

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Teja GORENC

PROTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKTA
Alpinia katsumadai V MLETEM MESU

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Teja GORENC

**PROTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKTA *Alpinia katsumadai* V
MLETEM MESU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Alpinia katsumadai* EXTRACT IN
MINCED MEAT**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil ter na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Barbara Jeršek in za recenzentko prof. dr. Lea Demšar.

Mentorica: prof. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Lea Demšar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Teja GORENC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	DN
DK	UDK 579.67 + 579.24: 547.9: 637.514.5 (043) = 163.6
KG	patogene bakterije / <i>Escherichia coli</i> / <i>Listeria monocytogenes</i> / <i>Campylobacter jejuni</i> / protimikrobne snovi / rastlinski ekstrakti / <i>Alpinia katsumadai</i> / EGKG / bakterijski koktail / protimikrobna aktivnost / inhibicija rasti / mleto meso / senzorične lastnosti
AV	GORENC, Teja
SA	JERŠEK, Barbara (mentorica) / DEMŠAR, Lea (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	PROTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKTA <i>Alpinia katsumadai</i> V MLETIM MESU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 56 str., 21 pregl., 21 sl., 65 vir.
IJ	SL
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil preveriti protimikrobno delovanje ekstrakta <i>Alpinia katsumadai</i> v mletem mesu pri bakterijah vrst <i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> in <i>Campylobacter jejuni</i>. Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču Mueller Hinton bujon (MHB) smo določili, da ima ekstrakt <i>A. katsumadai</i> protimikrobni učinek. Kombinacije ekstrakta z drugimi protimikrobnimi snovmi (Vivox 40, Vivox 70 in EGKG (epigalokatehin galat)) niso pokazale sinergističnega učinka. Ekstrakt <i>A. katsumadai</i> in EGKG sta imela protimikrobni učinek na bakterijski koktail (<i>E. coli</i>, <i>L. monocytogenes</i> in <i>C. jejuni</i>) in ta aktivnost ni bila zmanjšana pri znižanju pH gojišča MHB iz 7,0 na 5,3. Pri 37 °C je kombinacija ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v gojišču MHB popolnoma zavirala rast bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>C. jejuni</i>, medtem ko je bil indeks inhibicije pri bakterijah vrste <i>E. coli</i> 7,3 %. Pri 8 °C je ista protimikrobna kombinacija v gojišču MHB popolnoma zavrla rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i>, inhibicija preostalih dveh vrst bakterij pa je bila manjša (<i>L. monocytogenes</i> 44 %, <i>E. coli</i> 22,3 %). Protimikrobni učinek ekstrakta <i>A. katsumadai</i> (1,026 mg/g) na bakterijski koktail smo dokazali tudi v mletem mesu, saj se je rast vseh bakterij po 48 urah zmanjšala (<i>E. coli</i> za $2,37 \pm 0,18$ log cfu/ml, <i>L. monocytogenes</i> za $4,90 \pm 0,07$ log cfu/ml, <i>C. jejuni</i> za $1,61 \pm 1,76$ log cfu/ml). Senzorična analiza mletega mesa z dodatkom ekstrakta <i>A. katsumadai</i> je pokazala, da je mleto meso senzorično sprejemljivo pri nižji koncentraciji ekstrakta (0,016 mg/ml), ki ni pokazal protimikrobne aktivnosti na testirane bakterije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD	Dn
DK	UDK 579.67 + 579.24: 547.9: 637.514.5 (043) = 163.6
KG	pathogens / <i>Escherichia coli</i> / <i>Listeria monocytogenes</i> / <i>Campylobacter jejuni</i> / antimicrobial compounds / plant extracts / <i>Alpinia katsumadai</i> / EGCG / bacterial cocktail / antimicrobial activity / growth inhibition / minced meat / sensory properties
AV	GORENC, Teja
SA	JERŠEK, Barbara (supervisor) / DEMŠAR, Lea (reviewer)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
LI	2015
IN	ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF <i>Alpinia katsumadai</i> EXTRACT IN MINCED MEAT
TD	Graduation thesis (University studies)
OP	XIV, 56 p., 21 tab., 21 fig., 65 ref.
IJ	SL
JI	sl/en
AI	The aim of our research was to examine the antimicrobial activity of <i>Alpinia katsumadai</i> against <i>Escherichia coli</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Campylobacter jejuni</i> in minced meat. Antimicrobial activity of <i>A. katsumadai</i> extract was determined using microdilution method in Mueller Hinton broth (MHB). No synergistic effects of <i>A. katsumadai</i> extract with other antimicrobial agents (Vivox 40, Vivox 70 and EGCG (Epigallocatechin gallate)) against <i>E. coli</i>, <i>L. monocytogenes</i> and <i>C. jejuni</i> were determined. <i>A. katsumadai</i> extract and EGCG showed antimicrobial activity against bacterial cocktail (<i>E. coli</i>, <i>L. monocytogenes</i> and <i>C. jejuni</i>). This antimicrobial activity wasn't reduced by pH change of MHB medium from 7.0 to 5.3. Combination of <i>A. katsumadai</i> extract and EGCG in MHB at 37 °C completely inhibited growth of <i>L. monocytogenes</i> and <i>C. jejuni</i>, while <i>E. coli</i> growth was inhibited by 7.3 %. The same antimicrobial combination in MHB at 8 °C completely inhibited growth of <i>C. jejuni</i>, while inhibiting the other two bacteria in lesser extent (<i>L. monocytogenes</i> by 44 %, <i>E. coli</i> by 22.3 %). The antimicrobial activity of <i>A. katsumadai</i> extract (1.026 mg/g) against bacterial cocktail was also determined in minced meat, since the growth of all bacteria after 48 hours was reduced (<i>E. coli</i> by 2.37 ± 0.18 log cfu/ml, <i>L. monocytogenes</i> by 4.90 ± 0.07 log cfu/ml, <i>C. jejuni</i> by 1.61 ± 1.76 log cfu/ml). Sensory analysis of minced meat with added <i>A. katsumadai</i> extract showed that minced meat with lower concentration of extract (0.016 mg/ml), which didn't demonstrate antimicrobial activity against <i>E. coli</i>, <i>L. monocytogenes</i> and <i>C. jejuni</i>, was found sensorically acceptable.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RASTLINSKE PROTIMIKROBNE SNOVI	3
2.1.1 <i>Alpinia katsumadai</i>	5
2.1.2 Epigalokatehin galat	6
2.1.3 Rožmarin.....	7
2.2 IZBRANE PATOGENE BAKTERIJE	7
2.2.1 Bakterije vrste <i>Escherichia coli</i>	7
2.2.2 Bakterije vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.2.4 Bakterije vrste <i>Campylobacter jejuni</i>	9
2.3 METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA.....	11
2.4 KOMBINACIJE PROTIMIKROBNIH SREDSTEV	12
2.5 SENZORIČNA ANALIZA.....	13
2.5.1 Senzorični preskuševalci.....	13
2.5.2 Senzorične metode.....	14
2.5.2.1 Opisna ali deskriptivna analiza	14
2.5.3 Uporaba senzorične analize.....	14
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 POTEK DELA	16
3.2 MATERIAL	17
3.2.1 Bakterije.....	17
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	17
3.2.3 Priprava snovi s protimikrobnim delovanjem	20
3.2.3.1 Ekstrakt <i>Alpinia katsumadai</i> , Vivox 40 in Vivox 70	20
3.2.3.2 Epigalokatehin galat.....	21
3.2.4 Druge kemikalije in dodatki.....	21
3.2.5 Mleto meso	21

3.2.6 Laboratorijska oprema.....	21
3.3 METODE DELA	22
3.3.1 Revitalizacija bakterij.....	22
3.3.1.1 Bakterije vrst <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i>	22
3.3.1.2 Bakterije vrste <i>C. jejuni</i>	22
3.3.2 Priprava inokuluma	23
3.3.2.1 Priprava posameznih kultur	23
3.3.2.2 Priprava bakterijskega koktaila.....	23
3.3.3 Priprava 50 % živila	23
3.3.4 Izračun frakcijske inhibitorne koncentracije (FIC) in frakcijskega inhibitornega indeksa (FICI)	23
3.3.5 Izračun indeksa inhibicije	23
3.3.6 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču MHB	24
3.3.7 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici v 50 % živilu	25
3.3.8 Metoda razredčevanja v gojišču MHB.....	26
3.3.9 Protimikrobna aktivnost ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in EGKG v mletem mesu....	26
3.3.10 Senzorična analiza.....	26
3.3.10.1 Senzorična analiza mletega mesa z dodanim ekstraktom <i>A. katsumadai</i> raztopljenim v DMSO.....	27
3.3.10.2 Senzorična analiza mletega mesa z dodanim ekstraktom <i>A. katsumadai</i> raztopljenim v etanolu.....	27
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	28
4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK RASTLINSKIH ESKTRAKTOV DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V MIKROTITRSKI PLOŠČICI.....	28
4.1.1 Vrednosti MIC za različne ekstrakte <i>A. katsumadai</i> v gojišču MHB	28
4.1.2 Vrednosti MIC za ekstrakte Vivox 40, Vivox 70 in EGKG v gojišču MHB	29
4.1.3 Vrednosti MIC za ekstrakt <i>A. katsumadai</i> v 50 % mletem mesu	29
4.1.4 Vrednosti FICI za kombinacije ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in Vivox 40, Vivox 70 in EGKG v gojišču MHB.....	30
4.2 VPLIV pH NA PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTA <i>A. katsumadai</i> NA BAKTERIJSKI KOKTAIL V GOJIŠČU MHB	32
4.2.1 Bakterije vrste <i>E. coli</i>.....	32
4.2.2 Bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i>.....	34
4.2.3 Bakterije vrste <i>C. jejuni</i>	36
4.3 VPLIV TEMPERATURE NA PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTA <i>A. katsumadai</i> IN EGKG NA BAKTERIJSKI KOKTAIL.....	37

4.3.1 Gojišče MHB.....	37
4.3.1.1 Bakterije vrste <i>E. coli</i> pri 37 °C in 8 °C.....	37
4.3.1.2 Bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> pri 37 °C in 8 °C	40
4.3.1.3 Bakterije vrste <i>C. jejuni</i> pri 37 °C in 8 °C	42
4.4 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTA <i>A. katsumadai</i> IN EGKG NA BAKTERIJSKI KOKTAIL V MLETIM MESU	45
4.5 PRIMERJAVA PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA <i>A. katsumadai</i> IN EGKG NA BAKTERIJSKI KOKTAIL V GOJIŠČU MHB IN MLETIM MESU ..	45
4.6 SENZORIČNA ANALIZA MLETEGA MESA Z DODANIM EKSTRAKTOM <i>A.</i> <i>katsumadai</i>	47
5 SKLEPI	49
6 POVZETEK.....	50
7 VIRI	51
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavne skupine protimikrobnih snovi izoliranih iz rastlin (Cowan, 1999).....	4
Preglednica 2: Primeri stranskih produktov pri predelavi živil, ki imajo protimikrobno aktivnost (Gyawali in Ibrahim Salam, 2014).....	4
Preglednica 3: Sestavine eteričnega olja pridobljenega iz listov in cvetov <i>A. katsumadai</i> (Nan in sod., 2004)	5
Preglednica 4: Izrazi, ki se uporabljajo pri vrednotenju protimikrobnega delovanja (Burt, 2004).....	11
Preglednica 5: Pregled nekaterih metod za določanje protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004).....	11
Preglednica 6: Pregled senzoričnih preskusov (Golob in sod., 2005)	14
Preglednica 7: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu	22
Preglednica 8: Primer mikrotitrne ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70.....	24
Preglednica 9: Primer mikrotitrne ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije v 50 % živilu	25
Preglednica 10: Vrednosti MIC za heksanolni, diklorometanolni, etanolni in metanolni ekstrakt <i>A. katsumadai</i> , določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici.....	28
Preglednica 11: Vrednosti MIC ekstraktov Vivox 40, Vivox 70 in EGKG, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici	29
Preglednica 12: Vrednosti MIC ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , določene z metodo razredčevanja v 50 % živilu v mikrotitrski ploščici	30
Preglednica 13: Vrednosti MIC za kombinacije ekstraktov <i>A. katsumadai</i> in Vivox 40, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici.....	30
Preglednica 14: Vrednosti MIC za kombinacijo ekstraktov <i>A. katsumadai</i> in Vivox 70, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici.....	31
Preglednica 15: Vrednosti FIC za kombinacijo ekstraktov <i>A. katsumadai</i> in Vivox 70	31
Preglednica 16: Vrednosti MIC za kombinacijo ekstraktov <i>A. katsumadai</i> in EGKG, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici.....	31
Preglednica 17: Vrednosti FIC za kombinacijo ekstraktov <i>A. katsumadai</i> in EGKG	32
Preglednica 18: Povprečno število bakterij po 48 urah v gojišču MHB in mletem mesu z dodanim ekstraktom <i>A. katsumadai</i> in EGKG	46
Preglednica 19: Povprečna razlika med številom bakterij v gojišču MHB in mletem mesu z dodanim ekstraktom <i>A. katsumadai</i> in EGKG	46

Preglednica 20: Senzorična analiza mletega mesa z dodanim ekstraktom <i>A. katsumadai</i> raztopljenim v DMSO	47
Preglednica 21: Senzorična analiza mletega mesa z dodanim ekstraktom <i>A. katsumadai</i> raztopljenim v EtOH.....	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema eksperimentalnega dela.....	16
Slika 2: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB (pH= 7,0, 6,0, 5,3) z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i>	33
Slika 3: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>E. coli</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> pri pH= 7,0, 6,0, 5,3	33
Slika 4: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>E. coli</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> pri pH= 7,0, 6,0, 5,3	34
Slika 5: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> pri pH= 7,0, 6,0, 5,3)	35
Slika 6: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> pri pH= 7,0, 6,0, 5,3	35
Slika 7: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB (pH= 7,0, 6,0, 5,3) z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i>	36
Slika 8: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> pri pH= 7,0, 6,0, 5,3	37
Slika 9: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 37 °C	38
Slika 10: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 8 °C	38
Slika 11: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>E. coli</i> pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema	39
Slika 12: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>E. coli</i> pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema	39
Slika 13: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 37 °C	40
Slika 14: Rast bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 8 °C	40

Slika 15: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema	41
Slika 16: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema	42
Slika 17: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 37 °C	42
Slika 18: Rast bakterij vrste <i>C. jejuni</i> v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 8 °C	43
Slika 19: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>C. jejuni</i> pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema	43
Slika 20: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste <i>C. jejuni</i> pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> , 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema	44
Slika 21: Rast bakterij vrst <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> in <i>C. jejuni</i> v bakterijskem koktailu v mletem mesu z 1,026 mg/ml ekstrakta <i>A. katsumadai</i> in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C...	45

KAZALO PRILOG

Priloga A: Povprečno število bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

Priloga B: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

Priloga C: Povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

Priloga D: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

Priloga E: Povprečno število bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

Priloga F: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

Priloga G: Povprečno število bakterij vrste *E. coli* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga H: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga I: Povprečno število bakterij vrste *E. coli* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga J: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga K: Povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga L: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga M: Povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga N: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga O: Povprečno število bakterij vrste *C. jejuni* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga P: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga Q: Povprečno število bakterij vrste *C. jejuni* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Priloga R: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AHB	gojišče Abeyta-Hunt-Bark
AIEC	adherentnoinvazivna <i>E. coli</i>
ALOA	gojišče ALOA (ang. Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti)
<i>A. katsumadai</i>	<i>Alpinia katsumadai</i>
BPW	puferirana peptonska voda (ang. Buffered Peptone Water)
cfu	kolonijska enota
DAEC	difuznoadherentna <i>E. coli</i>
DMSO	dimetil sulfoksid
EAEC	enteroagregativna <i>E. coli</i>
EGKG	epigalokatehin galat
EHEC	enterohemoragična <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivna <i>E. coli</i>
EMB	gojišče z eozin-metilenskim modrilom
EPEC	enteropatogena <i>E. coli</i>
ETEC	enterotoksigena <i>E. coli</i>
EtOH	etanol
FIC	frakcijska inhibitorna koncentracija
FICI	frakcijski inhibitorni indeks
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogenfosfat
MHA	trdo gojišče Mueller Hinton (ang. Mueller Hinton Agar)
MHB	tekoče gojišče Mueller Hinton (ang. Mueller Hinton Broth)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
STEC	šiga-toskin proizvajajoča enteroagregativna <i>E. coli</i>
TBX	gojišče s triptonom, žolčnimi solmi in kromogenom (ang. Tryptone Bile X – Glucuronide Agar)
TL	toplotno labilni enterotoskin
TTC	2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid
UPEC	uropatogena <i>E. coli</i>
ŽM	mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniška fakulteta

1 UVOD

Dandanes je velik problem v protimikrobni odpornosti patogenih bakterij, ki se prenašajo s hrano. Visoka incidenca in povečana odpornost patogenih bakterij na antibiotike in protimikrobna sredstva, ki se uporabljajo v prehranski verigi, ogrožajo varnost prehrane (Kovač in sod., 2014). Še posebej velik problem je to, da se pojavlja čedalje več sevov, ki so odporni na številne antibiotike (večkratno odporni sevi). Da bi rešili ta problem, je potrebno odkriti nova in učinkovita protimikrobna sredstva, veliko teh pa najdemo v rastlinah (Kovač in sod., 2014).

