

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anja KINČIČ

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE KOMBINACIJE EKSTRAKTA *Alpinia katsumadai* IN EPIGALOKATEHIN GALATA NA BAKTERIJSKI KOKTAJL**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Alpinia katsumadai* EXTRACT AND EPIGALLOCATECHIN GALLATE COMBINATION AGAINST BACTERIAL COCTAIL**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo, Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek, za somentorico dr. Anjo Klančnik in za recenzentko doc. dr. Heleno Abramovič.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Somentorica: dr. Anja Klančnik

Recenzentka: doc. dr. Helena Abramovič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Anja Kinčič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 579. 24 + 579. 26 + 579. 67: 547. 9 (043) = 163.6  
KG patogene bakterije / protimikrobno delovanje / rastlinski ekstrakti / *Alpinia katsumadai* / epigalokatehin galat / bakterijski koktajl / *Listeria monocytogenes* / *Campylobacter jejuni* / *Escherichia coli* / minimalna inhibitorna koncentracija / inhibicija rasti  
AV KINČIČ, Anja  
SA JERŠEK, Barbara (mentorica) / KLANČNIK, Anja (somentorica) / ABRAMOVIČ, Helena (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2010  
IN PROTIMIKROBNO DELOVANJE KOMBINACIJE EKSTRAKTA *Alpinia katsumadai* IN EPIGALOKATEHIN GALATA NA BAKTERIJSKI KOKTAJL  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XIII, 64 str., 10 pregl., 25 sl., 64 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen naloge je bil preveriti protimikrobno delovanje ekstraktov *Alpinia katsumadai* in *Evodia rutaecarpa* v kombinaciji z nizinom in epigalokatehin galatom (EGKG) na posamezne bakterije vrst *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* in *Escherichia coli*. Določiti smo želeli kombinacijo izbranega ekstrakta in nizina ali EGKG, ki bi imela protimikrobno delovanje na bakterijski koktajl sestavljen iz omenjenih vrst grampozitivnih in gramnegativnih bakterij. Kot protimikrobno še učinkovita kombinacija na izbrane vrste bakterij se je izkazala kombinacija ekstrakta *Alpinia katsumadai* (1,026 mg/ml) in EGKG (0,625 mg/ml). Protimikrobna aktivnost te kombinacije je bila večja na bakterijski koktajl kot na posamezno vrsto bakterij (*L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*) v gojišču Mueller Hinton bujon (MHB) pri 37 °C. Protimikrobni učinek kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG na bakterijski koktajl je bil pri 37 °C v piščančjem soku podoben kot v gojišču MHB, medtem ko se je protimikrobna aktivnost pri 8 °C zmanjšala v piščančjem soku in razdetem mešanem mesu v primerjavi z aktivnostjo v gojišču MHB. Protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG na bakterijski koktajl smo dokazali tudi pri 8 °C v razdetem mešanem mesu z naravno prisotnimi bakterijami. Tu je bil protimikrobni učinek manjši kot v sterilnem razdetem mešanem mesu in v piščančjem soku, zato je omenjena kombinacija protimikrobnih snovi lahko le ena od ovir, ki v skupnem delovanju lahko zagotovijo proizvodnjo varnih živil kot je razdeto mešano meso.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ŠD Dn  
DK UDC 579. 24 + 579. 26 + 579. 67: 547. 9 (043) = 163.6  
KG pathogenic bacteria / antimicrobial activity / plant extracts / *Alpinia katsumadai* / epigallocatechin gallate / bacterial cocktail / *Listeria monocytogenes* / *Campylobacter jejuni* / *Escherichia coli* / minimal inhibitory concentration / growth inhibition  
AV KINČIČ, Anja  
SA JERŠEK, Barbara (supervisor) / KLANČNIK, Anja (co-advisor) / ABRAMOVIČ, Helena (reviewer)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA University of Ljubljani, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
LI 2010  
IN ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Alpinia katsumadai* EXTRACT AND EPIGALLOCATECHIN GALLATE COMBINATION AGAINST BACTERIAL COCTAIL  
TD Graduation thesis (University studies)  
OP XIII, 64 p., 10tab., 25 fig., 64 ref.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI The objective of this research was to examine the antimicrobial activity of *Alpinia katsumadai* and *Evodia rutaecarpa* extracts in combination with nisin and epigallocatechin gallate (EGCG) against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni*. We wanted to determine the combination of selected extract and nisin or EGCG which showed antimicrobial activity against bacterial cocktail made of the mentioned Gram-positive and Gram-negative bacteria. The combination of *Alpinia katsumadai* (1.026 mg/ml) extract and EGCG (0.625 mg/ml) proved to be still effective antimicrobial combination. The antibacterial activity of this combination was greater against bacterial cocktail than against individual bacterium (*L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*) in Mueller Hinton broth (MHB) at 37 °C. The antibacterial effect of *A. katsumadai* extract and EGCG against bacterial cocktail was at 37 °C in chicken juice similar it was effect in MHB, while at 8 °C the antibacterial activity was reduced in chicken juice and in minced mixed meat compared to activity in MHB. We proved the antimicrobial activity of *Alpinia katsumadai* extract and EGCG against bacterial cocktail at 8 °C in minced meat with naturally present bacteria. Here the antimicrobial effect was smaller than in sterile minced mixed meat and in chicken juice. Therefore the abovementioned combination of antimicrobial substances can only be one of the hurdles of which activities may provide the production of safe food as it is minced mixed meat.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>X</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 <b>NAMEN NALOGE .....</b>	<b>2</b>
1.2 <b>DELOVNE HIPOTEZE.....</b>	<b>2</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 <b>ZNAČILNOSTI BAKTERIJ VRSTE <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>3</b>
2.2 <b>ZNAČILNOSTI BAKTERIJ VRSTE <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>4</b>
2.3 <b>ZNAČILNOSTI BAKTERIJ VRSTE <i>Campylobacter jejuni</i>.....</b>	<b>5</b>
2.4 <b>PROTIMIKROBNE SNOVI RASTLINSKEGA IZVORA .....</b>	<b>6</b>
2.4.1 <b>Zgodovina.....</b>	<b>6</b>
2.4.2 <b>Značilnosti.....</b>	<b>6</b>
2.4.3 <b>Rastlina <i>Alpinia katsumadai</i> .....</b>	<b>7</b>
2.4.4 <b>Vrednotenje protimikrobnega delovanja.....</b>	<b>9</b>
2.5 <b>NIZIN.....</b>	<b>10</b>
2.6 <b>EPIGALOKATEHIN GALAT .....</b>	<b>11</b>
2.7 <b>UČINEK KOMBINACIJ DVEH ALI VEČ PROTIMIKROBNIH SNOVI .....</b>	<b>12</b>
2.7.1 <b>Kombinacije protimikrobnih sredstev .....</b>	<b>12</b>
2.7.2 <b>Kombinacije protimikrobnih snovi in njihovo protimikrobno delovanje v živilih .....</b>	<b>13</b>
2.7.3 <b>Dejavniki, ki vplivajo na protimikrobno delovanje rastlinskih ekstraktov .....</b>	<b>15</b>

2.7.3.1 Vpliv vrste bakterij .....	15
2.7.3.2 Vpliv vrste medija .....	16
2.7.3.3 Vpliv vsebnosti maščob, beljakovin in ogljikovih hidratov v živilih.....	16
2.7.3.4 Vpliv pH .....	17
2.7.3.5 Vpliv temperature .....	17
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>18</b>
3.1 POTEK DELA .....	18
3.2 MATERIAL .....	19
<b>3.2.1 Bakterije.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2 Mikrobiološka gojišča .....</b>	<b>19</b>
3.2.2.1 Selektivna gojišča .....	19
3.2.2.2 Neselektivna gojišča .....	20
<b>3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem .....</b>	<b>20</b>
3.2.3.1 Ekstrakt <i>Alpinia katsumadai</i> .....	20
3.2.3.2 Ekstrakt <i>Evodia rutaecarpa</i> .....	21
3.2.3.3 Nizin .....	21
3.2.3.4 Epigalokatehin galat .....	21
<b>3.2.4 Druge kemikalije in dodatki.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.5 Piščančji sok.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.6 Razdeto mešano meso .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.7 Laboratorijska oprema.....</b>	<b>23</b>
3.3 METODE DELA .....	24
<b>3.3.1 Revitalizacija bakterij.....</b>	<b>24</b>
3.3.1.1 Bakterije vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> .....	24
3.3.1.2 Bakterije vrste <i>C. jejuni</i> .....	24
<b>3.3.2 Priprava inokuluma .....</b>	<b>24</b>
3.3.2.1 Priprava posameznih kultur .....	24
3.3.2.2 Priprava bakterijskega koktajla .....	24

3.3.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotiterski ploščici ....	24
3.3.4 Spremljanje protimikrobne aktivnosti v gojišču MHB in piščančjem soku z rastnimi krivuljami .....	27
3.3.5 Spremljanje protimikrobne aktivnosti v gojišču MHB in piščančjem soku z rastnimi krivuljami za bakterijski koktajl .....	29
3.3.6 Spremljanje protimikrobne aktivnosti v razdetem mesu z rastnimi krivuljami za bakterijski koktajl.....	30
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK IZBRANIH SNOVI NA POSAMEZNE VRSTE BAKTERIJ V GOJIŠČU MHB .....	33
4.1.1 Vrednosti MIC določene za posamezno protimikrobno snov .....	33
4.1.2 Protimikrobni učinek kombinacije ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in nizina .....	34
4.1.3 Protimikrobni učinek kombinacije ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG .....	34
4.1.4 Posamezen protimikrobni učinek ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG.....	35
4.1.5 Spremljanje rasti bakterij v prisotnosti kombinacije ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG .....	37
4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK IZBRANIH SNOVI NA POSAMEZNE VRSTE BAKTERIJ V PIŠČANČJEM SOKU .....	39
4.2.1 Spremljanje rasti bakterij v prisotnosti ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG .....	39
4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK IZBRANE KOMBINACIJE EKSTRAKTA <i>A. katsumadai</i> IN EGKG NA BAKTERIJSKI KOKTAJL.....	42
4.3.1 Učinek v gojišču MHB pri 37 °C in 8 °C.....	42
4.3.2 Učinek v piščančjem soku pri 37 °C in 8 °C .....	45
4.3.3 Učinek v razdetem mesu pri 8 °C .....	46
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>49</b>
5.1 RAZPRAVA .....	49
5.1.1 Protimikrobno delovanje ekstrakta <i>Alpinia katsumadai</i> in EGKG na grampozitivne in gramnegativne bakterije.....	50
5.1.2 Vpliv medija na protimikrobno delovanje ekstrakta <i>Alpinia katsumadai</i> in EGKG.....	51

<b>5.1.3 Vpliv sestavin živila na protimikrobno delovanje ekstrakta <i>Alpinia katsumadai</i> in EGKG .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.4 Vpliv temperature na protimikrobno delovanje ekstrakta <i>Alpinia katsumadai</i> in EGKG .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.5 Vpliv kombinacij protimikrobnih sredstev .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 SKLEPI .....</b>	<b>55</b>
<b>6 VIRI .....</b>	<b>56</b>
<b>PRILOGE .....</b>	<b>65</b>



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemijske sestavine eteričnih olj listov in cvetov iz rastline <i>A. katsumadai</i> iz kitajskega otoka Hainan (Nan in sod., 2004).....	8
Preglednica 2: Razlaga pojmov pri vrednotenju protimikrobnega delovanja (Burt, 2004)...	9
Preglednica 3: Definicije kombiniranih protimikrobnih učinkov (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005b).....	13
Preglednica 4: Bakterije uporabljene pri eksperimentalnem delu.....	19
Preglednica 5: Laboratorijska oprema uporabljena pri eksperimentalnem delu.....	23
Preglednica 6: Primer načrta posameznega eksperimenta izvedenega v mikrotiterski ploščici za ekstrakt <i>A. katsumadai</i> .....	26
Preglednica 7: Vrednosti MIC ekstraktov <i>A. katsumadai</i> in <i>Evodia rutaecarpa</i> ter EGKG in nizina določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotiterski ploščici.....	33
Preglednica 8: Inhibicija rasti bakterij vrst <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i> s kombinacijami ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in nizina v gojišču MHB.....	34
Preglednica 9: Vrednosti MIC kombinacij ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v gojišču MHB določene z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici za bakterije vrst <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. jejuni</i> in <i>E. coli</i> .....	35
Preglednica 10: Povzetek glavnih rezultatov protimikrobnega delovanja ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG.....	49

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shema eksperimentalnega dela .....	18
Slika 2: Shema določitve MIC protimikrobne snovi z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotiterski ploščici .....	25
Slika 3: Shema določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v gojišču MHB in v piščančjem soku z rastnimi krivuljami .....	27
Slika 4: Shema določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v gojišču MHB in v piščančjem soku pri 37 °C in 8 °C z rastnimi krivuljami za bakterijski koktajl .....	29
Slika 5: Shema določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v razdetem mesu pri 8 °C z rastnimi krivuljami za bakterijski koktajl .....	31
Slika 6: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,156 mg/ml EGKG .....	36
Slika 7: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in z različnimi koncentracijami EGKG .....	36
Slika 8: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in z 0,156 mg/ml EGKG .....	37
Slika 9: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču MHB z različnimi koncentracijami ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG .....	38
Slika 10: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v gojišču MHB različnimi koncentracijami ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG .....	38
Slika 11: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v gojišču MHB z različnimi koncentracijami ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG .....	39
Slika 12: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v piščančjem soku z različnimi koncentracijami ekstrakta <i>A. katsumadai</i> .....	40
Slika 13: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v piščančjem soku z različnimi koncentracijami EGKG .....	40
Slika 14: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v piščančjem soku z 2,052 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> .....	41
Slika 15: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v piščančjem soku z različnimi koncentracijami EGKG .....	41
Slika 16: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C .....	43

Slika 17: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C v normalni in mikroaerofilni (mikro: 10 % CO <sub>2</sub> , 3 % O <sub>2</sub> , 87 % N <sub>2</sub> ) atmosferi.....	43
Slika 18: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 8 °C v normalni in mikroaerofilni (mikro: 10 % CO <sub>2</sub> , 3 % O <sub>2</sub> , 87 % N <sub>2</sub> ) atmosferi.....	44
Slika 19: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C .....	44
Slika 20: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v piščančjem soku z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C.....	45
Slika 21: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v piščančjem soku z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C .....	45
Slika 22: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v piščančjem soku z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C .....	46
Slika 23: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v razdetem mesu z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 8 °C .....	47
Slika 24: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v razdetem mesu z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 8 °C .....	47
Slika 25: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v razdetem mesu z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 8 °C .....	48

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Inhibicija bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. jejuni</i> in <i>E. coli</i> v gojišču MHB z dodanim ekstraktom <i>A. katsumadai</i> ali z dodanim EGKG.....	65
Priloga B: Inhibicija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> pri kombinaciji ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v gojišču MHB.....	65
Priloga C: Inhibicija bakterij vrste <i>C. jejuni</i> pri kombinaciji ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v gojišču MHB .....	65
Priloga D: Inhibicija bakterij vrste <i>E. coli</i> pri kombinaciji ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v gojišču MHB .....	66
Priloga E: Inhibicija bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i> v piščančjem soku z dodanim ekstraktom <i>A. katsumadai</i> ali z dodanim EGKG.....	66
Priloga F: Inhibicija bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> , <i>C. jejuni</i> in <i>E. coli</i> pri izbrani kombinaciji 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> + 0,625 mg/ml EGKG v bakterijskem koktajlu.....	67

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AHB	gojišče Abeyta-Hunt-Bark
<i>A. katsumadai</i>	<i>Alpinia katsumadai</i>
$a_w$	aktivnost vode
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
cfu	kolonijska enota
DMSO	dimetil sulfoksid
EAEC	enteroagregativna <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGKG	epigalokatehin galat
EHEC	enterohemoragična <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivna <i>E. coli</i>
EPEC	enteropatogena <i>E. coli</i>
EMB	gojišče z eozin-metilenskim modrilom
ETEC	enterotoksigena <i>E. coli</i>
EtOH	etanol
HCl	klorovodikova kislina
INT	2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fentil tetrazolijev klorid
INTF	formazan
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	kalijev dihidrogenfosfat
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
MHB	gojišče Mueller Hilton bujon
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
N	število mikroorganizmov (cfu/ml)
TSA	gojišče triptični soja agar
TTC	2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid
ŽM	mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniška fakulteta

## 1 UVOD

Varnost živil je ob prehranski vrednosti in senzorični kakovosti eden temeljnih kakovostnih parametrov hrane. Varnost hrane mora biti zagotovljena in nedvomno ima pri tem velik pomen mikrobiologija. Mikroorganizmi nas spremljajo skozi vse življenje v koristni in škodljivi vlogi. Ko gre za proizvodnjo in porabo hrane, najprej pomislimo na njihovo škodljivost, to je, da predstavljajo realno nevarnost za zdravje potrošnikov in povzročijo t.i. alimentarne toksikoinfekcije. Le-te so posledica napak v higiensko neustrezni predelavi, tehnološkem procesu predelave, konzerviranju, distribuciji in skladiščenju do porabe (Adamič in sod., 2003).

Zahteve potrošnikov stremijo k temu, da bi sintetične aditive in sol zamenjali za naravne konzervanse. Ena izmed možnosti je uporaba rastlinskih ekstraktov. Rastlinski ekstrakti so pridobljeni iz rastlin ali njihovih delov (cvetov, plodov, lubja, korenin, semen). Večina rastlinskih ekstraktov ima status GRAS (angl. Generally Recognized As Safe), zaradi česar je uporaba še posebej zanimiva in omogoča bolj naraven način konzerviranja živil (Burt, 2004).

Bakterije vrste *Campylobacter jejuni* so gramnegativne, spiralno zvite paličice. So mikroaerofilne. Za človeka so patogene in povzročajo veliko črevesnih okužb. Število primerov kampilobakterioz narašča in je v mnogih razvitih državah že presegllo pogostost salmoneloz (FAO/WHO, 2009).

Bakterije vrste *Escherichia coli* so gramnegativne paličice. Nekateri serološki tipi (na primer EHEC, EPEC, ETEC, EIEC) povzročajo hude alimentarne toksikoinfekcije. Na mesu, ribah, v mleku ipd. se hitro razmnožujejo in povzročajo zakisanje in kvar (WHO, 2010).

Bakterije vrste *Listeria monocytogenes* so grampozitivne kokoidne, gibljive paličice. So patogene za človeka, najpogostejši vir okužbe pa je kontaminirana hrana. Listerioza je oportunistična okužba, ki ogroža predvsem rizične skupine, kamor prištevamo tudi nosečnice. Smrtnost zaradi listerioze je najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano, na srečo pa je incidenca zelo nizka (WHO, 2010; FAO/WHO, 2004).

Kontaminacija hrane z bakterijami je pomemben dejavnik, ki vpliva na kakovost in varnost živil, zato je preprečevanje rasti mikroorganizmov ključnega pomena pri proizvodnji varnih živil. Ker so se rastlinski ekstrakti v mnogih dosedanjih raziskavah izkazali kot snovi s protimikrobnim delovanjem na bakterije, ki so pogost vzrok kontaminacije živil, so nadaljnje raziskave na tem področju zelo smiselne in dobrodošle za širjenje možnosti uporabe v različnih živilskih izdelkih.

## 1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil proučiti protimikrobno delovanje ekstraktov *Alpinia katsumadai* in *Evodia rutaecarpa* v kombinacijah z nizinom ali epigalokatehin galatom (EGKG). Določiti smo želeli kombinacijo izbranega ekstrakta in nizina, ali izbranega ekstrakta in EGKG, ki bi imela v kombinaciji boljši protimikrobni učinek kot ga ima posamezna snov. Za eksperimentalno delo smo izbrali bakterije vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*. Ker je v živilih lahko hkrati več različnih bakterij smo proučevali protimikrobni učinek izbrane kombinacije tudi na bakterijski koktajl. Preveriti smo želeli tudi, ali ima izbrana kombinacija ekstrakta in nizina ali EGKG enak protimikrobni učinek pri nižji temperaturi od 37 °C in kakšen je vpliv živila.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Rastopine ekstraktov *Alpinia katsumadai* in *Evodia rutaecarpa* ter nizin in EGKG imajo protimikrobni učinek na bakterije vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*.
- Ustrezna kombinacija dveh protimikrobnih snovi bo imela večji protimikrobni učinek kot ena sama protimikrobna snov.
- Protimikrobni učinek izbrane kombinacije bo večji na grampozitivne kot na gramnegativne bakterije.
- Protimikrobni učinek izbrane kombinacije na bakterijski koktajl bo manjši kot učinek na posamezne bakterijske vrste.
- Protimikrobni učinek izbrane kombinacije se bo zmanjšal v živilu v primerjavi z učinkom v laboratorijskem gojišču.
- Pri nižjih temperaturah bo učinkovitost izbrane kombinacije protimikrobnih snovi proti bakterijskemu koktajlu manjša kot pri optimalnih temperaturah za rast bakterij.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ VRSTE *Listeria monocytogenes*

Bakterije vrste *Listeria monocytogenes* so grampozitivne, nesporogene, kokoidne paličice. Lahko rastejo pri temperaturi od 1 °C do 45 °C z optimalno temperaturo razmnoževanja med 30 °C in 37 °C. Uniči jih pasterizacija oziroma toplotna obdelava živil pri temperaturi 60 °C za 30 minut. Zmrzovanje jih ne uniči. Lahko preživijo v živilih, ki imajo zmerno do nizko kislost (pH 4,5–9,2) in raven soli do 10 %, optimalen pH pa je 7. Rastejo lahko pri  $a_w$  nižji od 0,93 (Rocourt in Buchrieser, 2007).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so bile kot humani patogen zabeležene leta 1929. Listerioza, ki se prenaša s hrano je relativno redka a resna bolezen in v primerjavi z drugimi boleznimi, ki se prenašajo s hrano (npr. salmoneloza), z visokim odstotkom smrtnih primerov (20-30%). Bolezen v veliki meri prizadene posebne skupine ljudi, ki imajo večjo dovzetnost za okužbo. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so oportunistični patogeni, ki najpogosteje prizadenejo tiste, ki imajo hude osnovne bolezni ali bolezenska stanja (npr. zmanjšano imunsko odpornostjo, HIV/AIDS, kronične bolezni, kot so ciroza, bolezni ki vplivajo na imunski sistem), nosečnice, nerojene otroke in starejše osebe (Painter in Skutsker, 2007).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so pogosto prisotne v surovi hrani tako rastlinskega kot živalskega izvora. Večinoma se listerioza povezuje z okužbami s kontaminirano predpripravljeno hrano (Hitching in Whiting, 2001). Prav tako so lahko v kuhani hrani zaradi onesnaženja v postopku predelave ali nezadostne toplotne obdelave. Izolirane so bile iz mleka, sira (predvsem mehkih sirov), sladoleda, surove zelenjave, fermentiranega surovega mesa, in kuhanih klobas, surove in kuhane perutnine, surovih in prekajenih morskih sadežev (Sauders in Wiedemann, 2007).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so široko razširjene v okolju in hrani. Izolirane so bile iz različnih virov iz tal, fekalnega materiala, kanalizacije in vode. Temu, da so živila primarni način prenosa bakterij vrste *L. monocytogenes* na ljudi, ni bilo posvečene posebne pozornosti, dokler ni prišlo do nekaj izbruhov bolezni v Severni Ameriki in Evropi. Pomembni dejavnik pri prenosu s hrano je lastnost listerij, da se lahko razmnožujejo pri temperaturi hladilnika, če imajo dovolj časa. Kljub dejstvu, da so z bakterijami vrste *L. monocytogenes* lahko kontaminirane različne vrste hrane, so izbruhi in posamezni primeri povezani pretežno s predpripravljeno hrano. Čeprav je listerioza relativno redka bolezen, resnost in zelo pogost pojav v industrijsko pridelani hrani, zlasti med izbruhi, pomeni da so socialne in ekonomske posledice listerioze med najvišjimi med boleznimi, ki se prenašajo s hrano. Listeriozo je večinoma opaziti v industrializiranih državah. Listeriozo je mogoče razdeliti v dve kategoriji: invazivno in neinvazivno. O invazivni listeriozi govorimo, ko začetna stopnja okužbe črevesnega tkiva z bakterijami vrste *L. monocytogenes* vodi do vdora v ostale dele telesa (npr. maternice nosečnic, centralni živčni sistem ali kri). Inkubacijska doba je lahko dolga, ponavadi 2-3 tedne, včasih tudi do 3 mesece. Za invazivno listeriozo je značilna visoka umrljivost (20-30 %). Neinvazivno listeriozo so opazili med številnimi izbruhi, kjer so se v večini primerov pojavili znaki gastroenteritisa,



kot so driska, vročina, glavobol in bolečine v mišicah. Tu je obdobje inkubacije kratko. Do teh izbruhov pride, ko sicer zdrav posameznik zaužije velike količine bakterij vrste *L. monocytogenes*. V Evropi je na leto zabeleženih 0,3 do 7,5 primerov okužb z listeriozo na milijon ljudi (FAO/WHO, 2004).

## 2.2 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ VRSTE *Escherichia coli*

Bakterije vrste *Escherichia coli* so gramnegativni fakultativno anaerobni bacili. Nevirulentni sevi so del normalne črevesne flore, virulentni sevi pa povzročajo okužbe v prebavilih in zunajčrevesne okužbe pri človeku in živalih. Večina sevov *E. coli* je neškodljivih. Okužbe prebavil povzročajo enterohemoragična *E. coli* (EHEC), enteropatogena *E. coli* (EPEC), enterotoksigena *E. coli* (ETEC), enteroinvazivna *E. coli* (EIEC) in enteroagregativna *E. coli* (EAEC). Te se na ljudi prenašajo predvsem z uživanjem kontaminirane hrane, kot so surovi ali manj kuhani mesni izdelki in surovo mleko ali voda (Andlovic, 2002a).

Bakterije vrste *E. coli*, so bile kot zdravstven problem javno priznane leta 1982 po izbruhu bolezni v ZDA (WHO, 2010).

