln c + b \quad \dots (6)$$

Vrednosti parametrov a in b so s koeficienti determinacije (R^2) podane v preglednici 10. Iz parametrov krivulje smo izračunali vrednosti K_{SA} pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 0,10 mol GAE/mL.

Preglednica 10: Vrednosti parametrov a in b ter koeficient determinacije (R^2) za odvisnost koeficiente sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala od koncentracije spojin v reakcijski zmesi za izvlečke iz žajblja obrane v različnih obdobjih

Table 10: The values of the parameters a and b and the coefficient of determination (R^2) for the variation of superoxide anion scavenging activity coefficient of concentration of the compounds in the reaction mixture for extracts from sage harvested at different times

Čas obiranja	a	b	R^2
januar	14,29	168,92	0,95
februar	32,95	365,47	0,99
marec	28,76	329,29	0,92
april	18,20	226,44	0,93
maj	37,37	422,81	0,93
junij	37,16	421,00	0,94
julij	33,08	375,94	0,92
avgust	27,61	322,32	0,91
september	38,40	427,35	0,96
oktober	19,47	243,08	0,93
november	17,97	222,53	0,99
december	21,29	248,01	0,95



Slika 30: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala izračunana s pomočjo nelinearne regresijske analize pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 0,10 mol GAE/mL za izvlečke iz žajblja. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 30: Superoxide anion scavenging activity depending at a concentration of phenolic compounds in the reaction mixture of 0,10 mol GAE/mL for extracts from sage. Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd

Iz slike 30 vidimo, da ima sicer največjo antioksidativno učinkovitost izvleček žajblja, ki je bil obran v mesecu maju, vendar se učinkovitost statistično značilno ne razlikuje od učinkovitosti izvlečka žajblja obranega v juniju. Najboljšo antioksidativno učinkovitost imajo torej izvlečki žajblja, obranega v spomladanskih in poletnih mesecih, najslabšo izvlečki, obrani v jesenskih in zimskih mesecih.

4.3.2 Antioksidativno delovanje fenolnih kislin

Določali smo antioksidativno učinkovitost izbranih fenolnih kislin (galna, protokatehajska, vanilinska, siringinska, *p*-kumarna, kavna, ferulna, karnozolna in rožmarinska kislina), ki so po navedbah v literaturi prisotne v izvlečkih iz rastlin družine ustnatic. Za analize smo uporabili sprektrofotometrično metodo ugotavljanja sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala. Sposobnost izvlečkov žajblja za lovljenje $O_2^{\cdot-}$ smo izrazili kot koeficient sposobnosti lovljenja radikala $O_2^{\cdot-}$ (K_{SA}). V preglednici 11 so podane vrednosti K_{SA} za preiskovane fenolne kisline, ki smo jih določili pri 4-ih različnih koncentracijah fenolnih kislin v reakcijski zmesi.

Preglednica 11: Koeficient sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala ($\bar{K}_{SA(560)} \pm s (\%)$) fenolnih kislin, testiranih pri štirih različnih koncentracijah v reakcijski zmesi (c). Vrednosti absorbanc so podane v prilogi B

Table 11: Coefficient of superoxide anion scavenging activity ($\bar{K}_{SA(560)} \pm s (\%)$) phenolic acids tested in four different concentrations in the reaction mixture (c). The values of absorbances are seen in appendix B

Fenolna kislina	c (mol/mL)	$K_{SA1(560)}$ (%)	$K_{SA2(560)}$ (%)	$\bar{K}_{SA(560)} \pm sd$ (%)
galna kislina	0,52	84,2	82,9	83,6 ± 0,9
	0,26	78,7	82,2	80,4 ± 2,4
	0,13	73,1	72,0	72,5 ± 0,8
	0,065	57,0	62,8	59,9 ± 4,1
protokatehajska kislina	0,52	16,3	16,7	16,5 ± 0,3
	0,26	11,8	15,6	13,7 ± 2,7
	0,13	10,0	14,8	12,4 ± 3,4
	0,065	10,6	8,7	9,6 ± 1,3
vanilinska kislina	0,52	10,0	15,3	12,7 ± 3,8
	0,26	6,4	6,9	6,6 ± 0,4
	0,13	3,3	6,5	4,9 ± 2,2
	0,065	2,2	ND	0,6 ± 2,2
siringinska kislina	0,52	48,2	51,7	49,9 ± 2,5
	0,26	46,5	50,2	48,4 ± 2,6
	0,13	46,6	39,9	43,2 ± 4,7
	0,065	42,2	31,6	36,9 ± 7,5
<i>p</i> -kumarna kislina	0,52	94,3	89,0	91,7 ± 3,8
	0,26	83,1	79,9	81,5 ± 2,2
	0,13	71,4	70,0	70,7 ± 1,0
	0,065	64,8	65,7	65,3 ± 0,6
kavna kislina	0,52	92,4	92,7	92,6 ± 0,2
	0,26	85,4	78,4	81,9 ± 4,9
	0,13	73,1	72,0	72,5 ± 0,8
	0,065	57,0	62,8	59,9 ± 4,1
ferulna kislina	0,52	95,7	96,0	95,9 ± 0,3
	0,26	92,4	89,3	90,9 ± 2,2
	0,13	75,4	78,6	77,0 ± 2,3
	0,065	66,3	62,3	64,3 ± 2,8
karnozolna kislina	0,52	ND	ND	ND
	0,26	ND	ND	ND
	0,13	ND	ND	ND
	0,065	ND	ND	ND
rožmarinska kislina	0,52	67,2	66,8	67,0 ± 0,2
	0,26	64,0	64,7	64,3 ± 0,2
	0,13	58,8	62,3	60,5 ± 1,3
	0,065	50,1	51,7	50,9 ± 0,6