Kljub številnim tehnološkim napredkom v živilski industriji, ki prispevajo k povečanju varnosti živil, se še vedno soočamo z visokim deležem okužb s hrano (Kovač in sod., 2014). Samo v letu 2011 je bilo zabeleženih 69.553 primerov okužb s hrano. 93 od teh je bilo usodnih (EFSA, 2013).

Rok uporabe živil lahko podaljšujemo s sintetičnimi konzervansi, vendar potrošnik raje kupi hrano brez umetnih aditivov (Klein in sod., 2013). Predelovalci hrane in potrošniki pa so izrazili željo, da bi zmanjšali uporabo sintetičnih konzervansov v živilih. Zamenjala bi jih lahko zelišča, začimbe in aromatične rastline, ki imajo protimikrobno aktivnost in bi lahko bile učinkovite naravne alternative (Delaquis in sod., 2002). Posledica je ogromno povpraševanje po naravnih konzervansih (Klein in sod., 2013).

Bakterije vrste *Escherichia coli* so gramnegativne fakultativno anaerobne bakterije in so tipične predstavnice enterobakterij (Schaechter, 2009). Živijo v spodnjem delu prebavil ljudi in toplokrvnih živali (Starčič-Erjavec in sod., 2008). Bakterije vrste *E. coli* lahko povzročajo drisko, vnetje sečnika in ledvic, pljučnico, vnetje možganskih ovojnic (Starčič-Erjavec in sod., 2008).

Bakterije vrste *Listeria monocytogenes* so grampozitivni bacili, dolgi 0,5 do 2 μm in široki 0,4 do 0,5 μm . Listerije so primarno živalske patogene bakterije. V naravi jih najdemo v vodi, odplakah, na rastlinah ter v živalskem in človeškem blatu. Z listerijo so lahko okužena živila: sir, surovo mleko, nekatere vrste mesa in zelenjave. Bakterije se razmnožujejo pri temperaturah od 1 do 45 °C, pri vrednostih pH od 6 do 9. Uniči jih že 30-minutno segrevanje pri 60 °C (Müller-Premru, 2002).

Bakterije vrste *Campylobacter jejuni* so gramnegativne, nesporogene, mikroaerofilne, spiralne bakterije (Parkhill in sod., 2000). Bakterije vrste *C. jejuni* se ne morejo razmnoževati v živilih v normalnih razmerah shranjevanja in so občutljive na različne okoljske dejavnike kot so kisik, sušenje in vročina. Te bakterije tudi ne morejo rasti pod 35 °C, lahko pa preživijo 4 mesece pri 4 °C (Guévremont in sod., 2015).

Do sedaj je bilo znano, da se rastlina *Alpinia katsumadai* uporablja v tradicionalni kitajski medicini za zdravljenje želodčnih težav in slabosti, povečanje apetita in za krmo živali (Klančnik in sod., 2012), nismo pa še zasledili, da bi se *A. katsumadai* uporabila kot aditiv v živilu. Zato smo želeli ugotoviti, kakšen je protimikrobni učinek ekstrakta *A. katsumadai* v živilu. Ugotavljali smo tudi, če ima ekstrakt *A. katsumadai* v kombinaciji z drugim

protimikrobnim sredstvom večji protimikrobni učinek kot sam ekstrakt *A. katsumadai*. Za poskuse smo izbrali bakterije vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*. S senzorično analizo smo preverili tudi sprejemljivost pečenega mletega mesa z dodatkom ekstrakta *A. katsumadai*.

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

- Ekstrakt *A. katsumadai* bo imel protimikrobni učinek na posamezne bakterije vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in na bakterijski koktail iz bakterij vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*.
- Kombinacija ekstraktov *A. katsumadai* in Vivox 40 ali Vivox 70 bo imela protimikrobni učinek na bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.
- Kombinacija ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG bo imela protimikrobni učinek na bakterije vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*.
- Višji pH bo zmanjšal protimikrobno delovanje ekstrakta *A. katsumadai*.
- Pri nižji temperaturi (temperaturi hladilnika) bo protimikrobni učinek ekstrakta *A. katsumadai* manjši kot pri optimalni temperaturi za rast posamezne vrste bakterij.
- Senzorične lastnosti mešanega mletega mesa, kateremu bo dodan ekstrakt *A. katsumadai*, bodo sprejemljive.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RASTLINSKE PROTIMIKROBNE SNOVI

Zabeleženo je, da je na Zemlji od 250.000 do 500.000 vrst rastlin. Majhen odstotek (1 % do 10 %) se jih uporablja za hrano ljudi in živali. Hipokrat je v 5. stoletju pred našim štetjem omenil, da je 300 do 400 zdravilnih rastlin. Tudi v katalogu zdravilnih rastlin-De Materia Medica je omenjenih okoli 300 zdravilnih rastlin. Današnja medicina je vse bolj dovzetna za uporabo protimikrobnih učinkovin in drugih zdravil pridobljenih iz rastlin, saj današnji antibiotiki postajajo čedalje bolj neučinkoviti (Cowan, 1999).

Uporaba naravnih produktov s terapevtskimi učinki je stara toliko kot naša civilizacija. 25 % vseh predpisanih zdravil izhaja iz rastlin. Od 252 zdravil, ki jih Svetovna zdravstvena organizacija (WHO, ang. World Health Organisation) smatra za osnovne in nujne za človeka, jih je 11 % izključno rastlinskega izvora, npr. digoksin iz *Digitalis* spp., kinin in kinidin iz *Cinchona* spp., atropin iz *Atropa belladonna* in morfin iz *Papaver somniferum*. Zabeleženo je tudi, da je 60 % zdravil, ki učinkujejo proti tumorjem in infekcijam na trgu rastlinskega izvora (Rates, 2001).

Bolezni, ki se prenašajo s hrano, so velika skrb za živilsko industrijo, potrošnike in organizacije, ki skrbijo za varno hrano. Da bi izboljšali kakovost in obstojnost hrane, so v zadnjih letih naredili veliko raziskav naravnih protimikrobnih sredstev, ki bi zavirala bakterijsko in glivično rast. Podobno so potrošniki zelo zaskrbljeni nad varnostjo sintetičnih konzervansov v hrani. Kot posledica tega je povečano povpraševanje po naravnih snoveh, ki bi nadomeščale sintetične aditive v hrani. Zato je prišlo do iskanja protimikrobnih spojin iz naravnih virov. Naravne protimikrobne učinkovine lahko najdemo v rastlinah, živalih, bakterijah, algah in glivah (Gyawali in Ibrahim Salam, 2014).

Rastlinske komponente iz zelišč in začimb se uporabljajo že od nekdaj za začinjenje hrane, za terapevtsko medicino in kot konzervansi. Poleg tega, se uporabljajo v hrani za izboljšanje okusa, pikantnosti in barve. Zelišča in začimbe imajo tudi antioksidativne, protimikrobne, prehranske in zdravilne lastnosti. Komponente pridobljene iz rastlin so večinoma sekundarni metaboliti, večina teh je fenolov in oksigeniranih derivatov. Ti sekundarni metaboliti imajo različne prednosti, med njimi protimikrobne lastnosti proti patogenim in kvarljivim bakterijam. Glavne protimikrobne spojine iz rastlin so fenoli, fenolne kisline, kinoni, saponi, flavonoidi, tanini, kumarini, terpenoidi in alkaloidi (Gyawali in Ibrahim Salam, 2014).

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sintetizirati aromatske spojine. Večina teh so fenoli ali njihovi kisik-substituirani derivati. Vsaj 12.000 sekundarnih metabolizmov je izoliranih, kar naj bi bilo manj kot 10 %. Sekundarni metaboliti služijo kot obrambni mehanizem rastlin proti mikroorganizmom, insektom in rastlinojedom. Nekatere spojine dajejo rastlini vonj (terpenoidi), pigment (kinoni in tanini), okus (kapsaicin) (Cowan, 1999). V preglednici 1 so prikazane glavne protimikrobne spojine v rastlinah.

Preglednica 1: Glavne skupine protimikrobnih snovi izoliranih iz rastlin (Cowan,1999)

Razred	Podrazred	Primer
Fenolne spojine	• enostavni fenoli • fenolne kisline • kinoni • flavonoidi • flavoni • flavonoli • fanini • kumarini	• katehol, epikatehin • cimetna kislina • hipericin • krizin • absinon • totarol • elagitanin • varfarin
Terpenoidi, eterična olja		• kapsaicin
Alkaloidi		• berberin, piperin
Lektini, polipeptidi		• fabatin

Pri predelavi hrane je veliko stranskih produktov, kot so semena, tropine, lupine, kaše ali neuporabljeno meso. Večino teh produktov smatrajo za odpadke, vendar so raziskave pokazale, da so stranski produkti dober vir fenolnih komponent (polifenoli, tanini in flavonoidi), ki imajo tudi protimikrobno aktivnost. Stranski proizvodi sadja in zelenjave so potencialen vir mineralov, organskih kislin in fenolov. Tropine vsebujejo semena, olupke in stebila in so pomemben stranski proizvod, saj so bogat vir fenolnih spojin, flavonoidov, polifenolov, mineralov in prehranskih vlaknin. Te fenolne spojine imajo protimikrobno aktivnost proti širokemu spektru mikroorganizmov. Tako je na primer etanolni ekstrakt pomarančnih tropin v 10 % inhibiral rast bakterij družine Enterobacteriaceae, rodu *Salmonella*, vrste *S. aureus*, kvasovk in plesni v govejih pleskavicah v 48 urah pri 4 °C, kar pomeni, da so tropine lahko dobra izbira za podaljšanje obstojnosti živil. Podobno imajo lahko sadni olupki protimikrobno aktivnost. Olupki granatnega jabolka se uporabljajo v zeliščni medicini za zdravljenje različnih bolezni. Dokazno je, da ekstrakti iz olupkov granatnega jabolka inhibirajo rast patogenih bakterij vrst *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* in *B. cereus*, ki se prenašajo s hrano. Ekstrakt iz olupkov granatnega jabolka je bolj učinkovit proti grampozitivnim bakterijam (Gyawali in Ibrahim Salam, 2014). Primeri stranskih produktov, ki nastanejo pri predelavi živil, in imajo protimikrobno aktivnost, so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: Primeri stranskih produktov pri predelavi živil, ki imajo protimikrobno aktivnost (Gyawali in Ibrahim Salam, 2014)

Stranski produkti	Glavna komponenta
Olupki granatnega jabolka	fenoli in flavonoidi
Stranski produkti soka granatnega jabolka	fenoli, flavonoidi, tanini
Jabolčni olupki	polifenoli
Odpadki zelenega čaja	tanini
Paradižnikova semena	karatenoidi, saponini, fenoli
Grozdne tropine	fenolne kisline, flavonoidi
Oljčne tropine	fenoli
Mangova semena	fenolne komponente, nasičene maščobne kisline, tokoferoli
Ekstrakt mandljeve kože	polifenoli
Kutina lupina	polifenolne komponente: katehin, kamferol, klorogenska kislina
Krompirjevi olupki	klorogenska kislina, galska kislina
Ekstrakt grenivkinih semen	fenolne komponente: katehini, epikatehin, epikatehin-3-O-galat

2.1.1 *Alpinia katsumadai*

Semena rastline *A. katsumadai* so se uporabljala v tradicionalni kitajski medicini kot antiemetiki in za zdravljenje želodčnih težav. Zaradi njenega aromatičnega okusa se jo velikokrat uporablja v živilski industriji kot začimbo. Rastlina *A. katsumadai* vsebuje diaril heptanoide, flavonoide, monoterpene, seskviterpene, labdane in stilbene (Huang in sod., 2007). Začimba *A. katsumadai* ima status GRAS (generally recognized as safe) (Menghua, 2012). Ugotovljeno je bilo, da ima ekstrakt *A. katsumadai* antioksidativne in protivnetne učinke (Li in sod., 2011).

Alpinia spada v družino ingverjev *Zingiberaceae* in je razširjena predvsem na Kitajskem, v Indiji in v Polineziji. Poznamo približno 250 vrst rastline *Alpinia*. Rastlina *Alpinia* ima debele dišeče korenine z vonjem ingverja, iz katerih spomladi vzkljujejo novi poganjki. Njihovi listi so suličasti z resasto obliko. Rastline lahko zrastejo do 3 metre visoko in 0,9 metra v širino. Veliko vrst rastline *Alpinia* ima zdravilne učinke, še posebej so cenjene v tradicionalni medicini za zdravljenje hipertenzije, krčev, imajo pa tudi antioksidativni, bakteriostatičen, protivnetni, kardiovaskularni in fungistatičen učinek. Otok Hainan je eden večjih distributerjev rastline *Alpinia* na Kitajskem, saj jo tam raste okoli 80 %. Nan in sod. (2004) so s plinsko kromatografijo z masnim spektrofotometrom (GC-MS) analizirali kemijsko sestavo eteričnih olj iz listov in cvetov *A. katsumadai* (preglednica 3).

Preglednica 3: Sestavine eteričnega olja pridobljenega iz listov in cvetov *A. katsumadai* (Nan in sod., 2004)

Komponente eteričnega olja	List (%)	Cvet (%)
2-heptanol	0,7	0,2
Kamfen	1,2	0,7
Felandren	0,7	7,0
β -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-4-izoproil-2-ciklohesenol	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-cikloheksenon	0,4	0,1
Nonenal	0,2	< 0,1
Santalen	0,1	0,9
Kariofilen	2,3	1,7
Metilpentenil-2-norpinen	1,1	0,5
(Z)- β -farnesen	0,3	0,2
β -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

Se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 3: Sestavine eteričnega olja pridobljenega iz listov in cvetov *A. katsumadai* (Nan in sod., 2004)

Komponente eteričnega olja	List (%)	Cvet (%)
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-oktacedenamid	1,1	2,2
<i>n</i> -pentakosan	2,1	0,1

2.1.2 Epigalokatehin galat

Epigalokatehin galat (EGKG) je polifenol zelenega čaja, katerega učinkovitost pri preprečevanju raka kože je bila dokazana na celičnih kulturah, živalskih modelih in na človeški koži, vendar pa so molekularni mehanizmi njegovega delovanja še vedno nerazjasnjeni. Poleg lovljenja prostih radikalov mu pripisujejo še številne druge učinke. V kulturi keratinocitov je povečal izražanje genov za encime, ki sodelujejo v antioksidativni obrambi-glutation peroksidaze, γ -glutamyl-cistein sintetaze, hem oksidaze. V kulturi celic mišje povrhnjice je zaviral maligno preobrazbo celic, najverjetneje preko inhibicije AP-1. Razvoj kožnega raka naj bi, po rezultatih raziskav na kulturah keratinocitov, preprečeval tudi vzpodbujanje diferenciacije keratinocitov (Rozman in sod., 2006).