EHEC proizvajajo toksine, znane kot verotoksini ali Šigovi toksini, zaradi podobnosti s toksini, ki jih proizvajajo bakterije vrste *Shigella dysenteriae*, ki povzročajo grižo. EHEC lahko rastejo pri temperaturi od 7 °C do 50 °C, z optimalno temperaturo 37 °C. Nekateri sevi EHEC lahko rastejo v kislih živilih do pH 4,4 in v živilih z minimalno  $a_w$  0,95. Uniči jih kuhanje živil pri 70 °C in več (Bell in Kyriakides, 1998).

Diarejo povprečnega odraslega človeka povzroči od  $10^5$  do  $10^{10}$  celic EPEC,  $10^8$  do  $10^{10}$  ETEC in  $10^8$  celic EIEC (Susman, 1997).

Bakterije seva *E. coli* O157:H7 so EHEC, ki se najpogosteje omenjajo kot sev v povezavi z javnim zdravjem. Največ okužb z EHEC se pojavlja pri otrocih, mlajših od 15 let. 85 % primerov je posledica okužbe s hrano. Pogostejši so posamezni primeri, izbruhi so redkejši. Leta 1996 je prišlo do izbruha na Japonskem, ko so bili v šolskem kosilu kontaminirani kalčki redkve (WHO, 2010).

Znaki bolezni, ki jih povzroča EHEC vključujejo krče v trebuhu in drisko, ki je lahko v nekaterih primerih tudi krvava. Lahko se pojavi tudi povečana telesna temperatura in bruhanje. Inkubacijska doba lahko traja 3-8 dni, najpogosteje 3-4 dni. Večina bolnikov si opomore v 10 dneh, vendar lahko v redkejših primerih (predvsem pri majhnih otrocih in starejših osebah) okužba povzroči življenjsko nevarne bolezni, kot je hemolitično uremični sindrom (HUS), do katere lahko pride pri do 10 % bolnikov. Smrtnost je v razponu med 3-5 %. HUS je najpogostejši vzrok akutne ledvične odpovedi pri majhnih otrocih (Griffin, 1995).

Podatki o razmerah v državah v razvoju so omejeni, saj nadzora za bakterije vrste *E. coli* ne opravljajo rutinsko. Večina razpoložljivih podatkov se nanaša na serotip *E. coli* O157:H7. V razvitih državah pa se nadzor opravlja rutinsko. Rezervoar za ta patogeni sev je predvsem govedo in drugi prežvekovalci. Na ljudi se prenaša predvsem z uživanjem

kontaminirane hrane. Z izbruhom bolezni, ki je vzrok okužbe z bakterijami seva *E. coli* O157:H7 so povezani predvsem hamburgerji, suhe salame, nepasteriziran sveže iztisnjen jabolčnik, jogurti in mleko. Večje število izbruhov je povezanih z uživanjem sadja in zelenjave (ohrovta, zelene solate, zeljnate solate), kjer lahko pride do kontaminacije zaradi stika s fekalijami domačih in divjih živali pri sami pridelavi zelenjave. EHEC je bila prav tako izolirana iz ribnikov, potokov in vodnih korit, bazenov in pitne vode. Ugotovili so, da lahko v gnoju in usedlinah v vodi *E. coli* preživi tudi več mesecev (WHO, 2010).

### 2.3 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ VRSTE *Campylobacter jejuni*

Bakterije, ki pripadajo rodu *Campylobacter* so nesporogene, gramnegativne paličice. So na kisik občutljive mikroaerofilne bakterije. Optimalno rastejo v atmosferi, ki vsebuje 5-10 % kisika in 1-10 % CO<sub>2</sub>. Bakterije rodu *Campylobacter* rastejo pri temperaturi 37 °C, vendar ne pod 32 °C, zato je smiselno domnevati, da se med predelavo, po predelavi, prevozom s hladilnikom in zmrzovanjem ne razmnožujejo. Vendar pa organizmi lahko preživijo te korake še posebej če so temperature nizke. Na ohlajenem, surovem piščancu in svinjski koži so bakterije vrste *Campylobacter jejuni* preživele tudi več tednov (Lee in sod., 1998).

Bakterije rodu *Campylobacter* so še posebej občutljive na sušenje in znižan pH. Minimalni pH za rast je 4,9, optimalen pa pH 6,5-7,5. Občutljive so tudi na sol nad 1,5 %. Bakterije vrste *C. jejuni* ne preživijo kuhanja ali pasterizacije (Park, 2002). V vodi in drugih okoljih z neoptimalnimi razmerami rasti se bakterije rodu *Campylobacter* lahko spremenijo v stanje VBNC (živo, vendar nekultivabilno stanje). To stanje poda veliko vprašanj, ali so bakterije rodu *Campylobacter* v tem stanju virulentne za ljudi in če se lahko po prehodu skozi gostitelja vrnejo v kultivabilno stanje. Nekatere študije so pokazale, da po prehodu skozi piščanca, miši, podgane in oplojena jajca zopet dobijo kultivabilnost (Parkhill in sod., 2000; Moore in sod., 2001; FAO/WHO, 2009).

Bakterije vrst *C. jejuni* in *C. coli* se od ostalih bakterij, ki pripadajo rodu *Campylobacter* razlikujejo po optimalni temperaturi rasti, ki je 42 °C. Bakterije vrste *C. jejuni* so povezane pretežno s perutnino, vendar so bile izolirane tudi iz goveda, ovc, koz, psov in mačk (Skirrow, 1994).

Bakterije vrste *C. jejuni* so bile izolirane tudi iz jedi z gobami, sveže zelenjave (špinače, zelene solate, redkve, peteršilja, krompirja, čebule) in iz mešane solate pakirane v modificirani atmosferi (Philips, 1998).

Jacobs-Reitsma (2000) navaja visoko incidenco tudi pri svežem mleku. Tu gre verjetno za kontaminacijo s fekalijami. Blaser in sodelavci (1980) so beležili, da so bakterije vrste *C. jejuni* v mleku preživele 24 ur na sobni temperaturi in nekaj tednov v mleku ohlajenem na 4 °C. 500 celic bakterije vrste *C. jejuni* v mleku pa je bila zabeležena kot doza, ki povzroča gastroenteritis (Robinson, 1981).

Bakterije rodu *Campylobacter* se na ljudi prenašajo z neposrednim stikom okuženih živali ali živalskih trupel in neposredno z uživanjem kontaminirane hrane in vode (FAO/WHO, 2009).

Bakterije, ki pripadajo rodu *Campylobacter* so najbolj pogost povzročitelj črevesnih okužb v razvitih državah in v državah v razvoju (WHO, 2000). V Sloveniji je kampilobakter na drugem mestu med bakterijskimi povzročitelji driske (Andlovic, 2002b). Zabeleženi pojavi okužb z bakterijami rodu *Campylobacter* so izrazito narasli v mnogih razvitih državah v zadnjih 20 letih. Nezadostno poročanje o okužbah z bakterijami rodu *Campylobacter* je velik problem v mnogih državah. Incidenco odraža le število potrjenih primerov, zato je pravo število okužb mnogo višje od števila zabeleženih primerov. Te primere navadno povzročijo bakterije vrste *C. jejuni* in v manjšem obsegu bakterije vrste *C. coli* (FAO/WHO, 2009; EFSA, 2009).

Večina okužb z bakterijami rodu *Campylobacter* se pojavi kot posamezni primer ali kot družinsko povezan izbruh. Okužbe so resne, vendar je stopnja smrtnosti nizka. Okužbe prebavil potekajo kot vodena driska, v hujši obliki kot krvava driska. Bolnik ima bolečine v trebuhu in ima lahko vročino (Andlovic, 2002b).

V državah v razvoju so otroci nenehno izpostavljeni bakterijam rodu *Campylobacter* in kot posledico tega razvijejo serumska protitelesa že zgodaj v življenju. Raven protiteles pri teh otrocih je višja v primerjavi z ravnjo protiteles otrok v razvitih državah. Poleg tega se raven protiteles povečuje s starostjo (FAO/WHO, 2009).

## 2.4 PROTIMIKROBNE SNOVI RASTLINSKEGA IZVORA

### 2.4.1 Zgodovina

Hipokrat je v 5. stoletju pred našim štetjem v zapisih omenjal 300-400 zdravilnih rastlin. Tudi v Bibliji se omenja okoli 30 zdravilnih rastlin. Po propadu zahodnih civilizacij se je uničilo in izgubilo veliko dokumentov iz tega področja. Arabska in Azijska civilizacija pa sta znanje o zdravilnih rastlinah nadgrajevali. V obdobju renesanse, pa se je v zanimanje za zdravilne rastline obudilo tudi na vzhodu (Cowan, 1999).

Moderna medicina je vse bolj odprta do protimikrobnih učinkovin pridobljenih iz rastlin. Vzrok za to je predvsem v odpornosti vse več vrst bakterij na tradicionalne antibiotike. Zanimanje se je v zadnjih dvajsetih letih še povečalo, saj je izumrlo veliko število rastlinskih vrst, s tem pa so se zmanjšale možnosti za odkrivanje novih naravnih protimikrobnih in drugih biološko pomembnih snovi (Cowan, 1999).

### 2.4.2 Značilnosti

Danes potrošniki stremijo k zdravim živilskim proizvodom, ki bi imeli čim daljšo obstojnost in bi bili čim bolj kakovostni. Zato se vse več kemijskih konzervansov in aditivov (sol, nitriti in sulfati) zamenjuje z naravnimi dodatki. Izboljšave se delajo tudi na področju pakiranja in same predelave živil (Davidson in sod., 2002).

Rastline, zelišča in začimbe, njihova eterična olja in izolirane komponente vsebujejo veliko število substanc, ki so znane kot protimikrobna sredstva, ki zavirajo rast bakterij, kvasovk

in plesni. Za več kot 1340 rastlin je znano, da so vir protimikrobnih komponent. Večina teh komponent je zbranih v eteričnih oljih iz listov (rožmarin, žajbelj), cvetov in brstov (nageljnova žbica), gomoljev (česen, čebula), korenik (asafoedita), plodov (poper, kardamom) ali iz ostalih delov rastlin (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005a).

Rastline imajo skoraj neomejene možnosti za sintetiziranje aromatskih snovi, ki so v večini fenolne spojine ali njihovi oksigenirani derivati. Večina teh snovi je sekundarnih metabolitov. Do sedaj so jih izolirali že več kot 12.000, kar naj bi bilo le okrog 10 % vseh rastlinskih snovi. Večina teh snovi služi kot obramba proti mikroorganizmom, insektom in rastlinojedim živalim. Cowan (1999) jih deli na:

- fenole in polifenole (enostavni fenoli, fenolne kisline, kinoni, flavonoidi, flavoni, flavonoli, tanini in kumarini)
- terpene in eterična olja
- alkaloide
- lektine in polipeptide in
- poliacetilene

Tudi poliamini, tiosulfinati in glikozidi rastlinskega izvora imajo protimikrobne lastnosti (Cowan, 1999).

### **2.4.3 Rastlina *Alpinia katsumadai***

*Alpinia katsumadai* se je široko uporabljala v tradicionalni kitajski medicini za zdravljenje različnih bolezenskih stanj, kot so bruhanje in želodčne težave. Vendar je zelo malo znanega o celičnih aktivnostih s katerimi ta rastlina učinkuje in zaradi katerih ima terapevtske učinke (Lee in sod., 2003).

Rastline rodu *Alpinia* s približno 250 vrstami v družini ingverjev *Zingiberaceae* so razširjene večinoma na Kitajskem, v Indiji in Polineziji. Te rastline imajo debele lepo dišeče korenike, z vonjem po ingverju iz katerih spomladi poženejo novi poganjki, listi pa imajo suličasto obliko z resicami. Zrastejo lahko do 10 metrov visoko. Številne vrste rastlin rodu *Alpinia* so cenjene zaradi zdravilnih lastnosti in imajo dolgo zgodovino uporabe v tradicionalni kitajski in indijski medicini kot zdravilo proti krčem, hipertenziji, kot antioksidanti, delujejo protivnetno, bakteriostatično in fungistatično. Največ teh rastlin je na kitajskem otoku Hainan (okrog 80 %). Nan in sodelavci (2004) so kemično sestavo ekstraktov rastline *Alpinia katsumadai* analizirali z GC-MS (plinska kromatografija z masnim spektrofotometrom). Ekstrakte so pripravili iz cvetov in listov rastline *Alpinia katsumadai* (preglednica 1).

Hua in sodelavci (2009) so iz semen rastline *Alpinia katsumadai* izolirali tri monoterpenke konjugate kalkona: rubrain, izorubrain in sumandain C.

Preglednica 1: Kemijske sestavine eteričnih olj listov in cvetov iz rastline *A. katsumadai* iz kitajskega otoka Hainan (Nan in sod., 2004)

Sestavina eteričnega olja	List (%)	Cvet (%)
2-heptanol	0,7	0,2
kamfen	1,2	0,7
felandren	0,7	7,0
$\beta$ -pinen	2,7	5,2
2-metil-6-metilen-1,7-oktadien	1,3	1,3
4-karen	9,1	6,4
limonen	2,0	1,8
1,8-cineol	8,3	20,2
terpinen	19,0	12,6
terpineol	2,7	1,1
<i>p</i> -menta-1,4-dien	4,2	3,4
1-metil-4-izoproil-2-cikloheksenol	1,2	1,8
kamfor	5,6	3,5
trimetil norbornanol	0,1	0,1
borneol	0,2	0,2
<i>p</i> -ment-1-en-ol	22,0	21,3
benzilaceton	0,7	< 0,1
2-izopropil-5-metil-3-cikloheksenon	0,4	0,1
nonenal	0,2	< 0,1
santalen	0,1	0,9
kariofilen	2,3	1,7
metilpenteil-2-norpinen	1,1	0,5
( <i>Z</i> )- $\beta$ -farnesen	0,3	0,2
$\beta$ -kariofilen	0,6	0,6
tetrametil heksahidrobezociklohepten	0,2	0,1
germakren D	1,5	1,8
eudesma-4,11-dien	0,7	0,1
kamgren	0,8	0,2
longipinen	0,8	0,6
ledol	0,7	
<i>n-trans</i> -nerolidol	1,5	1,1
denderalasin	0,1	< 0,1
spatulenol	0,1	< 0,1
kariofilen oksid	0,2	0,1
dodekadienol acetat	0,1	< 0,1
bisabolol	0,2	0,1
sinensal	0,5	
<i>trans</i> -bergamotol	0,1	< 0,1
palmitinska kislina	0,4	1,0
fitol	0,5	0,1
heksadekanamid	0,5	0,3
9-oktadecenamid	1,1	2,2
<i>n</i> -pentakosan	2,1	0,1

Od glavnih sestavin eteričnih olj v *A. katsumadai* imajo tri sestavine,  $\beta$ -pinen, 1,8-cineol, *p*-ment-1-en-ol močno protimikrobno aktivnost (Juliani in sod., 2002; Faleiro in sod., 2003; Kim in sod., 2003).

#### 2.4.4 Vrednotenje protimikrobnega delovanja

Pri raziskavah, pri katerih se določa protimikrobno delovanje snovi, se najpogosteje kot merilo učinkovitosti uporablja minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Problem se pojavi, ker različni avtorji različno definirajo MIC, zaradi česar je rezultate med seboj težko primerjati. Poleg MIC pa se uporabljata tudi izraza minimalna baktericidna koncentracija (MBC) in bakteriostatična koncentracija, ki sta po vrednosti blizu MIC. Nekatere definicije so navedene v preglednici 2 (Burt, 2004).

Preglednica 2: Razlaga pojmov pri vrednotenju protimikrobnega delovanja (Burt, 2004)

POJEM	RAZLAGA
<b>MIC</b>	1. najmanjša koncentracija snovi, ki preprečuje razmnoževanje ali zniža živost inokuluma  2. najmanjša koncentracija snovi, ki popolnoma prepreči razmnoževanje izbranega mikroorganizma za vsaj 48 ur  3. najmanjša koncentracija, ki prepreči vidno rast izbranega mikroorganizma  4. najmanjša koncentracija, ki povzroči značilno zmanjšanje živosti izbranega mikroorganizma (> 90 %)
<b>MBC</b>	1. koncentracija izbrane snovi, ki ubije 99,9 % ali več začetnega števila inokuluma  2. najmanjša koncentracija, pri kateri po precepljanju na sveže gojišče ne opazimo rasti
<b>Bakteriostatična koncentracija</b>	Najmanjša koncentracija snovi, pri kateri ni rasti mikroorganizmov, se pa razmnožujejo po precepljanju na sveže gojišče
<b>Baktericidna koncentracija</b>	Najmanjša koncentracija snovi, pri kateri ni rasti mikroorganizmov in ti ne rastejo niti po precepljanju na sveže gojišče

## 2.5 NIZIN

Nizin so odkrili leta 1920. V živilski industriji se kot konzervans uporablja že več kot 50 let (McClintock in sod., 1952). Je molekula polipeptida, sestavljena iz 34 aminokislin in spada v skupino bakteriocinov (Mulders in sod., 1991).

Proizvajajo ga bakterije vrste *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. Ima širok protimikrobni spekter delovanja proti grampozitivnim bakterijam. Ni učinkovit proti gramnegativnim bakterijam, kvasovkam in plesnim. Gramnegativne bakterije so proti nizinu odporne zaradi njihove kompleksno zgrajene celične stene, ki onemogoča prehod nizina v celico. Prav tako ne more preko celične stene kvasovk. Ker v skupino grampozitivnih bakterij spadajo tudi toplotno odporne bakterije, je nizin postal zelo pomemben pri konzerviranju toplotno obdelanih živil, saj se s toplotno obdelavo njegova protimikrobna učinkovitost ne uniči. Uporablja se predvsem v mlečnih izdelkih, predelani hrani in v fermentacijski industriji. Druga pomembna skupina bakterij, ki so občutljive na nizin, so mlečno kisline bakterije, ki se lahko razmnožujejo v živilih z nizkim pH (npr: solatni preliv, omake, pivo in vino). Nizin je učinkovit tudi proti bakterijam vrste *L. monocytogenes* (Thomas in Delves-Broughton, 2001).

Nizin deluje na aktivne vegetativne celice s prehodom skozi membrano, formiranjem por in porazdelitvijo protonske gonilne sile oz. protonskega gradienta. Torej nizin vstopa skozi membrano tako, da formira pore, prenos pa omogoča protonski gradient. To zavira prehajanje aminokislin in pospeši nenaden izliv manjših molekul, ionov ali citoplazemskih topljencev kot so aminokisliline in nukleotidi. Poznamo štiri naravne oblike nizina, in sicer nizin A, Q, U in nizin Z (Mulders in sod., 1991; Zendo in sod., 2003; Brotz in Sahl, 2000).

V kombinaciji s kelatnimi spojinami (npr. EDTA) je lahko nizin učinkovit tudi proti gramnegativnim bakterijam kot so bakterije vrste *E. coli* in bakterije rodu *Salmonella*. Kelatne spojine odstranijo dvovalentne katione iz celične stene gramnegativnih bakterij, sprostijo fosfolipide in lipoproteine in tako naredijo celično steno prepustno za nizin. Učinkovitost nizina v živilih je odvisna od ostalih načinov, s katerimi je živilo še konzervirano, na primer od toplotne obdelave, modificirane atmosfere, nizke temperature in pH. Nizin bolje deluje v tekočih in homogeniziranih živilih kot v trdih in heterogenih, ker se lažje porazdeli po matriksu živila. Tudi maščoba lahko ovira porazdelitev po živilih in s tem zmanjša protimikrobno učinkovitost nizina (Jung in sod., 1992). Prav tako zmanjšanje protimikrobne učinkovitosti nizina povzroči znižana temperatura (Abee in sod., 1994).

Nekatere komponente pa imajo z nizinom sinergističen učinek. To so eterična olja (karvakrol, timol in karvon), organske kisline, bakteriocini, ekstrakt iz česna, lizocim, kelatne komponente in estri maščobnih kislin (Thomas in Delves-Broughton, 2005).

## 2.6 EPIGALOKATEHIN GALAT

Fenolne spojine gradi aromatski obroč z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Več tisoč fenolov lahko razdelimo na več načinov, uveljavlja pa se klasifikacija po številu C-atomov (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne spojine v rastlinski celici nastajajo kot sekundarni metaboliti. Pomembni so pri rasti in reprodukciji, akumulirajo se v epidermalnem tkivu rastline in sodelujejo pri zaščiti pred zunanjimi stresi (UV, mikroorganizmi, insekti), učinkujejo kot vizualni markerji (cvetovi, sadeži) ter vplivajo na senzorične lastnosti (barva, okus, aroma) živilskih izdelkov (Abramovič in sod., 2008).

Flavonoidi so spojine, ki imajo 15 C-atomov in osnovno strukturo (C6-C3-C6), ki se imenuje flavan oziroma 2-fenilbenzopiran. V tej skupini fenolnih spojin je največ antioksidantov, katehinov, procianidinov, flavonov in flavonolov. Te snovi se v rastlini tvorijo kot odgovor na okužbo z mikroorganizmi. V razmerah *in vitro* delujejo protimikrobno na širok spekter mikroorganizmov. Mehanizmi protimikrobne učinkovitosti so različni. Lahko tvorijo kompleks z najrazličnejšimi proteini ter bakterijskimi celičnimi stenami (Puupponen-Pimiae in sod., 2001), bolj lipofilni flavonoidi pa lahko porušijo strukturo celičnih membran (Tsuchiya in sod., 1996). Katehini iz listov zelenega čaja zavirajo rast patogenih mikroorganizmov in izničijo sposobnost njihovih membran, da bi jih ščitila pred vdorom protimikrobnih snovi (Sakanaka in sod., 1989; Borris 1996).

S stališča zagotavljanja varnosti živil so poleg inhibicije zelo zanimivi podatki o inhibiciji sinteze toksinov, tako bakterijskih kot glivnih, npr. inhibicija tvorbe aflatoksina (Molyneux in sod., 2007). Slabše je raziskan vpliv rastlinskih fenolnih učinkov na toplotno odporne bakterijske spore, kar lahko vpliva na varnost in obstojnost z bakterijskimi sporami kontaminiranih živil (Klančnik in sod., 2009). Posebej zanimivo s stališča varnosti živil pa je področje, ki se navezuje na sinergistično delovanje rastlinskih učinkovin z drugimi protimikrobnimi snovmi (npr. antibiotiki in biocidi) (Threlfall in sod., 2000).

Epigalokatehin galat je najbolj učinkovit in najbolj raziskan katehin v zelenem čaju. Je polifenolni bioflavonoid, topen je v organskih topilih (npr. etanol, DMSO, dimetil formamid). Deluje na principu fenolnih antioksidantov in preprečuje oksidacijo proteinov majhne gostote v telesu. Bioflavonoide imenujemo fitokemikalije, sem pa sodita tudi vitamin P in vitamin C2. Obstaja okoli 2000 znanih bioflavonoidov, kamor spadajo katehini, citrini, eriodictini, hesperetini, hesperidini, nobiletini, kvercetini, rutini, sinensetini in tangeretini. Vitamin P nima bistvenega prehranskega pomena, vendar je znano, da ima učinek na kapilare in sicer tako, da ureja njihovo prepustnost. To lahko prispeva k skupni aktivnosti antioksidantov in razstrupljevalcev. To lahko poveča delovanje vitamina C, kar vpliva na zniževanje ravni holesterola v krvi. Prav tako je znano, da bioflavonoidi delujejo tudi protivnetno in protivirusno, antialergijsko, antimutageno in antikancerogeno. Epigalokatehin galat je splošni inhibitor metaloproteaz in serinskih proteaz, inhibira regulacijo celičnega cikla, nastanek tumorjev ter zmanjša redukcijo kisikovih prostih radikalov (Chemicaland21.com, 2010; Abbas in Wink, 2009).

EGKG najdemo v vseh vrstah čaja, vendar ga je v črnem čaju za skoraj polovico manj kot v zelenem čaju. EGKG je pridobljen iz nefermentiranih ali pol-fermentiranih čajnih listov s



postopkom obdelave s toplo vodo (80 - 100 °C), 40 – 75 % raztopine alkohola ali z 30 – 80 % raztopino acetona. Ekstrakt se splakne s kloroformom in prenese v organska topila, kot so etil acetat, n-butanol, keton metil izobutil ali aceton. Organsko topilo se nato odstrani z destilacijo, preostalo komponento pa se liofilizira ali posuši z razprševanjem. Katehine iz čajev se ločuje s HPLC z reverzno fazo. Izvleček EGKG lahko nato koncentriramo, posušimo, shranimo v obliki prahu ali prečistimo z vodno rekristalizacijo (Hara, 1986).

## 2.7 UČINEK KOMBINACIJ DVEH ALI VEČ PROTIMIKROBNIH SNOVI

### 2.7.1 Kombinacije protimikrobnih sredstev

Kombinacije protimikrobnih sredstev, bodisi antibiotikov, razkužil in konzervansov, ki imajo sinergističen učinek so zelo iskane. Na kliničnem področju se kombinacije antibiotikov uporabljajo pri poizkusih, da bi se izognili pojavu odpornosti bakterij. To bi lahko razširili na protimikrobna sredstva, kjer bi z sinergističnim učinkom lahko prišli do izboljšanih rezultatov (Lambert in sod., 2003).

Raziskave na področju protimikrobnih snovi v hrani se delijo na dve področji. Na prvem področju gre za pridobivanje novih informacij o naravnih protimikrobnih snoveh. Z raziskavami so dokazane primernost in koristna uporaba komponent protimikrobnih snovi (npr. timol, karvakrol in alkil izotiocianat). Drugo področje pa vključuje raziskave kombinacij protimikrobnih učinkovin (Smid in Gorris, 2007).