Legenda: ND: ni določeno

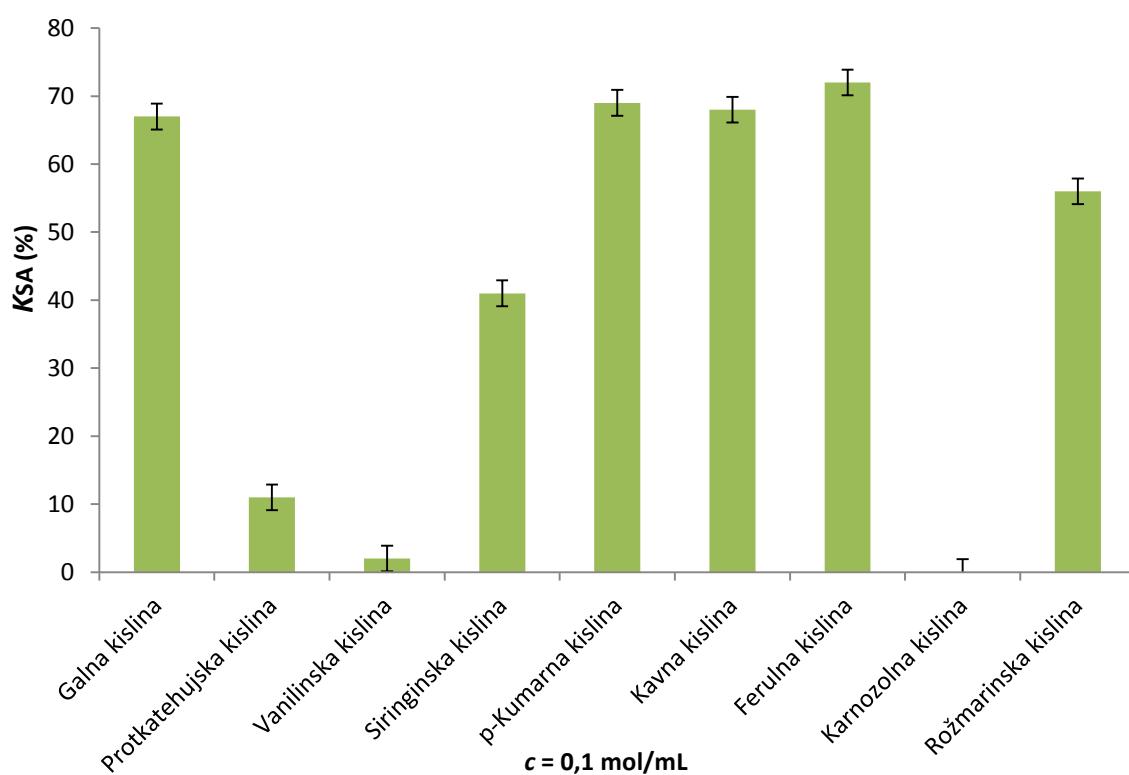
Da bi nazorneje predstavili primerjavo sposobnosti izvlečkov žajblja za lovljenje $O_2^{\cdot-}$ radikalov s fenolnimi kislinami, smo tudi za slednje (tako kot za izvlečke žajblja) izrazili vrednosti K_{SA} pri koncentraciji v reakcijski zmesi 0,1 mol/mL. Vrednosti K_{SA} za fenolne kisline pri omenjeni koncentraciji nismo eksperimentalno določili. Zato smo s pomočjo nelinearne regresijske analize določili parametre krivulje, ki opisuje odvisnost K_{SA} od koncentracije fenolnih kislin. Iz parametrov krivulje smo za fenolne kisline izračunali vrednosti K_{SA} pri koncentraciji fenolnih kislin 0,1 mol/mL. Vrednosti parametrov a in b so s koeficienti determinacije (R^2) podane v preglednici 12. Iz parametrov krivulje smo izračunali vrednosti K_{SA} pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 0,1 mol/mL.

Preglednica 12: Vrednosti parametrov a in b ter koeficient determinacije (R^2) za odvisnost koeficiente sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala od koncentracije fenolnih kislin v reakcijski zmesi za fenolne kisline

Table 12: The values of the parameters a and b and the coefficient of determination (R^2) for the variation of superoxide anion scavenging activity coefficient of concentration of phenolic compounds in the reaction mixture for phenolic acids

Fenolna kislina	a	b	R^2
galna kislina	11,40	172,28	0,94
protokatehajska kislina	3,32	41,79	0,99
vanilinska kislina	5,48	53,66	0,96
siringinska kislina	6,35	99,10	0,96
p-kumarna kislina	13,27	191,66	0,99
kavna kislina	15,58	211,02	0,99
ferulna kislina	15,87	218,50	0,97
karnozolna kislina	ND	ND	ND
rožmarinska kislina	7,36	124,04	0,90

Legenda: ND: ni določeno



Slika 31: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala izračunana s pomočjo nelinearne regresijske analize pri koncentraciji fenolnih kislin v reakcijski zmesi 0,1 mol/mL za čiste fenolne kisline. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh ponovitev \pm sd

Figure 31: Superoxide anion scavenging activity depending at a concentration of phenolic acids in the reaction mixture of 0,1 mol/mL for pure phenolic acids. Results are obtained as avarage value of two paralels \pm sd

Kisline z etilensko skupino v svoji strukturi, torej hidroksicimetne kisline, so protibakterijsko in antioksidativno bolj učinkovite od fenolnih kislin, ki te skupine nimajo. Po drugi strani so fenolne kisline z več hidroksi skupinami boljši antioksidanti, vendar imajo slabše protibakterijsko delovanje.

Med protibakterijsko in antioksidativno učinkovitostjo izvlečkov žajblja, ki je bil obran v različnih obdobjih in sestavo fenolnih spojin v izvlečkih oz. aktivnostjo fenolnih kislin ni videti povezave.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V skladu z delovnimi hipotezami smo preverili, ali imajo izvlečki žajblja v primerjavi z izvlečki drugih rastlin iz družine ustnatic (Lamiaceae) boljše protibakterijsko delovanje na patogene bakterije vrste *S. aureus* ATTC 25926, *B. cereus* WSBC 10530, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370 in v kakšnih koncentracijah le ti vplivajo na njih.

Hkrati smo preverjali, ali ima obdobje obiranja žajblja za predelavo le-tega v izvlečke vpliv na njihovo protibakterijsko in antioksidativno delovanje. Preverjali smo tudi protibakterijske in antioksidativne učinkovitosti izvlečkov žajblja, obranega v različnih mesecih in izbranih čistih fenolnih kislin, ki so po navedbah v literaturi prisotne v izvlečkih žajblja.

Fenolne kisline, med katere spadajo tudi galna, protokatehajska, vanilinska, siringinska, *p*-kumarna, kavna, ferulna, rožmarinska in karnozolna kislina, so v veliki meri odgovorne za protibakterijsko in antioksidativno delovanje fenolnih izvlečkov. To velja tudi za izvlečke iz rastlin družine ustnatic, ki smo jih analizirali. Skupne fenolne spojine izvlečkov so bile izražene v mg GAE/mL izvlečka za izvlečke iz žajblja, obranega v 12-ih različnih mesecih oziroma mg GAE/g izvlečka za izvlečke rastlin iz družine ustnatic.

Testiranja smo izvedli z *in vitro* metodo za ugotavljanje bakterijske občutljivosti na protimikrobnia sredstva, in sicer z metodo razredčevanja v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici z dodatkom barvila TTC. Poleg tega smo za izbrane izvlečke žajblja in izbrane čiste fenolne kisline spremljali tudi kinetiko rasti in odmiranja bakterij. Za izvlečke iz žajblja in fenolne kisline smo ugotavljali tudi antioksidativno učinkovitost preko njihove sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala.

5.1.1 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z dodatkom barvila TTC

Protibakterijsko delovanje izvlečkov rastlin iz družine ustnatic, izvlečkov žajblja in čistih fenolnih kislin smo določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču z dodatkom barvila TTC. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB v mikrotitrski ploščici smo lahko v eni mikrotitrski ploščici testirali šest različnih protibakterijskih snovi v sedmih različnih koncentracijah na eno bakterijsko vrsto. Ta metoda je zelo uporabna, saj lahko istočasno testiramo veliko število vzorcev in hkrati porabimo malo materiala, saj je volumen ene luknjice na ploščici 200 µL. Metodo lahko uporabimo kot referenčno metodo za ovrednotenje točnosti drugih metod (Klančnik in sod., 2009).

Metodo razredčevanja v tekočem gojišču z izvedbo v mikrotitrski ploščici z indikatorji metabolne aktivnosti (tetrazolijeve soli TTC), smo uporabili za ugotavljanje protibakterijske učinkovitosti izvlečkov iz rastlin družine ustnatic (Lamiaceae), izvlečkov žajblja, obranega v 12-ih različnih mesecih in čistih fenolnih kislin na vrste bakterij *B. cereus* WSBC 10530, *S. aureus* ATTC 25926, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370.