EGKG je najpomembnejši katehin, najden v listih zelenega čaja (*Camellia sinensis* L.). Farmakološki učinki tega močnega antioksidanta so bili preučevani v številnih znanstvenih raziskavah. Poleg antiangiogenega in protitumornega delovanja, izraža EGKG tudi imunomodulatorno delovanje, zmanjšal pa naj bi tudi nastanek toksičnih amiloidnih oligomerov, ki so eden od glavnih patoloških dejavnikov nastanka Alzheimerjeve bolezni (Emeršič in sod., 2013).

Dokazano je, da ima EGKG številne zdravilne učinke, protitumorne in protimikrobne učinke. EGKG ima zelo pomemben protimikrobni učinek proti grampozitivnim in gramnegativnim patogenim bakterijam ter glivicam, vključno z meticilin-odpornimi bakterijami vrst *Staphylococcus aureus* (MRSA) in večkratno odpornim *Acinetobacter baumannii* (MDR) (Gordon in Wareham, 2010).

EGKG je deklariran kot varna sestavina s strani FDA (ang. Food and Drug Administration). V zelenem čaju je 50-80 % katehinov EGKG, kar predstavlja 200-300 mg katehinov v skodelici zelenega čaja. Ostalih katehinov (katehin galat, galokatehin, galokatehin galat, epigalokatehin digalat) je občutno manj. EGKG deluje protimikrobno proti mikroorganizmom tako, da deluje na celične membrane, inhibira biosintezo celičnih sestavin ali poškoduje DNA. Najpomembnejši antioksidativni učinek je zelo pomemben

pri zdravljenju kroničnih bolezni (rak, kardiovaskularne bolezni, stres). EGKG preprečuje tudi staranje možganov in drugih nevrodegenerativnih bolezni, kot so Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen. Študije na živalih so pokazale, da je EGKG učinkovit element tudi pri preprečevanju razvoja sladkorne bolezni tipa 1 in 2 (Das in sod., 2014).

2.1.3 Rožmarin

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.), ki spada v družino ustnatic (*Lamiaceae*), je gosta, zimzelena, aromatična rastlina. Rastlina dobro uspeva v sredozemskih državah v dobro izsušenih tleh s pH 6,5-7,0. Visok je 90-200 cm z 2-4 cm velikimi koničastimi in lepljivimi listi. Na zgornji strani so temno zeleni, spodaj pa belkasti in dlakavi. Cvetovi so svetlo modre barve. Iz listov, cvetov in vejic lahko pridobimo eterična olja in oleorezin, ki so zelo cenjeni v tradicionalni medicini, moderni medicini, aromaterapiji in v industriji parfumov in arom. Zelo je uporaben tudi v kulinariki (Peter in Nirmal Babu, 2004).

Rožmarinovo olje vsebuje 1,8-cineol (30-40 %), kamfor (15-25 %), borneol (16-20 %), bornilacetat (do 7 %), α -pinen (25 %) in druge spojine (β -pinen, linalool, kamfen, sabinen, mircen, α -felandren, α -terpinen, limonen, *p*-cimen, terpinolen, terpinen-4-ol, α -terpineol in drugi). Rožmarinov ekstrakt in eterično olje se lahko uporabljata za stabilizacijo maščob, masla, maščob in olj v hrani, saj preprečujeta oksidacijo in žarkost (Peter in Nirmal Babu, 2004).

Rožmarin je zelo znan po antioksidativnem, protimikrobnem, protivirusnem, protivnetnem in antikancerogenem učinku (Ojeda-Sana in sod., 2013). Rastlina je bogat vir fenolnih spojin, ki imajo velik protimikrobni učinek proti gramnegativnim in grampozitivnim bakterijam. Karnozolne kisline in karnozol imata tudi največji protimikrobni učinek (Issabeagloo in sod., 2012).

2.2 IZBRANE PATOGENE BAKTERIJE

Za naše diplomsko delo smo izbrali bakterije vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*. Vse te bakterije so za nas zelo zanimive, saj se prenašajo s hrano in velikokrat pride do raznih alimentarnih okužb in zastrupitev. Po poročilu EFSA (2013) je bilo 31,3 % vzorcev piščančjega mesa kontaminiranih z bakterijami rodu *Campylobacter*. Z bakterijami vrste *L. monocytogenes* so bili kontaminirani ribji izdelki, fermentirane klobase in siri, z verotoksičnimi bakterijami vrste *E. coli* pa goveje in piščančje meso, surovo mleko, sir, maslo in zelenjava.

2.2.1 Bakterije vrste *Escherichia coli*

Bakterije vrste *Escherichia coli* so prvič našli leta 1885 v iztrebkih zdravih posameznikov (Liu in sod., 2014).

Te bakterije je v poznem 19. stoletju prvič opisal bavarski pediater Theodor Escherich, po katerem se ta vrsta bakterij imenuje (Kaper in sod., 2004).

Bakterije vrste *E. coli* so gramnegativne fakultativno anaerobne bakterije in so tipične predstavnice enterobakterij (Schaechter, 2009). Živijo v spodnjem delu prebavil ljudi in toplokrvnih živali (Starčič-Erjavec in sod., 2008). V iztrebkih jih najdemo v koncentraciji 10^7 - 10^8 živih organizmov v 1 g (Schaechter, 2009).

Kljub temu, da so bakterije vrste *E. coli* del normalne humane flore, lahko nekateri sevi teh bakterij povzročijo okužbe. Pestrost obolenj, v katere so vpleteni različni sevi bakterij vrste *E. coli*, je precejšnja, saj lahko povzročajo npr. drisko, vnetje sečnika in ledvic, pljučnico, vnetje možganskih ovojnic in okužbe ran. Patogeni sevi se razlikujejo od nepatogenih po tem, da imajo v svojem genomu genske zapise za virulentne dejavnike (na primer za toksine, adhezine, kapsule). Okužba sečil je ena izmed najpogostejših bakterijskih infekcij in uropatogeni sevi bakterij vrste *E. coli* (UPEC) so glavni vzrok (Kaper in sod., 2014). UPEC povzročajo približno 80 % okužb sečil. Sposobnost sevov UPEC, da povzročajo bolezni, je odvisna od mnogih dejavnikov, kot so adhezini, toksini in drugi (Starčič-Erjavec in sod., 2008).

Večina izolatov bakterij vrste *E. coli* je neškodljivih, najdemo pa tudi nekaj zelo nevarnih in prilagojenih sevov, ki pa imajo sposobnost, da povzročijo veliko človeških bolezni, kot so črevesne bolezni (gastroenteritis), okužbe sečil in neonatalni meningitis. Sevi *E. coli*, ki so odgovorni za enterične (črevesne) bolezni, delimo na enterotoksigene *E. coli* (ETEC), enteropatogene *E. coli* (EPEC), enterohemoragične *E. coli* (EHEC), enteroagregativne *E. coli* (EAEC), Šiga-toksin-proizvajajoče *E. coli* (STEC), enteroagregativne *E. coli* (EAEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), difuznoadherentne *E. coli* (DAEC) in adherentno-invazivne *E. coli* (AIEC) (Liu in sod., 2014). ETEC izločajo toplotno labilni enterotoksin (TL), ki je podoben kolerinemu toksinu. Posledica je obilna vodena driska. ETEC povzročajo drisko pri dojenčkih in majhnih otrocih. Sevi ETEC pogosto povzročajo potovalno drisko, prenašajo se predvsem s hrano in vodo, le redko s stikom. Za EPEC je značilno lokalno pritrdjevanje s fimbrijami na površino sluznice tankega črevesa. Sevi se tesno pritrdijo na mikroviluse enterocitov in jih uničijo. EPEC povzročajo sporadične primere in izbruhe driske pri otrocih do 3. leta starosti. EHEC izločajo toksine, ki so zelo podobni Šigovim toksinom *Shigella dysenteriae* serotipa 1. Najbolj znan serotip iz te skupine je *E. coli* 0157:H7. Vir teh bakterij so prebavila govedi. Prenašajo se s kontaminirano hrano, predvsem z izdelki iz mletega govejega mesa in vodo. Pri EAEC se sevi pritrdjujejo v značilnem vzorcu na celice in izločajo enterotoksin. Povzročajo dolgotrajno drisko pri otrocih. Bakterije EIEC so po biokemičnih lastnostih in sposobnosti invazije zelo podobne šigelam. Pripnejo se na mikroviluse enterocitov, ki so na površini sluznice tankega črevesa, in jih uničijo (Andlovic, 2002a). Bakterije AIEC najdemo v tankem črevesu pacientov s kronično Chronovo boleznijo (Strober, 2011).

2.2.2 Bakterije vrste *Listeria monocytogenes*

Bakterije vrste *Listeria monocytogenes* je prvič izoliral Murray leta 1924 iz zajcev in morskih prašičkov (Dortet in sod., 2009).

Rod *Listeria* ima 6 vrst: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* in *L. grayi* (Volokhov in sod., 2002).

So grampozitivne, fakultativne patogene bakterije. Lahko rastejo pri temperaturi $-0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, v območju pH med 4,0 in 9,6 in a_w do 0,90 v aerobnih in anaerobnih razmerah (Välimaa in sod., 2015). Z listerijami so lahko kontaminirana tudi živila, zlasti meso, perutnina in mlečni izdelki (Liu in sod., 2015). Uniči jih že 30-minutno segrevanje pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Müller-Premru, 2002). Velik problem kontaminacije hrane z bakterijo vrste *L. monocytogenes* je njena sposobnost razmnoževanja pri temperaturi hladilnika (Liu in sod., 2015).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so pomembne patogene bakterije, ki se lahko prenašajo na ljudi preko uživanja kontaminiranih živil (Spanu in sod., 2015). Bakterije vrste *L. monocytogenes* so najpogostejši vzrok hospitalizacije in smrti v Evropi (EFSA, 2013).

Pogosto jih najdemo v tleh, odtokih ter opremi in je sposobna preživeti več let v različnih nišah v predelovalni industriji, kljub rednemu čiščenju in razkuževanju (Spanu in sod., 2015).

Listerije so primarno živalske patogene bakterije. V naravi jih najdemo v vodi, odplakah, na rastlinah ter v živalskem in človeškem blatu. Obolevajo ovce in govedo, pri katerih se infekcije kažejo kot abortus, encefalitis in sepsa. Večino okužb povzročajo prav bakterije *L. monocytogenes* (Müller-Premru, 2002). Okužbe pri ljudeh so najpogostejše sporadične, opisane pa so tudi epidemije s kontaminirano hrano. Človek se okuži na več načinov, običajno oralno (vstopno mesto so prebavila), redkeje z neposrednim stikom z okuženo živaljo (vstopno mesto je koža) ali aerogeno (vstopno mesto je očesna veznica). Plod se običajno okuži preko placentе (transplacentarno), redkeje ob porodu pri prehodu skozi porodno pot. V razvitem svetu letno zbolijo 0,5 do 0,8 oseb na 100.000 prebivalcev (Müller-Premru, 2002). Patogeneza je odvisna od mesta vstopa listerij v gostitelja. Na potek vplivajo število bacilov, njihova virulenca in gostiteljeva obrambna sposobnost. Vstop v gostiteljeve celice in preživetje znotraj celic jim omogočajo toksini in encimi. Bakterije vrste *L. monocytogenes* tvorijo 4 toksine: listeriolizin O (hemolizin), faktor, ki omogoča bakterijam vstop v celice, fosfolipazo C in citolizin (Müller-Premru, 2002).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* povzročajo sistemsko listeriozo, spontani splav in neonatalno listeriozo. Pojav listerioze je precej redek, 2-8 primerov na milijon prebivalcev, vendar je stopnja smrtnosti do 30 %. 99 % primerov človeške listerioze je bilo povezanih z uživanjem kontaminirane hrane (Liu in sod., 2015).

2.2.4 Bakterije vrste *Campylobacter jejuni*

Kampilobakterji so ukrivljeni gramnegativni bacili, imajo oksidazo in katalazo ter so gibljivi zaradi polarnih flagel. So mikroaerofilni in dobro uspevajo samo v atmosferi z manj kisika in več CO_2 , od 5 do 10 %. Bakterije vrst *C. jejuni*, *C. coli* in *C. lari* so poleg tega še termofilne, saj bolje rastejo med 37 in $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, ne pa pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Andlovic, 2002b). *Campylobacter jejuni* so gramnegativne, nesporogene, mikroaerofilne, spiralne bakterije (Parkhill in sod., 2000). Bakterije vrste *C. jejuni* se ne morejo razmnoževati v živilih v normalnih razmerah shranjevanja in so občutljive na okoljske dejavnike, kot so kisik, sušenje in vročina. Te bakterije ne morejo rasti pod $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, lahko pa preživi več mesecev pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Guévremont in sod., 2015).

Kampilobakterji so v naravi zelo razširjeni in živijo kot komenzali ali povzročitelji bolezni v prebavilih, sečilih in rodilih številnih domačih in divjih živali (govedo, ovce, prašiči, perutnina, koze, psi, mačke, glodalci in zlasti različne ptice). Bolezni, ki jih povzročajo, imenujemo kampilobakterioze. To so zoonoze, ki so zelo razširjene po vsem svetu. Človek se okuži z uživanjem kontaminirane hrane, vode ali mleka in z neposrednim stikom z okuženimi živalmi. Možen je tudi neposredni prenos med ljudmi. Opisani so izbruhi v družinah in večje epidemije (Andlovic, 2002b).

Nedavna raziskava v Kanadi je pokazala, da so bakterije vrste *C. jejuni* tretja najpogostejša patogena bakterija, ki se prenaša s hrano, za norovirusom in bakterijami vrste *Clostridium perfringens*. Študija je pokazala, da je bilo okoli 145.000 primerov bakterijskega gastroenteritisa med 32,5 milijona prebivalci. Večina okužb z bakterijami vrste *C. jejuni* je sporadičnih, zato je težko določiti vzrok kontaminacije (Guévremont in sod., 2015). Bakterije vrste *C. jejuni* se trenutno smatrajo kot glavni vzrok bakterijskega gastroenteritisa v razvitem svetu. Večina primerov je povezanih z uživanjem ali s stikom onesnažene perutnine, surovim mlekom, domačimi živalmi in živalmi iz kmetije (Magajma in Schraft, 2015). V manj razvitih državah zbolevalo predvsem otroci do 2 let, v razvitih pa mladi odrasli (18 do 45 let). Kampilobakterji povzročajo tudi potovalne driske. Največ zbolevanj je v toplejših mesecih (Andlovic, 2002b). V Sloveniji je kampilobakterijski enteritis druga najpogostejša bolezen, ki se prenaša s hrano, za salmonelozo (Zorman in sod., 2006).

Črevesne okužbe povzročajo le gibljivi sevi, ki so se sposobni pritrditi na črevesno sluznico. Kampilobakterji so invazivne bakterije in izdelujejo več toksinov. Bakterije vrste *C. jejuni* izdelujejo toplotno občutljiv enterotoksin (TL), ki je soroden toksinu vibrija kolere, in citoksin. Lipopolisaharid v zunanji membrani ima endotoksično delovanje. Medtem ko bakterije vrste *C. jejuni* redko povzročajo bakteriemijo, se bakterije vrste *C. fetus* subsp. *fetus* pogosto razširijo iz prebavil v krvni obtok. Značilno je uničenje površine sluznice v jejunumu, ileumu in kolonu. Sluznica je vneta in infiltrirana z nevtrofilci (Andlovic, 2002b).