Termini, ki se uporabljajo pri opisovanju odnosa med dvema ali več snovmi s protimikrobnim učinkom so aditiven, antagonističen in sinergističen učinek. O aditivnosti govorimo, ko je vsota učinkovitosti posameznih protimikrobnih snovi enaka učinkovitosti obeh protimikrobnih snovi skupaj. Pri tem ne pride niti do povečanja niti do zmanjšanja učinka pri kombinaciji protimikrobnih snovi v primerjavi z učinkom posamezne protimikrobne snovi. Pri antagonizmu se učinkovitost kombinacije zmanjša glede na vsoto učinkovitosti posameznih protimikrobnih snovi. Sinergizem pa je večja protimikrobna učinkovitost kombinacije kot vsota učinkovitosti posameznih protimikrobnih snovi (preglednica 3).

Za izračun kombiniranega učinka dveh protimikrobnih spojin se iz praktično določenih posameznih minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC) izračuna t.i. frakcijsko inhibitorno koncentracijo (enačbi 1 in 2) (Bharadway in sod., 2003).

$$FICa = \frac{MICa \text{ v kombinaciji}}{MICa} \quad \dots(1)$$

$$FICb = \frac{MICb \text{ v kombinaciji}}{MICb} \quad \dots(2)$$

Legenda:

FICa, FICb...frakcijska inhibitorna koncentracija protimikrobnih snovi a in b  
MICa in MICb...vrednosti MIC za snov a in snov b

Preglednica 3: Definicije kombiniranih protimikrobnih učinkov (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005b)

Kombiniran protimikrobni učinek	Definicija
Aditivnost	$FICa + FICb = 1,0$
Antagonizem	$FICa + FICb > 1,0$
Sinergizem	$FICa + FICb < 1,0$

Legenda: FICa in FICb...frakcijska inhibitorna koncentracija protimikrobne komponente a in b.

### 2.7.2 Kombinacije protimikrobnih snovi in njihovo protimikrobno delovanje v živilih

Čeprav so protibakterijske lastnosti različnih protimikrobnih snovi rastlinskega izvora že dolgo znane, je nedavno zanimanje za alternativno naravno pridobljena protimikrobna sredstva povzročilo ponovni znanstveni interes za te snovi. Mnoge študije so pokazale visoko učinkovitost proti alimentarnim patogenom in bakterijskim kvarljivcem v razmerah *in vitro*. Vendar pa so za doseganje enakega učinka v živilih potrebne višje koncentracije. Protimikrobne snovi rastlinskega izvora lahko v višjih koncentracijah vplivajo na organoleptične lastnosti na primer tako, da se spremeni okus ali celo tako, da je živilo nesprejemljivega okusa. Pravilno izbrane kombinacije ekstraktov, ki imajo sinergistično ali aditivno protimikrobno delovanje, pomenijo zmanjšane koncentracije rastlinskih ekstraktov v živilih in posledično zmanjšan vpliv na senzorične lastnosti. Poleg tega kombinacije protimikrobnih snovi lahko omogočijo boljši nadzor nad bakterijami za katere je znano da imajo visoko rezistenco. Nekateri eksperimenti so pokazali, da ima samo eterično olje večji protibakterijski učinek kot mešanica glavnih komponent tega eteričnega olja. S kombinacijo teh glavnih komponent z drugimi komponentami, ki imajo šibkejši učinek, pa lahko dosežemo sinergistični učinek (Gutierrez in sod., 2008; Lopez-Malo Vigil in sod., 2005a).

Uporaba rastlinskih ekstraktov za nadzor alimentarnih patogenov in bakterij, ki kvarijo živila, zahteva, da se proučijo vplivi na organoleptične lastnosti, obseg delovanja proti organizmu, ki se nanaša na določen izdelek in tudi vplivi sestavin živila. Optimalna uporaba je v živilih odvisna od teh dejavnikov, zato je potrebno k uporabi rastlinskih ekstraktov vključiti tudi študije za določitev sestavin živila in kako količina teh sestavin vpliva na protimikrobno aktivnost. Te študije predstavljajo glavno povezavo med uporabo v razmerah *in vitro* in praktično uporabo v kompleksnih živilih (Gutierrez in sod., 2008).

Ko je dokazan pozitiven učinek kombinacij snovi s protimikrobnim delovanjem v razmerah *in vitro*, je potrebno ta učinek dokazati še v živilih. Pogosto se namreč zgodi, da ima kombinacija, ki ima v razmerah *in vitro* dokazan pozitiven učinek, v živilih zmanjšan učinek ali pa ga sploh nima. Do tega pride zaradi delovanja mnogih dejavnikov v živilih, na primer zaradi proteinov, lipidov, kationov, pH in slabe topnosti snovi s protimikrobnim učinkom (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005b).

Med eteričnimi olji so se za dobre kombinacije s protimikrobnim delovanjem izkazale kombinacije eteričnega olja origana in timijana, origana in melise, origana in bazilike,

origana in majarona, majarona in timijana, timijana in rožmarina ter timijana in žajblja (Gutierrez in sod., 2008).

Cui in sodelavci (2010) so dokazali da ima kombinacija  $\text{NaNO}_2$  in ekstrakta iz rastline koptis sinergističen učinek na bakterije vrste *Clostridium botulinum*. Podobne rezultate sta dobila Ismaiel in Pierson (1990), ki sta preučevala kombinacijo  $\text{NaNO}_2$  in eteričnega olja origana v gojišču in v mleti govedini.

Sinergizem je bil opažen med karvakrolom in njegovim prekurzorjem p-cimenom in med cinamaldehydom in evgenolom (Ultee in sod. 2000). Sinergistični učinek je bil opažen tudi med komponentami eteričnih olj in blagimi metodami konzerviranja (npr. povišan tlak, nizka vsebnost kisika, znižan pH in znižana  $a_w$ ) (Burt, 2004).

Za karvakrol in timol sta Gill in Holley (2006) dokazala protimikrobno delovanje v razmerah *in vitro* na širok spekter grampozitivnih bakterij, vključno z bakterijami vrste *L. monocytogenes*.

Exarchou in sodelavci (2002) so dokazali protimikrobni učinek dveh komponent iz eteričnega olja origana, karvakrola in timola skupaj z rožmarinovim ekstraktom. Lin in sodelavci (2004) so dokazali sinergističen protimikrobni učinek med ekstraktom origana in brusnice proti bakterijam vrste *L. monocytogenes* v mesu in ribah.

Solomakos in sodelavci (2008a) so testirali kombinacije med nizinom in eteričnim oljem timijana. Dokazali so dobro protimikrobno učinkovitost proti bakterijam vrste *L. monocytogenes*. To kombinacijo so nato prenesli na vzorec mesa, kjer so za enako protimikrobno učinkovitost morali koncentracije protimikrobnih snovi povišati iz 0,3 % eteričnega olja in 500 IU nizina na 0,6 % eteričnega olja in 1000 IU nizina.

Samelis in sodelavci (2005) so dokazali, da se protimikrobna učinkovitost poveča, če nizin kombinirajo z organskimi kislinami in njihovimi solmi, v primerjavi s protimikrobno učinkovitostjo samega nizina.

Protimikrobna učinkovitost kombinacije nizina in eteričnega olja timijana proti bakterijam vrste *E. coli*, je bila boljša pri temperaturi 10 °C, kot pri 4 °C (Solomakos in sod., 2008b).

Govaris in sodelavci (2010) so dokazali boljši skupni učinek nizina in eteričnega olja origana pri temperaturi 4 °C in 10 °C proti bakterijam vrste *Salmonella enteritidis*.

Na področju živil s kombinacijami z EGKG ni bilo veliko raziskane. Večino raziskav se dela na področju zdravljenja in preprečevanja bolezni. Upaganlawar in sodelavci (2009) so delali raziskave s kombinacijo zelenega čaja in vitamina E, ki naj bi imela pozitivne učinke pri zdravljenju infarkta. Raziskave so potekale na podganah in so dale pozitivne rezultate. Povečali sta se teža srca in telesna teža podgane, znižal se je nivo serumskih encimov (troponin), zvišal se je nivo kalcija in kalija.

Raziskave se delajo tudi na tem, da bi imele kombinacije zdravil z naravnimi agensi pozitivne učinke. Zato sta Stuart in Rosengren (2008) raziskovala vpliv kombinacije

EGKG in 4-hidroksitamoksifena na MDA-MB-231 celice rakavih obolenj prsi pri ženskah. Kombinacija se je izkazala kot kombinacija s sinergističnim učinkom, ki je hitreje zaviralno delovala na rakave celice, kot sam 4-hidroksitamoksifen.

Ohishi in sodelavci (2002), so raziskali kombinacijo EGKG in zdravila Sulindac na rakave celice debelega črevesa na podganah. Kombinacija je zavirala rast rakavih celic bolje, kot samo zdravilo Sulindac.

### **2.7.3 Dejavniki, ki vplivajo na protimikrobno delovanje rastlinskih ekstraktov**

Splošno velja, da naj bi lastnosti živil kot so vsebnost vode, maščob, proteinov, antioksidantov, konzervansov, pH, sol in drugi dodatki, ščitile bakterije pred delovanjem protimikrobnih snovi (Munoz in sod., 2009).

#### **2.7.3.1 Vpliv vrste bakterij**

Za gramnegativne bakterije je na splošno znano, da so manj občutljive na biocide kot grampozitivne bakterije (Russell in Gould, 1988).

Grampozitivne bakterije so se izkazale kot bolj občutljive na eterična olja pridobljena iz rastline *Lonicera japonica*, kot gramnegativne (Rahman in Kang, 2009). Bezic in sodelavci (2003) prav tako navajajo, da so gramnegativne bakterije bolj odporne kot grampozitivne. Tudi Ceylan in Fung (2004) sta ugotovila, da so bila eterična olja (origana, nageljnovc žbice, rožmarina, popra, sladkega korena, kurkume, janeža, ruja, kardamoma, angelike) bolj učinkovita proti grampozitivnim kot gramnegativnim bakterijam, kar drži tudi za mnoge začimbe in rastline. Hidrofilna celična stena gramnegativnih bakterij je sestavljena predvsem iz lipopolisaharida, ki zavira prehajanje hidrofobnih eteričnih olj v celice. To pa je glavni razlog, zakaj so grampozitivne bakterije bolj občutljive na eterična olja od gramnegativnih bakterij (Bezic in sod., 2003).

Grampozitivne bakterije imajo debelo togo celično steno sestavljeno iz peptidoglikana (90 %), ki celični steni zagotavlja trdnost. Pri gramnegativnih bakterijah pa je peptidoglikanskega sloja le 10 %. Bakterijska stena grampozitivnih bakterij vsebuje poleg peptidoglikana še znatne količine teihoične kisline, nekatere bakterijske vrste pa imajo v njej tudi veliko polisaharidnih molekul. Teihoični kislini sta dve: lipoteihoična kislina, ki je kovalentno povezana z glikolipidi citoplazemske membrane in teihoična kislina, ki ovija peptidoglikan in tvori zunanjo plast bakterijske stene. Bakterijska stena gramnegativnih bakterij vsebuje dve dodatni plasti, ki obe navzven obdajata peptidoglikan; ti sta zunanja membrana in periplazemski prostor, ki je vmesni prostor med peptidoglikanom in zunanjo membrano (Brock, 2006).

Kelatne komponente (npr. etilendiamintetraocetna kislina - EDTA) povečajo delovanje protimikrobnih snovi (npr. nizin, lizocim) na gramnegativnih bakterijah, ki načeloma niso inhibirane z eno samo protimikrobno snovjo. Grampozitivne bakterije so bolj občutljive na določene protimikrobne komponente v prisotnosti kelatnih komponent. Kelatne

komponente naj bi destabilizirale lipopolisaharidni sloj celične membrane gramnegativnih bakterij (Davidson in Branen, 2005).

Sharififar in sodelavci (2006) navajajo, da je imelo eterično olje iz rastline *Z. multiflora* boljši protimikrobni učinek na gramnegativne kot na grampozitivne bakterije.

### 2.7.3.2 Vpliv vrste medija

Gill in sodelavci (2002) so predvideli, da lahko bakterije v živilih zaradi večje dostopnosti hranil kot v laboratorijskih gojiščih, hitreje popravijo poškodovane celice. V povezavi s tem niso pomembne samo lastnosti živil ampak tudi zunanji dejavniki, kot so temperatura ali lastnosti bakterij, ki lahko vplivajo na občutljivost bakterij. Ker je večina živil sestavljenih iz vode, ogljikovih hidratov, maščob, beljakovin in NaCl je potrebno analizirati vpliv teh komponent na protimikrobno delovanje spojin z protimikrobnim učinkom (Cui in sod., 2010).

Kombinacija eteričnih olj origana in muškata oreška je imela protimikrobni vpliv na bakterije vrste *E. coli*, v bujonu, v predpripravljenem piščancu pa ne (Gutierrez in sod., 2008).

Dejstvo, da je inhibicija bakterij vrste *L. monocytogenes* v mesu manjša kot v tekočem gojišču lahko pojasnimo s konceptom »obnavljanja s prolinom« (Apostolidis in sod., 2008). Prolin ali njegovi prekurzorji kot so glutamat in arginin v mesu, bi lahko tem bakterijam pomagali, da si opomorejo pri protimikrobnih inhibitornih aktivnostih rastlinskih fenolnih spojin.

Larson in sodelavci (1996) navajajo, da je imel ekstrakt hmelja manjši protimikrobni učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes* v mesu, kot v laboratorijskem gojišču.

Nedavne raziskave (Mytle in sod., 2006; Ahn in sod., 2007) so pokazale, da so rastlinski ekstrakti uporabni za zmanjšanje patogenov v piščančjih hrenovkah in kuhani govedini. Ravno nasprotno pa so Firouzi in sodelavci (2007) beležili nizko protimikrobno aktivnost ali pa učinka sploh niso beležili proti bakterijam vrste *E. coli* O157:H7 in salmonelam, ko so eterična olja uporabili v mleti govedini in predpripravljenem piščancu za kuhanje.

### 2.7.3.3 Vpliv vsebnosti maščob, beljakovin in ogljikovih hidratov v živilih

Kemične reakcije med protimikrobnimi snovmi in komponentami živil lahko pomembno vplivajo na protimikrobno aktivnost snovi. Reakcije z lipidi, proteini, ogljikovimi hidrati in ostalimi komponentami živil lahko popolnoma zavrejo delovanje protimikrobnih snovi, povzročijo pa lahko tudi neželene spremembe v okusu, barvi in aromi živila. Večina protimikrobnih snovi je amfifilnih, kar pomeni, da imajo tako polarni kot nepolarni del. To lahko pomaga pri prehodu v celice ali pa predstavlja oviro za lipide ali hidrofobne proteine v živilih, kar jih naredi manj dostopne za inhibicijo mikroorganizmov v živilih (Davidson in Branen, 2005).

Na splošno se lahko učinkovitost dodanih protimikrobnih sredstev zmanjša zaradi nekaterih sestavin hrane. Predvideva se, da visoka raven maščob in/ali beljakovin v živilih ščiti bakterije pred delovanjem eteričnih olj, ogljikovi hidrati pa te zaščite niso pokazali (Cui in sod., 2010).

Visoka koncentracija sončničnega olja je imela negativen vpliv na protimikrobno delovanje eteričnega olja origana in timijana. Singh in sodelavci (2003) navajajo, da je eterično olje timijana zmanjšalo število bakterij v brez-maščobnih in manj mastnih hrenovkah, v polnomastnih pa ne. Cava in sodelavci (2007) so odkrili, da se je protimikrobno delovanje eteričnega olja cimeta in nageljnovе žbice zmanjšalo v vzorcih mleka z več maščobe. Podobno so Smith-Palmer in sodelavci (1998) odkrili, da so bila eterična olja manj učinkovita v polnomastnih kot v manj mastnih mehkih sirih. Zmanjšana aktivnost se je pokazala tudi pri visokih koncentracijah škroba, čeprav je znano, da ogljikovi hidrati naj nebi ščitili bakterij pred aktivnostjo eteričnih olj tako kot maščoba in proteini.

Lipidi lahko zmanjšajo aktivnost hidrofilnih komponent v živilu in ker je veliko protimikrobnih snovi hidrofilnih, je aktivnost vedno nekoliko zmanjšana. Proteini lahko povežejo nekatere komponente in s tem zmanjšajo protimikrobno aktivnost (Rico-Munoz in Davidson, 1983). Protimikrobna učinkovitost hmeljnega ekstrakta proti bakterijam vrste *L. monocytogenes* je variirala glede na količino maščobe v mesu (Zhang in sod., 2009). Cutter in Huska (2000) domnevata, da maščoba okoli bakterijske celice naredi zaščitno plast, ki jo ščiti pred vplivi protimikrobne snovi.

#### 2.7.3.4 Vpliv pH

pH živila lahko prav tako povzroči spremembe v aktivnosti protimikrobne snovi. Za živila, ki imajo pH 5,5 ali več je znanih zelo malo protimikrobnih snovi, ki delujejo v nizkih koncentracijah (Davidson in Branen, 2005).

Del Campo in sodelavci (2000) in Hsieh in sodelavci (2001) so dokazali, da je inhibicija bakterij z rastlinskimi ekstrakti večja v kislem pH območju.

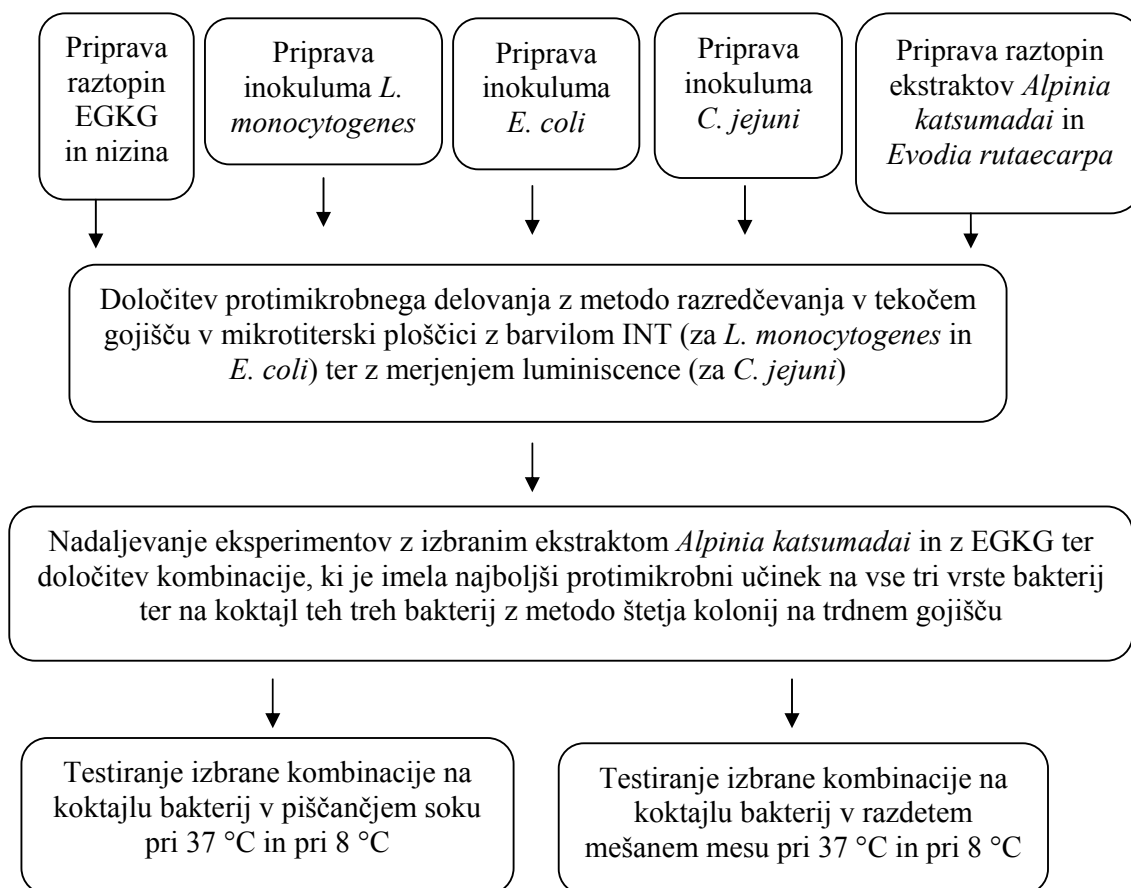
#### 2.7.3.5 Vpliv temperature

Solomakos in sodelavci (2008) so ugotovili, da eterično olje timijana, ki so ga dodali na goveje meso slabše učinkuje pri temperaturi 4 °C, kot pri 10 °C. Tudi Thomas in Wimpeny (1996) sta ugotovila, da se je protimikrobno delovanje nizina proti bakterijam vrste *L. monocytogenes* drastično zmanjšalo pri znižanju temperature, za kar vzrok je bil verjetno zmanjšanje fluidnosti membran v celicah. Prav tako je imel sinergističen učinek med nizinom in eteričnim oljem timijana manjši učinek pri temperaturi 4 °C, kot pri 10 °C. Pol in Smid (1999) sta odkrila sinergističen učinek med nizinom in karvakrolom, ki je glavna komponenta eteričnega olja origana. Ta sinergizem je deloval tudi pri nižjih temperaturah. Podobne rezultate sta dobila s kombinacijo eteričnega olja timola in karvakrola.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA

Glede na namen naloge smo eksperimentalni del izvedli tako, da smo pripravili raztopine EGKG in nizina ter ekstraktov *Alpinia katsumadai* in *Evodia rutaecarpa*. Najprej smo določili protimikrobno delovanje naštetih snovi z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici z dodatkom barvila INT ter vizualnim odčitavanjem ter z merjenjem luminiscence na čitalcu mikrotiterskih ploščic (TECAN). Eksperiment smo nadaljevali z izbranim protimikrobnima snovema (EGKG in ekstraktom *A. katsumadai*) ter določili njuno optimalno kombinacijo. To je bila tista, ki je imela najboljši protimikrobni učinek na vse tri vrste bakterij (*L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*) ter na koktajl teh bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (SIST EN ISO 4833). To kombinacijo smo nato testirali še na koktajlu bakterij v piščančjem soku in v razdetem mešanem mesu.



Slika 1: Shema eksperimentalnega dela

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Bakterije

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili bakterije, ki so navedene v preglednici 4.

Preglednica 4: Bakterije uporabljene pri eksperimentalnem delu

OZNAKA BAKTERIJ	VIR BAKTERIJ
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM58 (IHM 4b)	Nemški referenčni sev, 4b
<i>Escherichia coli</i> ŽM370 (ATTC 11229)	Tipski sev, humani izvor
<i>Campylobacter jejuni</i> (NTCT 11168)	Referenčni sev, humani izvor

Vsi trije bakterijski sevi so iz zbirke laboratorija za živilsko mikrobiologijo Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete.

### 3.2.2 Mikrobiološka gojišča

#### 3.2.2.1 Selektivna gojišča

**Gojišče EMB:** (Biolife, 40145012, Milano, Italija)

Priprava: 21,25 g gojišča smo raztopili v 500 ml destilirane vode, vsebino smo dobro premešali in 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Na 45 °C ohlajeno gojišče smo razlili po približno 15 ml v sterilne petrijevke.

**Gojišče Palcam:** (Merck, 1.11755.0500, Darmstadt, Nemčija) in selektivni dodatek (Merck, 1.10399)

Priprava: 35,9 g gojišča smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili in dodali 1 stekleničko selektivnega dodatka, ki smo ga predhodno raztopili v 1 ml sterilne destilirane vode. Na 45 °C ohlajeno gojišče smo razlili po približno 15 ml v sterilne petrijevke.

**Gojišče AHB z antibiotiki:** osnovno gojišče Bacto TM Heart Infusion Agar (Oxoid, CM 375, Hampshire, Anglija) in kvasni ekstrakt (Yeast Extract, Oxoid CM19), dodatek za rast *Campylobacter* growth supplement (Oxoid, SR 232E), kromogeno barvilo 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid (TTC, 10 mg/ml) (Sigma-Aldrich T8877), antibiotika Na-cefaperazon (8 mg/ml) (Sigma, C4292, Steinheim, Nemčija) in rifampicin (2,5 mg/ml) (Sigma R3501).

Priprava: 2 g osnovnega gojišča in 1 g kvasnega ekstrakta smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C dodali 1 stekleničko dodatka za rast, 5 ml kromogenega barvila TTC, 4 ml Na-cefaperazona, 4 ml rifampicina. Sestavine smo dobro premešali in razlili po približno 15 ml v sterilne petrijevke.

**Krvni agar Columbia:** osnovno gojišče Columbia Agar Base (Oxoid, CM331), dodatek za rast *Campylobacter* growth supplement (Oxoid, SR 232E) in dodatek za selektivnost *Campylobacter* selective supplement (Oxoid, SR 069E)



Priprava: 19,5 g osnovnega gojišča smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C dodali 25 ml sterilne defibrirane konjske krvi, 1 stekleničko dodatka za rast in 1 stekleničko dodatka za selektivnost in ga razlili po približno 15 ml v sterilne petrijevke.

### 3.2.2.2 Neselektivna gojišča

**Gojišče AHB:** osnovno gojišče Bacto TM Heart Infusion Agar (Oxoid, CM 375) in kvasni ekstrakt (Yeast Extract, Oxoid CM19), dodatek za rast *Campylobacter growth supplement* (Oxoid, SR 232E) in kromogeno barvilo TTC (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, T8877)

Priprava: 2 g osnovnega gojišča in 1 g kvasnega ekstrakta smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C, dodali 1 stekleničko dodatka za rast in 5 ml kromogenega barvila. Sestavine smo dobro premešali in razlili po približno 15 ml v sterilne petrijevke.

**Gojišče TSA:** osnovno gojišče Tripični soja agar (TSA) (Oxoid, CM0131), di-kalijev-hidrogenfosfat ( $K_2HPO_4$ ) (Kemika, 1116108, Zagreb, Hrvaška), D-(+)-glukoza (Kemika, 0705007) in kvasni ekstrakt (Biolife, 4122202)

Priprava: 20 g osnovnega gojišča, 1,25 g di-kalij-hidrogenfosfata, 1,25 g D-(+)-glukoza in 3g kvasnega ekstrakta smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in razlili po približno 15 ml v sterilne petrijevke.