Rezultati so podani v preglednicah 6 za izvlečke iz družine ustnatic, 7 za izvlečke žajblja ter 8 za fenolne kisline. Ugotovili smo, da je med izvlečki iz družine ustnatic na vse štiri testne vrste bakterij najbolj učinkovit izvleček žajblja. Za izvleček žajblja smo pri bakteriji *S. aureus* ATTC 25926 določili vrednosti MIK v gojišču TSB 0,04 mg GAE/mL, pri bakteriji *B. cereus* WSBC 10530 je bila vrednosti MIK v gojišču TSB nižja od 0,02 mg GAE/mL, pri bakterijah *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370 pa 0,31 mg GAE/mL v gojišču TSB. Zelo dobro protibakterijsko delovanje smo ugotovili tudi pri izvlečku iz mete, medtem ko je bilo delovanje najslabše pri izvlečku iz sivke.

Glede na to, da ima izvleček žajblja glede na ostale izvlečke iz družine ustnatic najboljšo protibakterijsko učinkovitost, smo se odločili za nadaljne analize tega izvlečka. Testirali smo 12 različnih vzorcev izvlečka žajblja, obranega v 12-ih različnih mesecih. Ugotovili smo, da obdobje obiranja žajblja vpliva na njegovo protibakterijsko učinkovitost, saj so bili izvlečki žajblja, ki je bil obran v poletnih mesecih (maj, junij, julij) bolj učinkoviti od izvlečkov žajblja, obranega v ostalih mesecih. Pri izvlečku žajblja, obranem v mesecu maju smo dobili vrednosti MIK pri bakteriji *S. aureus* ATTC 25926 0,03 mg GAE/mL v gojišču TSB, pri bakteriji *B. cereus* WSBC 10530 0,01 mg GAE/mL v gojišču TSB, pri gramnegativnih bakterijah *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370 pa 0,21 mg GAE/mL v gojišču TSB. Pri izvlečku žajblja, obranem v mesecu juniju so bile vrednosti MIK najnižje in sicer pri bakteriji *S. aureus* ATTC 25926 0,02 mg GAE/mL v gojišču TSB, pri bakteriji *B. cereus* WSBC 10530 0,01 mg GAE/mL v gojišču TSB, pri gramnegativnih bakterijah pa 0,16 mg GAE/mL v gojišču TSB. Pri izvlečku žajblja, obranem v mesecu juliju so bile vrednosti MIK pri bakteriji *S. aureus* ATTC 25926 0,06 mg GAE/mL v gojišču TSB, pri bakteriji *B. cereus* WSBC 10530 0,03 mg GAE/mL v gojišču TSB, pri gramnegativnih bakterijah pa 0,23 mg GAE/mL v gojišču TSB.

Določili smo tudi protibakterijsko učinkovitost izbranih fenolnih kislin (galna, protokatehajska, vanilinska, siringinska, *p*-kumarna, kavna, ferulna, karnozolna in rožmarinska kislina), ki so po navedbah v literaturi prisotne v izvlečkih ustnatic. Ugotovili smo, da je na grampozitivne bakterije najbolj učinkovita karnozolna kislina, medtem ko sta najslabše učinkoviti galna in protokatehajska kislina. Pri gramnegativnih bakterijah so bili rezultati pri galni, karnozolni in protokatehajski kislini večji od testiranih koncentracij, zato je v tem primeru razlaga rezultatov težja. Učinkovitosti pri višjih koncentracijah nismo mogli preveriti, ker pri višjih koncentracijah kisline niso bile več topne v etanolu.

Z dobljenimi rezultati lahko potrdimo, da struktura fenolnih kislin vpliva na njihovo protibakterijsko učinkovitost. Čiste fenolne kisline, ki spadajo v skupino hidroksicimetnih kislin, so bile bolj učinkovite od hidroksibenzojskih, kar je bilo pričakovati. Te vrste kislin (hidroksicimetne kisline) imajo v svoji strukturi etilensko skupino (-CH=CH-), kar zniža polarnost, zato so le te v primerjavi s hidroksibenzojskimi kislinami bolj lipofilne. Ta lastnost lahko pospeši prehod molekul skozi celično membrano in na ta način poveča njihov inhibicijski učinek. Poleg tega na protibakterijsko učinkovitost kislin vpliva tudi prisotnost in število -OCH₃ skupin, tako naj bi bila med hidroksicimetnimi kislinami najbolj učinkovita ferulna kislina (1 metoksi), med hidroksibenzojskimi siringinska (2 metoksi) in vanilinska (1 metoksi). Po drugi strani prisotnost -OH skupin poveča polarnost kislin, zato le-te težje prehajajo skozi lipofilni del membrane kar zmanjša njihov

inhibicijski učinek. Rezultati kažejo, da imata galna in rožmarinska kislina najslabšo protibakterijsko učinkovitost, kar sovpada z njuno povečano polarnostjo.

V preglednici 2 so podane vsebnosti karnozolne in rožmarinske kisline v rastlinskih izvlečkih družine ustnatic (Vitiva d.d., Markovci, Slovenija). Najbolj učinkovit je torej izvleček žajblja, ki edini izmed izvlečkov rastlin družine ustnatic vsebuje karnozolno kislino, kar pojasni njegovo odlično protibakterijsko delovanje, saj je prav karnozolna kislina med čistimi fenolnimi kislinami najbolj učinkovita. Po drugi strani je vsebnost rožmarinske kisline v izvlečkih rastlin družine ustnatic obratnosorazmerna z njihovo protibakterijsko učinkovitostjo. Več rožmarinske kisline kot vsebuje izvleček, tem slabša bo njegova protibakterijska učinkovitost, saj prisotnost rožmarinske kisline poveča polarnost izvlečka in s tem oteži njegov prehod skozi celično membrano (preglednica 2). Lahko torej trdimo, da obstaja povezava med vsebnostjo fenolnih kislin in učinkovitostjo izvlečkov iz rastlin družine ustnatic.

Rezultati kažejo, da so izvlečki žajblja v primerjavi z ostalimi izvlečki iz rastlin družine ustnatic protibakterijsko bolj učinkoviti, kar je v povezavi z njihovo molekulsko strukturo fenolnih kislin.

V preglednici 5 so podane vsebnosti siringinske, p-kumarne, kavne in rožmarinske kisline v izvlečkih žajblja, obranega v 12-ih različnih mesecih (Fakulteta za kemijsko tehnologijo, Split). Med vsebnostjo testiranih fenolnih kislin in protibakterijsko učinkovitostjo izvlečkov iz žajblja težko najdemo kakršnokoli povezavo. Mogoče bi bilo smiselno določiti vsebnost karnozolne kisline v izvlečkih iz žajblja, saj ima le-ta najboljše protibakterijsko delovanje.

5.1.2 Kinetika rasti in odmiranja bakterij

Rezultati, ki smo jih dobili z mikrodilucijsko metodo z dodatkom barvila TTC, so semikvantitativni in zato smo za natančno določanje protibakterijskega učinka uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB smo glede na rezultate, dobljenje z metodo v mikrotitrski ploščici, testirali štiri različne koncentracije protimikrobnih snovi in tako obseg dela precej skrajšali. Rezultati, ki smo jih dobili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču, so kvantitativni v smislu določitve števila bakterijskih celic. Iz dobljenih podatkov smo narisali rastne krivulje celic (Burt, 2004).

Spremljanje kinetike protibakterijskega delovanja rastlinskih izvlečkov preko analize krivulj preživetja oz. odmiranja bakterij v odvisnosti od časa v tekočem gojišču smo uporabili za testiranje protokatehajske (hidroksibenzojske kisline) in *p*-kumarne (hidroksicimetne kisline) kisline, ter izbranih izvlečkov žajblja, obranega v poletnih mesecih (maj, junij, julij) na testna organizma *B. cereus* WSCB 10530 in *S. aureus* ATTC 25926.