Okužbe prebavil z bakterijami vrste *C. jejuni* potekajo kot vodena driska, v hujši obliki kot krvava driska. Bolj ogroženi so posamezniki s pomanjkanjem želodčne kisline. Bolnik ima značilne bolečine v trebuhu, se slabo počuti in ima lahko vročino. Bolezen poteka kot kratkotrajna driska; v hujših primerih traja dlje kot teden dni. Zapleti so redki in se pojavljajo kot zunaj črevesna vnetja, npr. meningitis. Možni zapleti so še sepsa, reaktivni artritis, nodozni eritem idr. (Andlovic, 2002b).

Poleg preprečevanja okužb pri živalih so najučinkovitejši ukrepi preprečevanja kampilobakterioze higiena pri pripravi mesa, pravilna toplotna obdelava mesa, pasterizacija mleka in kloriranje vode (Andlovic, 2002b).

Bakterije vrste *C. jejuni* lahko preidejo v nekultivabilno stanje oz. stanje VNBC (ang. viable-but non-culturable) kot posledica različnih dejavnikov: stradanje, nizka temperatura in nizek pH. VNBC bakterije vrste *C. jejuni* so bolj odporne na sredstva za razkuževanje kot aktivno rastoče celice, saj lahko preživijo v stanju VNBC do 7 mesecev (Magajma in Schraft, 2015).

2.3 METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA

Metode za določanje protimikrobne aktivnosti lahko opredelimo kot difuzijske, dilucijske ali avtobiografske. Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) večina raziskovalcev navaja kot merilo za protimikrobno aktivnost eteričnih olj. Ker različne publikacije in avtorji definirajo MIC različno, pride do težav pri primerjanju rezultatov različnih raziskav in študij. V nekaterih primerih pride do tega, da sta minimalna baktericidna koncentracija (MBC) ali bakteriostatična koncentracija zelo podobni MIC. V preglednici 4 so prikazani najbolj pogosti pojmi in njihove definicije pri vrednotenju protimikrobne aktivnosti, medtem ko so v preglednici 5 podane nekatere metode za vrednotenje protimikrobne učinkovitosti eteričnih olj (Burt, 2004).

Preglednica 4: Izrazi, ki se uporabljajo pri vrednotenju protimikrobnega delovanja (Burt, 2004)

Izraz	Definicija
minimalna inhibitorna koncentracija (MIC)	• najmanjša koncentracija snovi, ki preprečuje razmnoževanje ali zniža živost inokuluma • najmanjša koncentracija snovi, ki popolnoma prepreči razmnoževanje izbranega mikroorganizma za vsaj 48 ur • najmanjša koncentracija, ki prepreči vidno rast izbranega mikroorganizma • najmanjša koncentracija, ki povzroči značilno zmanjšanje živosti izbranega mikroorganizma (> 90 %)
minimalna baktericidna koncentracija (MBC)	• koncentracija izbrane snovi, ki ubije 99,9 % ali več začetnega števila inokuluma • najmanjša koncentracija snovi, pri kateri po precepljanju na sveže gojišče ne opazimo rasti
bakteristatična koncentracija	• najmanjša koncentracija snovi, pri kateri ni rasti mikroorganizmov, se pa razmnožujejo po precepljanju na sveže gojišče
baktericidna koncentracija	• najmanjša koncentracija snovi, pri kateri ni rasti mikroorganizmov in ti ne rastejo niti po precepljanju na sveže gojišče

Preglednica 5: Pregled nekaterih metod za določanje protimikrobne aktivnosti (Burt, 2004)

Metoda	Namen
• metoda difuzije v trdem gojišču z diski • metoda difuzije v trdem gojišču z luknjicami	Določitev protimikrobne aktivnosti.
• razredčevalna metoda v trdem gojišču • razredčevalna metoda v tekočem gojišču	Določitev protimikrobne aktivnosti.
• rastna krivulja	Določitev hitrosti in časa protimikrobne aktivnosti.
• elektronska mikroskopija	Opazovanje morfoloških sprememb zaradi protimikrobne aktivnosti.

2.4 KOMBINACIJE PROTIMIKROBNIH SREDSTEV

Za konzerviranje hrane se je običajno uporabljalo samo eno protimikrobno sredstvo, zadnje čase pa se vse bolj uporabljajo kombinacije protimikrobnih sredstev, ki zagotavljajo večjo protimikrobno aktivnost. Metode, ki se uporabljajo za testiranje kombinacij protimikrobnih sredstev so metoda difuzije v trdem gojišču, razredčevalna metoda v tekočem gojišču ali rastna krivulja (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005).

Za opis protimikrobnih interakcij med dvema ali več snovmi, uporabljamo izraze aditiven, antagonističen in sinergističen. Do aditivnosti pride, ko je vsota aktivnosti dveh protimikrobnih snovi enaka vsoti aktivnosti posameznih protimikrobnih snovi in pri tem ne pride do povečanja ali zmanjšanja aktivnosti kombinacije protimikrobnih snovi v primerjavi s posameznimi protimikrobnimi snovmi. Antagonizem pomeni zmanjšanje aktivnosti kombiniranih protimikrobnih sredstev v primerjavi s posameznimi protimikrobnimi snovmi. Pri sinergizmu gre za povečanje ali izboljšanje celotne protimikrobne aktivnosti, ko je vsota aktivnosti dveh protimikrobnih sredstev večja kot vsota aktivnosti posameznih protimikrobnih sredstev (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005). Gardner (1977) navaja, da je sinergizem zelo redek pri kombinaciji protimikrobnih sredstev.

Za vrednotenje delovanja dveh ali več protimikrobnih snovi se uporablja frakcijska inhibitorna koncentracija (FIC), ki jo izračunamo po enačbi (1) oziroma (2) in nato skupno delovanje določimo po enačbi (3) kot indeks frakcijske inhibitorne koncentracije (FICI) (Yap in sod., 2013).

$$FICa = \frac{\text{MIC kombinacije dveh protimikrobnih snovi}}{\text{MIC protimikrobne snovi a}} \quad \dots(1)$$

$$FICb = \frac{\text{MIC kombinacije dveh protimikrobnih snovi}}{\text{MIC protimikrobne snovi b}} \quad \dots(2)$$

Legenda:

FICa.... frakcijska inhibitorna koncentracija protimikrobne snovi a

FICb.....frakcijska inhibitorna koncentracija protimikrobne snovi b

MIC.....minimalna inhibitorna koncentracija

$$FICI = FICa + FICb \quad \dots(3)$$

Legenda:

FICI...indeks frakcijske inhibitorne koncentracije

FICa in FICb sta frakcijski inhibitorni koncentraciji protimikrobnih sredstev a in b

Definicije aktivnosti protimikrobnih kombinacij (Yap in sod., 2013)

- $FICI > 0,5-4,0$ni interakcije
- $FICI > 4,0$antagonizem
- $FICI \leq 0,5$sinergizem

Dejavniki, ki lahko vplivajo na protimikrobno aktivnost so (Lopez-Malo Vigil in sod., 2005):

- vrsta bakterij: sev, velikost inokuluma, fiziologija celice, gojišče, protimikrobno sredstvo,
- vrsta medija: pH, vodna aktivnost, redoks potencial, atmosferski CO₂,
- okoljski parametri pri izvedbi poskusa: razmere pri inkubaciji (na primer-temperatura, čas, sestava plinske faze), variabilnost uporabljene opreme.

2.5 SENZORIČNA ANALIZA

Senzorična analiza je opisovanje in ocenjevanje lastnosti nekega živila s človekovimi čutili: vidom, okusom, vohom, sluhom in tipom oziroma dotikom. Kot merilni instrument nam v senzorični analizi služijo človekova čutila: oči, nos, usta, ušesa. V njih so nameščeni receptorji za zaznavanje videza, barve, okusa, vonja, temperature, pookusa. Senzorična analiza obsega niz različnih tehnik in načinov, ki omogočajo natančno merjenje človekovega odziva na hrano, minimalizirajo možne stranske učinke ocenjevanega izdelka ter minimizirajo zunanje učinke, ki vplivajo na preskuševalčevo oz. potrošnikovo zaznavo (Golob in sod., 2006).

Cilj senzorične analize je definirati posamezne senzorične lastnosti in zagotoviti pomembne ter uporabne informacije različnim profilom živilske stroke, tako tistim, ki izdelek razvijajo, kot tudi tistim, ki imajo kot potrošniki možnost vplivati na senzorične lastnosti izdelka (Golob in sod., 2006).

S senzorično analizo lahko ugotovimo (Skvarča, 1999):

- stopnjo odličnosti senzoričnih lastnosti,
- stopnjo izraženosti posameznih specifičnih lastnosti (videz, barva, aroma),
- stopnjo uglasenosti (harmonijo) med posameznimi komponentami v enotno zaznavo jedi (aroma, tekstura).

2.5.1 Senzorični preskuševalci

Panel ali skupino senzoričnih preskuševalcev sestavljajo člani panela, ki jih je potrebno ustrezno izbrati, izšolati ter preverjati. Senzorično analizo lahko izvajajo trije tipi preskuševalcev glede na njihove sposobnosti zaznavanja, razlikovanja, stopnjo šolanja in izkušnje (Golob in sod., 2006):

- preskuševalci (laiki ali preskuševalci začetniki) – so ljudje, ki še niso delali po natančnih kriterijih ali začetniki, ki so že sodelovali v senzoričnem ocenjevanju,
- izbrani preskuševalci – kandidati, ki so bili izbrani in šolani za ocenjevanje z določeno senzorično metodo in za delo na določenem področju,
- izvedenci ali strokovnjaki (eksperti) so lahko izvedeni preskuševalci, ki so pri delu v panelu pokazali določeno ostrost svojih čutov in razvili dober, dolgotrajen spomin ali specializirani izvedeni preskuševalci, ki uporabljajo specialno znanje, pridobljeno na določenih strokovnih področjih.

2.5.2 Senzorične metode

Senzorične metode v glavnem delimo na hedonske in analitične (preglednica 6). Obe vrsti preskusov sta v medsebojni zvezi, vendar ima vsaka svoje značilnosti, prednosti in omejitve tako glede izvedbe, kot tudi zahtev po potrebnem predhodnem znanju. Kateri preskus izberemo, je odvisno od problema, ki ga želimo rešiti (Golob in sod., 2005).

Preglednica 6: Pregled senzoričnih preskusov (Golob in sod., 2005)

Vrsta preskusov	Preskusi	Vprašanje	Značilnosti preskuševalcev
Hedonski	Afektivni	Kako ti je vzorec všeč? Kateri vzorec je bolj sprejemljiv?	Izbrani za določeno vrsto izdelka, nešolani.
Analitični	Preskusi razlikovanja	Ali se vzorci med seboj razlikujejo?	Izbrani glede na senzorične sposobnosti.
	Preskusi z uporabo lestvic	Kako bi z uporabo lestvice ocenili določeno senzorično lastnost v vzorcih ali ugotovili sprejemljivost vzorcev?	Izbrani glede na senzorične sposobnosti, šolani ali nešolani.
	Opisna analiza	Kakšne so razlike v eni ali več senzoričnih lastnosti?	Izbrani glede na senzorične sposobnosti in motivacijo, šolani ali celo visoko usposobljeni.

2.5.2.1 Opisna ali deskriptivna analiza

Opisna analiza je postopek opisovanja zaznanih senzoričnih lastnosti izdelka, običajno v takem vrstnem redu, kot jih zaznavamo. Je popoln senzorični opis, ki upošteva vse občutke, zaznane med ocenjevanjem izdelka (vidne, slušne, vohalne, tipne, itd.). Opisna analiza je torej metoda pri kateri senzorične lastnosti izdelka (hrane, pijače) identificiramo, jih opišemo z besedo in nato tudi kvantitativno ovrednotimo. Poznamo kvalitativne in kvantitativne deskriptivne metode. Vse veljajo za bolj ali manj objektivne metode, saj jih izvajajo le visoko usposobljeni senzorični preskuševalci. Opisne analize nikdar ne izvajamo s potrošniki, za vse opisne metode se zahteva izšolan panel, ki je v svojih ocenah dosleden in ponovljiv. Opisna analiza temelji na dejstvu, da je senzorični vtis, ki ga pri ocenjevanju vzorca zazna preskuševalec, sestavljen iz številnih prepoznavnih, močnejše ali slabše izraženih senzoričnih lastnosti. Te lastnosti lahko opišemo z opisom-deskriptorjem. Deskriptor je definiran izraz (beseda ali opis), s katerim preskuševalec opiše zaznavo. Značilnost vsakega deskriptorja je, da omogoča ocenjevanje na neki intenzivnostni lestvici (Golob in sod., 2006).

2.5.3 Uporaba senzorične analize

Senzorična analiza je vsestransko uporabna pri (Golob in sod., 2006):

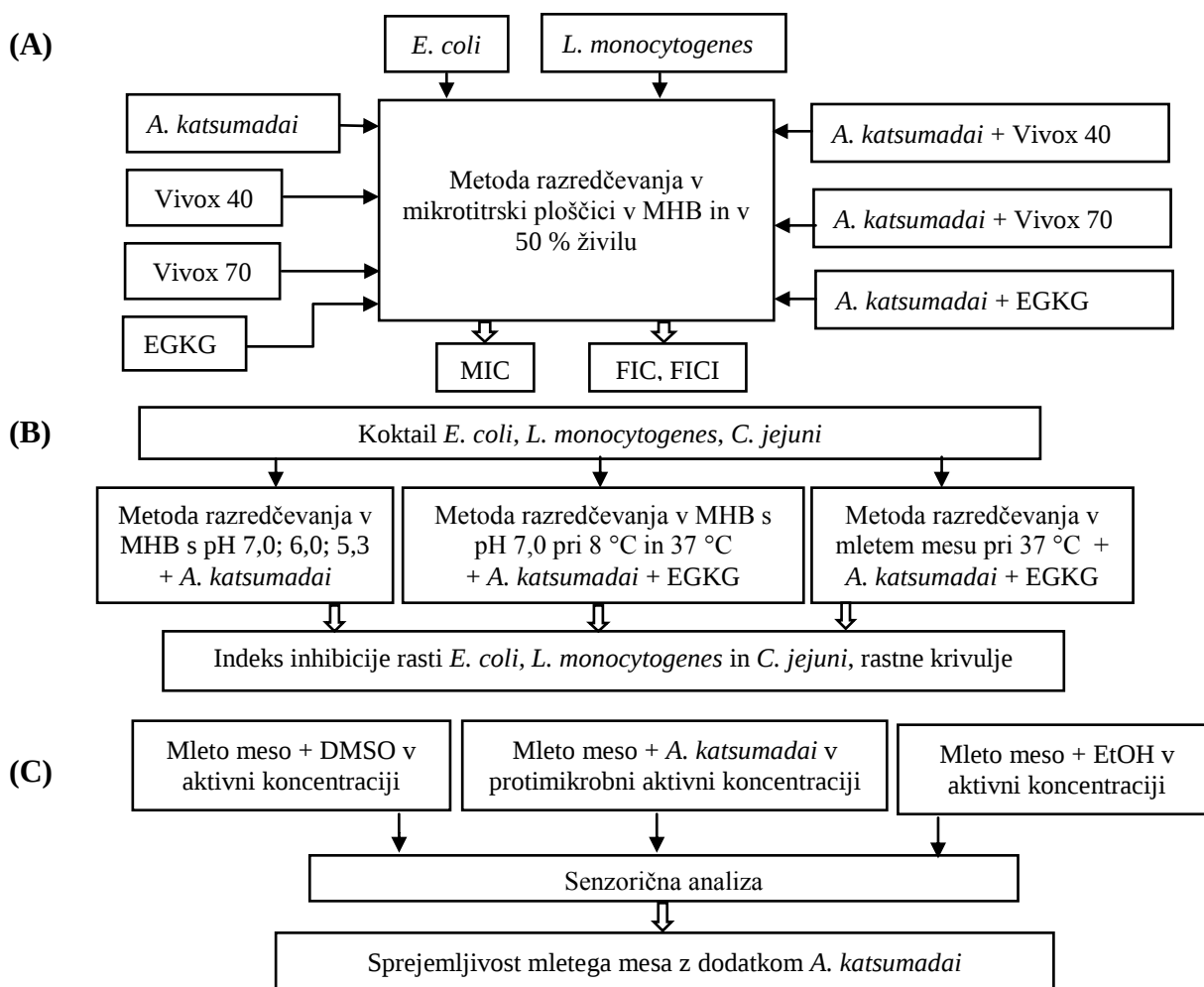
- kontroli kakovosti osnovnih surovin in končnih izdelkov,
- spremljanju kakovosti izdelkov med skladiščenjem,
- analizi konkurenčnih izdelkov,
- proučevanju vzrokov določenih sprememb v barvi, vonju, okusu, aromi in teksturi,

- primerjanju senzoričnih lastnosti izdelka z njegovimi instrumentalnimi, kemijskimi ali fizikalnimi metodami,
- tržnih raziskavah,
- različnih hedonskih analizah (ugotavljanje sprejemljivosti izdelka za potrošnika).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA

Namen našega eksperimentalnega dela je bil ugotoviti protimikrobno aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* v mletem mesu. Eksperimenti so bili izvedeni v 3 sklopih (slika 1).