**Gojišče MHB:** (Merck, 1.10293.0500)

Priprava: 21 g gojišča smo raztopili v 500 ml destilirane vode, dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga po približno 15 ml razlili v sterilne petrijevke.

## 3.2.3 Snovi s protimikrobnim delovanjem

### 3.2.3.1 Ekstrakt *Alpinia katsumadai*

Ekstrakt smo dobili od prof. dr. Franza Bučarja iz Inštituta za Farmacevtske znanosti Univerze v Gradcu.

Priprava: založno raztopino smo pripravili tako, da smo v epruveto natehtali približno 30 mg ekstrakta in nato po enačbi 3 izračunali ustrezen volumen DMSO (dimetil sulfoksid) v katerem smo ekstrakt raztopili. Založno raztopino smo uporabili za pripravo delovnih raztopin.

$$V(\text{DMSO}) = \frac{m}{\gamma} \quad \dots (3)$$

Legenda:

V (DMSO)...volumen DMSO (ml)

m...masa ekstrakta (mg)

$\gamma$ ...začetna koncentracija ekstrakta (16,384 mg/ml)

### 3.2.3.2 Ekstrakt *Evodia rutaecarpa*

Ekstrakt smo dobili od prof. dr. Franza Bučarja iz Inštituta za Farmacevtske znanosti Univerze v Gradcu.

Priprava: Založno raztopino smo pripravili tako, da smo v epruveto natehtali približno 30 mg ekstrakta in nato po enačbi 3 izračunali ustrezen volumen DMSO v katerem smo ekstrakt raztopili. Založno raztopino smo uporabili za pripravo delovnih raztopin.

### 3.2.3.3 Nizin

Priprava: Pripravili smo 0,02 M HCl po naslednjem postopku: V 100 ml stekleno bučko smo natočili približno 60 ml ddH<sub>2</sub>O in dodali 17,2  $\mu$ l koncentrirane HCl (37 %), ter nato dopolnili z vodo do oznake 100 ml.

V 100 ml stekleno stekleničko smo natehtali 2,5 g nizina (Sigma, N5764-25G) in dolili 100 ml predhodno pripravljene 0,2 M HCl. Založno raztopino smo sterilizirali preko filtra z velikostjo por 0,2  $\mu$ m. Filtrirali smo aseptično v 100 ml sterilno stekleno stekleničko. Filtrat smo nato prenesli v 2 ml-epruvete in jih shranili pri -20 °C. Koncentracija tako pripravljene založne raztopine nizina je znašala 25 mg/ml = 25000 IU/ml. Založno raztopino smo uporabili za pripravo delovnih raztopin.

### 3.2.3.4 Epigalokatehin galat

Priprava: Založno raztopino smo pripravili tako, da smo v sterilno 5 ml-epruveto natehtali 0,01 g EGKG (Sigma, E4143-50MG), dodali 0,5 ml absolutnega EtOH in mešali na vrtničnem mešalu dokler se EGKG v etanolu ni popolnoma raztopil. Nato smo dodali še 1,5 ml sterilnega gojišča MHB. Koncentracija tako pripravljene založne raztopine EGKG je znašala 5 mg/ml.

## 3.2.4 Druge kemikalije in dodatki

**Fiziološka raztopina:** (Merck, 1.04873.0250)

Priprava: v 1000 ml bučko smo k 1,25 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> je bilo predhodno raztopljenega v 100 ml destilirane vode, pH 7,2) dodali destilirano vodo do oznake. Vsebinsko smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C.

Etanol 96% - EtOH (Merck, 1.00971.6025)  
Absolutni etanol - EtOH (Merck, 1.00983.100)  
DMSO – dimetilsulfoksid (Merck, 1.0295.1000)  
Barvilo INT (2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fentil tetrazolijev klorid), (Sigma-Aldrich, 18377-5G)  
Barvilo TTC (2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid), (Sigma, T8877-50G)  
BacTiter-Glo<sup>TM</sup> (Promega, Madison, USA)

### **3.2.5 Piščančji sok**

Priprava (Riedel in sod., 2009): Celega zmrznjenega piščanca smo shranili v čašo in ga čez noč pustili v hladilniku. Naslednji dan smo piščanca vzeli iz hladilnika in ga pustili na sobni temperaturi še 3 ure. Tekočina, ki se je nabrala je bil piščančji sok. Dobljeni sok smo prelili v centrifugirke (50 ml) in 10 minut centrifugirali pri 10000 obr./min. Supernatant smo filtrirali skozi filter s porami 0,2  $\mu$ m. Sterilen piščančji sok smo po 5 ml odpipetirali v sterilne epruvete (15 ml) in ga shranili na -20° C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi.

### **3.2.6 Razdeto mešano meso**

Za eksperimente smo uporabili sveže razdeto mešano (1:1 goveje in svinjsko meso) meso (Mercator, d.d., Brdo, Ljubljana).

### 3.2.7 Laboratorijska oprema

Oprema, ki smo jih uporabljali pri raziskovalnem delu je navedena v preglednici 5.

Preglednica 5: Laboratorijska oprema uporabljena pri eksperimentalnem delu

Oprema	Oznaka	Proizvajalec
Avtomatske pipete in nastavki	10 µl, 100 µl, 1000 µl, 10 ml	Eppendorf, Nemčija Gilson, Francija
Mikrovalovna pečica	Cook n' grill 1300	Sanyo, Japonska
Jeklenka z mešanico plinov	10 % CO <sub>2</sub> , 3 % O <sub>2</sub> , 87 % N <sub>2</sub>	Istragas, Slovenija
Plinski gorilnik	/	/
Hladilnik	/	Zanussi, Japonska
Zračni sušilnik	SP190	Kambič, Slovenija
Zaščitna inkubacijska komora	SCMB 122 AV	Iskra, Slovenija
Inkubator z magnetnimi mešali	I-45-4M	Kambič, Slovenija
Inkubator	I-115C	Kambič, Slovenija
Gnetilnik	Stomacher 400	Seward, Velika Britanija
Precizna avtomatska tehtnica	SI 99-05-03	Melter toledo, Švica
Centrifuga	Thermomixer comfort	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga Helltich Rotanta	Rotanta 460R	Helltich Zentrifugen, Nemčija
Omara za sušenje steklovine	SO-250	Elektromedicina Ljubljana, Slovenija
Avtoklav	Tip 500x700	Sutjeska, Beograd
Avtoklav	1-61-137	Sutjeska, Beograd
Avtoklav	A-21	Kambič, Slovenija
Pipetor	Multipette steam	Eppendorf, Nemčija
Vrtinčno mešalo	Yellowline	Ika, Belgija
Digestorij	Tip 382	Med-lab Rauh, Slovenija
Zamrzovalnik	/	LTH, Slovenija
Zamzovalna omara	/	Heto Ultra Freeze, Kanada
Stresalnik	Vibriomix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija

Poleg opreme, ki je navedena v preglednici 5, smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo: Prozorne mikrotiterske ploščice (Nunc), 1,5- in 2,0-ml epruvete (Eppendorf), krio-epruvete, cepilne zanke, centrifugirke, petrijeve plošče (Labor tehnika Golias), anaerobni lonc (Oxoid Ago), laboratorijske steklenice 100 ml, 250 ml, 500 ml (Duran), merilne valje (Plastibrand), parafilm (PM 992, American National Can), pincete, steklovino.

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Revitalizacija bakterij

##### 3.3.1.1 Bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*

Posamezna vrsta bakterij je bila pred začetkom eksperimentalnega dela shranjena na trdnem gojišču TSA v hladilniku na temperaturi 8° C. Eno bakterijsko kolonijo smo s cepilno zanko ob ognju prenesli v 4 ml sterilnega tekočega gojišča MHB. Vsebinsko smo dobro premešali na vrtničnem mešalu. Sledila je 24-urna inkubacija na stresalniku (75 obratov/minuto) pri 37 °C.

##### 3.3.1.2 Bakterije vrste *C. jejuni*

Izolat bakterij je bil pred začetkom eksperimentalnega dela shranjen v skrinji na temperaturi -80 °C v krio-epruvetki. S cepilno zanko smo zajeli nekaj kulture in jo razmazali po gojišču Columbia. Gojišča smo nato postavili v anaerobni lonec kjer smo mikroaerofilno atmosfero dosegli s prepihanjem z mešanico plinov (10 % CO<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub>, 87 % N<sub>2</sub>), nato smo anaerobni lonec zaprli in 24 ur inkubirali pri 42 °C. Nato smo eno kolonijo precepili v 4 ml tekočega gojišča MHB, ki smo mu pred precepljanjem dodali 0,2 ml konjske krvi. Suspenzijo smo v mikroaerofilni atmosferi 24 ur inkubirali pri 42 °C.

#### 3.3.2 Priprava inokuluma

##### 3.3.2.1 Priprava posameznih kultur

75 µl posamezne 24-urne bakterijske kulture *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni* smo prenesli v tri epruvete s po 5 ml tekočega gojišča MHB.

##### 3.3.2.2 Priprava bakterijskega koktajla

Po 150 µl 24-urnih bakterijskih kultur *L. monocytogenes* in *C. jejuni* smo prenesli v 10 ml tekočega gojišča MHB. Bakterije vrste *E. coli* smo redčili tako, da smo 1 ml 24-urne bakterijske kulture prenesli v 9 ml fiziološke raztopine, dobro premešali in od tu prenesli 150 µl v 10 ml tekočega gojišča MHB. Enako smo pripravili bakterijski koktajl, ko smo tekoče gojišče MHB zamenjali za piščančji sok.

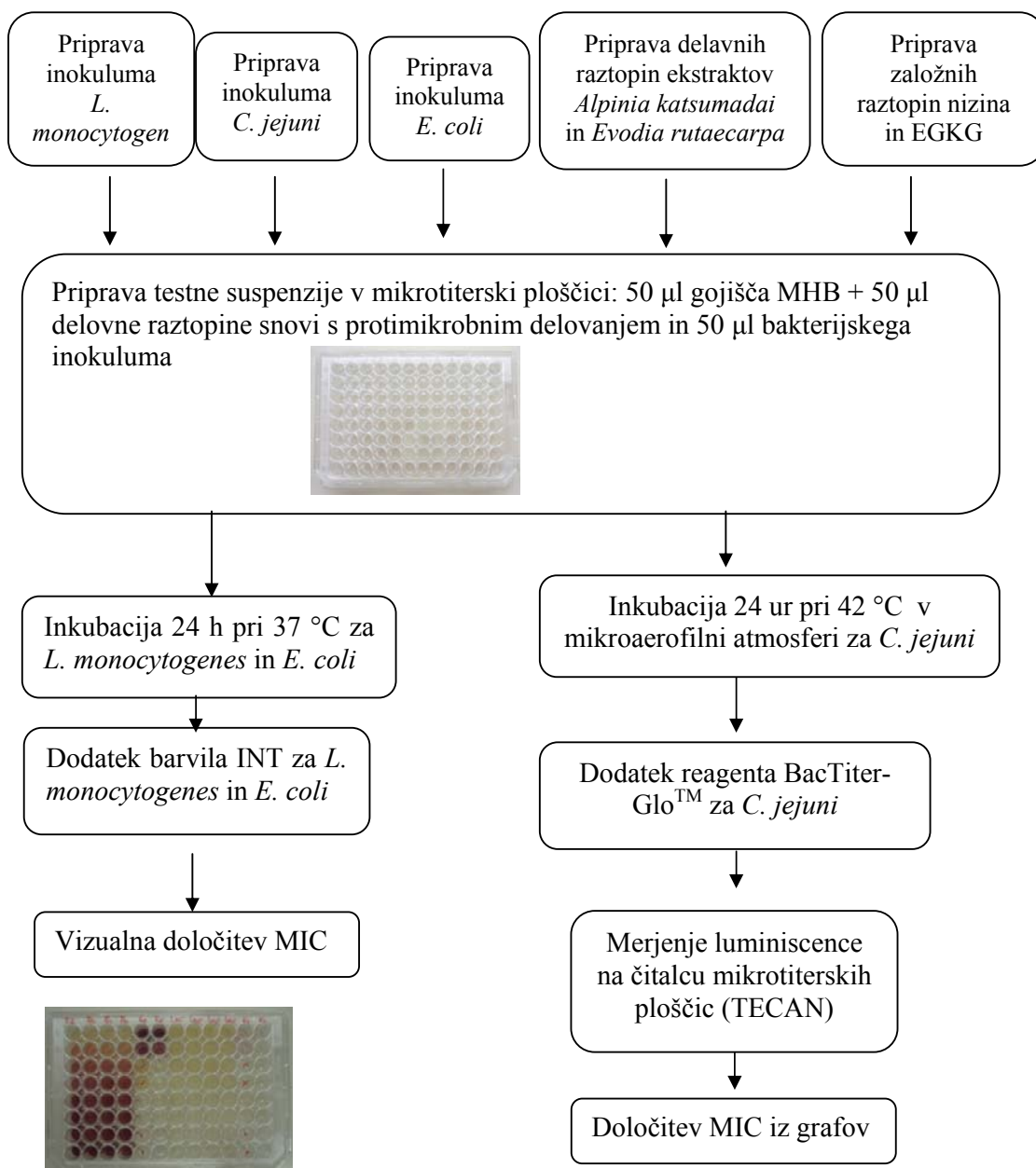
#### 3.3.3 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotiterski ploščici

Uporabljen material

- tekoče gojišče MHB,
- založna raztopina ekstrakta *Alpinia katsumadai* ali *Evodia rutaecarpa*,
- založna raztopina nizina ali EGKG in
- inokulum bakterij vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski plošči smo določali minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) ekstraktov *Alpinia katsumadai* in *Evodia rutaecarpa*

oziroma nizina in EGKG pri bakterijah vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*. Shema eksperimentalnega dela je prikazana na sliki 2.



Slika 2: Shema določitve MIC protimikrobne snovi z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotiterski ploščici

V vse luknjice na mikrotiterski ploščici razen v prvi vrstici smo odpipetirali po 50 µl gojišču MHB. V prvo luknjico smo nato odpipetirali 100 µl posamezne snovi s protimikrobnim delovanjem. Nato smo iz prve luknjice prenašali v naslednje vrstice po 50 µl pri čemer smo v vsaki luknjici razpolovili koncentracijo protimikrobne snovi glede na

koncentracijo v predhodni luknjici. Iz zadnje luknjice smo 50 µl zavrgli. Tako smo v posamezni luknjici dobili koncentracije protimikrobne snovi, kot jih prikazuje preglednica 7. Pazili smo, da smo pred vsakim prenašanjem vsebine v naslednjo luknjico z nastavkom za pipetiranje dobro premešali vsebino luknjice. Nato smo v vsako suspenzijo dodali po 50 µl pripravljenega inokuluma, vsebino smo 1 minuto stresali na stresalniku za mikrotiterske ploščice in mikrotitersko ploščico inkubirali. Pri vsakem eksperimentu smo naredili še pozitivno kontrolo za posamezno vrsto bakterij, kjer smo v luknjico odpipetirali 50 µl gojišča MHB in 50 µl pripravljenega inokuluma posameznih vrst bakterij in negativno kontrolo za vsako snov s protimikrobnim delovanjem, kjer smo v luknjico odpipetirali 50 µl gojišča MHB in 50 µl najvišje koncentracije pripravljene delavne raztopine snovi s protimikrobnim delovanjem. Kontrolo za DMSO smo pripravili tako, da smo zmešali 375 µl gojišča MHB in 125 µl DMSO in od tu v prvo luknjico odpipetirali 100 µl. Nato smo iz prve luknjice prenašali v naslednje vrstice po 50 µl pri čemer smo v vsaki luknjici razpolovili koncentracijo iz prve luknjice. Iz zadnje luknjice smo 50 µl zavrgli. Pazili smo, da smo pred vsakim prenašanjem v naslednjo luknjico z nastavkom za pipetiranje dobro premešali vsebino luknjice. Po inkubaciji smo v vse testne suspenzije kjer so bile bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* dodali 10 µl barvila INT (s koncentracijo 2 mg/ml), ki sprejema elektrone iz encima dehidrogenaze in jih reducira v rdeče obarvan formazan (INTF). Ponovno smo inkubirali še 30 minut v temnem in vizualno glede na spremembo barve določili MIC (Eloff, 1998).

Preglednica 6: Primer načrta posameznega eksperimenta izvedenega v mikrotiterski ploščici za ekstrakt *A. katsumadai*

	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	K ( <i>E. coli</i> )	Kontrola DMSO <i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	K ( <i>L. monocytogenes</i> )	Kontrola DMSO <i>L. monocytogenes</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	4,103	4,103	PK	12,5 %	4,103	4,103	PK	12,5 %
B	2,052	2,052	PK	6,25 %	2,052	2,052	PK	6,25 %
C	1,026	1,026	NK	3,125 %	1,026	1,026	NK	3,125 %
D	0,513	0,513	NK	1,563 %	0,513	0,513	NK	1,563 %
E	0,256	0,256	SV	0,781 %	0,256	0,256	SV	0,781 %
F	0,128	0,128	SV	0,391 %	0,128	0,128	SV	0,391 %
G	0,064	0,064		0,195 %	0,064	0,064		0,195 %
H	0,03205	0,03205		0,098 %	0,03205	0,03205		0,098 %

Legenda:

PK...pozitivna kontrola (50 µl pripravljenega inokuluma + 50 µl gojišča MHB)

NK...negativna kontrola (50 µl ekstrakta z najvišjo koncentracijo + 50 µl gojišča MHB)

SV...slepi vzorec (100 µl gojišča MHB)

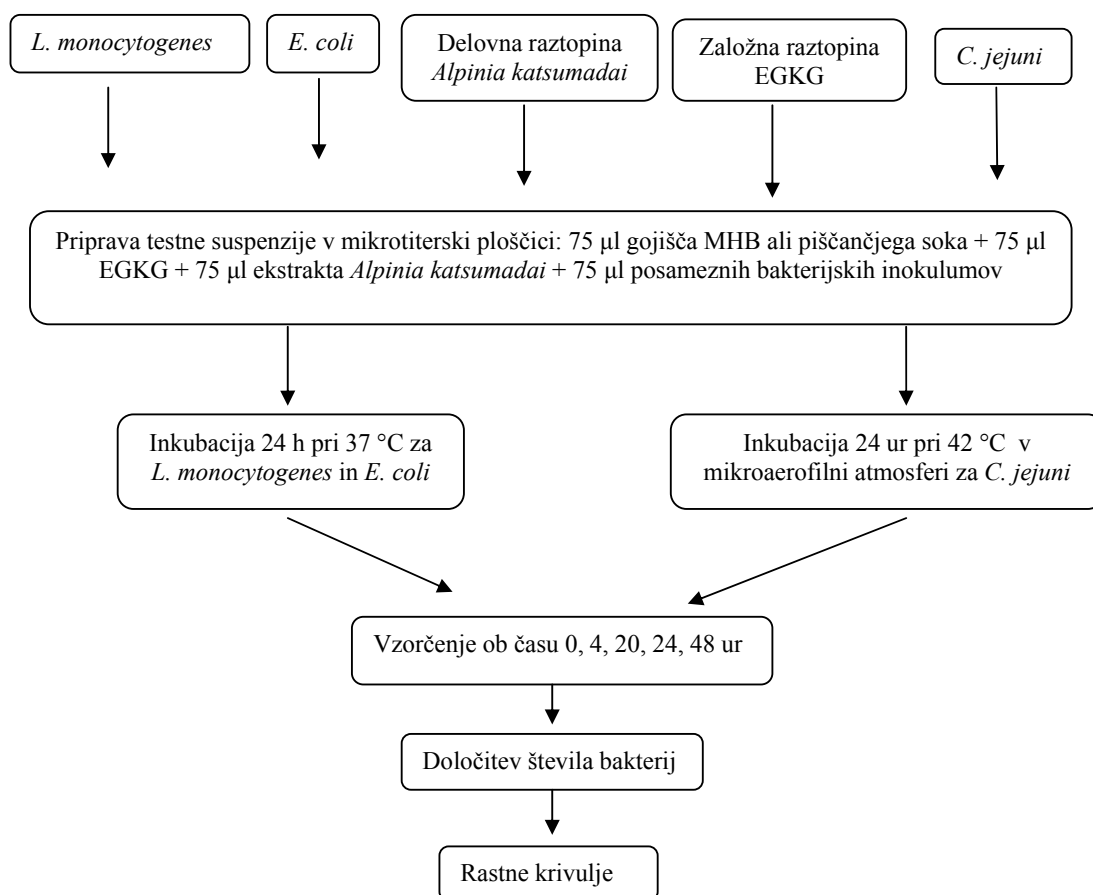
1,2,5,6...koncentracija ekstrakta *A. katsumadai* (mg/ml)

4,8...koncentracija DMSO (%)

Za določitev MIC pri bakterijah vrste *C. jejuni* smo po 24-urni inkubaciji v vsako testno suspenzijo dodali po 100  $\mu$ l reagenta BacTiter-Glo™, ki povzroči lizo celic in nastanek luminiscence. Nastala luminiscenca je proporcionalna količini ATP, ta pa je proporcionalna številu metabolno aktivnih celic. Vsebinsko ploščice smo premešali na stresalniku za ploščice ter jo zavili v folijo. Luminiscenco smo izmerili na čitalcu mikrotiterskih ploščic TECAN po 5 minutni inkubaciji v temnem (integracijski čas 1000 ms). MIC smo določili iz grafov odvisnosti relativne luminiscenčne enote (RLU) od koncentracije ekstrakta *Alpinia katsumadai*, *Evodia rutaecarpa*, nizina ali EGKG.

### 3.3.4 Spremljanje protimikrobne aktivnosti v gojišču MHB in piščančjem soku z rastnimi krivuljami

V nadaljevanju smo testirali protimikrobno delovanje ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG tako, da smo spremljali rast bakterij vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni* v gojišču MHB z dodanima protimikrobnima snovema in v gojišču MHB brez dodanih protimikrobnih snovi (slika 3). Enake eksperimente smo nato izvedli namesto v gojišču MHB v piščančjem soku.

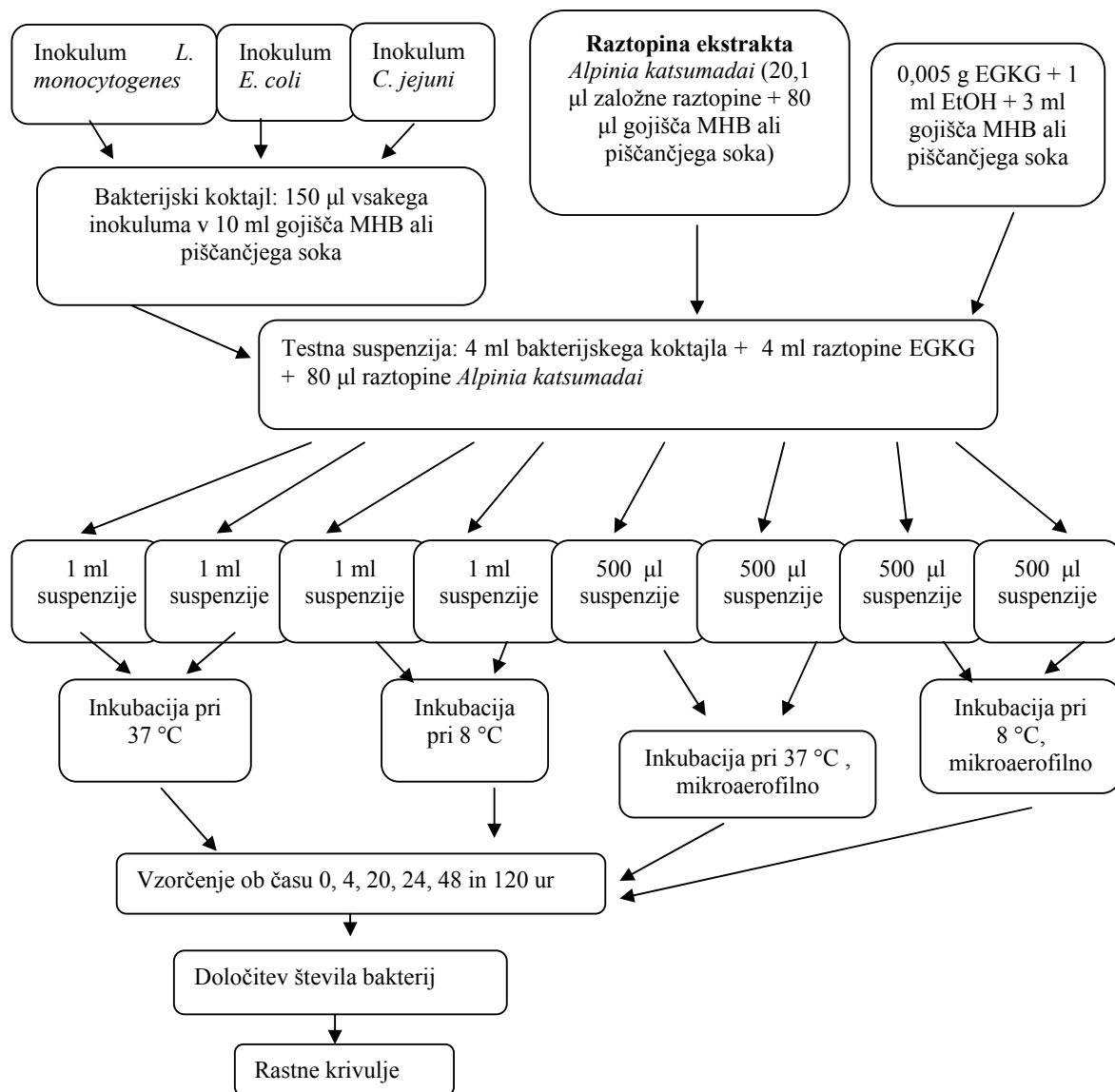


Slika 3: Shema določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v gojišču MHB in v piščančjem soku z rastnimi krivuljami



V vse luknjice na mikrotiterski ploščici razen v prvi vrstici smo odpipetirali po 75  $\mu$ l tekočega gojišča MHB ali piščančjega soka. V prvo luknjico smo odpipetirali 150  $\mu$ l posamezne snovi s protimikrobnim delovanjem. Nato smo iz prve luknjice prenašali v naslednje vrstice po 75  $\mu$ l s čimer smo v vsaki luknjici razpolovili koncentracijo iz prve luknjice. Tako smo ekstrakt *Alpinia katsumadai* testirali v rangu od 4,103 mg/ml do 0,032 mg/ml in EGKG v rangu od 2,5 mg/ml do 0,032 mg/ml). Iz zadnje luknjice smo 75  $\mu$ l zavrgli. Pazili smo da smo pred vsakim prenašanjem v naslednjo luknjico z nastavkom za pipetiranje dobro premešali vsebino luknjice. Nato smo v vsako luknjico dodali po 75  $\mu$ l pripravljenega inokuluma in inkubirali 24 ur pri 37 °C za bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* in 24 ur pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi za bakterije vrste *C. jejuni*. Pozitivne kontrole za posamezne bakterije smo pripravili tako, da smo v luknjico odpipetirali 75  $\mu$ l gojišča MHB in 75  $\mu$ l pripravljenega inokuluma posameznih bakterij. Iz vsake testne suspenzije smo ob času 0, 4, 20, 24, 48 ur določili število bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003). Kot trdno gojišče smo uporabili gojišče TSA. Iz teh rezultatov smo nato narisali rastne krivulje kot odvisnost logaritma števila preživelih bakterij od časa. Rezultati so izračunane povprečne vrednosti 2 paralelk.