Rezultati za izvlečke žajblja so podani v obliki krivulj in so prikazani na slikah od 20 do 25, ter od 26 do 29 za izbrani fenolni kislini. Med kislinami je bolj učinkovita *p*-kumarna

kislina na obe grampozitivni bakteriji, med izvlečki žajblja izvleček, ki je bil obran v mesecu juniju.

Modelni poskusi tega magistrskega dela so pokazali, da so v tekočem gojišču inhibitorno delovale na rast testirane učinkovine pri vseh koncentracijah, ki smo jih predhodno določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici. Rezultati kažejo na to, da so vrednosti MIK, dobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici z dodatkom barvila TTC precej natančne, saj smo pri spremeljanju kinetike rasti/odmiranja prišli do enakih rezultatov.

5.1.3 Določitev sposobnosti lovljenja radikala O_2^-

Določanje antioksidativne učinkovitosti s spektrofotometrično metodo ugotavljanja sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala smo izvedli na izvlečkih žajblja, obranega v 12-ih mesecih in čistih fenolnih kislinah.

Antioksidativna učinkovitost fenolnih kislin je v povezavi s številom hidroksi in metoksi skupin. Te skupine delujejo kot donorji elektrona, njihova prisotnost na drugem, četrtem in/ali šestem C atomu v benzenovem obroču zveča elektronsko gostoto na fenolni –OH skupini. To zveča reaktivnost vodikovega atoma v fenolni –OH skupini v reakcijah z radikali. Med omenjenimi skupinami, ki so donorji elektrona, ima v fenolnih kislinah največji vpliv prisotnost dodatne hidroksilne skupine na benzenovem obroču. Antioksidativna učinkovitost narašča s številom hidroksilnih skupin na benzenovem obroču in se zmanjša, če hidroksilno skupino na drugem in šestem C-atomu v benzenovem obroču nadomesti metoksi skupina (Abramovič, 2011).

Med skupine, ki so akceptorji elektrona, sodi karboksilna skupina. Prisotnost te skupine zniža elektronsko gostoto na fenolni –OH skupini, kar zmanjša reaktivnost vodikovega atoma v fenolni –OH skupini v reakcijah z radikali ter doprinese k manjši stabilnosti fenolnega radikala (AO^\bullet), ki nastane v reakciji fenolne spojine z radikalom, kot je npr. O_2^- . Manjša stabilnost AO^\bullet pomeni slabšo antioksidativno učinkovitost fenolne spojine. Na antioksidativno učinkovitost fenolnih kislin vpliva tudi to, kako je karboksilna skupina vezana na fenolni obroč. Etilenska skupina, ki povezuje –COOH s fenolnim obročem, dodatno stabilizira AO^\bullet . Zato je antioksidativna učinkovitost hidroksicimetnih kislin večja od antioksidativne učinkovitosti hidroksibenzojskih kislin (Abramovič, 2011).

Rezultati so podani v preglednici 9 za izvlečke iz žajblja ter v preglednici 11 za fenolne kisline. Vidimo, da je kavna kislina, ki je hidroksicimetna kislina, antioksidativno učinkovitejša od ustrezne analoga s prav tako dvema –OH skupinama, ki sodi med hidroksibenzojske kisline, to je od protokatehajske kisline. Podobno je ferulna kislina učinkovitejša od vanilinske kisline. Če primerjamo učinkovitost hidroksicimetnih kislin vidimo, da se le-ta v okviru eksperimentalne napake določitve za omenjene kisline ne razlikuje. Galna kislina sicer spada med hidroksibenzojske kisline, vendar je zaradi treh –OH skupin, vezanih na aromatski obroč njena antioksidativna učinkovitost primerljiva z učinkovitostjo hidroksicimetnih kislin, ki imajo celo manjše število –OH skupin. Med hidroksibenzojskimi kislinami je galna kislina najboljši lovilec radikala O_2^- . Protokatehajska kislina z dvema –OH skupinama je znatno manj učinkovita od galne, sledi

ji kislina z eno –OH in eno –OCH₃ skupino vezano na aromatski obroč v *o*- poziciji, to je vanilinska kislina. Rezultati kažejo, da dodatna –OCH₃ skupina (siringinska kislina v primerjavi z vanilinsko) znatno poveča učinkovitost. Presenetljivo je, da rožmarinska kislina, ki vsebuje 4 –OH skupine, ni med najbolj učinkovitimi kislinami.

Iz slike 31 vidimo, da ima največjo antioksidativno učinkovitost izvleček žajblja, ki je bil obran v mesecu maju, sledijo mu junij, julij in september. Lahko rečemo, da imajo najboljšo antioksidativno učinkovitost izvlečki iz žajblja, ki je bil obran v spomladanskih in poletnih mesecih, najslabšo izvlečki žajblja, obranega v jesenskih in zimskih mesecih. Ob primerjavi antioksidativne učinkovitosti izvlečkov žajblja, ki je obran v različnih obdobjih z antioksidativno učinkovitostjo čistih fenolnih kislin lahko povzamemo, da je učinkovitost izvlečkov žajblja iz poletnih mesecev primerljiva z učinkovitostjo hidroksicimetnih kislin (ferulna, *p*-kumarna, kavna kislina) in njihovih derivatov (rožmarinska kislina) oz. fenolnih kislin z več –OH skupinami (galna) in znatno večja od učinkovitosti hidroksibenzojskih kislin z eno –OH skupino.

5.2 SKLEPI

Iz rezultatov, pridobljenih pri našem delu, lahko sklepamo naslednje:

- Izvlečki žajblja so med izvlečki iz rastlin družine ustnatic (Lamiaceae) najbolj učinkoviti za grampozitivne bakterije, saj edini izmed izvlečkov rastlin iz družine ustnatic vsebujejo karnozolno kislino, kar pojasni njihovo odlično protibakterijsko delovanje, saj je prav karnozolna kislina med čistimi fenolnimi kislinami najbolj učinkovita za grampozitivne bakterije.
- Obdobje obiranja žajblja vpliva na protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izvlečkov. Najučinkovitejši za grampozitivne bakterije so bili izvlečki žajblja, ki je bil obran v spomladanskih in poletnih mesecih in sicer v mesecu maju, juniju in juliju.
- Struktura fenolnih kislin vpliva na njihovo protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost. Kisline, ki v svoji strukturi vključujejo etilensko skupino –CH=CH–, torej hidroksicimetne kisline, so protibakterijsko in antioksidativno učinkovitejše od fenolnih kislin, ki te skupine nimajo (hidroksibenzojske kisline). Po drugi strani so fenolne kisline z več –OH skupinami antioksidativno bolj učinkovite, medtem ko protibakterijsko manj.
- Podatkov o vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg GAE/mL) v izvlečkih žajblja, obranega v različnih obdobjih in podatkov o vsebnosti siringinske, *p*-kumarne, kavne in rožmarinske kisline ne moremo neposredno povezati s protibakterijsko in antioksidativno učinkovitostjo izvlečkov žajblja, obranega v 12-ih različnih mesecih.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

V živilstvu narašča zanimanje za uporabo naravnih snovi s protimikrobnim in antioksidativnih delovanjem, ki bi zmanjšale glavne vzroke kvarjenja hrane. Procese oksidacije in mikrobiološkega kvara lahko preprečimo z uporabo konzervansov. Kupci dajejo prednost živilom brez kemijskih konzervansov, z manjšo koncentracijo soli in sladkorja ter brez radikalnih načinov konzerviranja. Med naravne rastlinske dodatke sodijo tudi zelišča in začimbe iz rastlin družine ustnatic (Lamiaceae). Njihovo protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost smo preučevali tudi v magistrski nalogi.