Legenda:

MHB: tekoče gojišče Mueller Hillton, EGKG: epigalokatehin galat, DMSO: dimetilsulfoksid, EtOH: etanol, MIC: minimalna inhibitorna koncentracija, FIC: frakcijska inhibitorna koncentracija, FICI: frakcijski inhibitorni indeks

Slika 1: Shema eksperimentalnega dela

V prvem sklopu (A) smo preverili protimikrobno aktivnost ekstraktov *A. katsumadai*, Vivox 40, Vivox 70 in čiste komponente EGKG ter kombinacije ekstraktov v gojišču MHB in 50 % živilu. V drugem sklopu (B) smo preverili vpliv pH in temperature na učinkovitost delovanja kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v gojišču MHB in mletem mesu. V zadnjem sklopu (C) smo s senzorično analizo mletega mesa z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* preverili možnosti za uporabo v živilu. Shematski potek dela je prikazan na sliki 1.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterije

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili bakterije vrst:

- *Listeria monocytogenes* ŽM58 (IHM 4b), nemški referenčni sev
- *Escherichia coli* ŽM370 (ATTC 11229), tipski sev
- *Campylobacter jejuni* (NTCT 11168), referenčni sev

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Gojišče EMB

Sestavine:

- osnovni medij Levine EMB Agar (40145012, Biolife, Milano, Italija)
- destilirana voda

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 21,25 g gojišča EMB. Vsebino smo dobro premešali in sterilizirali 20 minut v avtoklavu pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke ter jih shranili v hladilnik.

Gojišče OXFORD

Sestavine:

- osnovni medij OXFORD (1.07004, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- destilirana voda
- selektivni dodatek (Oxford Listeria Selektiv Supplement, 1.07006, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- etanol
- sterilna destilirana voda

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 29,25 g gojišča Oxford. Vsebino smo dobro premešali in 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C, aseptično dodali Oxford Listeria Selektiv Supplement, v katerega smo predhodno dodali 2,5 ml etanola in 2,5 ml sterilne destilirane vode. Nato smo gojišče aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke ter jih shranili v hladilnik.

Gojišče Columbia

Sestavine:

- osnovni medij Columbia (Columbia Agar Base, CM331, Oxoid, Hampshire, Anglija)
- destilirana voda
- sterilna defibrinirana konjska kri (SR048C, Oxoid, Hampshire, Anglija)
- dodatek za rast (Campylobacter Growth Supplement, SR232E, Oxoid, Hampshire, Anglija)
- dodatek za selektivnost (Columbia Selective Supplement, SR069, Oxoid, Hampshire, Anglija)

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 19,5 g osnovnega medija Columbia. Vsebino smo dobro premešali in 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in aseptično dodali 25 ml defibrinirane konjske krvi, 1 stekleničko dodatka za rast in 1 stekleničko dodatka za selektivnost. Vsebino smo dobro premešali in jo aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke ter jih shranili v hladilnik.

Gojišče AHB

Sestavine:

- osnovni medij (Bacto TM Heart Infusion Agar, CM375, Oxoid, Hampshire, Anglija)
- kvasni ekstrakt (Yeast Extract, CM19, Oxoid, Hampshire, Anglija)
- destilirana voda
- dodatek za rast (Campylobacter growth supplement, SR232E, Oxoid, Hampshire, Anglija)
- kromogeno barvilo tetrazolijev klorid (TTC, T8877, Sigma-Aldrich, Nemčija)

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 20 g osnovnega medija in 1 g kvasnega ekstrakta. Vsebino smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in aseptično dodali 1 stekleničko dodatka za rast in 5 ml kromogenega barvila. Še tekoče gojišče smo dobro premešali in ga aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke ter jih shranili v hladilnik. Zaradi občutljivosti TTC na svetlobo, smo gojišča hranili v temi.

Gojišče ALOA

Sestavine:

- osnovni medij ALOA (Agar Listeria acc. to Ottaviani & Agosti, 4016052, Biolife, Milano, Italija)
- selektivni dodatek (ALOA enrichment selective supplement, 423501, Biolife, Milano, Italija)
- destilirana voda

- etanol
- sterilna destilirana voda

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 35,3 g osnovnega medija. Vsebino smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in aseptično dodali selektivni dodatek ALOA ter 2,5 ml etanola in 2,5 ml sterilne destilirane vode. Sestavine smo dobro premešali in aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke ter jih shranili v hladilnik.

Gojišče TBX

Sestavine:

- osnovni medij (Tryptone Bile X – Glucuronide Agar, 5121562, Biolife, Milano, Italija)
- destilirana voda

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 15,5 g osnovnega medija. Vsebino smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke ter jih shranili v hladilnik.

Gojišče MHB

Sestavine:

- osnovni medij (Mueller-Hillton-Broth, 1.10293, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- destilirana voda

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 10,5 g osnovnega medija. Vsebino smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke ter jih shranili v hladilnik.

Gojišče MHA

Sestavine:

- osnovni medij (Mueller Hinton Agar, 1.05435, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- destilirana voda

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 19 g osnovnega medija. Vsebino smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke ter jih shranili v hladilnik.

Gojišče BPW

Sestavine:

- osnovni medij (Buffered Peptone Water, CM0509, Oxoid, Hampshire, Anglija)
- destilirana voda

Priprava:

V 500 ml destilirane vode smo zatehtali 10 g osnovnega medija. Vsebino smo dobro premešali in sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili in ga shranili v hladilnik.

Fiziološka raztopina

Sestavine:

- kalijev dihidrogen fosfat-KH₂PO₄ (1.04873, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- destilirana voda

Priprava:

3,4 g KH₂PO₄ smo raztopili v 100 ml destilirane vode. Vzeli smo 1,25 ml te raztopine in jo razredčili v 1000 ml destilirane vode. Vsebino smo dobro premešali in jo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C.

3.2.3 Priprava snovi s protimikrobnim delovanjem

3.2.3.1 Ekstrakt *Alpinia katsumadai*, Vivox 40 in Vivox 70

Ekstrakte *A. katsumadai* (etanolni, heksanolni, diklorometanolni in metanolni) smo pridobili v sodelovanju s prof. dr. Franzem Bučarjem iz Inštituta za Farmacevtske znanosti (Gradec, Avstrija). Ekstrakta Vivox 40 in Vivox 70 smo pridobili od podjetja Vitiva d.o.o., Markovci.

Priprava:

Raztopine *A. katsumadai*, Vivox 40 in Vivox 70 smo pripravili tako, da smo zatehtali približno 20 mg ekstrakta in mu dodali predhodno izračunan volumen DMSO, ker smo želeli začetno koncentracijo ekstrakta 16,384 mg/ml.

$$V(\text{DMSO}) = \frac{m}{\gamma} \quad \dots(4)$$

Legenda:

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

mmasa ekstrakta (mg)

γ.....začetna koncentracija ekstrakta (16,384 mg/ml)

Izračun koncentracije raztopine *A. katsumadai*:

$$C = \frac{m}{V(\text{DMSO})} \quad \dots(5)$$

Legenda:

C.....koncentracija ekstrakta v DMSO (mg/ml)

m.....masa ekstrakta (mg)

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

$$C_K = \frac{V_S * C}{0,500 \text{ ml}} \quad \dots(6)$$

Legenda:

C_K.....končna koncentracija (mg/ml)

V_S.....volumen STOCK (ml)

C.....koncentracija ekstrakta v DMSO (mg/ml)

3.2.3.2 Epigalokatehin galat

Priprava:

5 mg epigalokatehin galata (E4143-50MG, Sigma) smo zatehtali v 5 ml sterilno epruveto in dodali 0,5 ml absolutnega EtOH in dobro premešali na vrtničnem mešalu. Ko se je EGKG stopil, smo dodali še 1,5 ml sterilnega gojišča MHB. Koncentracija raztopine EGKG je znašala 5 mg/ml.

3.2.4 Druge kemikalije in dodatki

- Absolutni etanol (1.00983, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 96 % etanol (1.00971, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- DMSO – dimetilsulfoksid (1.0295, Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Barvilo INT – iodonitrotetrazolium klorid (18377-5G, Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.2.5 Mleto meso

Uporabili smo mleto mešano meso (goveje meso : svinjsko meso = 1:1) (Mercator, Slovenija).

3.2.6 Laboratorijska oprema

Poleg navedene laboratorijske opreme, ki je navedena v preglednici 7, smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo: mikrotitrne ploščice (Nunc, Danska), cepilne zanke, petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija), merilne valje (Plastibrand, Nemčija), steklene epruvete, laboratorijske steklenice 100 ml, 250 ml, 500 ml (Duran, Nemčija), centrifugirke ter drugo laboratorijsko steklovino.

Preglednica 7: Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri eksperimentalnem delu

Oprema	Oznaka	Proizvajalec
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Beograd
Avtomatske pipete in nastavki	10 µl, 100 µl, 1000 µl, 10 ml	Eppendorf, Nemčija, Gilson, Francija
Digestorij	Tip 382	Med-lab Rauh, Slovenija
Digitalna tehtnica	PB 1502-S	Mettler Toledo, Švica
Gnetilnik	Stomacher 400	Seward, Velika Britanija
Hladilnik	/	Zanussi, Japonska
Inkubator	I-115C	Kambič, Slovenija
Mikrovalovna pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
pH meter	SerenEosy pH	Mettler, Toledo, Švica
pH elektroda	Inlab Expert Pro pH	Mettler, Toledo, Švica
Omara za sušenje steklovine	SO-250	Elektromedicina Ljubljana, Slovenija
Plinska jeklenka z mešanico plinov	10 % CO ₂ , 3 % O ₂ , 87 % N ₂	Istragas, Slovenija
Plinski gorilnik	/	/
Stresalnik	Vibriomix 314 EVT	Tehtnica, Slovenija
Tehtnica	PB 1502-S	Mettler, Toledo, Švica
Zaščitna mikrobiološka komora	PIO SMBC 122 AV	Iskra, Slovenija
Zamrzovalnik	/	LTH, Slovenija
Žar	Tip 610.8	Silex, Hamburg, Nemčija

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija bakterij

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

Izolati bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* so bili pred pričetkom eksperimenta shranjeni na trdnem gojišču TSA v hladilniku pri 8 °C. S cepilno zanko smo ob ognju prenesli eno bakterijsko kolonijo v 4 ml MHB ter vsebino dobro premešali in jo 24 ur inkubirali pri 37 °C.

3.3.1.2 Bakterije vrste *C. jejuni*

Izolat bakterij vrste *C. jejuni* je bil pred pričetkom eksperimenta shranjen v skrinji pri temperaturi –80 °C. S cepilno zanko smo prenesli kulturo na gojišče Columbia in jih 24 ur inkubirali pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Po inkubaciji smo kolonijo precepili v 4 ml tekočega gojišča MHB, ki smo mu dodali 0,2 ml konjske krvi. Nato je sledila 24 urna inkubacija pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi.

3.3.2 Priprava inokuluma

3.3.2.1 Priprava posameznih kultur

Po 24-urni inkubaciji (3.3.1) smo 75 µl kulture bakterij vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* prenesli v 3 epruvete s 5 ml gojišča MHB. Tako smo pripravili inokulum, katerega smo uporabili za nadaljnji potek eksperimentalnega dela.

3.3.2.2 Priprava bakterijskega koktaila

Za pripravo bakterijskega koktaila smo prenesli po 150 µl 24-urnih (3.3.1) bakterijskih kultur *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* v 10 ml tekočega gojišča MHB. Predhodno smo 1 ml bakterij vrste *E. coli* prenesli v 9 ml fiziološke raztopine in od tu prenesli 150 µl v 10 ml tekočega gojišča MHB.

3.3.3 Priprava 50 % živila

Za pripravo 50 % živila smo zatehtali 150 g mletga mesa in 150 g ¼ BPW. Vsebino smo homogenizirali in 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C. Po sterilizaciji smo vsebino ohladili in jo ponovno homogenizirali. Nato smo jo prenesli v vrečko s filtrom za gnetilnik in jo še enkrat homogenizirali. Na koncu smo suspenzijo odpipetirali preko filtra v čisto, sterilno stekleničko. ¼ BPW smo pripravili tako, da smo v 500 ml destilirane vode zatehtali 2,5 g osnovnega medija BPW, premešali in 20 minut sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.

3.3.4 Izračun frakcijske inhibitorne koncentracije (FIC) in frakcijskega inhibitornega indeksa (FICI)

Za izračun frakcijske inhibitorne koncentracije (FIC) in indeksa frakcijske inhibitorne koncentracije (FICI) smo uporabili enačbe (1)-(3) (2.4).

3.3.5 Izračun indeksa inhibicije

Za izračun indeksa inhibicije smo uporabili enačbo (7).

$$IN (\%) = \left(\frac{N_K - N_P}{N_K} \right) * 100 \quad \dots(7)$$

Legenda:

INindeks inhibicije (%)

N_K.....povprečno število preživelih bakterij v kontrolnem vzorcu (log cfu/ml)

N_P.....povprečno število preživelih bakterij v vzorcu z dodano protimikrobno snovjo (log cfu/ml)

3.3.6 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici v gojišču MHB

V eksperimentu smo uporabili metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici, s katero smo določali minimalno inhibitorno koncentracijo čiste kulture v gojišču MHB in 50 % živilu.

Za izvedbo smo pripravili posamezne snovi s protimikrobnim delovanjem (Vivox 40, Vivox 70), bakterijsko kulture (*E. coli*, *L. monocytogenes*), pozitivno (50 µl gojišča MHB in 50 µl bakterijskega inokuluma) in negativno kontrolo (50 µl gojišča MHB in 50 µl protimikrobne snovi) ter slepi vzorec (100 µl gojišča MHB). Osnovno raztopino posamezne protimikrobne snovi smo pripravili s koncentracijo 4,104 mg/ml (3.2.3.1) in jo v mikrotitrski ploščici razredčili do koncentracije 0,016 mg/ml.