### 3.3.5 Spremljanje protimikrobne aktivnosti v gojišču MHB in piščančjem soku z ravnimi krivuljami za bakterijski koktajl



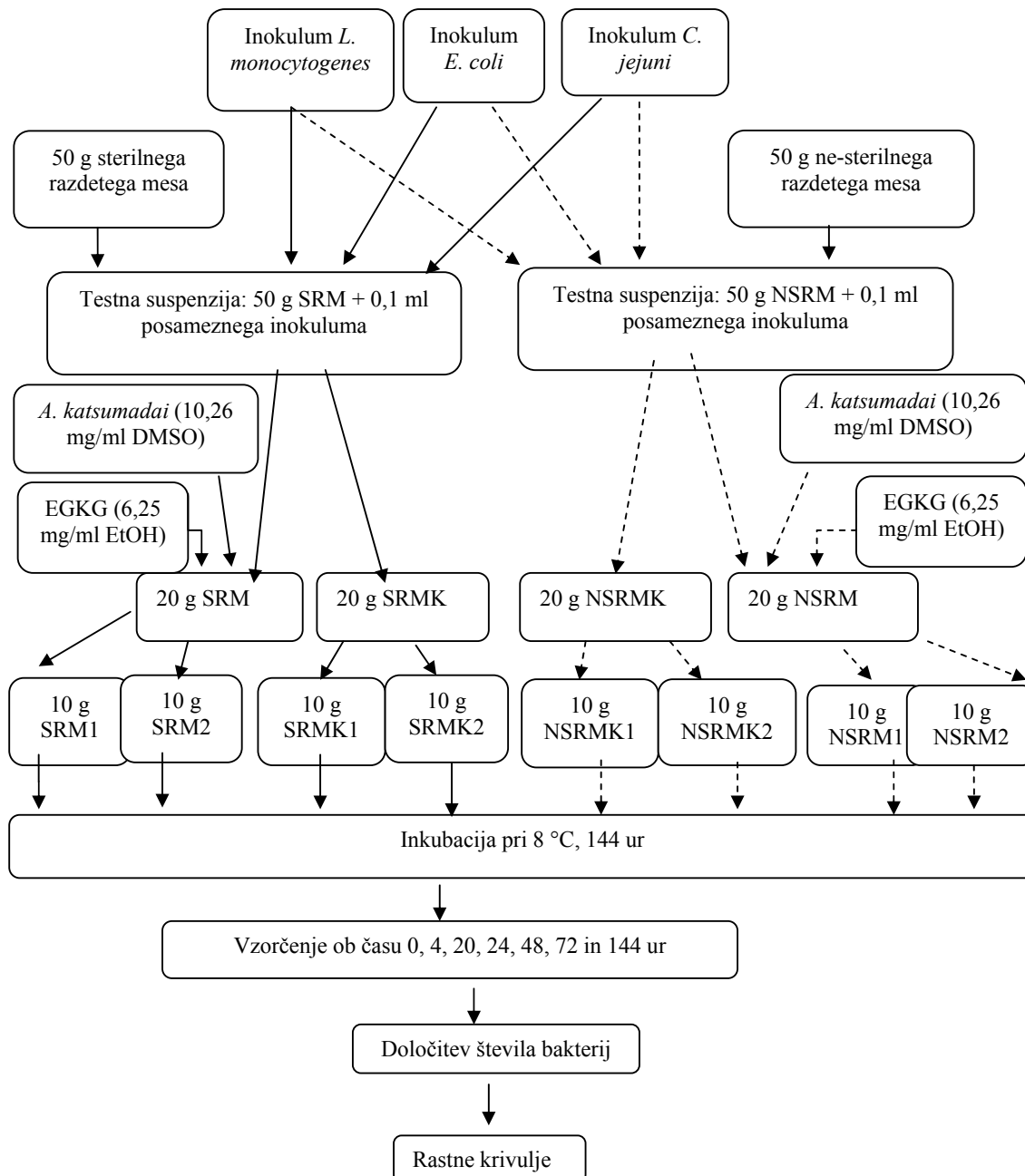
Slika 4: Shema določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v gojišču MHB in v piščančjem soku pri 37 °C in 8 °C z ravnimi krivuljami za bakterijski koktajl

Protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG, ki se je izkazala za najbolj učinkovito pri zaviranju rasti vseh treh vrst bakterij (0,625 mg/ml EGKG in 1,026 mg/ml *A. katsumadai*) smo testirali tudi na bakterijskem koktajlu, tako da smo spremljali sočasno rast bakterij vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni* v gojišču MHB z dodanimi protimikrobnima snovema in v gojišču MHB brez dodanih protimikrobnih snovi ter enako v piščančjem soku (slika 4).

V tekočem gojišču MHB ali piščančjem soku smo pripravili bakterijski koktajl tako, da smo 150  $\mu$ l 24-urnih bakterijskih kultur *L. monocytogenes* in *C. jejuni* sterilno prenesli v 10 ml tekočega gojišča MHB. Bakterije vrste *E. coli* smo redčili tako, da smo 1 ml 24-urne bakterijske kulture prenesli v 9 ml fiziološke raztopine, dobro premešali in od tu prenesli 150  $\mu$ l v 10 ml tekočega gojišča MHB. EGKG smo pripravili tako, da smo natehtali 0,005 g EGKG, ga raztopili v 1 ml EtOH in ga zmešali s 3 ml tekočega gojišča MHB ali piščančjega soka. Iz založne raztopine ekstrakta *A. katsumadai* smo odpipetirali 20,1  $\mu$ l in zmešali z 80  $\mu$ l tekočega gojišča MHB ali piščančjega soka. Nato smo v centrifugirko zmešali 4 ml pripravljenega bakterijskega koktajla, 4 ml raztopine EGKG in 80  $\mu$ l raztopine ekstrakta. Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (SIST EN ISO 4833) smo določili začetno število bakterij vrste *E. coli* na gojišču EMB, *L. monocytogenes* na gojišču Palcam in *C. jejuni* na gojišču AHB z dodanimi antibiotiki. Gojišči EMB in Palcam smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, gojišče AHB z dodanimi antibiotiki pa 48 ur pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Nato smo v 4 1,5 ml-epruvete odpipetirali po 1 ml, v 4 pa po 500  $\mu$ l testne suspenzije. Dve 1,5 ml-epruveti z 1 ml testne suspenzije smo inkubirali pri 37 °C, 2 pa pri 8 °C. Z 1,5 ml-epruvetami s po 500  $\mu$ l testne suspenzije smo naredili enako, le da smo jih inkubirali v anaerobnih loncih, ki smo jih prepihali z mešanico plinov (10 % CO<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub>, 87 % N<sub>2</sub>). Poleg začetnega števila bakterij smo število bakterij določili po 4, 20, 24, 48 in 120 urah. Povsem enako smo izvedli eksperiment za testno suspenzijo, kjer smo spremljali rast bakterijskega koktajla brez dodanih protimikrobnih snovi. Iz dobljenih rezultatov smo nato narisali rastne krivulje kot odvisnost logaritma števila preživelih bakterij od časa. Rezultati so izračunane povprečne vrednosti 2 paralelk. Iz rastnih krivulj smo lahko odčitali za koliko log cfu/ml sta *A. katsumadai* in EGKG inhibirala rast posameznih bakterij.

### **3.3.6 Spremljanje protimikrobne aktivnosti v razdetem mesu z ravnimi krivuljami za bakterijski koktajl**

Najbolj učinkovito kombinacijo ekstrakta in EGKG (0,625 mg/ml EGKG in 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*) smo testirali še na sterilnem in nesterilnem razdetem mesu (slika 5).



Slika 5: Shema določanja protimikrobne aktivnosti ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v razdetem mesu pri 8 °C z ravnimi krivuljami za bakterijski koktajl

Legenda:

SRM...sterilno razdeto meso

NSRM...nesterilno razdeto meso

SRMK...sterilno razdeto meso brez dodatka protimikrobnih snovi

NSRMK...nesterilno razdeto meso brez dodatka protimikrobnih snovi

100 g razdetega mesa smo razdelili na polovico in 50 g sterilizirali v avtoklavu 10 minut pri temperaturi 115 °C. Nato smo v vsak 50 g-vzorec (SRM (sterilno razdeto meso) in NSRM (nesterilno razdeto meso)) dodali po 0,1 ml posameznega bakterijskega inokuluma in ga nato homogenizirali v gnetilniku (1 min, srednja hitrost). 50 g sterilnega razdetega mesa smo nato razdelili v 2 vrečki po 20 g mesa in vzorca označili SRM (sterilno razdeto meso) in SRMK (sterilno razdeto meso brez dodatka protimikrobnih snovi). Enako smo storili s 50 g nesterilnega razdetega mesa in vzorca označili NSRM (nesterilno razdeto meso) in NSRMK (nesterilno razdeto meso brez dodatka protimikrobnih snovi). Vzorca SRMK (sterilno razdeto meso brez dodatka protimikrobnih snovi) in NSRMK (nesterilno razdeto meso brez dodatka protimikrobnih snovi) sta bila pozitivna kontrolna vzorca, kjer smo spremljali rast bakterijskega koktajla brez dodanih protimikrobnih snovi. V vzorca SRM (sterilno razdeto meso) in NSRM (nesterilno razdeto meso) pa smo dodali EGKG, ki smo ga predhodno pripravili tako, da smo ga 6,25 mg raztopili v 1 ml EtOH, in 1 ml ekstrakta *A. katsumadai*, ki smo ga predhodno pripravili tako, da smo ga 10,26 mg raztopili v 1 ml DMSO. Nato smo iz vsake vrečke vsebino razpolovili in jo prenesli v stekleničke. Tako smo imeli 8 vzorcev s po 10 g mesa. Vse stekleničke smo inkubirali pri 8 °C in vzorčili ob času 0, 4, 20, 24, 48, 72 in 144 ur ter določili število bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (SIST EN ISO 4833). Kot trdno gojišče smo za bakterije vrste *E. coli* uporabili gojišče EMB, za bakterije vrste *L. monocytogenes* gojišče Palcam in za bakterije vrste *C. jejuni* gojišče AHB z dodanimi antibiotiki. Iz teh rezultatov smo nato narisali rastne krivulje kot odvisnost logaritma števila preživelih bakterij od časa. Rezultati so izračunane povprečne vrednosti 2 paralelk.

## 4 REZULTATI

### 4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK IZBRANIH SNOVI NA POSAMEZNE VRSTE BAKTERIJ V GOJIŠČU MHB

Predpostavili smo, da bosta imela ekstrakta *A. katsumadai* in *Evodia rutaecarpa* ter nizin in EGKG nekoliko boljši protimikrobni učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes* kot na bakterije vrst *C. jejuni* in *E.coli*. Da bi ugotovili koncentracije izbranih protimikrobnih snovi, ki inhibirajo rast in razmnoževanje teh bakterij smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski plošči in določili minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Nato smo vrednosti MIC posamezne protimikrobne snovi in izbranih kombinacij protimikrobnih snovi preverili z ravnimi krivuljami.

#### 4.1.1 Vrednosti MIC določene za posamezno protimikrobno snov

V začetni fazi eksperimentov smo določili, katera od izbranih snovi ima največjo protimikrobno aktivnost. Uporabili smo metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotiterski ploščici in kot merilo za protimikrobno aktivnost določili vrednosti MIC za posamezno protimikrobno snov in za posamezno vrsto bakterij. Vrednost MIC za bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* smo definirali kot najmanjšo koncentracijo protimikrobne snovi, pri kateri ni bilo spremembe barve vzorca po dodatku barvila INT (Klančnik in sod., 2010). Vrednosti MIC za bakterije vrste *C. jejuni* smo določili z merjenjem luminiscence (BacTiter-Glo™) tako, da je bila vrednost MIC tista koncentracija pri kateri se je luminiscenca vzorca povečala nad luminiscenco ozadja (Klančnik in sod., 2010).

Preglednica 7: Vrednosti MIC ekstraktov *A. katsumadai* in *Evodia rutaecarpa* ter EGKG in nizina določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotiterski ploščici

Bakterija	Snov s protimikrobnim delovanjem	MIC (mg/ml)
<i>L. monocytogenes</i>	<b>Alpinia katsumadai</b>	0,513
	<b>Evodia rutaecarpa</b>	≥ 4,103
	<b>Nizin</b>	0,25 (250 IU)
	<b>EGKG</b>	0,313
<i>C. jejuni</i>	<b>Alpinia katsumadai</b>	0,513
	<b>Evodia rutaecarpa</b>	1,026
	<b>Nizin</b>	2,0 (2000 IU)
	<b>EGKG</b>	0,313
<i>E. coli</i>	<b>Alpinia katsumadai</b>	≥ 4,103
	<b>Evodia rutaecarpa</b>	≥ 4,103
	<b>Nizin</b>	≥ 4,0 (4000 IU)
	<b>EGKG</b>	0,625

V preglednici 7 vidimo, da je imel ekstrakt *Evodia rutaecarpa* na vse tri vrste bakterij manjši protimikrobni učinek kot ekstrakt *A. katsumadai*. Zato smo v nadaljevanju eksperimentalnega dela uporabljali ekstrakt *A. katsumadai*.

#### 4.1.2 Protimikrobni učinek kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in nizina

V nadaljevanju smo preizkusili skupno protimikrobno delovanje ekstrakta *A. katsumadai* in nizina in rezultate izrazili kot inhibicijo (preglednica 8). Inhibicijo smo določili glede na število (N (log cfu/ml)) preživelih bakterij v gojišču z dodano protimikrobno snovjo v primerjavi z številom, ki smo ga določili v gojišču brez dodane protimikrobne snovi (pozitivna kontrola). Določitev protimikrobnega učinka pri kombinaciji 2000 UI nizina in 4,103 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* ni bila možna, saj je pri tej koncentraciji rast bakterij zaviral DMSO v katerem smo topili ekstrakt. Pri nižjih koncentracijah preizkušenih kombinacij nizina in ekstrakta *A. katsumadai* je bil učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes* baktericidni, medtem ko je bila inhibicija rasti bakterij vrste *E. coli* za manj kot 1 log cfu/ml. Zato eksperimentov s kombinacijami nizina in ekstrakta *A. katsumadai* nismo nadaljevali.

Preglednica 8: Inhibicija rasti bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* s kombinacijami ekstrakta *A. katsumadai* in nizina v gojišču MHB

Kombinacija <i>A. katsumadai</i> (mg/ml) + nizina (UI)	Inhibicija rasti bakterij po 24 urah (log cfu/ml)	
	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
4,103 + 2000	*	*
2,052 + 2000	0,6	≥ 5 (smrtnost)
1,026 + 2000	0,7	≥ 5 (smrtnost)
4,103 + 1000	*	*
2,052 + 1000	0,8	≥ 5 (smrtnost)
1,026 + 1000	0,6	≥ 5 (smrtnost)
4,103 + 500	*	*
2,052 + 500	0,9	≥ 5 (smrtnost)
1,026 + 500	0,2	≥ 5 (smrtnost)

\* zaviralno delovanje DMSO

#### 4.1.3 Protimikrobni učinek kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

Nato smo v gojišču MHB določali protimikrobni učinek kombinacij ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG na bakterije vrst *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli* z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici.

Pri odčitavanju vrednosti MIC z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotiterski ploščici ni bilo možno točno določiti vrednosti MIC, ker je bila med določenimi koncentracijami premajhna razlika, zato so v preglednici 9 navedeni po 3 - 4 rezultati.

Ker smo pri nekaterih kombinacijah ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG lahko opazili, da gre za protimikrobno delovanje tudi na gramnegativne bakterije vrste *E. coli* (preglednica 9), smo nadaljevali poizkuse s tema dvema protimikrobnima snovema. Poskušali smo najti kombinacijo najnižjih koncentracij ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG, ki bi imela protimikrobni učinek na vse tri vrste bakterij.

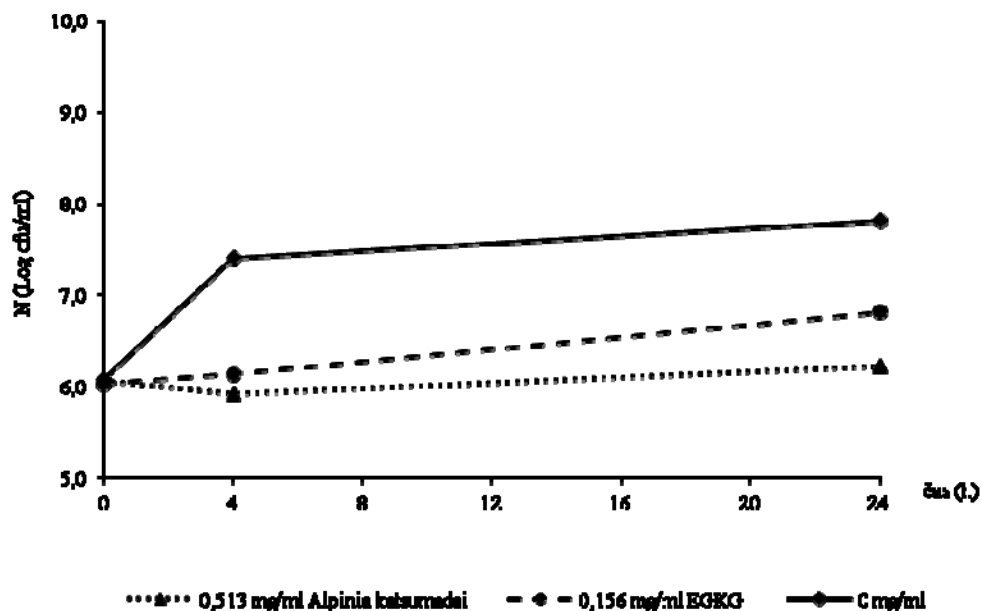
Preglednica 9: Vrednosti MIC kombinacij ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v gojišču MHB določene z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici za bakterije vrst *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli*

Bakterije	MIC (mg/ml) kombinacije <i>A. katsumadai</i> in EGKG	
	<i>Alpinia katsumadai</i>	EGKG
<i>L. monocytogenes</i>	0,513	0,078
	0,256	0,313
	0,256	0,156
	0,128	0,313
<i>C. jejuni</i>	0,513	0,078
	0,313	0,019
	0,313	0,039
<i>E. coli</i>	2,052	0,625
	1,026	0,625
	1,026	0,156
	0,513	0,313

#### 4.1.4 Posamezen protimikrobni učinek ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

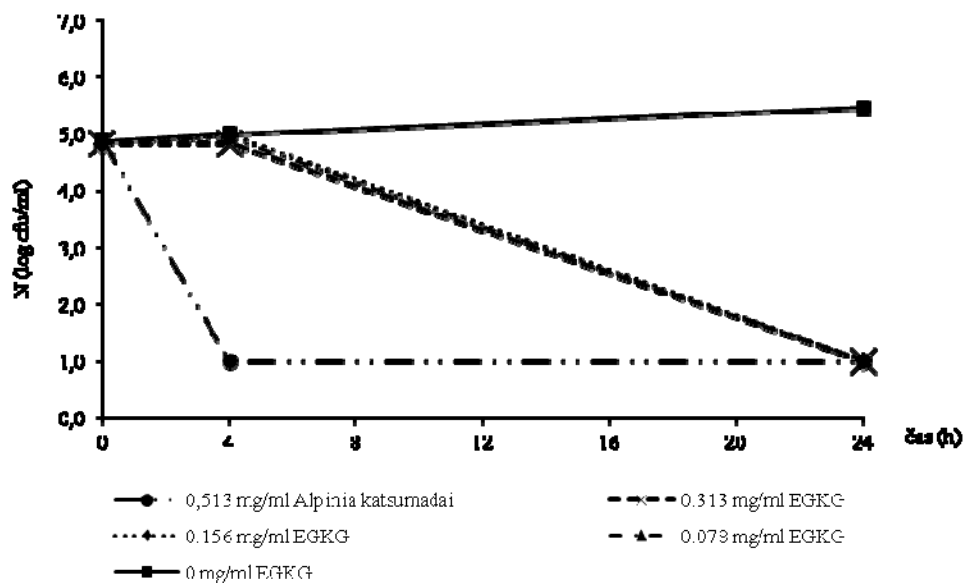
Z določitvijo števila bakterij v gojišču MHB z dodano protimikrobno snovjo smo po 24 urni inkubaciji iz rastnih krivulj odčitali inhibicijo kot kolonijsko enoto v mililitru vzorca, ki smo jo dosegli s posamezno protimikrobno snovjo. Tako smo želeli dobiti natančnejše rezultate o tem, katere koncentracije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG imajo najboljši protimikrobni učinek in kolikšen je ta učinek na bakterije vrst *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli*. Rezultati so prikazani na slikah 6-8 in v prilogi A.





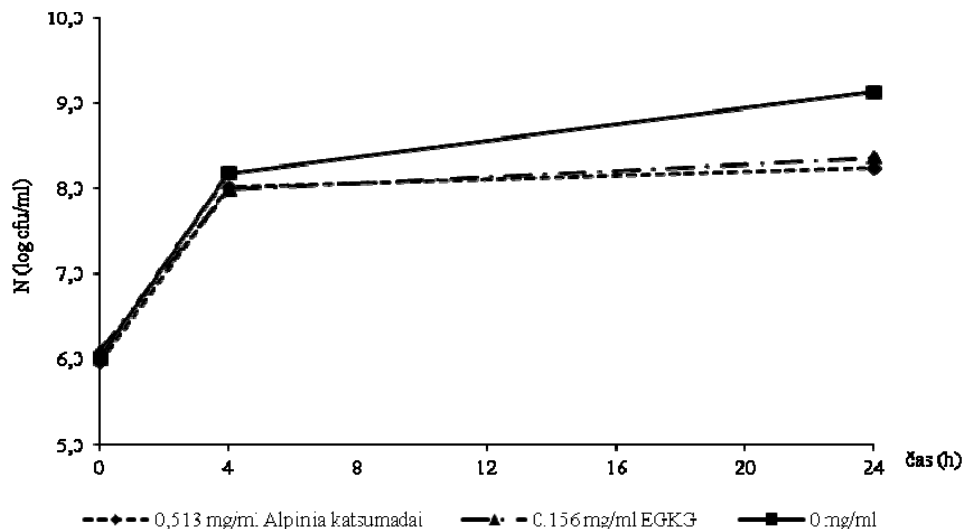
Slika 6: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,156 mg/ml EGKG

Na sliki 6 in prilogi A vidimo, da je 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* po 24 urah inhibiral rast bakterij vrste *L. monocytogenes* za 1,6 log cfu/ml, 0,156 mg/ml EGKG pa za 1 log cfu/ml.



Slika 7: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in z različnimi koncentracijami EGKG

0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* je imel na bakterije vrste *C. jejuni* baktericidni učinek po 4 urah, 0,313 mg/ml, 0,156 mg/ml ter 0,078 mg/ml EGKG pa so imeli baktericidni učinek po 24 urah (slika 7).

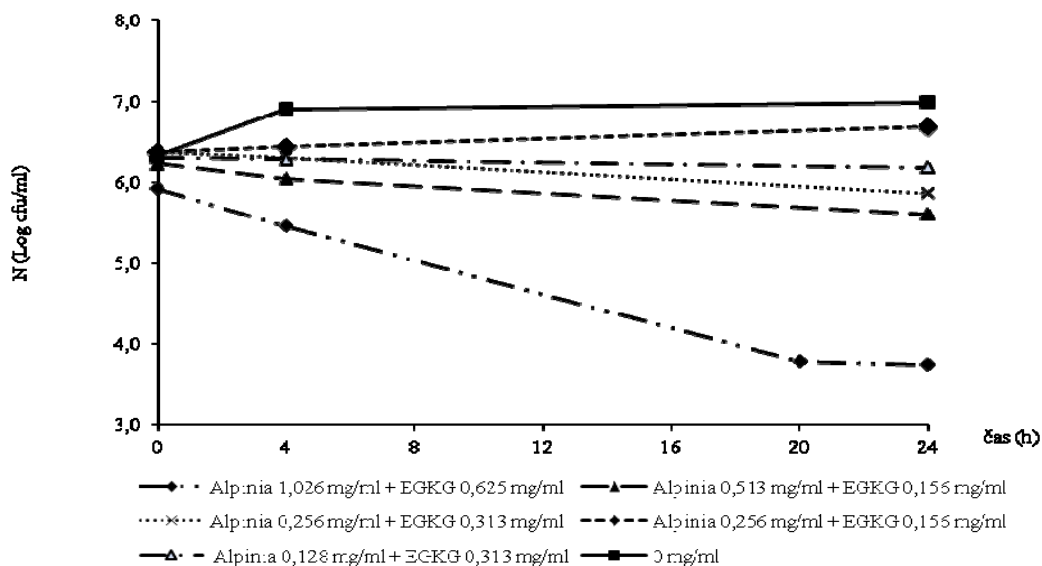


Slika 8: Rast bakterij vrste *E. coli* v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in z 0,156 mg/ml EGKG

Tako koncentracija 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, kot tudi 0,156 mg/ml EGKG sta inhibirala rast bakterij vrste *E. coli* za manj kot eno logaritemsko enoto (0,7 log cfu/ml) (slika 8, priloga A).