Med učinkovinami izvlečkov rastlin iz družine ustnatic s protibakterijsko in antioksidativno aktivnostjo so fenolne spojine, med njimi še posebej fenolne kislina, karnozolna kislina in karnozol ter kavna kislina in njeni derivati, npr. rožmarinska kislina. V največjih količinah so v rastlinah iz družine ustnatic zastopane naslednje fenolne kislina: galna, protokatehujska, vanilinska, siringinska, *p*-kumarna, kavna, ferulna, karnozolna in rožmarinska kislina. Uporabili smo jih tudi v naši magistrski nalogi.

V magistrski nalogi smo ugotavljali protibakterijsko delovanje izvlečkov žajblja v primerjavi z izvlečki drugih rastlin iz družine ustnatic in čistimi fenolnimi kislinami na bakterije vrste *B. cereus* WSBC 10530, *S. aureus* ATTC 25926, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370. Uporabili smo standardno metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici, z dodatkom barvila TTC, ter metodo spremljanja kinetike rasti in odmiranja bakterij. Testne kulture smo pripravili v tekočem gojišču TSB. Koncentracije izvlečkov smo pripravili glede na preučevane metode. Antioksidativno učinkovitost omenjenih izvlečkov iz žajblja in fenolnih kislin smo določili spektrofotometrično z metodo ugotavljanja sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala. Uporabili smo izvlečke iz rastlin družine ustnatic (melisa, meta, origano, sivka, timijan, žajbelj), izvlečke žajblja, obranega v 12-ih mesecih in čiste fenolne kislina (ferulna, galna, kavna, *p*-kumarna, rožmarinska, protokatehujska, siringinska, vanilinska in karnozolna kislina).

Namen dela je bil dokazati, da je izvleček iz žajblja v primerjavi z ostalimi rastlinskimi izvlečki naboljše protibakterijsko sredstvo, saj le-ta vsebuje največ karnozolne kislina, ki je med fenolnimi kislinami protibakterijsko najbolj učinkovita. Poleg tega smo žeeli preveriti vpliv obdobja obiranja žajblja na protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost njegovih izvlečkov. Prav tako smo dokazali, da so med fenolnimi kislinami v primerjavi s hidroksibenzojskimi kislinami protibakterijsko in antioksidativno učinkovitejše tiste kislina, ki v svoji strukturi vključujejo etilensko skupino, to so hidroksicimetne kislina. Pokazali smo povezano med protibakterijsko in antioksidativno aktivnostjo testiranih izvlečkov žajblja glede na vsebnost fenolnih spojin v izvlečkih in aktivnostjo čistih fenolnih kislin.

Ugotovili smo, da so izvlečki žajblja med izvlečki iz rastlin družine ustnatic najboljše protibakterijsko sredstvo proti bakterijam vrste *B. cereus* WSBC 10530, *S. aureus* ATTC 25926, *S. Infantis* ŽMJ9 in *E. coli* ŽM370. Razlog za to je verjetno vsebnost karnozolne kislina v izvlečkih iz žajblja, le-ta je med čistimi fenolnimi kislinami protibakterijsko

najbolj učinkovita. Obdobje obiranja žajbla vpliva na protibakterijsko in antioksidativno učinkovitost izvlečkov, saj so bili najučinkovitejši izvlečki iz žajbla, ki je bil obran v spomladanskih in poletnih mesecih. Struktura fenolnih kislin prav tako vpliva na njihovo protibakterijsko in antioksidativno delovanje. Kisline z etilensko skupino v svoji strukturi, torej hidroksicimetne kisline, so protibakterijsko in antioksidativno bolj učinkovite od fenolnih kislin, ki te skupine nimajo. Po drugi strani so fenolne kisline z več hidroksi skupinami boljši antioksidanti, vendar imajo slabše protibakterijsko delovanje. Med protibakterijsko in antioksidativno učinkovitostjo izvlečkov žajbla, ki je bil obran v različnih obdobjih in sestavo fenolnih spojin v izvlečkih oz. aktivnostjo fenolnih kislin ni videti povezave.

Z rezultati smo potrdili možnost uporabe izvlečkov rastlin iz družine ustnatic kot protibakterijskih sredstev, ki inhibirajo rast patogenih mikroorganizmov v hrani in s tem preprečujejo njeno kvarjenje. Še posebej bi tukaj izpostavili izvlečke žajbla, ki imajo poleg protibakterijskega tudi močno antioksidativno delovanje in imajo poleg tega, da preprečujejo mikrobiološki in oksidativni kvar živil, tudi številne pozitivne učinke na človeški organizem, tako v preventivi kot tudi pri zdravljenju številnih bolezni.

6.2 SUMMARY

In the food industry there is growing interest in the use of natural substances with antimicrobial and antioxidant activity, which would reduce major causes of food deterioration. The processes of oxidation and microbiological deterioration may be prevented by preservatives. Customers prefer food products without chemical preservatives, with lower concentration of salt and sugar and without radical methods of food preservation. The natural herbal supplements, which include herbs and spices from the family Labiateae (Lamiaceae), have been used in practise for many years. Their antibacterial and antioxidant effectiveness was shown in the master's thesis.

Among the important substances in plant extracts from the Labiateae family with strong antibacterial and antioxidant activity are phenolic compounds, the most important are phenolic acids, especially carnosic acid and carnosol and caffeic acid and its derivatives, for example rosmarinic acid. In the largest quantities in plants of the mint family are represented the following phenolic acids: gallic, protocatechuic, vanillic, syringic, *p*-coumaric, caffeic, ferulic, rosmarinic and carnosic acid. These phenolic acids were used in our master's thesis.

This master thesis was used to determine antibacterial activity of extracts of sage compared with extracts of other plants from the mint family and pure phenolic acids against bacterial strains, namely *B. cereus* WSB 10530, *S. aureus* ATCC 25926, *S. Infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370. We used a standard dilution method in the liquid medium with the addition of TTC and time-kill analysis, which determine kinetics of antibacterial activity. The test culture was prepared in liquid medium TSB. The concentrations of the extracts were prepared according to the studied methods. The antioxidant effectiveness of extracts of sage and phenolic acids were determined spectrophotometrically by measuring the ability of superoxide anion radical scavenging. We used extracts from plants of the family Labiateae (lemon balm, mint, oregano, lavender, thyme, sage), extracts of sage harvested in 12

months and pure phenolic acids (gallic, protocatechuic, vanillic, syringic, *p*-coumaric, caffeic, ferulic, rosmarinic and carnosic acid).

The aim of this work was to prove that the extract of sage has the strongest antibacterial activity in comparison to other plant extracts, as it contains maximum values of carnosic acid, which is the most effective among the phenolic acids. In addition, we want to study the influence of different time of harvesting sage on antibacterial and antioxidative efficiency of its extracts. Also, we wanted to prove that among phenolic acids, more than hydroxybenzoic acids, antibacterial and antioxidant effective are those acids, which in their structure include an ethylene group i.e. hydroxycinnamic acids. We wanted to compare the antibacterial and antioxidant efficiency of the tested extracts of sage in relation to the composition of phenolic compounds in the extracts and activity of pure phenolic acids.