Preglednica 8: Primer mikrotitrške ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije ekstraktov Vivox 40 in Vivox 70

	Vivox40 <i>E. c.</i>	Vivox40 <i>E. c.</i>	Vivox40 <i>L. m.</i>	Vivox40 <i>L. m.</i>	Vivox70 <i>E. c.</i>	Vivox70 <i>E. c.</i>	Vivox70 <i>L. m.</i>	Vivox70 <i>L. m.</i>			Kontrola DMSO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	2,052	2,052	0,257	0,257	2,052	2,052	0,257	0,257	PK	PK	12,5 %
B	1,026	1,026	0,128	0,128	1,026	1,026	0,128	0,128	PK	PK	6,25 %
C	0,513	0,513	0,064	0,064	0,513	0,513	0,064	0,064	NK	NK	3,125 %
D	0,257	0,257	0,032	0,032	0,257	0,257	0,032	0,032	NK	NK	1,563 %
E	0,128	0,128	0,016	0,016	0,128	0,128	0,016	0,016	SV	SV	0,781 %
F	0,064	0,064	0,008	0,008	0,064	0,064	0,008	0,008	SV	SV	0,391 %
G	0,032	0,032	0,004	0,004	0,032	0,032	0,004	0,004			0,195 %
H	0,016	0,016	0,002	0,002	0,016	0,016	0,002	0,002			0,098 %

Legenda:

E. c.: *Escherichia coli*

L. m.: *Listeria monocytogenes*

PK: pozitivna kontrola

NK: negativna kontrola

SV: slepi vzorec

V luknjice prve vrstice mikrotitrške ploščice (od A1 do A8) (preglednica 8) smo odpipetirali 100 µl posamezne protimikrobne snovi, v vse ostale luknjice (B1 – H8, B2 – H8,...B3-H8) pa smo odpipetirali 50 µl gojišča MHB. Nato smo 50 µl iz A1 prenesli v B1 in osemkrat premešali ter tako nadaljevali do konca stolpca. Na koncu smo zadnjih 50 µl zavrgli. Ta postopek smo ponovili tudi v ostalih stolpcih (2-8). Ko smo protimikrobno snov razredčili do želene koncentracije, smo v vsako luknjico dodali 50 µl inokuluma (3.3.2). Mikrotitrsko ploščico smo nato 1 minuto stresali na stresalniku in jo 24 ur inkubirali pri 37 °C.

Na mikrotitrski ploščici smo pripravili tudi pozitivno kontrolo tako, da smo zamešali 50 µl gojišča MHB in 50 µl bakterijskega inokuluma in negativno kontrolo, kjer je bilo 50 µl gojišča MHB in 50 µl protimikrobne snovi.

Kontrolo za DMSO (stolpec 11) smo pripravili tako, da smo zamešali 375 µl gojišča MHB in 125 µl DMSO. Nato smo vsebino premešali in dali 100 µl raztopine v prvo luknjico. 50 µl iz A11 smo prenesli v B11, osemkrat premešali in ponovili postopek do H11, zadnjih 50 µl pa smo zavrgli. Naredili smo še slepi vzorec iz 100 µl tekočega gojišča MHB.

Mikrotitrsko ploščico smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po 24 urni inkubaciji smo v vsako luknjico dodali 10 µl barvila INT, ki smo ga pripravili tako, da smo v temnem prostoru zatehtali 0,02 g INT in ga raztopili v 10 ml sterilne destilirane vode. Mikrotitrsko ploščico smo 1 minuto stresali na stresalniku in dali v inkubator za 30 minut pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo določili MIC glede na spremembo barve.

3.3.7 Metoda razredčevanja v mikrotitrski ploščici v 50 % živilu

Za izvedbo smo pripravili snov s protimikrobnim delovanjem (*A. katsumadai*, 3.2.3.1), 50 % živilo (3.3.3), pozitivni in negativni kontroli ter slepa vzorca.

V luknjici prve vrstice mikrotitrsko ploščice A1 in A2 (preglednica 9) smo odpipetirali 200 µl protimikrobne snovi, v luknjice od B1 do H1 in B2 do H2 pa smo odpipetirali 100 µl 50 % živila. Nato smo 100 µl iz A1 prenesli v B1 in osemkrat premešali ter tako nadaljevali do konca stolpca (do H8). Na koncu smo zadnjih 100 µl zavrgli. Ta postopek smo ponovili tudi v stolpcu številka 2. Ko smo protimikrobno snov v obeh stolpcih razredčili do želene koncentracije, smo v vsako luknjico dodali 100 µl delovne raztopine inokuluma (3.3.2.1). Pri vsaki mikrotitrski ploščici smo pripravili tudi 2 pozitivni kontroli. Prvo smo pripravili tako, da smo zmešali 100 µl 50 % živila in 100 µl pripravljene delovne kulture posameznih vrst bakterij, v drugo pa smo zamešali 100 µl gojišča MHB in 100 µl bakterijskega inokuluma (3.3.2). Kontrolo 70 % EtOH smo pripravili tako, da smo zmešali 375 µl gojišča MHB in 125 µl 70 % EtOH. Pripravili smo tudi 4 slepe vzorce, od tega sta dva vzorca vsebovala 200 µl tekočega gojišča MHB (SV₁), dva pa 200 µl 50 % živila (SV₂). Mikrotitrsko ploščico smo nato 1 minuto stresali na stresalniku in jo inkubirali 24 ur pri 37 °C. Enak postopek smo naredili tudi za mikrotitrsko ploščico, ki smo jo inkubirali pri 8 °C.

Po 24-urni inkubaciji smo v vsako luknjico dodali 10 µl barvila INT, ki smo ga pripravili tako, da smo v temnem prostoru zatehtali 0,02 g INT in ga raztopili v 10 ml sterilne destilirane vode. Mikrotitrsko ploščico smo 1 minuto stresali na stresalniku in 30 minut inkubirali pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo določali MIC glede na spremembo barve.

Preglednica 9: Primer mikrotitrsko ploščice pri določanju minimalne inhibitorne koncentracije v 50 % živilu

	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>				
	1	2	3	4	5	6
A	2,052	2,052	SV ₁	SV ₂	PK ₁	PK ₁
B	1,026	1,026	SV ₁	SV ₂	PK ₁	PK ₁
C	0,513	0,513				
D	0,257	0,257		PK ₂	PK ₂	kontrola 70 % EtOH
E	0,128	0,128		PK ₂	PK ₂	kontrola 70 % EtOH
F	0,064	0,064				
G	0,032	0,032				
H	0,016	0,016				

Legenda:

SV₁: slepi vzorec 1 PK₂: pozitivna kontrola (MHB + bakterijska vrsta)

SV₂: slepi vzorec 2 Kontrola 70 % EtOH: kontrola etanola (375 µl gojišča MHB + 125 µl 70 % EtOH)

PK₁: pozitivna kontrola (50% živilo + bakterijska vrsta)

3.3.8 Metoda razredčevanja v gojišču MHB

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB smo določili protimikrobno učinkovitost ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml in 0,512 mg/ml) pri različnih vrednostih pH (5,3, 6,0 in 7,0) in različnih temperaturah inkubacije (8 °C in 37 °C). Aktivnost smo določali bakterijskemu koktailu, ki smo ga pripravili iz bakterij vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* (3.3.2.2.).

20 µl raztopine *A. katsumadai* (3.2.3.1) smo dodali 80 µl tekočega gojišča MHB, pri katerem je bila vrednost pH 5,3, 6,0 in 7,0. Nato smo v centrifugirko zmešali 4 ml bakterijskega koktaila in 80 µl raztopine ekstrakta. Kot kontrolo smo imeli samo bakterijski koktail v gojišču MHB brez dodanega ekstrakta *A. katsumadai*. Najprej smo z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču določili število bakterij. Nato smo določali število bakterij še po 4, 24 in 48 urah inkubacije pri 37 °C. Z dobljenimi podatki smo narisali rastne krivulje bakterij v gojišču MHB z dodano protimikrobno snovjo.

Pri določitvi vpliva temperature na protimikrobno aktivnost smo pripravili bakterijski koktail (3.3.2.2), raztopino ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml, 3.2.4.1) in raztopino EGKG (0,625 mg/ml, 3.2.3.2) in testiranje izvedli v gojišču MHB pri temperaturi 8 °C in 37 °C. Najprej smo z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču določili število bakterij. Nato smo določali število bakterij še po 4, 24 in 48 urah inkubacije pri 8 °C in 37 °C. Z dobljenimi podatki smo narisali rastne krivulje bakterij v gojišču MHB z dodanimi protimikrobnimi snovmi.

3.3.9 Protimikrobna aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v mletem mesu

Iz bakterij vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* smo pripravili bakterijski koktail (3.3.2.2) ter preverili protimikrobno aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml, 3.2.3.1) in EGKG (0,625 mg/ml, 3.2.3.2) v mletem mesu pri 37 °C.

V 100 ml stekleničko smo stehali 60 g mesa in ga sterilizirali v avtoklavu 10 minut pri 115 °C. 10 g sterilnega mletega mesa smo prenesli v vrečko za homogeniziranje in mu dodali 0,94 ml ekstrakta *A. katsumadai*, 2,5 ml raztopine EGKG in 1 ml bakterijskega koktaila. Vzorec smo nato homogenizirali v gnetilniku 2 minuti pri normalni hitrosti. Z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo določali število bakterij po 0, 24, 48 urah inkubacije. Za bakterije vrste *E. coli* smo uporabili gojišče EMB, za bakterije vrste *L. monocytogenes* gojišče Oxford in *C. jejuni* gojišče AHB z dodanimi antibiotiki. Z dobljenimi podatki 2 paralelk smo narisali rastne krivulje bakterij v mletem mesu z dodanimi protimikrobnimi snovmi.

3.3.10 Senzorična analiza

Senzorična analiza je potekala v senzoričnem laboratoriju Katedre za tehnologijo mesa in vrednotenje živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani, katero sta izvedla 2 preizkušena ocenjevalca.

3.3.10.1 Senzorična analiza mletega mesa z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* raztopljenim v DMSO

Najprej smo pripravili raztopino *A. katsumadai* (3.2.3.1). Nato smo zatehtali 300 g mletega mesa, kateremu smo dodali ekstrakt *A. katsumadai* tako, da je bila koncentracija 1,026 mg/g in dobro homogenizirali. Od tu smo vzeli 150 g mesa in dodali 150 g mletega mesa brez dodane protimikrobne snovi in tako dobili nižjo koncentracijo ekstrakta *A. katsumadai* 0,513 mg/g. Tako smo nadaljevali postopek dokler nismo prišli do koncentracije 0,016 mg/g ekstrakta (vzorci od 1-6). Nato smo zatehtali 200 g mletega mesa, kateremu smo dodali samo raztopino DMSO brez ekstrakta *A. katsumadai*. Dodali smo 6,26 ml DMSO (3 % DMSO), dobro premešali in od tu vzeli 100 g mletega mesa, kateremu smo dodali novih 100 g mesa (1,5 % DMSO). Postopek smo nadaljevali do koncentracije 0,1875 % DMSO (vzorci od 8-12). Dva vzorca mesa smo imeli kot kontrolo in sicer brez dodane protimikrobne snovi in DMSO (vzorca 7 in 13). Po končani pripravi vzorcev, smo vzorce toplotno obdelali s pečenjem na žaru, do središčne temperature 75 °C in nato ponudili komisiji. Za senzorično ocenjevanje smo uporabili test s točkovanjem lastnosti iz skupine analitičnih deskriptivnih testov z nestrukturirano točkovno lestvico (analitični test), kjer smo ocenjevali vonj in okus.

Vonj mletega mesa (0-5 točk)

0 točk – neznačilen vonj

5 točk – značilen vonj

Okus mletega mesa (0-5 točk)

0 točk – neznačilen okus

5 točk – značilen okus

3.3.10.2 Senzorična analiza mletega mesa z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* raztopljenim v etanolu

Najprej smo pripravili raztopino *A. katsumadai* (3.2.3.1). Nato smo zatehtali 200 g mletega mesa, kateremu smo dodali ekstrakt *A. katsumadai* (2,052 mg/g) in dobro premešali. Od tu smo vzeli 100 g mesa in dodali 100 g mletega mesa brez prisotnosti protimikrobne snovi in tako dobili koncentracijo ekstrakta *A. katsumadai* 1,026 mg/g. Tako smo nadaljevali postopek dokler nismo prišli do koncentracije 0,032 mg/g ekstrakta (vzorci od 1-6). Nato smo zatehtali 200 g mletega mesa, kateremu smo dodali samo raztopino etanola brez prisotnosti ekstrakta *A. katsumadai*. Dodali smo 25 ml etanola (11 % etanol), dobro premešali in od tu vzeli 100 g mletega mesa, kateremu smo dodali novih 100 g mesa (5,55 % etanol). Postopek smo nadaljevali do koncentracije 0,347 % etanola (vzorci od 8-12). Dva vzorca mesa smo imeli kot kontrolo in sicer brez dodane protimikrobne snovi in etanola (vzorca 7 in 13). Nadaljnji postopek toplotne obdelave in senzoričnega ocenjevanje pripravljenih vzorcev je bil enak kot v 3.3.10.1.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

V eksperimentalnem delu smo poskušali dokazati protimikrobni učinek posameznih ekstraktov in čiste snovi (*A. katsumadai*, Vivox 40, Vivox 70, EGKG) ter kombinacijo dveh protimikrobnih snovi pri posameznih bakterijah vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* in pri bakterijskem koktailu, ki je vseboval vse prej navedene bakterije. Da bi ugotovili, katere koncentracije inhibirajo rast bakterij, smo uporabili metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici in določili MIC. Preverili smo vpliv temperature in pH na protimikrobno delovanje ekstrakta *A. katsumadai* na bakterijski koktail v gojišču MHB in v mletem mesu. Za protimikrobno učinkovito kombinacijo smo naredili senzorično analizo, s katero smo preverili uporabo v mletem mesu.

4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK RASTLINSKIH ESKTRAKTOV, DOLOČEN Z METODO RAZREDČEVANJA V MIKROTITRSKI PLOŠČICI

V prvem delu smo z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici določili protimikrobno aktivnost treh rastlinskih ekstraktov (*A. katsumadai*, Vivox 40, Vivox 70), EGKG in kombinacijo rastlinskih ekstraktov za bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.

4.1.1 Vrednosti MIC za različne ekstrakte *A. katsumadai* v gojišču MHB

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici smo določili kateri izmed ekstraktov *A. katsumadai* ima največjo protimikrobno učinkovitost za bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*. 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).

Preglednica 10: Vrednosti MIC za heksanolni, diklorometanolni, etanolni in metanolni ekstrakt *A. katsumadai*, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici

Bakterije vrste	Ekstrakt <i>A. katsumadai</i>	MIC (mg/ml)
<i>E. coli</i>	Heksanolni ekstrakt	2,052
	Diklorometanolni ekstrakt	2,052
	Etanolni ekstrakt	2,052
	Metanolni ekstrakt	2,052
<i>L. monocytogenes</i>	Heksanolni ekstrakt	1,026
	Diklorometanolni ekstrakt	0,513
	Etanolni ekstrakt	0,513
	Metanolni ekstrakt	1,026

V preglednici 10 vidimo, da so imeli pri bakterijah vrste *E. coli* heksanolni, diklorometanolni, etanolni in metanolni ekstrakt *A. katsumadai* enako vrednost MIC (2,052 mg/ml). Heksanolni in metanolni ekstrakt *A. katsumadai* sta imela pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* MIC 1,026 mg/ml, diklorometanolni in etanolni pa MIC 0,513 mg/ml. V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo uporabili etanolni ekstrakt *A. katsumadai*. Lee in sod. (2010) so prav tako dokazali protimikrobni učinek etanolnega ekstrakta *A. katsumadai*, tako kot tudi Klančnik in sod. (2014), ki so v svojem

eksperimentalnem delu prav tako uporabili etanolni ekstrakt *A. katsumadai*, saj naj bi se pokazal kot učinkovito protimikrobno sredstvo.

4.1.2 Vrednosti MIC za ekstrakte Vivox 40, Vivox 70 in EGKG v gojišču MHB

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici smo določili protimikrobno učinkovitost ekstraktov Vivox 40, Vivox 70 in EGKG pri bakterijah vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.

Preglednica 11: Vrednosti MIC ekstraktov Vivox 40, Vivox 70 in EGKG, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici

Bakterije vrste	Snov s protimikrobnim učinkom	MIC (mg/ml)
<i>E. coli</i>	Vivox 40	2,052
	Vivox 70	1,026
	EGKG	0,625
<i>L. monocytogenes</i>	Vivox 40	0,625
	Vivox 70	/
	EGKG	0,625

Legenda:

/: do koncentracije 1,026 mg/ml ni MIC

V preglednici 11 vidimo, da imajo pri bakterijah vrste *E. coli* protimikrobno učinkovitost ekstrakta Vivox 40 (2,052 mg/ml) in Vivox 70 (1,026 mg/ml) ter EGKG (0,625 mg/ml). Pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* imata protimikrobno učinkovitost ekstrakt Vivox 40 (0,625 mg/ml) in EGKG (0,625 mg/ml), medtem ko ekstrakt Vivox 70 do koncentracije 1,026 mg/ml ni bil protimikrobno učinkovit. Ugotovili smo, da ima EGKG na obe vrsti bakterij največji protimikrobni učinek.