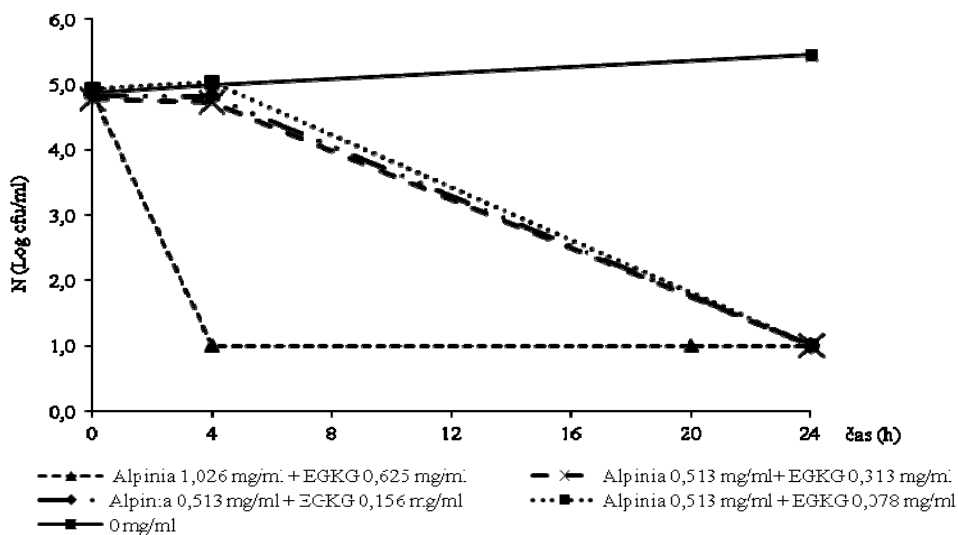
#### 4.1.5 Spremljanje rasti bakterij v prisotnosti kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo s spremljanjem bakterijske rasti poizkušali najti kombinacijo ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG, ki bi še imela inhibitorni učinek na bakterije vrst *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli* v gojišču MHB. Rezultati so zbrani v slikah 9-13 in v prilogah B-D.



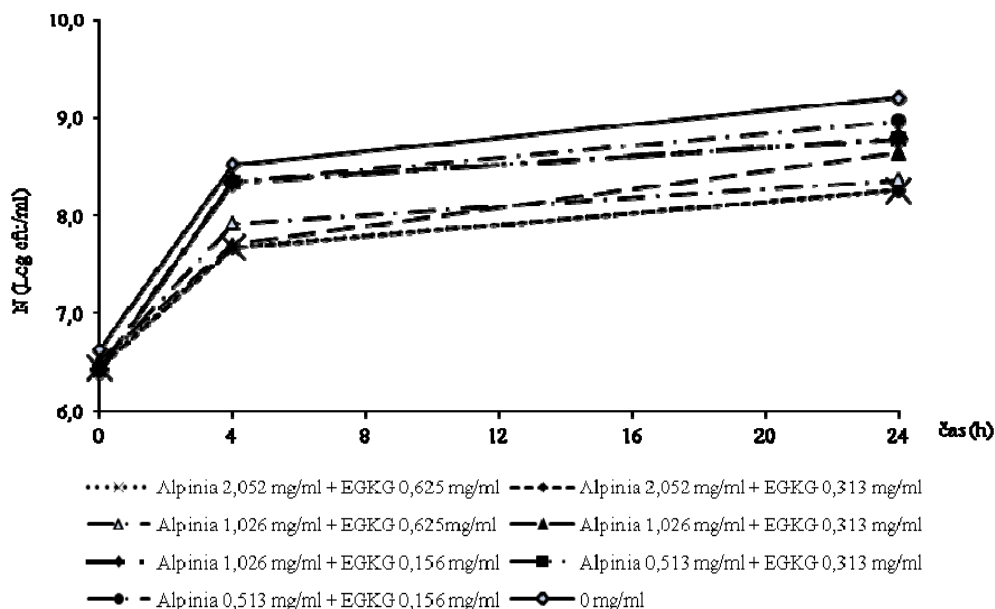
Slika 9: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču MHB z različnimi koncentracijami ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* je najbolje inhibirala kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG, ki je imela po 20 urah baktericidni učinek, najslabše pa kombinacija 0,256 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,156 mg/ml EGKG, ki je rast bakterij inhibirala za 0,3 log cfu/ml. V prilogi B vidimo, da je kombinacija 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,156 mg/ml EGKG inhibirala rast bakterije za 1,4 log cfu/ml, kombinacija 0,256 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,313 mg/ml EGKG za 1,1 log cfu/ml in da je kombinacija 0,128 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,313 mg/ml EGKG inhibirala za 0,8 log cfu/ml (slika 9, priloga B).



Slika 10: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v gojišču MHB različnimi koncentracijami ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

Kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG je imela na bakterije vrste *C. jejuni* po 4 urah baktericidni učinek. Med kombinacijami z nižjimi koncentracijami protimikrobnih snovi pa ni bilo velikih razlik in so imele prav tako po 24 urah baktericidni učinek (slika 10, priloga C).



Slika 11: Rast bakterij vrste *E. coli* v gojišču MHB z različnimi koncentracijami ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

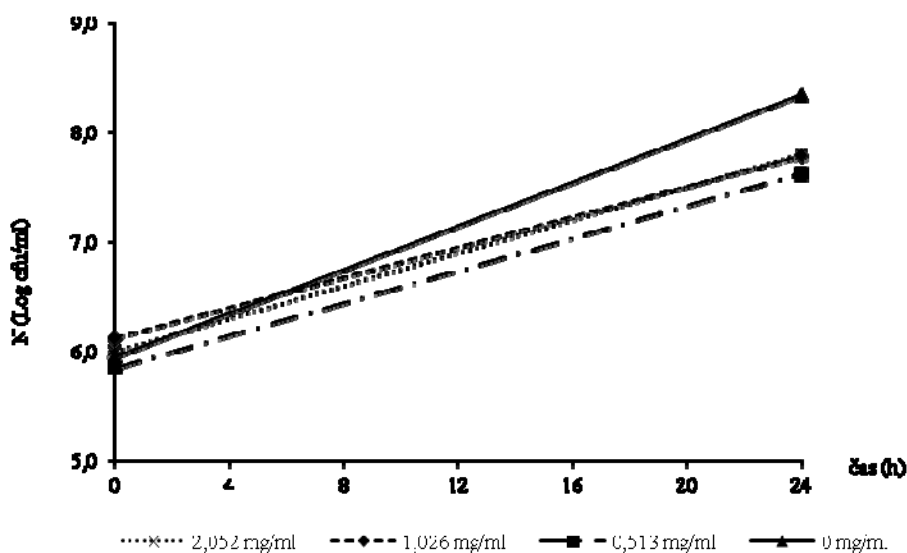
Na sliki 11 in v prilogi D je razvidno da je kombinacija 2,052 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG najboljše inhibirala rast bakterij vrste *E. coli* (0,9 log cfu/ml) in da je kombinacija 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,156 mg/ml EGKG najslabše inhibirala rast, le za 0,3 log cfu/ml, kar je v skladu s pričakovanji.

## 4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK IZBRANIH SNOVI NA POSAMEZNE VRSTE BAKTERIJ V PIŠČANČJEM SOKU

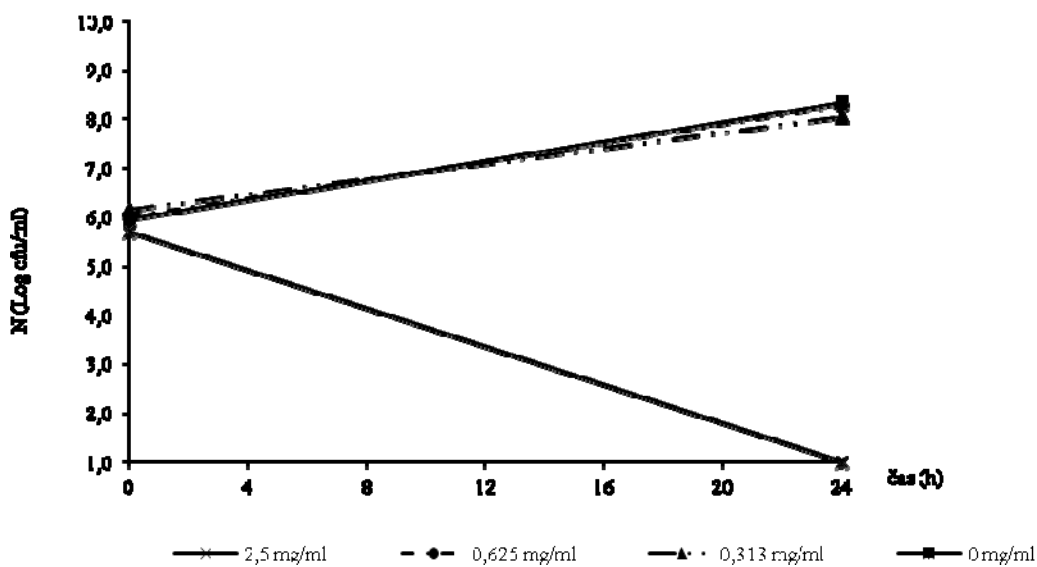
Kot vmesno stopnjo preizkušanja protimikrobnega učinka ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG med laboratorijskim gojiščem in živilom smo uporabili sterilni piščančji sok. Vanj smo inokulirali posamezne vrste bakterij ter dodajali različne koncentracije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG. Protimikrobni učinek smo spremljali z ravnimi krivuljami.

### 4.2.1 Spremljanje rasti bakterij v prisotnosti ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

Rast bakterij v piščančjem soku z dodano posamezno protimikrobno snovjo (ekstrakt *A. katsumadai* ali EGKG) smo spremljali 24 ur. Rezultati so prikazani v slikah 12-15 in v prilogi E.

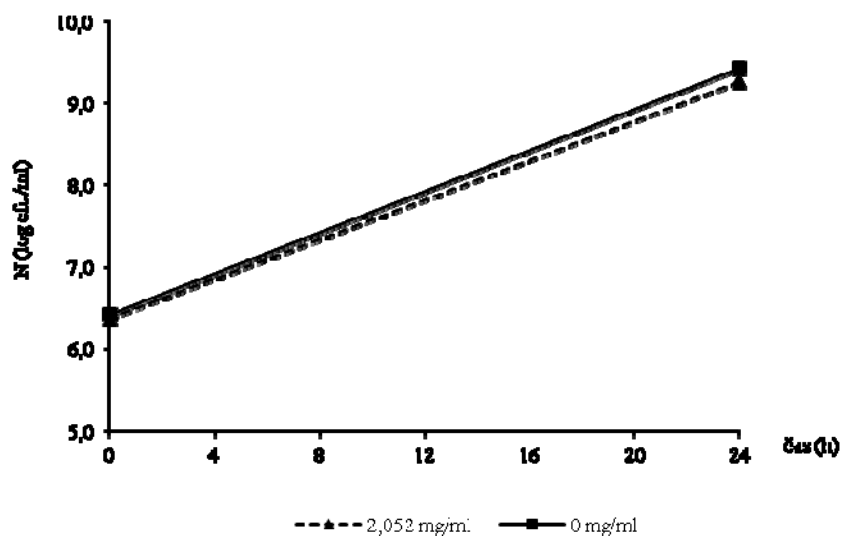


Slika 12: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v piščančjem soku z različnimi koncentracijami ekstrakta *A. katsumadai*

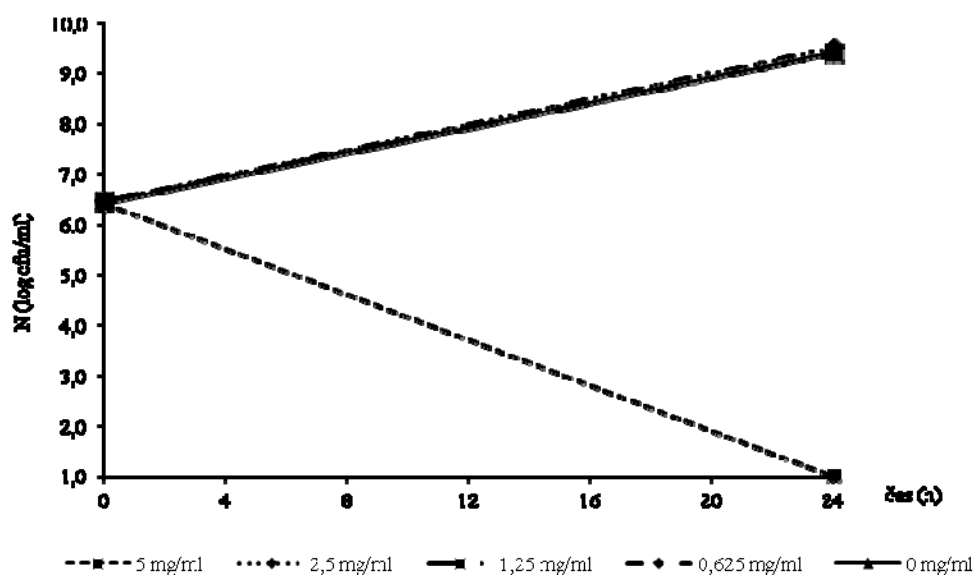


Slika 13: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v piščančjem soku z različnimi koncentracijami EGKG

Iz slike 12 in priloge E lahko razberemo, da so izbrane koncentracije ekstrakta *A. katsumadai* inhibirale rast bakterij vrste *L. monocytogenes* med 0,6 in 0,7 log cfu/ml. Iz slike 13 in priloge E pa, da je imela najvišja koncentracija (2,5 mg/ml) EGKG baktericidni učinek, koncentraciji 0,625 mg/ml in 0,313 mg/ml EGKG pa skoraj nista imeli inhibitornega učinka na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*.



Slika 14: Rast bakterij vrste *E. coli* v piščančjem soku z 2,052 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*



Slika 15: Rast bakterij vrste *E. coli* v piščančjem soku z različnimi koncentracijami EGKG

Koncentracija 2,052 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* je imela na rast bakterij vrste *E. coli* slab inhibitorski učinek (slika 14). Iz slike 15 pa lahko odčitamo, da je imela najvišja koncentracija (5 mg/ml) EGKG baktericidni učinek, pri koncentraciji 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml ter pri 0,625 mg/ml EGKG pa je bil inhibitorski učinek na rast bakterij vrste *E. coli* zelo slab.

Vrednosti MIC, ki smo jih z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotiterski ploščici določili v začetnem eksperimentalnem delu (preglednica 1), se ujemajo z rezultati, ki smo jih dobili z rastnimi krivuljami za posamezno vrsto bakterij (slike 6,7 in 8). Pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* smo kot MIC določili koncentracijo 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, z rastnimi krivuljami pa smo pri tej koncentraciji ekstrakta določili inhibicijo 1,6 log cfu/ml. Za EGKG je bila MIC 0,313 mg/ml, z rastnimi krivuljami pa smo dosegli inhibicijo 1 log cfu/ml. Pri bakterijah vrste *C. jejuni* smo določili, da je MIC 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,313 mg/ml EGKG, ki sta se z rastnimi krivuljami izkazali za baktericidne (slika 7). Za bakterije vrste *E. coli* pa smo dobili nekoliko različne a še vedno primerljive rezultate.

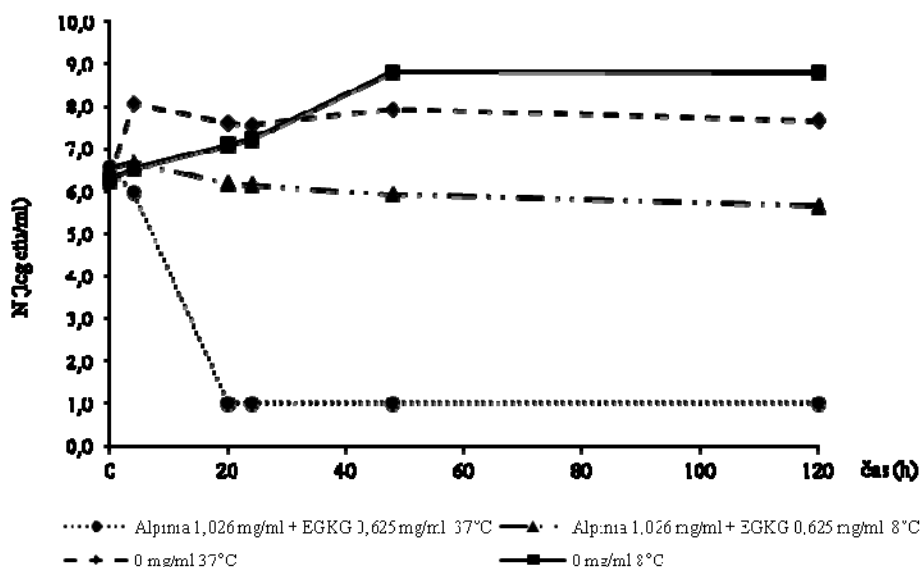
Iz dobljenih rezultatov smo za nadaljnje eksperimente izbrali kombinacijo 1,026 mg/ml *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Za ti koncentraciji smo se odločili, ker je bil učinek baktericidni na grampozitivne bakterije vrste *L. monocytogenes* po 20 urah (slika 9), in na gramnegativne bakterije vrste *C. jejuni* po 4 urah (slika 10). Za gramnegativne bakterije vrste *E. coli* baktericidnega učinka nismo dosegli z nobeno od preizkušenih kombinacij. Najboljša inhibicija je bila pri kombinaciji 2,025 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG, takoj za to kombinacijo pa je bila po protimikrobnem učinku kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Zato smo se odločili, da to kombinacijo v nadaljnjih eksperimentih uporabimo za določanje protimikrobnega učinka na bakterijskem koktajlu.

#### 4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK IZBRANE KOMBINACIJE EKSTRAKTA *A. katsumadai* IN EGKG NA BAKTERIJSKI KOKTAJL

Iz bakterij vrst *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli* smo naredili bakterijski koktajl. Protimikrobno aktivnost izbrane kombinacije 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG na bakterijski koktajl smo določili v gojišču MHB, v piščančjem soku in v razdetem mešanem mesu. Eksperiment smo naredili pri temperaturi 37 °C in 8 °C. Pri 8 °C zato, ker je to povprečna temperatura hladilnika, kjer naj bi se hranil piščanec in razdeto mešano meso. 37 °C pa smo vzeli kot primerjavo, da bi ugotovili ali znižana temperatura vpliva na protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG. Za bakterije vrste *C. jejuni* smo preizkusili še, ali ima spremenjena atmosfera (10 % CO<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub>, 87 % N<sub>2</sub>) vpliv na protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG glede na normalno atmosfero.

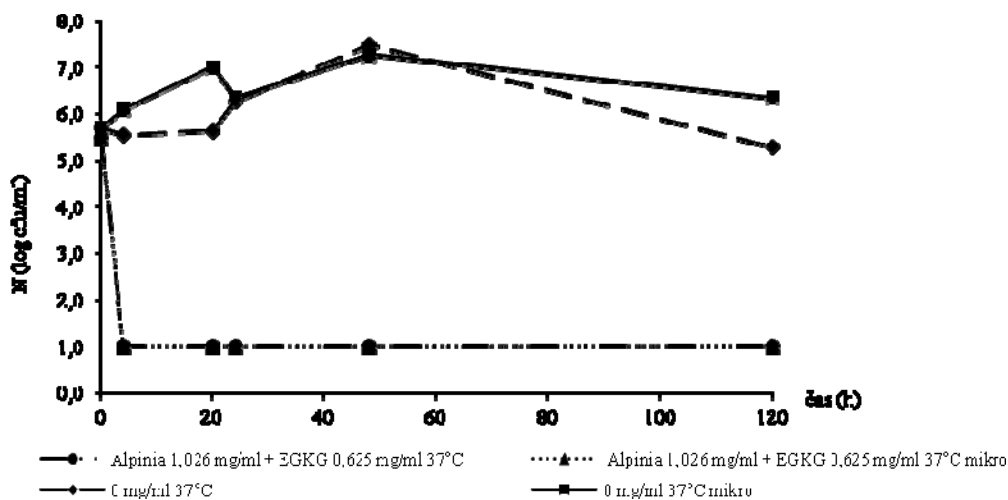
##### 4.3.1 Učinek v gojišču MHB pri 37 °C in 8 °C

Izbrano kombinacijo 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG, smo testirali na bakterijskem koktajlu v gojišču MHB pri temperaturi 37 °C in 8 °C. Rezultati so prikazani na slikah 17-20 in v prilogi 6. Razdeljeni so za bakterije vrste *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli*. Pri bakterijah vrste *C. jejuni* so prikazani rezultati tudi za poizkuse v mikroaerofilni atmosferi.



Slika 16: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C

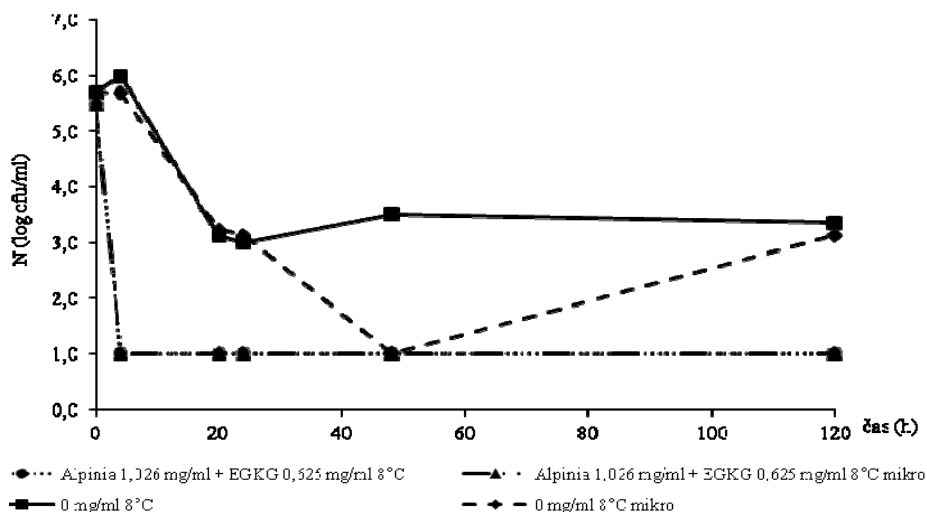
Kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG je bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču MHB pri 8 °C v 120 urah inhibirala za 3,1 log cfu/ml, pri 37 °C pa za več kot 6 log cfu/ml (slika 16, priloga F).



Slika 17: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C v normalni in mikroaerofilni (mikro: 10 % CO<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub>, 87 % N<sub>2</sub>) atmosferi

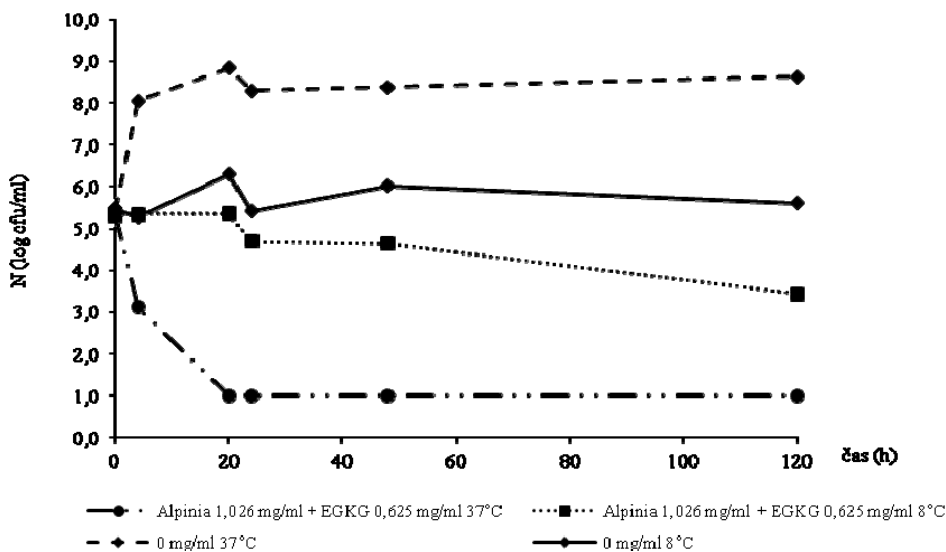
Po 120 urah je kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG bakterije vrste *C. jejuni* v gojišču MHB pri 37 °C inhibirala za več kot 4 log cfu/ml. V vzorcu, ki smo ga inkubirali v spremenjeni atmosferi pa za več kot 5 log cfu/ml (slika 17, priloga F).





Slika 18: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 8 °C v normalni in mikroaerofilni (mikro: 10 % CO<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub>, 87 % N<sub>2</sub>) atmosferi

Na sliki 18 in v prilogi F je razvidno, da je bila pri kombinaciji 1,026 mg/ml *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG, inhibicija bakterij vrste *C. jejuni* v gojišču MHB pri 8 °C v 120 urah več kot 2 log cfu/ml in enako tudi v vzorcu, ki smo ga inkubirali v spremenjeni atmosferi.