We have found that extracts of sage are the best antibacterial agents against bacteria species *B. cereus* WSBC 10530, *S. aureus* ATCC 25926, *S. Infantis* ŽMJ9 and *E. coli* ŽM370 among plants of the family Labiate. The reason for this is probably the content of carnosic acid in the extracts of sage, which is among the pure phenolic acids the most effective antibacterially. Different times of harvesting sage have an impact on the effectiveness of antibacterial and antioxidant activity of its extracts. The most effective extracts were those from sage harvested in the spring and summer months. The structure of phenolic acids also affect their antibacterial and antioxidant activity. Acids with an ethylene group in their structure, that are, hydroxycinnamic acids, are antibacterial and antioxidant more effective than phenolic acids without this group. On the other hand, the phenolic acids with more hydroxy groups are better antioxidants, but have less antibacterial activity. Among the antibacterial and antioxidant effectiveness of extracts of sage, which was harvested at different times and composition of phenolic compounds in the extracts and the activity of pure phenolic acids we do not see the link.

With this results we confirmed the possibility of using plant extracts from the Labiate family as antibacterial agents, which inhibit the growth of pathogenic microorganisms in food and prevent its deterioration. In particular, we would like to pointed out the extracts of sage, which beside strong antibacterial have also antioxidant activity. Thus, they prevent microbiological and oxidative deterioration of food products and have a number of positive effects on the human body in both the prevention and the treatment of many diseases.

7 VIRI

Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti. Učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu bioznanosti. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.

Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine stranskih proizvodov rastlinske pridelave – funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17. in 18. april, 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 412 str.

Accoa M., Ferreirab F. S., Henriquesa J. A. P., Tondob E. C. 2003. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. Food Microbiology, 20: 489-493

Al-Bayati F.A. 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. Journal of Ethnopharmacology, 116: 403–406

Alimpić A., Pljevljakušić D., Šavikin K., Knežević A., Ćurčić M., Veličković D., Stević T., Petrović G., Matevski V., Vukojević J., Marković S., Marin P.D., Duletić-Laušević S. 2015. Composition and biological effects of *Salvia ringens* (Lamiaceae) essential oil and extracts. Industrial Crops and Products, 76: 702-709

Andersson A., Rönner U., Granum P.E. 1995. What the problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology, 28: 145-155

Ayaz F.A., Hayırlioglu-Ayaz S., Alpay-Karaoglu S., Gruž J., Valentova' K., Ulrichova' J., Strnad M. 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. Food Chemistry, 107: 19–25

Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chemistry, 99: 191-203

Baričevič D. 1996. Priročnik za ciklus predavanj. Pridelovanje zdravilnih rastlin I. del. 1. izdaja. Ljubljana, samozaložba: 117 str.

Bisa. 2016. Sage (*Salvia officinalis*). Herb & Spice: 1 str.
<http://herbspice.guide/home-herbal/sage-salvia-officinalis/> (20.08.2016)

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253

- Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag A., Kilburn J.D., Rakariyatham N. 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. Food Chemistry, 100: 1044-1048
- Chen H., Frankel G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. FEMS Microbiology Reviews, 29: 83–98
- Chen J.H., Ho C.T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 2374-2378
- Cloete T.E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. International Biodeterioration & Biodegradation, 51: 277-282
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 4: 564-582
- Cummings P.B. 2009. Mechanisms of antimicrobial action. V: Microbiology with diseases by body system. Miller-Kittrell M. Knoxville, University of Tennessee: 8 str.
<http://slideplayer.com/slide/7063387/> (30.12.2015)
- Da Porto C., Decorti D., Kikic I. 2009. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing:Comparison of three different extraction methods. Food Chemistry, 112, 4: 1072-1078
- Danevčič T., Mandić-Mulec I. 2007. Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov za študente mikrobiologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 66 str.
- Dastmalchi K., Dorman H.J.D., Oinonen P.P., Darwis Y., Laakso I., Hiltunen R. 2008. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemin balm (*Melissa officinalis* L.) extract. Food Science and Technology, 41: 391-400
- Davidson P.M., Bozkurt Cekmer H., Monu E.A., Techathuvanan C. 2015. The use of natural antimicrobials in food: an overview. V: Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality. Taylor M. (ed.). Knoxville, Universitiy of Tennessee, 1: 1-27
- Davidson P.M., Branen A.L. 2005. Food antimicrobials – an introduction. V: Antimicrobials in food. 3rd ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group, 1: 1-10
- Del Campo J., Amiot M.J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. Journal of Food Protection, 63, 10: 1359-1368
- Dhar A., Lee K.S., Dhar K., Rosazza J.P.N. 2007. *Nocardia* sp. vanillic acid decarboxylase. Enzyme and Microbial Technology, 41: 271–277

Eloff J.N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, *Planta Medica*, 64: 711-713

Ersoy S., Orhan I., Turan N.N., Şahan G., Ark M., Tosun F. 2008. Endothelium-dependent induction of vasorelaxation by *Melissa officinalis* L. ssp. *officinalis* in rat isolated thoracic aorta. *Phytomedicine*, 15: 1087–1092

Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. 2003. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 66, 10: 1811-1821

Favn Professional. 2011. Sivka *Lavandula angustifolia*. Grusuplje. Podjetje za predelavo zdravilnih zelišč: 1 str.
<http://www.favn.eu/naravna-etericna-olja/sivka-lavendula-angustifolia> (20.08.2016)

From C., Pukall R., Schumann P., Hormazabal V. 2005. Toxin – producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 3: 1178-1183

Galle-Toplak K. 2002. Zdravilne rastline na Slovenskem. 2. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 310 str.

Gelluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and mehtanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103: 1449-1456

Generalić I., Skroza D., Ljubenkov I., Katalinić A., Burčul F., Katalinić V. 2011. Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food Chemistry*, 127, 2: 427-433

Generalić I., Skroza D., Šurjak J., Smole Možina S., Ljubenkov I., Katalinić A., Šimat V., Katalinić V. 2012. Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry and Biodiversitiy*, 9: 441-457

Generalić Mekinić I., Skroza D., Ljubenkov I., Šimat V., Smole Možina S., Katalinić V. 2014. *In vitro* antioxidant and antibacterial activity of Lamiaceae phenolic extracts: A correlation study. *Food Technology and Biotechnology*, 52: 119-127

Ghosh S., Lapara T.M. 2007. The effect of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistance of antibiotic resistance among soil bacteria. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 1: 191-203

Ghosh S., Sachan A., Mitra A. 2006. Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotti* MTCC 6581. *Current Science*, 90, 6: 825-829

Gilbert P., McBain A.J. 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 2: 189-208

Gould G.W. 2004. Microbiological and other aspects of food safety. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-10

Granum P.E. 2003. *Bacillus*. Food Poisoning. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Pres, 1: 365-371

Gyawali R., Hayek S.A., Ibrahim S.A. 2015a. Plant extracts as antimicrobials in food products: types. V: Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality, 2: 31-47

Gyawali R., Hayek S.A., Ibrahim S.A. 2015b. Plant extracts as antimicrobials in food products: mechanisms of action, extraction methods, and applications. V: Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality, 3: 49-68

Hammerum A.M., Heuer O.E. 2009. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectius Diseases*, 48: 916-921

Holko I., Bisova T., Holkova Z., Kmet V. 2006. Virulence markers of *Escherichia coli* Strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control*, 17: 393-396

Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856

Huong B.T.M., Mahmuda Z.H., Neogi S.B., Kassu A., Nhien N.V., Mohammad A., Yamato M., Ota F., Lam N.T., Dao H.T.A., Khan N.C. 2010. Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. *Food Control*, 21: 166-171

Jørgensen M.M. 2016. Bunch of fresh herbs tyme *Thymus serpyllum* on white background, stock photo. Odense. Colourbox & Skyfish CEO: 1 str.
<https://www.colourbox.com/image/bunch-of-fresh-herbs-thyme-thymus-serpyllum-on-white-background-image-2900065> (20.08.2016)

Kamdem J.P., Adeniran A., Boligon A.A., Vargas Klimaczewski C., Olalekan Elekofehinti O., Hassan W., Ibrahim M., Pansera Waczuk E., Meiner D.F., Athayde M.L. 2013. Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: Its potential role in neuroprotection. *Industrial Crops and Products*, 51: 26-34

Kivilompolo M., Hyötyläinen T. 2007. Comprehensive two-dimensional liquid Chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145: 115-164

Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009. Protimikrobnno delovanje Rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije. V: Protimikrobne snovi. Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. Ljubljana 29-30 jan. 2009. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 145-157

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 249 str.