Rožman in Jeršek (2009) sta z metodo difuzije v trdem gojišču dokazali protimikrobni učinek ekstraktov Vivox 40 in Vivox 20 na različne vrste bakterij rodu *Listeria*. Ugotovili sta, da je odpornost listerij proti ekstraktoma rožmarina odvisna od ekstrakta, koncentracije ter vrste in seva listerij.

Polifenol EGKG v zelenem čaju ima širok protimikroben spekter, kot npr. protiglivične, dermatofitne, protibakterijske in protivirusne učinke (Das in sod., 2014). Taguri in sod. (2004) so raziskovali protimikrobno aktivnost 10 različnih rastlinskih polifenolov na patogene bakterije, ki se prenašajo s hrano. Med njimi je imel tudi EGKG protimikrobni učinek na bakterije vrste *E. coli*. Tudi Jeon in sod. (2014) so dokazali protimikrobni učinek EGKG na bakterije vrste *E. coli*.

Si in sod. (2006) so ugotovili, da je ekstrakt kitajskega zelenega čaja, ki je vseboval tudi EGKG, močno inhibiral rast bakterij vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.

4.1.3 Vrednosti MIC za ekstrakt *A. katsumadai* v 50 % mletem mesu

Protimikrobno aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* smo določili tudi v 50 % mletem mesu v mikrotitrski ploščici. MIC smo določali po 24-urni inkubaciji z barvilom INT.

Preglednica 12: Vrednosti MIC ekstrakta *A. katsumadai*, določene z metodo razredčevanja v 50 % živilu v mikrotitrski ploščici

Bakterija	MIC <i>A. katsumadai</i> (mg/ml) pri 37 °C
<i>E. coli</i>	/
<i>L. monocytogenes</i>	/

Legenda: /: do koncentracija 2,052 mg/ml ni MIC

V preglednici 12 vidimo, da vse do 2,052 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* v 50 % mletem mesu ni protimikrobnega učinka na bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.

Larson in sod. (1996) so dokazali, da ima ekstrakt hmelja večji protimikrobni učinek na bakterije vrste *L. monocytogenes* v mediju kot pa v živilu. Stopnja inhibicije bakterij vrste *L. monocytogenes* je bila odvisna od značilnosti živila in razmer inkubacije. Ekstrakt hmelja je bil bolj učinkovit v kislih živilih (zelje in skuta), kot v živilih, ki imajo višji pH (mleko, Camembert sir).

Kotzekidou in sod. (2008) so ugotovili, da rastlinski ekstrakti in eterična olja izgubijo protimikrobno učinkovitost pri bakterijah vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*, ko so dodane k čokoladi.

Devlieghere in sod. (2004) so ugotovili, da hitozan ne morejo uporabiti kot protimikrobno sredstvo za premaz v živilih z nizko vsebnostjo beljakovin in NaCl. V to skupino spadajo sadje in zelenjava, saj so bila ta živila po premazu s hitozanom grenkega okusa.

Selim (2011) je dokazal, da ima eterično olje timijana protimikrobni učinek na bakterije vrste *E. coli* O175:H7 v feta siru in mletem govejem mesu in tako bi lahko eterično olje timijana potencialno uporabljali kot naravni konzervans v živilih.

4.1.4 Vrednosti FICI za kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in Vivox 40, Vivox 70 in EGKG v gojišču MHB

Ker smo dokazali, da imajo posamezne protimikrobne snovi (*A. katsumadai*, Vivox 40, Vivox 70) protimikrobni učinek vsaj pri eni izmed izbranih bakterij, smo v nadaljevanju želeli ugotoviti, ali imajo te protimikrobne snovi skupno delovanje. Vrednosti MIC za različne kombinacije protimikrobnih snovi smo določili z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici pri bakterijah vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*.

Preglednica 13: Vrednosti MIC za kombinacije ekstraktov *A. katsumadai* in Vivox 40, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici

Bakterije vrste	Testirane koncentracije (mg/ml)		Vrednosti MIC (mg/ml) določene v kombinaciji	
	<i>A. katsumadai</i>	Vivox 40	<i>A. katsumadai</i>	Vivox 40
<i>E. coli</i>	0,256	1,026	/	/
	0,513	1,026	0,513	/
<i>L. monocytogenes</i>	0,256	1,026	/	/
	0,513	1,026	0,513	/

Legenda:

/: pri izbrani kombinaciji ni vrednosti MIC

V preglednici 13 vidimo, da kombinacija ekstraktov *A. katsumadai* in Vivox 40 v izbranih koncentracijah nima skupnega protimikrobnega delovanja na bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*, zato te protimikrobne kombinacije nismo izbrali za nadaljnje delo.

Preglednica 14: Vrednosti MIC za kombinacijo ekstraktov *A. katsumadai* in Vivox 70, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici

Bakterije vrste	Testirane koncentracije (mg/ml)		Vrednosti MIC (mg/ml) določene v kombinaciji	
	<i>A. katsumadai</i>	Vivox 70	<i>A. katsumadai</i>	Vivox 70
<i>E. coli</i>	0,256	1,026	/	1,026
	0,513	1,026	0,513	1,026
<i>L. monocytogenes</i>	0,256	1,026	/	/
	0,513	1,026	0,513	/

Legenda:

/: pri izbrani kombinaciji ni vrednosti MIC

V preglednici 14 vidimo, da pride do protimikrobne aktivnosti pri kombinaciji ekstraktov *A. katsumadai* pri koncentraciji 0,513 mg/ml in Vivox 70 pri koncentraciji 1,026 mg/ml pri bakterijah vrste *E. coli*, medtem ko skupnega učinka pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* nismo določili.

Preglednica 15: Vrednosti FIC za kombinacijo ekstraktov *A. katsumadai* in Vivox 70

Bakterije vrste	FIC <i>A. katsumadai</i>	FIC Vivox 70	FICI kombinacije <i>A. katsumadai</i> in Vivox 70
<i>E. coli</i>	0,25	1,0	1,25
<i>L. monocytogenes</i>	1	/	/

Legenda:

/: ni vrednosti FIC oz. FICI

V nadaljevanju smo izračunali vrednosti FIC in FICI (preglednica 15) za kombinacijo ekstraktov *A. katsumadai* in Vivox 70, kjer smo videli, da ne pride do medsebojnega učinka testiranih protimikrobnih snovi.

Ker ni bilo skupnega učinka kombinacij ekstraktov *A. katsumadai* in Vivox 40 ter ekstraktov *A. katsumadai* in Vivox 70, smo testirali protimikrobni učinek kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG. Veliko študij je dokazalo, da je EGKG zelo dobro protimikrobno sredstvo. Med njimi so protimikrobno aktivnost EGKG dokazali tudi Gordon in Wareham (2010), Jeon in sod. (2014) in Novy in sod. (2013). Kombinacijo ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG smo testirali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici (preglednica 16).

Preglednica 16: Vrednosti MIC za kombinacijo ekstraktov *A. katsumadai* in EGKG, določene z metodo razredčevanja v gojišču MHB v mikrotitrski ploščici

Bakterije vrste	Testirane koncentracije (mg/ml)		Vrednosti MIC (mg/ml) določene v kombinaciji	
	<i>A. katsumadai</i>	EGKG	<i>A. katsumadai</i>	EGKG
<i>E. coli</i>	0,513	0,625	0,513	0,625
<i>L. monocytogenes</i>	0,513	0,625	0,513	0,625

Preglednica 17: Vrednosti FIC za kombinacijo ekstraktov *A. katsumadai* in EGKG

Bakterije vrste	FIC <i>A. katsumadai</i>	FIC EGKG	FICI kombinacije <i>A. katsumadai</i> + EGKG
<i>E. coli</i>	0,25	1,0	1,25
<i>L. monocytogenes</i>	1,0	1,0	2,0

Ugotovili smo (preglednica 17), da pri kombinaciji ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG ne pride do skupnega učinka na bakterije vrst *E. coli* (FICI=1,25) in *L. monocytogenes* (FICI=2,0).

Klančnik in sod. (2014) so dokazali, da etanolni ekstrakt *A. katsumadai* in EGKG predstavljata pomemben vir protimikrobnega učinka proti bakterijam *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *E. coli*.

Tako kakor Pillai in sod. (2005) smo tudi mi opazili, da ni nujno, da je kombinacija dveh protimikrobnih sredstev vedno učinkovita.

V eksperimentih želimo raziskovati kombinacije protimikrobnih sredstev, saj imajo lahko te sinergističen učinek, kjer sta dve protimikrobni sredstvi bolj učinkoviti kot eno samo (Hessen in Kaye, 2004). Sinergističen učinek dveh protimikrobnih sredstev smo želeli tudi mi pokazati z našim eksperimentalnim delom. Iskali smo ga v kombinaciji ekstrakta *A. katsumadai* z Vivox 40, Vivox 70 in EGKG. Ugotovili smo, da pri kombinaciji ekstrakta *A. katsumadai* z Vivox 70 in EGKG pri bakterijah vrste *E. coli* ni interakcije (FICI > 0,5-4,0, Yap in sod. 2013), prav tako ni interakcije pri kombinaciji ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* (FICI=2,0).

Za nadaljevanje eksperimentalnega dela smo pri izbranih primerih vzeli kombinacijo ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG. Za EGKG smo se odločili, saj je dokazano, da v kombinaciji z β -laktam antibiotiki in tetraciklini deluje sinergistično (Novy in sod., 2013). Novy in sod. (2013) so tudi dokazali sinergističen učinek EGKG z oksitetraciklinom.

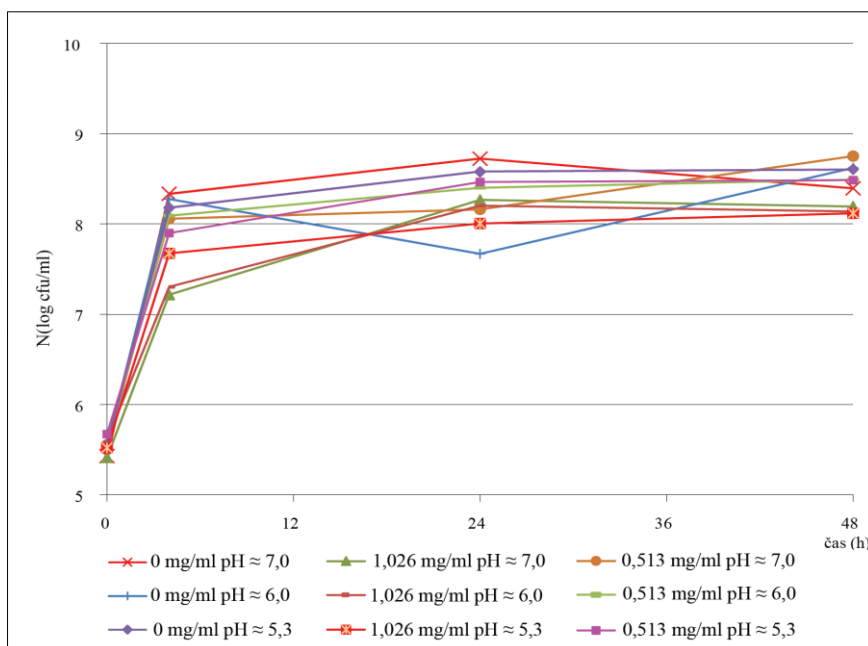
4.2 VPLIV pH NA PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTA *A. katsumadai* NA BAKTERIJSKI KOKTAIL V GOJIŠČU MHB

Iz bakterij vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* smo pripravili bakterijski koktail in določili vpliv znižanja pH na protimikrobno učinkovitost ekstrakta *A. katsumadai*. Izbrali smo dve koncentraciji ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml) in gojišče MHB s pH 7,0 (nespremenjen pH), 6,0 in 5,3.

4.2.1 Bakterije vrste *E. coli*

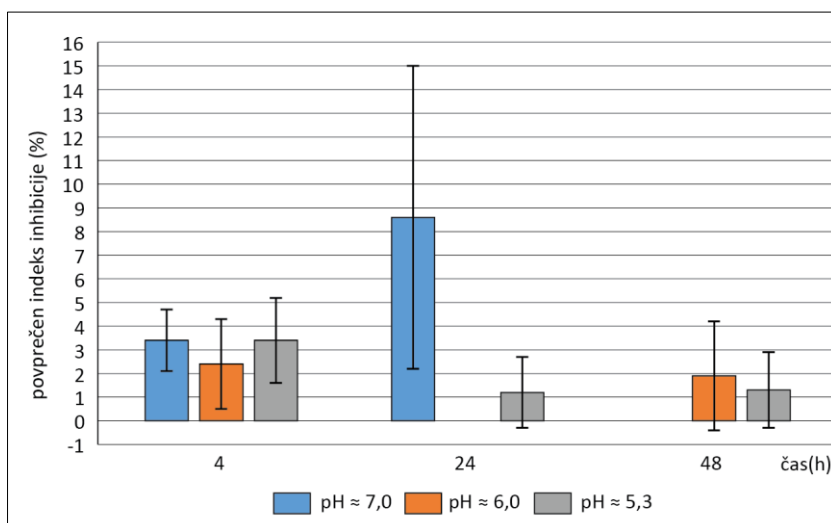
Rezultati na sliki 2 prikazujejo rast bakterij vrste *E. coli* v gojišču MHB skupaj z bakterijami vrst *L. monocytogenes* in *C. jejuni* in vidimo, da je 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH 7,0 v 48 urah zmanjšal rast za 0,2 log cfu/ml, medtem ko 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* ni inhibiral rasti. V gojišču MHB pri pH 6,0 z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* je bila rast bakterij vrste *E. coli* zmanjšana za 0,5 log cfu/ml, medtem ko nižja koncentracija ni vplivala na rast. Pri pH 5,3 in z 1,026 mg/ml ekstrakta *A.*

katsumadai v gojišču MHB je bila rast bakterij vrste *E. coli* zmanjšana za 0,1 log cfu/ml, medtem ko je nižja koncentracija zmanjšala rast bakterij vrste *E. coli* za 0,5 log cfu/ml.



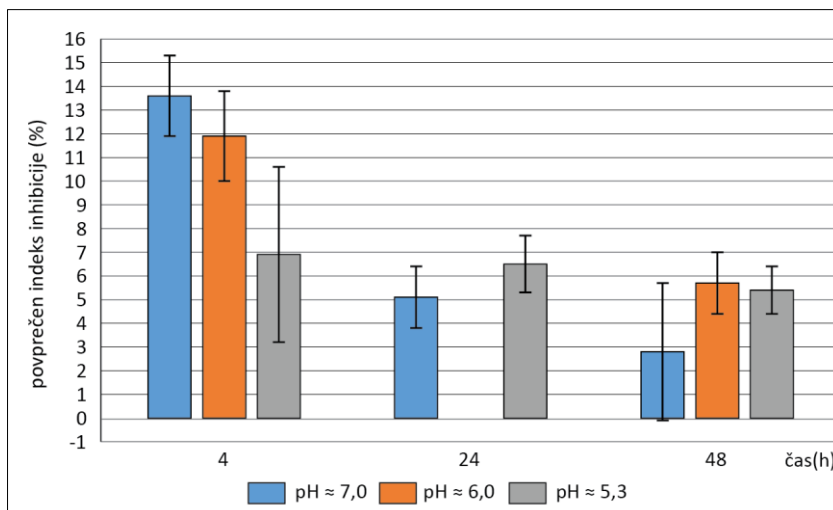
Slika 2: Rast bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB (pH= 7,0, 6,0, 5,3) z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*

V prilogi A so navedena povprečna števila bakterij vrste *E. coli*, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga B). Indeks inhibicije rasti (pri 0,513 mg/ml, slika 3) pri pH 7,0 je bil po 4 urah 3,4 %, po 24 urah 8,6 %, medtem ko po 48 urah ni bilo inhibicije. Pri pH 6,0 smo dobili 2,4 % indeks inhibicije po 4 urah ter le 1,9 % po 48 urah. Pri pH 5,3 smo po 4 urah dobili indeks inhibicije 3,4 %, po 24 urah 1,2 % in po 48 urah 1,6 %.