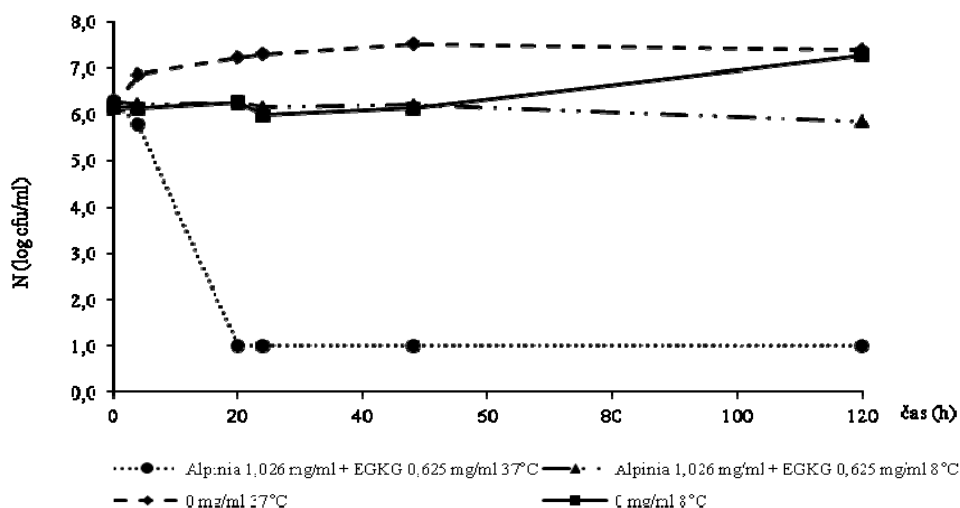


Slika 19: Rast bakterij vrste *E. coli* v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C

Pri kombinaciji 1,026 mg/ml *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG je bila inhibicija bakterij vrste *E. coli* v gojišču MHB pri 8 °C za 2,2 log cfu/ml, pri 37°C pa je imela ta kombinacija po 20 urah baktericidni učinek (inhibicija več kot 7 log cfu/ml) (slika 19, priloga F).

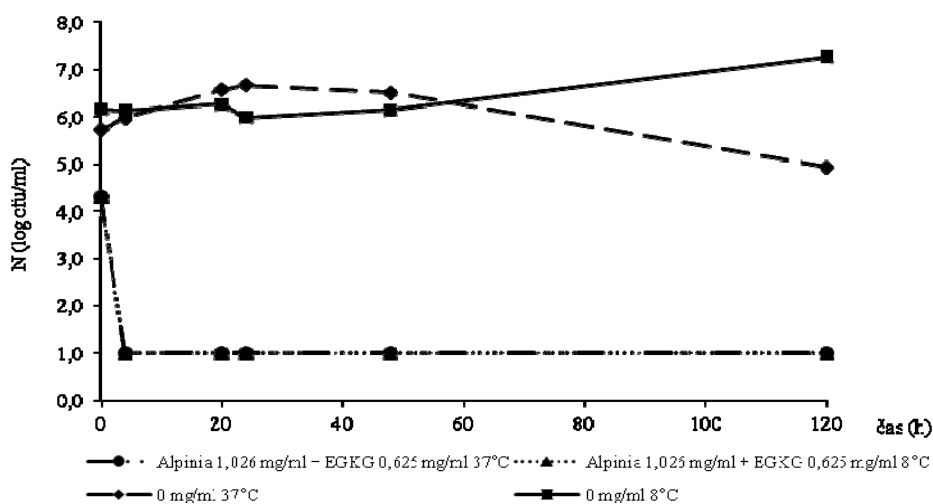
### 4.3.2 Učinek v piščančjem soku pri 37 °C in 8 °C

V nadaljevanju smo protimikrobni učinek izbrane kombinacije, 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG, določili v piščančjem soku pri temperaturi 37 °C in 8 °C. Rastne krivulje so prikazane na slikah 20, 21 in 22, v prilogi F pa so izračunane inhibicije rasti posameznih bakterij.



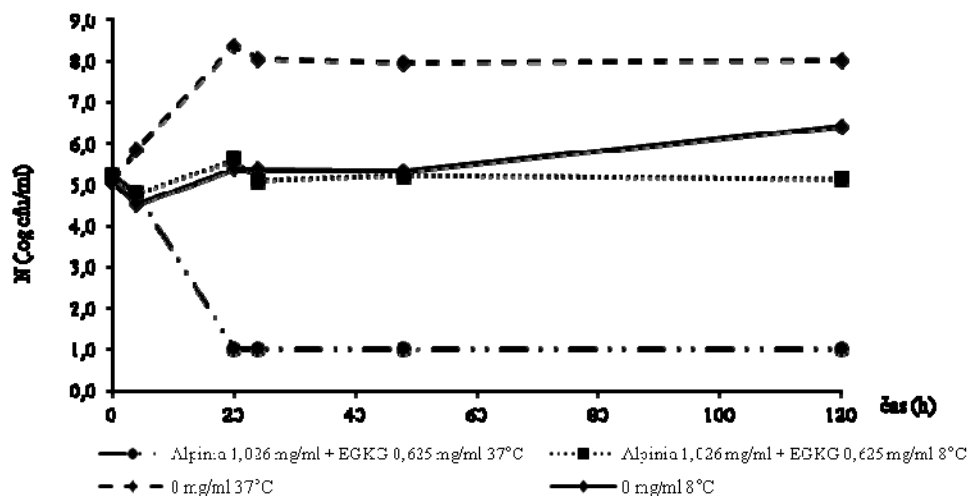
Slika 20: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v piščančjem soku z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C

V piščančjem soku pri 8 °C je kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG inhibirala bakterije vrste *L. monocytogenes* za 1,4 log cfu/ml, pri 37 °C pa za več kot 6 log cfu/ml oziroma je imela po 20 urah na bakterije vrste *L. monocytogenes* baktericidni učinek (slika 20, priloga F).



Slika 21: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v piščančjem soku z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C

Za kombinacijo 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG je iz slike 21 in priloge F razvidno, da je bakterije vrste *C. jejuni* v piščančjem soku pri 37 °C v 120 urah inhibirala za več kot 3 log cfu/ml, pri 8 °C pa za več kot 6 log cfu/ml oziroma je imela kombinacija pri 37 °C in 8 °C po 4 urah za bakterije vrste *C. jejuni* baktericidni učinek.



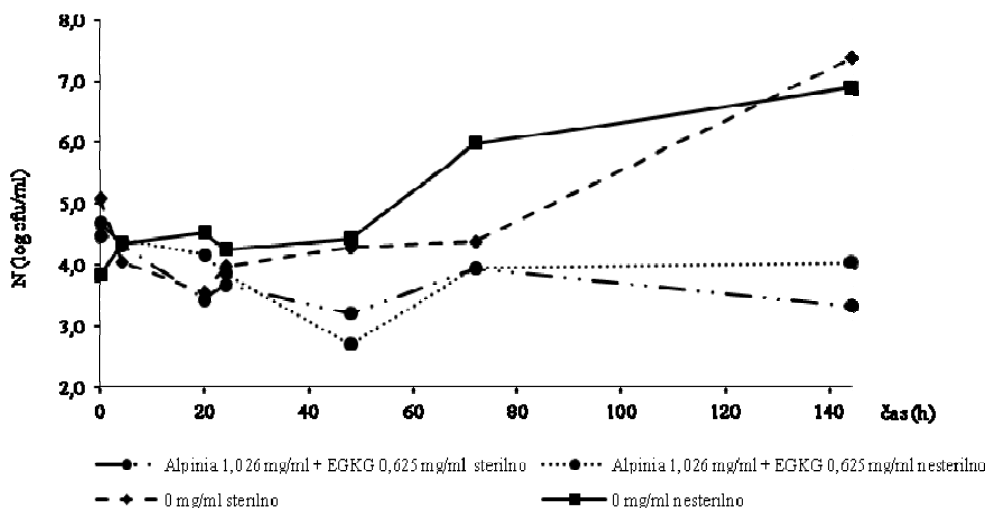
Slika 22: Rast bakterij vrste *E. coli* v piščančjem soku z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C in 8 °C

Bakterije vrste *E. coli* v piščančjem soku pri 8 °C v 120 urah je kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG inhibirala za 1,3 log cfu/ml, pri 37 °C pa za več kot 7 log cfu/ml oziroma je imela po 20 urah za bakterije vrste *E. coli* baktericidni učinek (slika 22, priloga F).

Protimikrobna učinkovitost kombinacije *A. katsumadai* in EGKG pri 37 °C je bila v piščančjem soku in MHB zelo podobna, saj je bil učinek na vse tri vrste bakterij baktericidni (priloga F). Z znižanjem temperature iz 37 °C na 8 °C je bil baktericidni učinek le na bakterije vrste *C. jejuni*. Spremenjena atmosfera, ki smo jo uporabili pri eksperimentih z mikroaerofilnimi bakterijami vrste *C. jejuni*, ni imela posebnega vpliva pri protimikrobnem delovanju kombinacije 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG na bakterije vrste *C. jejuni*, zato je v piščančjem soku nismo testirali več. Pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* je bila inhibicija v gojišču MHB večja za 1,7 log cfu/ml kot inhibicija v piščančjem soku pri 8 °C. Pri bakterijah vrste *E. coli* pa je bila ta razlika manjša, saj je bil protimikrobni učinek v piščančjem soku glede na gojišče MHB za 0,9 log cfu/ml manjši.

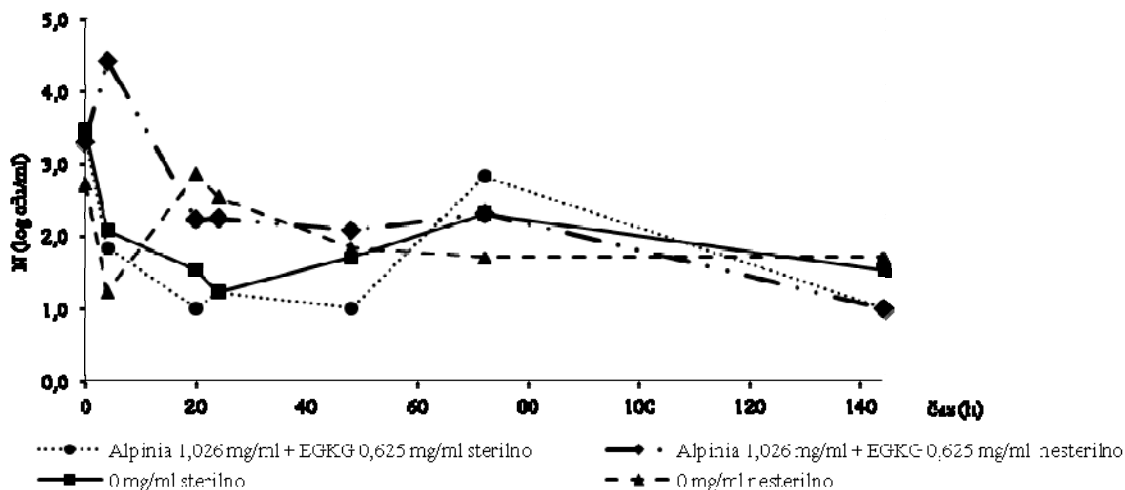
#### 4.3.3 Učinek v razdetem mesu pri 8 °C

Na koncu smo protimikrobno delovanje izbrane kombinacije 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG, določili še na razdetem mešanem mesu pri 8 °C. Testirati smo želeli tudi razliko v protimikrobnem delovanju kombinacije ekstrakta in EGKG na sterilno razdeto meso in meso z naravno prisotno mikrofloro. Rezultati so prikazani na slikah 23, 24 in 25 ter v prilogi F.



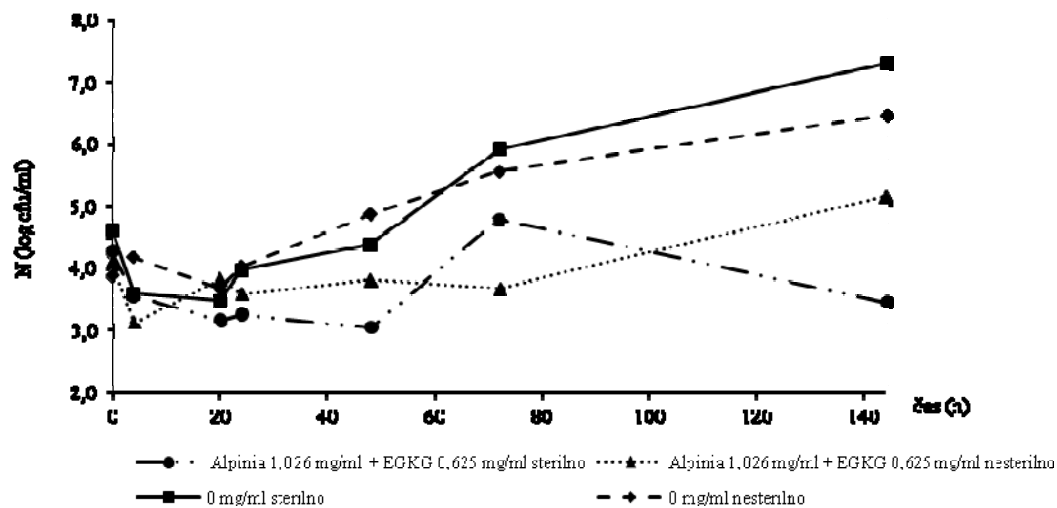
Slika 23: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v razdetem mesu z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 8 °C

Iz slike 23 in priloge F lahko razberemo, da je bila pri kombinaciji 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG na bakterije vrste *L. monocytogenes* v sterilnem razdetem mesu pri temperaturi 8 °C v 144 urah inhibicija za 4,1 log cfu/ml, v nesterilnem razdetem mesu pa za 2,9 log cfu/ml.



Slika 24: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v razdetem mesu z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 8 °C

Na sliki 24 in v prilogi F je razvidno, da je kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG bakterije vrste *C. jejuni* v sterilnem razdetem mesu pri temperaturi 8 °C v 144 urah inhibirala za 0,5 log cfu/ml v nesterilnem razdetem mesu pa za 0,7 log cfu/ml.



Slika 25: Rast bakterij vrste *E. coli* v razdetem mesu z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 8 °C

Pri kombinaciji 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG je bila na bakterije vrste *E. coli* v razdetem sterilnem mesu pri temperaturi 8 °C v 144 urah inhibicija 3,9 log cfu/ml, v razdetem nesterilnem mesu pa 1,3 log cfu/ml (slika 25, priloga F).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V preglednici 10 so prikazani glavni rezultati protimikrobnega delovanja ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG na posamezne bakterije vrst *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli* ter na koktajl omenjenih bakterij pri različnih razmerah.

Preglednica 10: Povzetek glavnih rezultatov protimikrobnega delovanja ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

Temperatura	Gojišče in dodana protimikrobna snov (mg/ml)	Inhibicija (log cfu/ml) posamezne vrste bakterij (24 ur)		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>E. coli</i>
37 °C	<b>MHB</b>			
	<i>A. katsumadai</i> 4,103 mg/ml	/	/	*
	<i>A. katsumadai</i> 0,513 mg/ml	1,6	≥ 4 (smrtnost)	0,9
	EGKG 0,313 mg/ml	/	≥ 4 (smrtnost)	/
	EGKG 0,156 mg/ml	1	≥ 4 (smrtnost)	0,7
	EGKG 0,078 mg/ml	/	≥ 4 (smrtnost)	/
37 °C	<b>Piščančji sok</b>			
	<i>A. katsumadai</i> 2,052 mg/ml	0,5	/	0,2
	<i>A. katsumadai</i> 1,026 mg/ml	0,6	/	/
	<i>A. katsumadai</i> 0,513 mg/ml	0,7	/	/
	EGKG 5 mg/ml	/	/	≥ 8 (smrtnost)
	EGKG 2,5 mg/ml	≥ 7 (smrtnost)	/	0,02
	EGKG 1,25 mg/ml	/	/	0,02
	EGKG 0,625 mg/ml	0,6	/	0,01
	EGKG 0,313 mg/ml	0,3	/	/
37 °C	<b>MHB (kombinacija <i>A. katsumadai</i> in EGKG)</b>			
	4,103 in 0,313	/	/	*
	4,103 in 0,156	/	/	*
	2,052 in 0,625	/	/	0,9
	2,052 in 0,313	/	/	0,9
	1,026 in 0,625	3,3	≥ 4,5 (smrtnost)	0,8
	1,026 in 0,313	/	/	0,6
	1,026 in 0,156	/	/	0,4
	0,513 in 0,313	/	≥ 4,5 (smrtnost)	0,4
	0,513 in 0,156	1,4	≥ 4,5 (smrtnost)	0,3
	0,513 in 0,078	0,9	≥ 4,5 (smrtnost)	/
	0,256 in 0,313	1,1	≥ 4,5 (smrtnost)	/
	0,256 in 0,156	0,3	/	/
	0,256 in 0,078	0,8	/	/
0,128 in 0,313	0,8	/	/	
<b>Inhibicija (log cfu/ml) bakterijskega koktajla (24 ur ter 120 – 144 ur) pri izbrani kombinaciji 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG</b>				
37 °C	MHB	≥ 6 (smrtnost)	≥ 4 (smrtnost) ≥ 5 (smrtnost) **	≥ 7,6 (smrtnost)
	Piščančji sok	≥ 6 (smrtnost)	≥ 3,9 (smrtnost)	≥ 7 (smrtnost)
8 °C	MHB	3,1	≥ 2,4 (smrtnost) ≥ 2,1 (smrtnost) **	2,2
	Piščančji sok	1,4	≥ 6,3 (smrtnost)	1,3
	Sterilno razdeto meso	4,1	0,5***	3,9
	Nesterilno razdeto meso	2,9	0,7***	1,3

Legenda:

/ nismo testirali

\* inhibicija DMSO

\*\* spremenjena atmosfera (10 % CO<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub>, 87 % N<sub>2</sub>)

\*\*\* slaba rast

Protimikrobna učinkovitost določene snovi je odvisna od mnogih dejavnikov kot so vrsta bakterij, vrsta gojišča, temperatura, pH, vsebnost maščob, beljakovin in ogljikovih hidratov v živilu. Protimikrobni učinek izbranih snovi, ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG, smo določali z dvema metodama, kot učinek posamezne snovi in kot učinek kombinacije dveh snovi na posamezno vrsto bakterij (*L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli*) in na bakterijski koktajl v gojišču MHB, v modelnem živilu (piščančji sok) in v razdetem mešanem mesu.

### **5.1.1 Protimikrobno delovanje ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG na grampozitivne in gramnegativne bakterije**

Na podlagi eksperimentov smo spoznali, da obstajajo razlike v protimikrobnem delovanju ekstrakta *A. katsumadai* na grampozitivne in gramnegativne bakterije. Preden smo začeli z eksperimentalnim delom z izbranimi vrstami bakterij smo predvidevali, da so različno občutljive na snovi s protimikrobnim delovanjem. Predvidevali smo, da naj bi bile grampozitivne bakterije bolj občutljive od gramnegativnih. Z našim eksperimentom smo to hipotezo deloma potrdili, saj so se bakterije vrste *L. monocytogenes*, ki so grampozitivne bakterije, in bakterije vrste *C. jejuni*, ki so gramnegativne izkazale za bolj občutljive od bakterij vrste *E. coli*, ki so gramnegativne bakterije. Kot merilo za občutljivost smo izbrali minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC). Vrednost MIC za bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* smo definirali kot najmanjšo koncentracijo protimikrobne snovi, pri kateri ni bilo spremembe barve vzorca po dodatku barvila INT (Klančnik in sod., 2010). Vrednosti MIC za bakterije vrste *C. jejuni* smo določili z merjenjem luminiscence (BacTiter-Glo<sup>TM</sup>) tako, da je bila vrednot MIC tista koncentracija, pri kateri se je luminiscenca vzorca povečala nad luminiscenco ozadja (Klančnik in sod., 2010).

V preglednicah 7 in 8 so podani rezultati za ekstrakta *A. katsumadai* in *Evodia rutaecarpa* ter za nizin in EGKG. Ekstrakt *Evodia rutaecarpa* je imel na bakterije vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* vpliv šele pri koncentraciji 4,103 mg/ml, kjer smo dokazali, da protimikrobno deluje že sam DMSO v katerem smo topili ekstrakt, na bakterije vrste *C. jejuni* pa je imel učinek pri 1,026 mg/ml. Kombinacija nizina in ekstrakta *A. katsumadai* je imela na bakterije vrste *E. coli* zelo slab inhibitorni učinek in zato nizina nismo uporabili v nadaljnjih eksperimentih. Večino eksperimentalnega dela smo uporabljali ekstrakt *A. katsumadai* in EGKG. V preglednici 9 so zbrane vrednosti MIC za kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG. Tu so se kot bolj občutljive izkazale grampozitivne bakterije vrste *L. monocytogenes* in gramnegativne bakterije vrste *C. jejuni*, bolj odporne pa so bile gramnegativne bakterije vrste *E. coli*. Na slikah 6-11 in prilogah A-D, so prikazane krivulje rasti v gojišču MHB, iz katerih je razvidna inhibicija rasti vseh treh vrst bakterij ob dodatku ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG. Na slikah 12-15 in v prilogi E pa so predstavljeni rezultati inhibicije v sterilnem piščančjem soku za vse tri vrste bakterij. Tudi tukaj smo dobili povsem enake rezultate in sicer, da so bakterije vrst *C. jejuni* in *L. monocytogenes* bolj občutljive na protimikrobno delovanje ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG kot bakterije vrste *E. coli*. Rezultati so bili ponovno enaki, ko smo iz teh treh vrst bakterij naredili bakterijski koktajl in ga preizkusil v gojišču MHB, v sterilnem piščančjem soku in v razdetem mešanem mletem mesu.

Bezic in sodelavci (2003), kot vzrok da so gramnegativne bakterije manj občutljive na protimikrobno delovanje eteričnih olj navajajo razlog, da je hidrofилna celična stena

gramnegativnih bakterij sestavljena predvsem iz lipopolisaharida, ki zavira prehajanje hidrofилnih eteričnih olj v celice.

Yoda in sodelavci (2004) so ugotovili, da se na grampozitivne bakterije veže več EGKG kot na gramnegativne bakterije. EGKG se veže na peptidoglikan, ki je pri gramnegativnih bakterijah prekrit z zunanjo membrano in se posledično nanj veže manj EGKG, kot se ga veže na grampozitivne bakterije, ki zunanje membrane nimajo. Ko se EGKG veže na bakterijsko steno, celica izgubi sposobnost delitve, postane bolj občutljiva na spremembe osmotskega tlaka, upočasni pa se tudi sinteza celične stene. Zaradi naštetih razlik so gramnegativne bakterije bolj odporne na delovanje protimikrobnih snovi.

Za bakterije rodu *Campylobacter* je znano, da so netipične v njihovih ekoloških značilnostih, da so občutljive na različne okoljske razmere, in da imajo neznane in drugačne mehanizme in regulacijske poti. Domnevno so zaradi teh značilnosti bakterije rodu *Campylobacter* bolj občutljive od drugih gramnegativnih bakterij (npr. *Salmonella* Infantis in *E. coli* O157:H7) (Klančnik, 2010).

### **5.1.2 Vpliv medija na protimikrobno delovanje ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG**

Eden izmed ciljev raziskovalnega dela je bil proučiti razlike v protimikrobnem delovanju ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG, če jih uporabimo v laboratorijskem gojišču in živilih. Kot laboratorijsko gojišče smo uporabili tekoče gojišče MHB, kot modelno živilo smo uporabili piščančji sok, in kot živilo predhodno sterilizirano razdeto mešano meso in naravno kontaminirano razdeto mešano meso. Izkazalo se je, da se protimikrobna učinkovitost ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG ni dosti zmanjšala v piščančjem soku, do večjih razlik pa je prišlo v razdetem mešanem mesu glede na delovanje v gojišču MHB. Razlike so se pokazale tudi med sterilnim razdetim mešanim mesom in naravno kontaminiranim razdetim mešanim mesom, kjer je bila protimikrobna učinkovitost ekstrakta in EGKG nekoliko boljša v sterilnem razdetem mešanem mesu pri bakterijah vrst *L. monocytogenes* in *E. coli*, medtem ko pri bakterijah vrste *C. jejuni* te razlike ni bilo. Učinkovitost se je zmanjšala ne glede na to ali je bila bakterija grampozitivna ali gramnegativna. Prav tako se je učinkovitost zmanjšala, ko smo testirali bakterijski koktajl z izbrano kombinacijo 1,026 mg/ml ekstrakta *Alpinia katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Tako smo potrdili našo domnevo, da se bo protimikrobna učinkovitost snovi s protimikrobnim delovanjem zmanjšala po prenosu iz laboratorijskega gojišča v živilo. To so ugotovili tudi mnogi raziskovalci. Na primer, Gutierrez in sodelavci (2008) so ugotovili, da kombinacija eteričnega olja origana in muškarnega oreščka ni imela protimikrobnega vpliva na bakterije vrste *E. coli* v predpripravljenem piščancu, medtem ko je imela protimikrobni vpliv v tekočem gojišču (Gutierrez in sod., 2008). Nekateri avtorji navajajo, da lahko dejstvo, da je učinek snovi s protimikrobnim delovanjem manjši v mesu, pojasnimo s konceptom obnavljanja s prolinom in njegovimi prekurzorji. Ti naj bi bakterijam pomagali pri obnavljanju in zaščiti pred snovmi s protimikrobnim delovanjem (Apostolidis, 2008).

Burt (2004) kot razlog za večjo odpornost bakterij v živilih navaja dejavnike, kot je večja dostopnost raznolikih hranil, fizično strukturo živila, ter vsebnost maščob in beljakovin.