Kumar V., Mathela C.S., Tewari A.K., Bisht K.S. 2014. *In vitro* inhibition activity of Essential oils from some Lamiaceae species against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 114: 67-71

Kumar N., Pruthi V. 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*, 4: 86-93

Kundalunga. 2016. What if life is just a game: 1 str.
<http://kundalunga.si/tinkture/tinktura-melisa/> (20.08.2016)

Kunkel D. 2004. *E. coli* – rod prokaryote (bacterium). Kailua, Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Science Stock Photography: 1 str.
<http://www.denniskunkel.com/detail/246.html> (20.08.2016)

Kunkel D. 2007. *Salmonella Infantis* bacteria. Kailua, Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Science Stock Photography: 1 str.
https://www.ciriscience.org/ph_24-Salmonella-infantis-bacteria (20.10.2015)

Kunkel D. 2009. *Staphylococcus aureus* – coccoid, MRSA prokaryote (bacterium). Kailua, Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Science Stock Photography: 1 str.
<http://www.denniskunkel.com/detail/11630.html> (20.10.2015)

Kuštrak D. 2005. Farmakognozija – fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing – Tehnička knjiga: 615 str.

Lahiri A., Das P., Chakravortty D. 2009. *Salmonella Typhimurium*: Insight into the multi faceted role of the LysR-type transcriptional regulators in *Salmonella*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41: 2129-2133

Liu L., Jin C., Zhang Y. 2014. Lipophilic phenolic compounds (Lipo-PCs): emerging antioxidants applied in lipid systems. *RSC Advances*, 4: 2879-2891

Longaray Delamare A.P., Moschen-Pistorello I.T., Artico L., Atti-Serafini L., Echeverrigaray S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100, 2: 603-608

Lu Z., Nie G., Belton P. S., Tang H., Zhao B. 2006. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International*, 48: 263–274

Mastroeni P., Sheppard M. 2004. *Salmonella* infections in the mouse model: Host resistance factors *in vivo* dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes and Infection*, 6: 398-405

Mattila P., Hellström J., Törrönen R. 2006. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 19: 7193-7199

Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40: 223-231

Muraina I.A., Picard J., Eloff J.N. 2009. Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a slow-growing mycoplasmas organism, *Phytomedicine*, 16: 262–264

Mussatto S.I., Dragone G., Roberto I.C. 2007. Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 25: 231–237

Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 1: 142-201

Neo Y.P., Ariffin A., Tan C.P., Tan Y.A. 2010. Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. *Food Chemistry*, 122: 353-359

Nordqvist J. 2015. Oregano: Health benefits, side effects. Knowledge center. MediLexicon International Ltd. Bexhill-on-Sea: 1 str.
<http://www.medicalnewstoday.com/articles/266259.php> (20.08.2016)

Nógrády N., Kardos G., Bistyák A., Turcsányi I., Mészáros J., Galántai Z., Juhász P., Samu P., Kaszanyitzky J.E., Pászti J., Kiss I. 2008. Prevalence and characterization of *Salmonella infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken–human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 162–167

Nychas G. J. E. 1995. Natural antimicrobials from plant. V: New methods of food preservation. Gould G. W. (ed.). London, Blacike Academic & Professional: 59-89

Park J.B. 2008. 5-Caffeoylquinic acid and caffeic acid orally administered suppress P-selectin expression on mouse platelets. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 10: 800-805

Petersen M., Abdullah Y., Benner J., Eberle D., Gehlen K., Hücherig S., Janiak V., Hee Kim K., Sander M., Weitzel C., Wolters S. 2009. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70, 15-16: 1663-1679

Petersen M., Simmonds M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62, 2: 121-125

Peockel D., Greiner C., Verhoff M., Rau O., Tausch L., Hořník C., Steinhilber D., Schubert-Zsilavecz M., Werz O. 2008. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical Pharmacology*, 76: 91-97

Rates S. M. K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613

Rižner Hraš A., Hadolin M., Knez Ž., Bauman D. 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extraction with [alpha]-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*, 71: 229-233

Rodriguez Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca de Nadra M. 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 587-593

Russo A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Delfine S., Cardile V., Rosselli S., Bruno M. 2013. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55: 42-47

Sanchis V. 2010. Introduction to *Bacillus cereus sensu stricto*. France, Micalis institute, INRA, Génétique microbienne et environnement: 1 str.
<http://www.komunich.de/vincent-sanchis/france/bacillus-cereus.html> (27.7.2016)

Singh R., Shushni M.A.M., Belkheir A. 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 3: 322-328

Seme K. 2002a. Patogene bakterije. Stafilocoki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139-145

Seme K. 2002b. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446

Suhaj M. 2006. Spice antioxidant isolation and their antiradical activity: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 531-537

Tauveron G., Slomianny C., Henry C., Faille C. 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 254-262

Tiwari B. K., Valdramidis V. P., O' Donnell C. P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P. J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 14: 5987-6000

Tovarna Organika. 2016. Vse za izdelavo domače kozmetike, naravnih mil ter sveč. Trzin: 1 str.

<http://www.tovarnaorganika.si/trgovina/ekoloska-pridelava-bio-1/hidrolat-poprova-meta-bio/> (20.08.2016)

Trošt N. 2012. Gradivo za delavnico Spoznavamo: Zeliščarstvo. Radovljica, Ljudska univerza Jesenice: 9 str.

Woods G.L., Washington J.A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. V: Manual of clinical microbiology. Murray P.R., Baron E.J., Pfaler M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. (eds.). Washington, American Society for Microbiology, 113: 1327-1341

Zgórka G., Glowniak K. 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants Belonging to the Lamiaceae family. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 26: 79-87

Zhang X.L., Guo Y.S., Wang C.H., Li G.Q., Xu J.J., Chung H.Y., Ye W.C., Li Y.L., Wang G.C. 2014. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. Food Chemistry, 152: 300-306

Zhao Z., Moghadasian M.H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. Food Chemistry, 109: 691-702

Yin M., Chao C. 2008. Anti-Campylobacter, anti-aerobic, and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. International Journal of Food Microbiology, 127: 73–77

Yoda Y., Hu Z.Q., Zhao W.H. 2004. Different susceptibilities of *Staphylococcus* and gram-negative rods to epigallocatechin gallate. Journal of Infection and Chemotherapy, 10: 55-58

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila vam, prof. dr. Sonja Smole Možina, za strokovno vodenje, pomoč in nasvete pri opravljanju magistrskega dela.

Lepa hvala tudi somentorici prof. dr. Heleni Abramovič za vso pomoč pri opravljanju magistrskega dela.

Hvala članom komisije prof. dr. Barbari Jeršek, doc. dr. Tjaši Danevčič in doc. dr. Iztoku Koširju za skrben in natančen pregled naloge.

Zahvala gre tudi Saši Piskernik in Mii Ličen za pomoč v laboratoriju.

Hvala Karmen Stopar za pomoč pri iskanju in natančnem urejanju virov.

Hvala tudi mojim staršem in možu Mihu za moralno podporo tekom študija.

PRILOGA A

Priloga A: Vrednosti izmerjenih absorbanc s standardnim odklonom ($\bar{A}_{vz(560)} \pm sd$) za izvlečke žajbla, obranega v 12-ih mesecih pri različnih koncentracijah fenolnih spojin v reakcijski zmesi (c)

Appendix A: Values of measured absorbance with standard deviation ($\bar{A}_{vz(560)} \pm sd$) for extracts of sage harvested in 12 months in different concentrations of phenolic compounds in the reaction mixture (c)

Čas obiranja	c (mol GAE/mL)	$A_{1(560)}$	$A_{2(560)}$	$\bar{A}_{vz(560)} \pm sd$
januar	0,05	0,131	0,133	0,132 ± 0,001
	0,07	0,114	0,113	0,113 ± 0,001
	0,10	0,110	0,110	0,112 ± 0,002
	0,13	0,101	0,102	0,102 ± 0,010
	0,26	0,293	0,307	0,300 ± 0,001
februar	0,05	0,106	0,109	0,108 ± 0,002
	0,07	0,293	0,291	0,292 ± 0,002
	0,10	0,229	0,227	0,228 ± 0,002
	0,13	0,055	0,051	0,053 ± 0,002
marec	0,05	0,101	0,101	0,101 ± 0,002
	0,07	0,073	0,070	0,071 ± 0,002
	0,10	0,229	0,225	0,227 ± 0,002
	0,13	0,174	0,171	0,172 ± 0,002
april	0,05	0,330	0,332	0,331 ± 0,002
	0,07	0,274	0,273	0,274 ± 0,002
	0,10	0,256	0,259	0,256 ± 0,002
	0,13	0,217	0,218	0,217 ± 0,002
maj	0,025	0,462	0,492	0,477 ± 0,021
	0,0375	0,370	0,357	0,364 ± 0,009
	0,05	0,068	0,069	0,068 ± 0,001
	0,07	0,169	0,166	0,168 ± 0,002
	0,10	0,122	0,132	0,127 ± 0,007
	0,13	0,113	0,112	0,113 ± 0,001
junij	0,025	0,463	0,490	0,477 ± 0,019
	0,0375	0,350	0,357	0,354 ± 0,005
	0,05	0,239	0,249	0,244 ± 0,007
	0,07	0,207	0,211	0,209 ± 0,003
	0,10	0,182	0,175	0,178 ± 0,005
	0,13	0,118	0,108	0,113 ± 0,007
julij	0,025	0,471	0,489	0,480 ± 0,013
	0,0375	0,390	0,367	0,378 ± 0,016
	0,05	0,287	0,288	0,288 ± 0,001
	0,07	0,188	0,189	0,188 ± 0,001
	0,10	0,182	0,175	0,178 ± 0,005
	0,13	0,160	0,166	0,163 ± 0,004

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A

Čas obiranja	<i>c</i> (mol GAE/mL)	<i>A₁(560)</i>	<i>A₂(560)</i>	$\bar{A}_{vz(560)} \pm sd$
avgust	0,025	0,450	0,453	$0,451 \pm 0,002$
	0,0375	0,369	0,366	$0,367 \pm 0,002$
	0,05	0,261	0,264	$0,262 \pm 0,002$
	0,07	0,216	0,234	$0,225 \pm 0,012$
	0,10	0,201	0,212	$0,206 \pm 0,008$
	0,13	0,175	0,173	$0,174 \pm 0,001$
september	0,025	0,489	0,479	$0,484 \pm 0,007$
	0,0375	0,411	0,436	$0,424 \pm 0,017$
	0,05	0,293	0,291	$0,292 \pm 0,002$
	0,07	0,207	0,211	$0,209 \pm 0,003$
	0,10	0,160	0,166	$0,163 \pm 0,004$
	0,13	0,122	0,123	$0,122 \pm 0,001$
oktober	0,025	0,369	0,355	$0,362 \pm 0,010$
	0,0375	0,330	0,355	$0,343 \pm 0,018$
	0,05	0,313	0,332	$0,322 \pm 0,013$
	0,07	0,251	0,259	$0,255 \pm 0,006$
	0,10	0,239	0,241	$0,240 \pm 0,001$
	0,13	0,163	0,166	$0,165 \pm 0,002$
november	0,05	0,330	0,332	$0,331 \pm 0,001$
	0,07	0,299	0,301	$0,300 \pm 0,002$
	0,10	0,261	0,262	$0,261 \pm 0,001$
	0,13	0,235	0,230	$0,233 \pm 0,004$
december	0,05	0,111	0,112	$0,111 \pm 0,001$
	0,07	0,313	0,332	$0,322 \pm 0,013$
	0,10	0,299	0,301	$0,300 \pm 0,002$
	0,13	0,251	0,259	$0,255 \pm 0,006$

PRILOGA B

Priloga B: Vrednosti izmerjenih absorbanc s standardnim odklonom ($\bar{A}_{(560)} \pm sd$) pri fenolnih kislinah, testiranih pri štirih različnih koncentracijah v reakcijski zmesi (c)

Appendix B: The values of measured absorbances with standard deviation ($\bar{A}_{vz(560)} \pm sd$) for phenolic acids tested in four different concentrations in the reaction mixture (c)

Fenolna kislina	c (mol/mL)	$A_{1(560)}$	$A_{2(560)}$	$\bar{A}_{(560)} \pm sd$
galna kislina	0,52	0,029	0,032	0,030 ± 0,002
	0,26	0,039	0,033	0,036 ± 0,004
	0,13	0,050	0,052	0,051 ± 0,001
	0,065	0,080	0,069	0,074 ± 0,008
protokatehajska kislina	0,52	0,155	0,154	0,155 ± 0,001
	0,26	0,163	0,156	0,160 ± 0,005
	0,13	0,167	0,158	0,162 ± 0,006
	0,065	0,166	0,169	0,167 ± 0,002
vanilinska kislina	0,52	0,167	0,157	0,162 ± 0,007
	0,26	0,173	0,172	0,173 ± 0,001
	0,13	0,179	0,173	0,176 ± 0,004
	0,065	0,181	0,187	0,184 ± 0,004
siringinska kislina	0,52	0,096	0,089	0,093 ± 0,005
	0,26	0,099	0,092	0,096 ± 0,005
	0,13	0,099	0,111	0,105 ± 0,009
	0,065	0,107	0,127	0,117 ± 0,014
<i>p</i> -kumarna kislina	0,52	0,011	0,020	0,015 ± 0,007
	0,26	0,031	0,037	0,034 ± 0,004
	0,13	0,053	0,056	0,054 ± 0,002
	0,065	0,065	0,064	0,064 ± 0,001
kavna kislina	0,52	0,014	0,014	0,014 ± 0,000
	0,26	0,027	0,040	0,033 ± 0,009
	0,13	0,050	0,052	0,051 ± 0,001
	0,065	0,076	0,068	0,074 ± 0,008
ferulna kislina	0,52	0,008	0,007	0,008 ± 0,000
	0,26	0,014	0,020	0,017 ± 0,004
	0,13	0,046	0,040	0,043 ± 0,004
	0,065	0,062	0,070	0,066 ± 0,005
karnozolna kislina	0,52	ND	ND	ND
	0,26	ND	ND	ND
	0,13	ND	ND	ND
	0,065	ND	ND	ND
rožmarinska kislina	0,52	0,061	0,062	0,061 ± 0,001
	0,26	0,067	0,065	0,066 ± 0,001
	0,13	0,076	0,070	0,073 ± 0,005
	0,065	0,092	0,089	0,091 ± 0,002

Legenda: ND: ni določeno