Koncentracije potrebne za doseg MIC v živilih v primerjavi z laboratorijskimi gojišči so 2- do 100-krat večje, odvisno od živila (Burt, 2004). Če primerjamo naše rezultate opazimo, da se inhibicija pri 37 °C v piščančjem soku v primerjavi z gojiščem MHB ni prav dosti zmanjšala pri nobeni od bakterij. Pri 8 °C pa so razlike večje. Pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* se je inhibicija v piščančjem soku glede na inhibicijo v gojišču MHB zmanjšala za 1,7 log cfu/ml, v sterilnem razdetem mesu se je povečala za 1 log cfu/ml v nesterilnem razdetem mesu pa se je zmanjšala za 0,2 log cfu/ml. Pri bakterijah vrste *C. jejuni* smo v gojišču MHB in piščančjem soku dosegli baktericidni učinek, v sterilnem razdetem mesu se je inhibicija zmanjšala za 1,9 log cfu/ml, v nesterilnem razdetem mesu pa se je zmanjšala za 1,7 log cfu/ml. Pri bakterijah vrste *E. coli* pa se je inhibicija glede na gojišče MHB v piščančjem soku zmanjšala za 0,9 log cfu/ml, v sterilnem razdetem mesu se je povečala, v nesterilnem pa je bila enaka kot v piščančjem soku. Iz tega lahko zaključimo, da bi za enak protimikrobni učinek ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG kot smo ga dosegli v gojišču MHB morali povečati koncentracije uporabljenih protimikrobnih snovi. Poleg tega je iz dobljenih rezultatov razvidno, da ima vpliv medija velik pomen pri testiranju protimikrobne učinkovitosti in da je le-ta odvisen tudi od drugih dejavnikov (na primer vrsta živila, vrsta bakterij, temperatura), kar navajajo tudi literaturni podatki (Burt 2004; Bezic in sod., 2003; Gill in sod., 2002)

Cui in sodelavci (2010) predvidevajo, da lahko bakterije v živilih hitreje popravijo poškodovane celice zaradi večje dostopnosti hranil kot v laboratorijskih gojiščih

### **5.1.3 Vpliv sestavin živila na protimikrobno delovanje ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG**

Glede na to, da se je učinkovitost protimikrobnega delovanja snovi s protimikrobnim učinkom proti vsem trem vrstam bakterij zmanjšala, ko smo jih prenesli iz gojišča MHB v razdeto mešano meso, lahko predvidevamo, da struktura živila vpliva na razporeditev protimikrobnih snovi v živilih. Velike vsebnosti maščob in/ali beljakovin v živilu občutno zmanjšajo delovanje protimikrobnih snovi na bakterije. V našem primeru tako piščančji sok, kot tudi razdeto mešano meso vsebujeta dokaj velik delež maščob in beljakovin, iz česar lahko sklepamo, da imata maščoba in beljakovine vpliv na protimikrobno delovanje ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG. To je bilo v skladu s pričakovanji. Lopez-Malo Vigil in sodelavci (2005) navajajo, da se protimikrobni učinek kombinacije protimikrobnih snovi, ki ima v razmerah *in vitro* dokazan pozitiven učinek, v živilih zmanjša ali pa ga sploh nima. Do tega pride zaradi delovanja mnogih dejavnikov v živilih, na primer zaradi proteinov, lipidov, kationov, pH in slabe topnosti snovi s protimikrobnim učinkom. Burt (2004) navaja, da je imelo eterično olje, ki je bilo raztopljeno v maščobni fazi živila, slabše protimikrobno delovanje na bakterije, ki so bile v vodni fazi živila. Ogljikovi hidrati niso izkazali tako velikega vpliva na zmanjšanje protimikrobne učinkovitosti spojin kot maščobe in beljakovine.

Davidson in Branen (2005) navajata, da lahko reakcije z lipidi, proteini, ogljikovimi hidrati in ostalimi komponentami živila, poleg tega, da zavirajo delovanje protimikrobnih snovi, povzročajo tudi neželene spremembe v okusu, barvi in aromi živila.

#### 5.1.4 Vpliv temperature na protimikrobno delovanje ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG

Pri naših eksperimentih smo določali protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG pri 37 °C in 8 °C, kjer smo pri 8 °C poizkusili ponazoriti temperaturo hladilnika, kjer se razdeto meso ponavadi shranjuje.

Pri nižji temperaturi je potrebno upoštevati čas faze lag in hitrost rasti (generacijski čas). Bakterije vrste *L. monocytogenes* imajo pri 5 °C čas faze lag od 1 do 3 dni, generacijski čas pa od 13 do 25 ur (Adamič, 2003). Pri bakterijah vrste *E. coli* z znižanjem temperature iz 37 °C na 10 °C pride do zastoja rasti za približno 4 ure, nato pa zopet prične z eksponentno rastjo (Berry in Foegeding, 1997).

Veliko raziskav potrjuje, da se rastlinskim ekstraktom in snovem s protimikrobnim delovanjem pri nižji temperaturi zmanjša protibakterijska učinkovitost. Kot vzrok navajajo zmanjšanje fluidnosti membran v celicah (Solomakos in sod., 2008a).

Pri bakterijah rodu *Campylobacter* lahko kot vzrok, da niso sposobne rasti pri temperaturi, nižji od 30 °C navedemo, da nimajo proteinov hladnega stresa (Parkhill in sod., 2000; Hazeleger in sod., 1998).

Pri naših eksperimentih smo ugotovili, da je temperatura precej vplivala na protimikrobno delovanje ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG. Rezultati so predstavljeni na slikah 17-26. V gojišču MHB za bakterije vrste *C. jejuni* razlike v delovanju kombinacije *Alpinia katsumadai* in EGKG glede na temperaturo ni bilo, kajti pri obeh temperaturah (37 °C in 8 °C) je bil učinek baktericidni. Pri bakterijah vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* pa so bile razlike kar precejšnje. Pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* smo pri temperaturi 37 °C dosegli baktericidni učinek, medtem ko je bila inhibicija pri 8 °C 3,1 log cfu/ml. Podoben rezultat smo dobili pri bakterijah vrste *E. coli*, kjer je bil učinek pri temperaturi 37 °C prav tako baktericidni, pri 8 °C pa je bila inhibicija 2,2 log cfu/ml. Če primerjamo učinek temperature glede na gojišče MHB in piščančji sok, lahko rečemo, da se rezultati ponovijo. Se pravi, pri temperaturi 37 °C je protimikrobni učinek ponovno precej večji kot pri 8 °C. Pri bakterijah vrst *L. monocytogenes* in *E. coli* se je inhibicija rasti zmanjšala, če primerjamo nesterilno meso s sterilnim vzorcem razdetega mesa, pri bakterijah vrste *C. jejuni* pa je bila protimikrobna učinkovitost približno enaka. Bakterije vrste *C. jejuni* so v razdetem mešanem mesu pri nižji temperaturi zelo slabo raste ne glede na dodatek protimikronih snovi. Tako lahko potrdimo domnevo, da naj bi se protimikrobni učinek rastlinskim ekstraktom in snovem s protimikrobnim delovanjem pri nižji temperaturi zmanjšal.

#### 5.1.5 Vpliv kombinacij protimikrobnih sredstev

Naš cilj raziskovalnega dela je bil poiskati sinergističen učinek med dvema protimikrobnima snovema. Sinergističen učinek smo iskali med ekstraktom *A. katsumadai* in EGKG in tega žal nismo dokazali. Zato smo eksperimentalno delo nadaljevali tako, da smo iskali optimalno kombinacijo med tema dvema protimikrobnima snovema, ki je imela

protimikrobni učinek na koktajl bakterij vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*. Za to kombinacijo smo sicer zmanjšano protimikrobno delovanje potrdili tudi v razmerah *in vivo*, ko smo jo prenesli v sterilni piščančji sok in v razdeto mešano meso.

Za mnogo kombinacij z rastlinskimi ekstrakti, eteričnimi olji in komponentami izoliranimi iz rastlin je znano, da imajo boljši protimikrobni učinek kot če delujejo proti mikroorganizmom samostojno. Veliko raziskav dokazuje, da se protimikrobno delovanje nizina v kombinacijah poveča. V našem primeru, ko smo poleg nizina testirali še EGKG, se je EGKG izkazal kot snov, ki v kombinacijah dosega boljše protimikrobne učinke, zato eksperimentov z nizinom nismo nadaljevali. Za kombinacije z EGKG na področju živil je bilo do danes zelo malo raziskanega, zato naše rezultate, ki smo jih dobili pri kombinaciji z EGKG težko ovrednotimo. Trenutno je EGKG precej bolj zanimiv na področju zdravljenja in preprečevanja bolezni (npr. rak debelega črevesa, rak dojk, Alzheimerjeva bolezen itd.), kjer se prav tako iščejo kombinacije EGKG z mnogimi zdravili, ki bi imele boljši učinek, kot zdravilo samo.

## 5.2 SKLEPI

Preučili smo protimikrobno delovanje ekstraktov *Alpinia katsumadai* in *Evodia rutaecarpa* v kombinacijah z nizinom ali epigalokatehin galatom (EGKG). Kot protimikrobno učinkovito kombinacijo, ki je imela učinek na bakterije vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni* in na bakterijski koktajl smo določili kombinacijo ekstrakta *Alpinia katsumadai* in EGKG. Glede na rezultate eksperimentalnega dela lahko povzamemo:

- da se je ekstrakt *A. katsumadai* izkazal kot snov z boljšim protimikrobnim delovanjem na bakterije vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni* kot ekstrakt *Evodia rutaecarpa*
- da se je EGKG izkazal kot snov z boljšim protimikrobnim delovanjem na bakterije vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni* kot nizin
- da je kombinacija 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG najnižja kombinacija, ki še ima protimikrobni učinek od vseh preizkušenih kombinacij na vse tri vrste testiranih bakterij in bakterijski koktajl
- da ima ekstrakt *A. katsumadai* boljši protimikrobni učinek na grampozitivne bakterije vrste *L. monocytogenes* in gramnegativne bakterije vrste *C. jejuni*, kot na gramnegativne bakterije vrste *E. coli*
- protimikrobni učinek izbrane kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG se na bakterijski koktajl poveča glede na učinek na posamezne bakterije vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni*
- da je protimikrobni učinek kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml) in EGKG (0,625 mg/ml) odvisen od vrste gojišča, in sicer je v gojišču MHB učinek največji, sledi piščančji sok, najmanjši učinek pa je v razdetem mešanem mesu
- da znižanje temperature iz 37 °C na 8 °C vpliva na zmanjšano protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG

## 6 VIRI

- Abbas S., Wink M. 2009. Epigallocatechin gallate from green tea (*Camellia sinensis*) increases lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta Medica*, 75: 216–221
- Abee T., Rombouts F.M., Hugenholtz J., Guihard G., Letellier L. 1994. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott a grown at high and low temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1962-1968
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573-589
- Abramovič H., Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave - funkcionalni dodatki živilom. 25. Bitenčevi živilski dnevi. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu - uporabnost in ekologija. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija, V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 17-21
- Ahn J., Grün I.U., Mustapha A. 2007. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, 24: 7–14
- Andlovic A. 2002a. *Escherichia coli*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185-188
- Andlovic A. 2002b. Kampilobakterji. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 217-220
- Apostolidis E., Kwon Y.I., Shetty K. 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 317–324
- Bell C., Kyriakides A. 1998. Factors affecting the growth and survival of *E. coli*. V: *E. coli*, A practical approach to the organism and its control in foods. London, Blackie Academic & Professional: 44-47
- Bezic N., Skocibusic M., Dinkic V., Radonic A. 2003. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytotherapy Research*, 17:1037–1040
- Berry E.D., Foegeding P.M. 1997. Cold temperature adaption and growth of microorganisms. *Journal of Food Protection*, 60, 12: 1586-1594

- Bharadway R., Vidya A., Dewan B., Pal A. 2003. An *in vitro* study to evaluate the synergistic activity of norfloxacin and metronidazole. *Indian Journal of Pharmacology*, 35: 220-226
- Blaser M.J., Hardesty H.L., Powwers B., Wang W.L. 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology*, 11: 309-313
- Borris R.P. 1996. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, 51: 29–38
- Brock T.D. 2006. *Biology of microorganisms*. 11<sup>th</sup> ed. Illinois, Paerson Education: 991 str.
- Brotz H., Sahl H.G. 2000. New insights into the mechanism of action of lantibiotics—divers biological effects by binding to the same molecular target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 1–6
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223– 253
- Cava R., Nowak E., Taboada A., Marin-Iniesta F. 2007. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 70: 2757–2763
- Ceylan E., Fung D.Y.C. 2004. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12: 1–55
- Chemicaland21.com. 2010. Epigallocatechin gallate. Rasporden, Chemicaland21.com: 1 stran  
<http://chemicaland21.com/lifescience/foco/%28-%29-EPIGALLOCATECHIN%20GALLATE.htm> (september 2010)
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564–582
- Cui H., Gabriel A. A., Nakano H. 2010. Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. *Food Control*, 21: 1030–1036
- Cutter C. N., Hruska L. 2000. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63: 601–607
- Davidson P.M., Branen J.K. 2005. *Food antimicrobials – an introduction*. V: *Antimicrobials in food*. 3<sup>rd</sup> ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 1-9

Davidson P.M., Juneja V., Branen J.K. 2002. Antimicrobial agents. V: Food additives. Branen A.L., Davidson P.M., Salminen S., Thorngate J.H. (eds.). New York, Marcel Dekker: 563-620

Del Campo J., Amito M.J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 63: 1359–1368

EFSA. 2009. Food-borne outbreaks: the European Union in 2007: Community summary report. *EFSA Journal*, 223: 1-129  
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/271r.htm> (september 2010)

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

Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I.P., Troganis A., Boskou D. 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5294–529

Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 35-40

FAO/WHO. 2009. Risk assessment of *Campylobacter* spp. in broiler chickens. Technical report. Microbiological Risk Assessment Series; No 12. Geneva, FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations/World health organization: 132 str.

FAO/WHO. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Interpretative summary. Microbiological risk assessment series No. 4. Geneva, FAO/WHO-Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization: 48 str.

Firouzi R., Shekarforoush, S.S., Nazer A.H., Borumand Z., Jooyandeh A.R. 2007. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. *Journal of Food Protection*, 70: 2626–2630

Gill A. O., Delaquis P., Russo P., Holley R. A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73: 83–92

Gill A.O., Holley R.A. 2006. Disruption of *E. coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 1–9

Govaris A., Solomakos N., Pexara A., Chatzopoulou P.S. 2010. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 175–180

Griffin P.M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. V: Infection of the gastrointestinal tract. Blaser M.J, Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrant R.L. (eds.). New York. Raven Press Ltd: 739-761

Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 91–97

Hara Y. 1986. Process for the production of tea catechins. United States Patent 4613672: 21 str.

Hazeleger W.C., Wouters J.A., Rombouts F.M., Abee T. 1998. Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3917-3922

Hitchins A.D., Whiting R.C. 2001. Food-borne *Listeria monocytogenes* risk assessment. *Food Additives & Contaminants*, 18: 1108-1117

Hsieh P.C., Ma J.L., Huang S.H. 2001. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology*, 18: 35–43

Hua S., Luo J., Wang W., Wang J., Kong L. 2009. Two novel monoterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19: 2728–2730

Ismaiel A.A., Pierson M.D. 1990. Effect of sodium nitrite and oregano oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. *Journal of Food Protection*, 53: 958–960.

ISO 4833. Microbiology of food and animal feedingstuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 degree C. 3<sup>rd</sup> ed. 2003: 9 str.

Jacobs-Reitsma W. 2000. *Campylobacter* in the food supply. V: *Campylobacter*. Nachamkin I., Blaser M.J. (eds.). Washington DC, ASM Press: 467-482

Juliani H.R., Biurrun F., Koroch A.R., Oliva M.M., Demo M.M., Trippi V.S., Zygadlo J.A. 2002. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica*. *Planta Medica*, 68: 762-764



Jung D.S., Bodyfelt F.W., Daeschel M.A. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 75: 387-393

Kim K.J., Kim Y.H., Jeong S.I., Cha J.D., Kil B.S., You Y.O. 2003. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*. *Planta Medica*, 69: 274-277

Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 121–126

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

Lambert R.J.W., Johnston M.D., Hanlon G.W., Denyer S.P. 2003. Theory of antimicrobial combinations: Biocide mixtures – synergy or addition? *Journal of Applied Microbiology*, 94: 747–759

Larson A. E., Yu R. R. Y., Lee O. A., Price S., Haas G. J., Johnson E. A. 1996. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 195–207

Lee A., Smith S.C., Coloe P.J. 1998. Survival and growth of *Campylobacter jejuni* after artificial inoculation onto chicken skin as a function of temperature and packaging conditions. *Journal of Food Protection*, 61: 1609-1614

Lee S. E., Shin H. T., Hwang H.J., Kim J. H. 2003. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytotherapy Research*, 17: 1041–1047

Li J., Nie S., Qiu Z., Che M., Li C., Xie M. 2009. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from *HerbaMoslae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1347-1352

Lin Y.T., Labbe R.G., Shetty K. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems using oregano and cranberry synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5672–5678

Lopez-Malo Vigil A., Palou E., Alzamora S.M. 2005a. Naturally occurring compounds-plant Sources V: Antimicrobials in food. 3<sup>rd</sup> ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 429-451

Lopez-Malo Vigil A., Palou E., Parish M.E., Davidson P.M. 2005b. Methods for activity assay and evaluation of results. V: Antimicrobials in food. 3<sup>rd</sup> ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 659-677

McClintock M., Serres L., Marzolf J.J., Hirsch A., Mocquot G. 1952. Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le developpement des sportules anaerobies dans le fromage de Gruyere fondu. *Journal of Dairy Research*, 19: 187-193

Molyneux R.J., Mahoney N., Kim J.H., Campbell B.C. 2007. Mycotoxins in edible tree nuts. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 72-78

Moore J.E. 2001. Bacterial dormancy in *Campylobacter*. Abstract theory or cause of concern? *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 593-600

Mulders J.W., Boerrigter I.J., Rollema H.S., Siezen R.J., de Vos W.M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*, 201: 581-584

Munoz M., Guevara L., Palop A., Tabera J., Fernandez P.S. 2009. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *LWT/ Food Science and Technology*, 42: 220-227

Mytle N., Anderson G.L., Doyle M.P., Smith M.A. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control*, 17: 102-107

Nan P., Huc Y., Zhaoa J., Fengb Y., Zhong Y. 2004. Chemical composition of the essential oils of two *Alpinia* species from Hainan Island, China. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 157-160

Ohishi T., Kishimoto Y., Miura N., Shiota G., Kohri T., Hara Y., Hasegawa J., Isemura M. 2002. Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with sulindac against colon carcinogenesis of rats treated with azoxymethane. *Cancer Letters*, 177: 49-56

Painter J., Skutsker L. 2007. Listeriosis in humans. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser E.T, Marth E.H. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 85-102

Park S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177- 188

Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., van Vliet A.H., Whitehead S., Barrell B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403: 665-668

Philips C.A. 1998. The isolation of *Campylobacter* spp. from modified atmosphere packaged foods. *International Journal of Environmental Health Research*, 8: 215-221

Pol I.E., Smid E.J. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 166–170

Promega. 2009. BacTiter-Glo™ microbial cell viability assay: Instructions for use of products G8230, G8231, G8232 and G8233. Madison, Promega Corporation: 16 str.

Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Mieier C., Kae H.N.M., Heinonen M., Hopia A., Oksman-Caldentey K.M. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 494-507

Rahman A., Kang S.C. 2009. *In vitro* control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* thunb. *Food Chemistry*, 116: 670–675

Rico-Munoz E., Davidson P.M. 1983. Effect of corn oil and casein on the antimicrobial activity of phenolic antioxidants. *Journal of Food Science*, 48:1284-1288

Riedel C.H., Bronsted L., Rosequist H., Haxgart S. N., Christensen B. B. 2009. Chemical decontamination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin and meat. *Journal of Food Protection*, 72: 1173-1180

Robinson D.A. 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, 282: 1374-1376

Rocourt J., Buchrieser C. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy and identification. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser E.T, Marth E.H. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 5-12

Russell A.D., Gould G.W. 1988. Resistance of *Enterobacteriaceae* to preservatives and disinfectants. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, Suppl. S: S 167-S 195

Sakanaka S., Kim M., Taniguchi M., Yamamoto T. 1989. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 2307-2311

Samelis J., Bedie G.K., Sofos J.N., Belk K.E., Scanga J.A., Smith G.C. 2005. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4 °C in vacuum packages. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 38: 21–28

Sauders B.D., Wiedemann M. 2007. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser E.T, Marth E.H. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 5-12

Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M., Khoshnoodi M. 2006. *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 10: 1-6

- Singh A., Singh, R.K., Bhunia, A.K., Singh, N. 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *LWT/Food Science and Technology*, 36: 787–794
- Skirrow M.B. 1994. Disease due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *Journal of Comparative Pathology*, 111: 113-149
- Smid E.J., Gorris L.M.G. 2007. Natural antimicrobials for food preservation. V: *Handbook of food preservation*. 2<sup>nd</sup> ed. Rahman M.S. (ed.). New York. Marcel Dekker: 237-259
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 118–122
- Solomakos N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. 2008a. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 25: 120–127
- Solomakos N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. 2008b. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80: 159–166
- Stuart E.C., Rosengren R.J., 2008. The combination of raloxifene and epigallocatechin gallate suppresses growth and induces apoptosis in MDA-MB-231 cells. *Life Sciences*, 82: 943–948
- Susman M. 1997. *Escherichia coli* and human disease. V: *Escherichia coli: Mechanism of virulence*. Susman M. (ed.). Cambridge, Cambridge University Press: 3-48
- Thomas L., Wimpeny J.W.T. 1996. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2006–2012
- Thomas L.V., Delves-Broughton J. 2005. Nisin. V: *Antimicrobials in food*. 3<sup>rd</sup> ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (ur.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 237-274
- Thomas L.V., Delves-Broughton J. 2001. New advances in the application of the food preservative nisin. *Advanced Food Science*, 2: 11-22
- Threlfall E.J., Walt L.R., Frost J.A., Wilshaw G.A. 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 1-5
- Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Linuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 50: 27-34

Ultee A., Slump R.A., Steging G., Smid E.J. 2000. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63: 620–624

Upaganlawar A., Gandhi C., Balaraman R. 2009. Effect of Green tea and vitamin E combination in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64: 75–80

Zendo T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J., Sonomoto K. 2003. Identification of the Lantibiotic Nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61–14 isolated from a River in Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67: 1616–1619

Zhang H., Kong B., Xiong Y.L., Sun X. 2009. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81: 686–692

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

WHO. 2010. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Fact Sheet; N°125. Geneva, WHO - World Health Organization: 1 str.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/> (avgust, 2010)

WHO. 2000. The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and proceedings of a WHO consultation of experts, Copenhagen, 21-25 november 2000. Geneva, WHO- World Health Organization: 135 str.

## PRILOGE

Priloga A: Inhibicija bakterij vrst *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli* v gojišču MHB z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* ali z dodanim EGKG

Snov s protimikrobnim delovanjem	Koncentracija snovi (mg/ml)	Inhibicija (log cfu/ml) po 24 urah		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>E. coli</i>
<i>A. katsumadai</i>	4,103	/	/	*
	0,513	1,6	≥ 4 (smrtnost)	0,9
EGKG	0,313	/	≥ 4 (smrtnost)	/
	0,156	1	≥ 4 (smrtnost)	0,7
	0,078	/	≥ 4 (smrtnost)	/

\* zaviralno delovanje DMSO

/ nismo testirali

Priloga B: Inhibicija bakterij vrste *L. monocytogenes* pri kombinaciji ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v gojišču MHB

Kombinacija <i>A. katsumadai</i> (mg/ml) in EGKG (mg/ml)	Inhibicija (log cfu/ml) po 24 urah
1,026 + 0,625	3,3
0,513 + 0,156	1,4
0,256 + 0,313	1,1
0,256 + 0,156	0,3
0,128 + 0,313	0,8

Priloga C: Inhibicija bakterij vrste *C. jejuni* pri kombinaciji ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v gojišču MHB

Kombinacija <i>A. katsumadai</i> (mg/ml) in EGKG (mg/ml)	Inhibicija (log cfu/ml) po 24 urah
1,026 + 0,625	≥ 4,5 (smrtnost)
0,513 + 0,313	≥ 4,5 (smrtnost)
0,513 + 0,156	≥ 4,5 (smrtnost)
0,513 + 0,078	≥ 4,5 (smrtnost)

Priloga D: Inhibicija bakterij vrste *E. coli* pri kombinaciji ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v gojišču MHB

Kombinacija <i>A. katsumadai</i> (mg/ml) in EGKG (mg/ml)	Inhibicija (log cfu/ml) po 24 urah
4,103 + 0,313	*
4,103 + 0,156	*
2,052 + 0,625	0,9
2,052 + 0,313	0,9
1,026 + 0,625	0,8
1,026 + 0,313	0,6
1,026 + 0,156	0,4
0,513 + 0,313	0,4
0,513 + 0,156	0,3

\* zaviralno delovanje DMSO

Priloga E: Inhibicija bakterij vrste *L. monocytogenes* in *E. coli* v piščančjem soku z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* ali z dodanim EGKG

Snov s protimikrobnim delovanjem	Koncentracija snovi (mg/ml)	Inhibicija (log cfu/ml) po 24 urah	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>
<i>A. katsumadai</i>	2,052	0,5	0,2
	1,026	0,6	/
	0,513	0,7	/
EGKG	5	/	≥ 8 (smrtnost)
	2,5	≥ 7 (smrtnost)	0,02
	1,25	/	0,02
	0,625	0,6	0,01
	0,313	0,3	/

\* zaviralno delovanje DMSO

/ nismo testirali

Priloga F: Inhibicija bakterij vrst *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli* pri izbrani kombinaciji 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* + 0,625 mg/ml EGKG v bakterijskem koktajlu

Temperatura	gojišče	Inhibicija (log cfu/ml) po 120 urah		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>E. coli</i>
37 °C	MHB	≥ 6 (smrtnost)	≥ 4 (smrtnost) ≥ 5 (smrtnost) *	≥ 7,6 (smrtnost)
	Piščančji sok	≥ 6 (smrtnost)	≥ 3,9 (smrtnost)	≥ 7 (smrtnost)
8 °C	MHB	3,1	≥ 2,4 (smrtnost) ≥ 2,1 (smrtnost) *	2,2
	Piščančji sok	1,4	≥ 6,3 (smrtnost)	1,3
	Sterilno Razdeto meso	4,1	0,5	3,9
	Nesterilno razdeto meso	2,9	0,7	1,3

\* spremenjena atmosfera (10 % CO<sub>2</sub>, 3 % O<sub>2</sub>, 87 % N<sub>2</sub>)