Slika 3: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

Pri 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* smo dobili najvišji indeks inhibicije rasti za bakterije vrste *E. coli* po 4 urah pri vseh pH, medtem ko je bil po 48 urah nižji kot na začetku (slika 4).



Slika 4: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

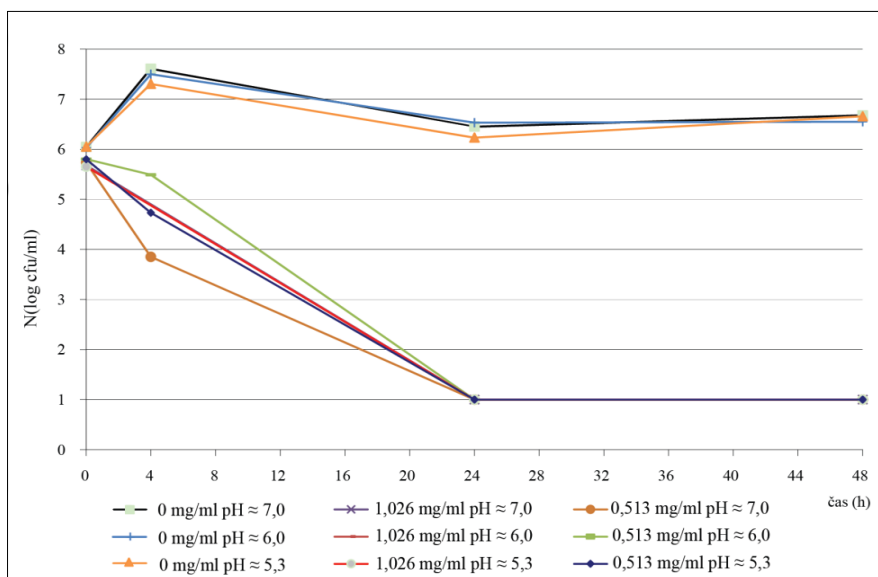
Ekstrakt *A. katsumadai* ima minimalen protimikrobni učinek na bakterije vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB po 48 urah, saj inhibira rast le za $2,8 \pm 2,9$ %.

Protimikrobna aktivnost kaprilne in kaprinske kisline je na bakterije vrste *E. coli* večja pri nižjem pH kot pri $\text{pH} > 6$ (Srivanova in Marounek, 2007).

Doughari and Manzara (2008) sta dokazala, da imajo ekstrakti listov *Mangifera indica* L. na bakterije vrste *E. coli* manjši protimikrobni učinek v alkalnem pH.

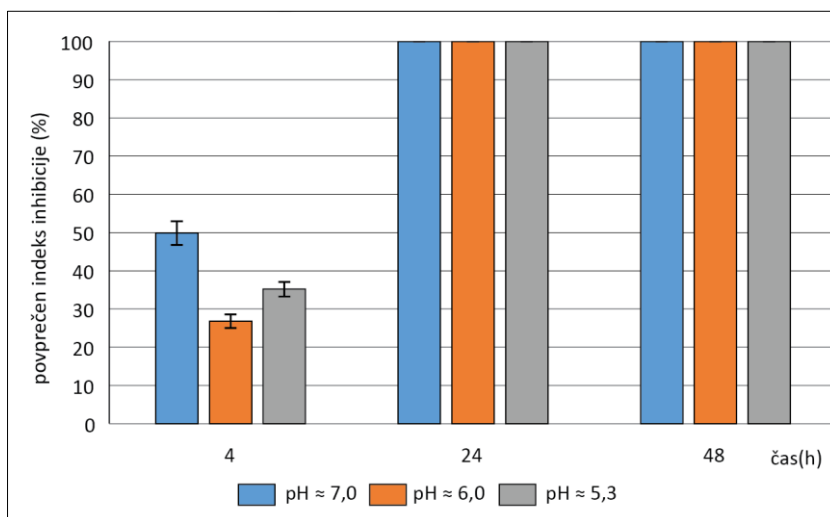
4.2.2 Bakterije vrste *L. monocytogenes*

Pri pH 7,0 sta obe preizkušeni koncentraciji ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml) v gojišču MHB v 48 urah zmanjšali rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu za 5,6 log cfu/ml. Podobno sta obe koncentraciji ekstrakta v 48 urah pri pH 6,0 zmanjšali rast bakterij vrste *L. monocytogenes* za 5,5 log cfu/ml in pri pH 5,3 za 5,6 log cfu/ml.



Slika 5: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB (pH= 7,0, 6,0, 5,3) z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*

V prilogi C so navedena povprečna števila bakterij vrste *L. monocytogenes*, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga D). Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH 7,0 je bil po 4 urah 49,9 %, pri pH 6,0 26,8 % ter pri pH 5,3 35,2 % (slika 6). Po 24 in 48 urah je bil indeks inhibicije pri vseh pH 100 %. Pri koncentraciji 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* je bil indeks inhibicije rasti na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri vseh pH in časih 100 % (priloga D).



Slika 6: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

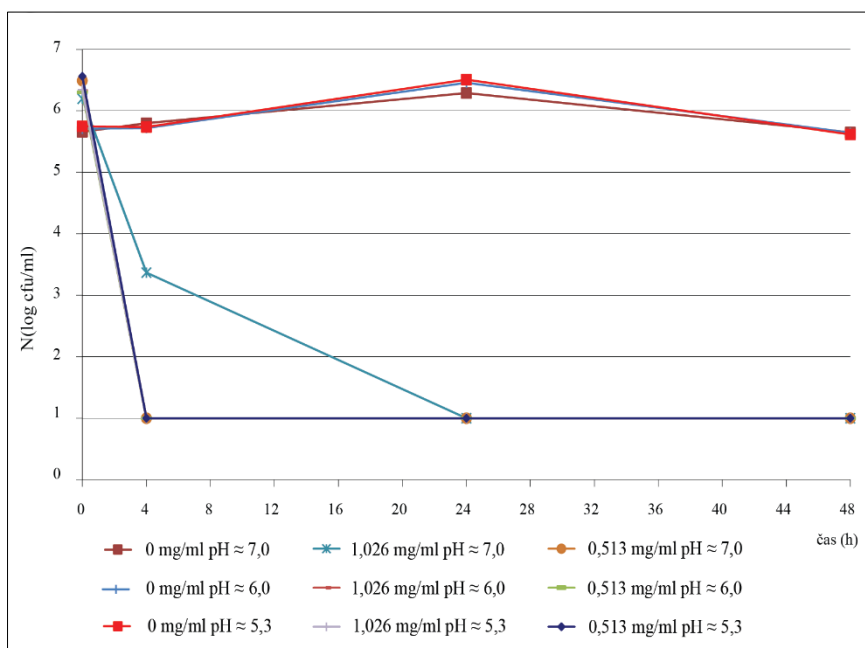
Ekstrakt *A. katsumadai* ima protimikrobni učinek na bakterijski koktail v gojišču MHB po 48 urah, saj 100 % inhibira rast bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Tako kot mi, so tudi Klančnik in sod. (2014) pokazali, da ima ekstrakt *A. katsumadai* protimikrobni učinek na bakterijski koktail, ki je bil prav tako sestavljen iz bakterij vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*

Larson in sod. (2006) so ugotovili, da so monogliceridi bolj učinkoviti pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* pri pH 5,0 kot pri pH 6,0. Tudi Gutierrez in sod. (2009) so ugotovili, da so eterična olja protimikrobno učinkovitejša na bakterije vrste *L. monocytogenes* v kislem pH (6,0) kot pa v nevtralnem pH (7,0).

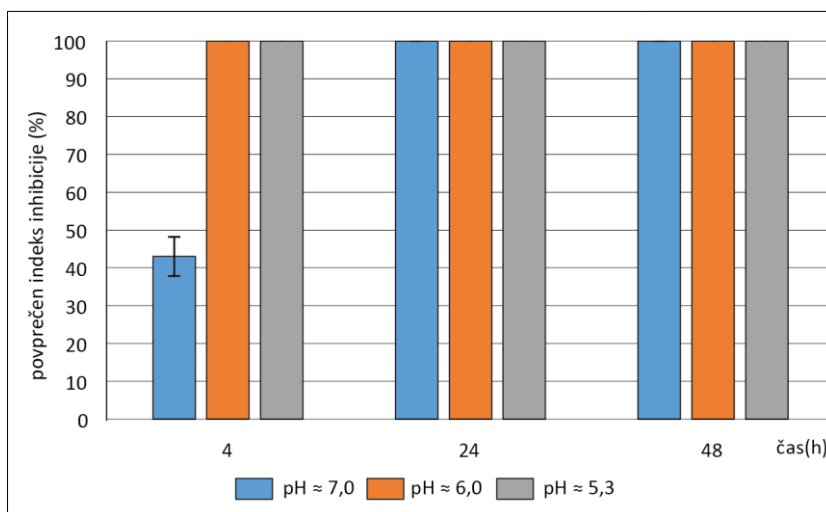
4.2.3 Bakterije vrste *C. jejuni*

Pri pH 7,0 sta obe preizkušeni koncentraciji ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml) v gojišču MHB v 48 urah zmanjšali rast bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu za 4,6 log cfu/ml (slika 7). Tudi pri pH 6,0 sta obe koncentraciji ekstrakta *A. katsumadai* v 48 urah zmanjšali rast bakterij vrste *C. jejuni* za 4,6 log cfu/ml in pri pH 5,3 za 4,6 log cfu/ml.



Slika 7: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB (pH= 7,0, 6,0, 5,3) z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*

V prilogi E so navedena povprečna števila bakterij vrste *C. jejuni*, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga F). Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* je bil po 4 urah pri pH 7,0 43 % (slika 8). Pri vseh ostalih vrednostih pH in časih je bil indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* 100 %. Pri koncentraciji 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* smo dobili pri vseh pH in časih indeks inhibicije rasti 100 % (priloga F).



Slika 8: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

Ekstrakt *A. katsumadai* ima protimikrobni učinek na bakterijski koktail v gojišču MHB po 48 urah, saj 100 % inhibira rast pri bakterijah vrste *C. jejuni*.

Za živila s pH 5,5 ali več, je znanih zelo malo protimikrobnih komponent, ki delujejo v nizkih koncentracijah (Davidson in Branen, 2005).

V našem eksperimentalnem delu smo opazili, da znižanje pH iz 7,0 na 5,3 ne vpliva bistveno na protimikrobno delovanje ekstrakta *A. katsumadai* na bakterije v bakterijskem koktailu.

4.3 VPLIV TEMPERATURE NA PROTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKTA *A. katsumadai* IN EGKG NA BAKTERIJSKI KOKTAIL

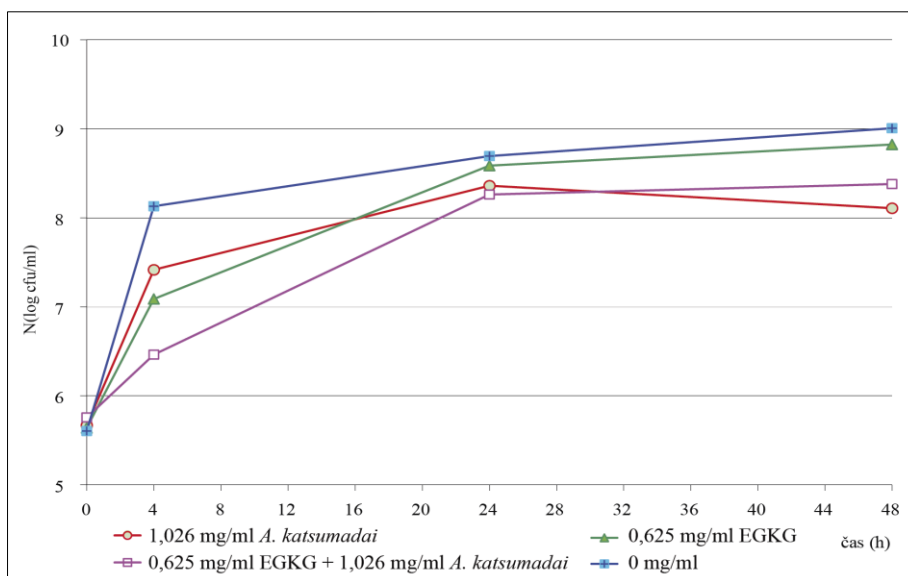
4.3.1 Gojišče MHB

Protimikrobni učinek smo določali za 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG ter za kombinacijo ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG na bakterijskem koktailu pripravljenem iz bakterij vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*. Poskuse smo izvedli v gojišču MHB pri 37 °C in 8 °C. Za ti dve temperaturi smo se odločili, ker je v hladilniku kjer hranimo meso povprečna temperatura 8 °C. Višjo temperaturo 37 °C smo vzeli za primerjavo, da vidimo ali nižja temperatura vpliva na učinek protimikrobne kombinacije *A. katsumadai* in EGKG.

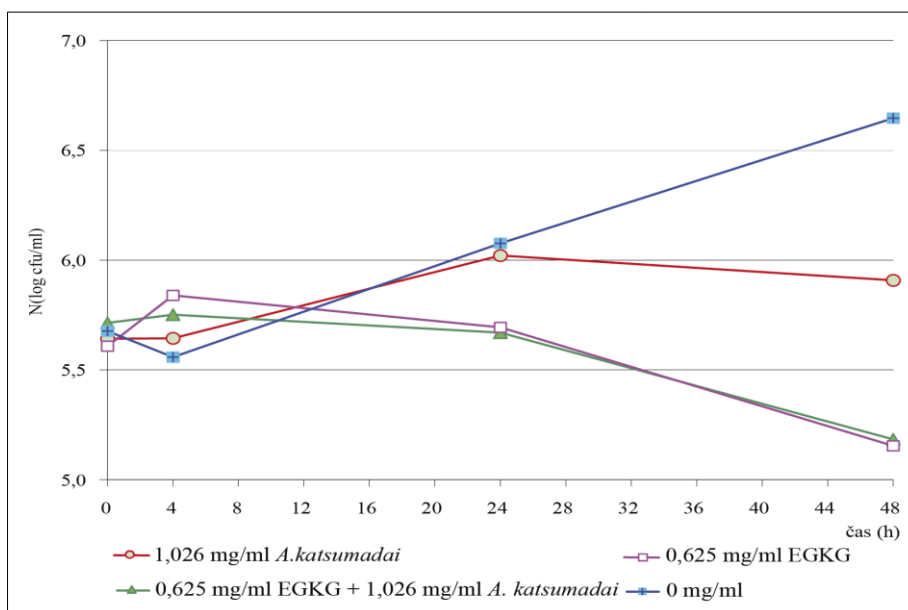
4.3.1.1 Bakterije vrste *E. coli* pri 37 °C in 8 °C

Ekstrakt *A. katsumadai* je v tekočem gojišču MHB pri temperaturi 37 °C v 48 urah zmanjšal rast bakterij vrste *E. coli* za 1,0 log cfu/ml, 0,625 mg/ml EGKG za 0,2 log cfu/ml, kombinacija obeh skupaj pa za 0,6 log cfu/ml (slika 9). Na sliki 10 vidimo, da je 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* v tekočem gojišču MHB pri temperaturi 8 °C v 48

urah zmanjšal rast bakterij vrste *E. coli* za 0,9 log cfu/ml, 0,625 mg/ml EGKG za 1,5 log cfu/ml, kombinacijo obeh skupaj pa za 1,5 log cfu/ml.



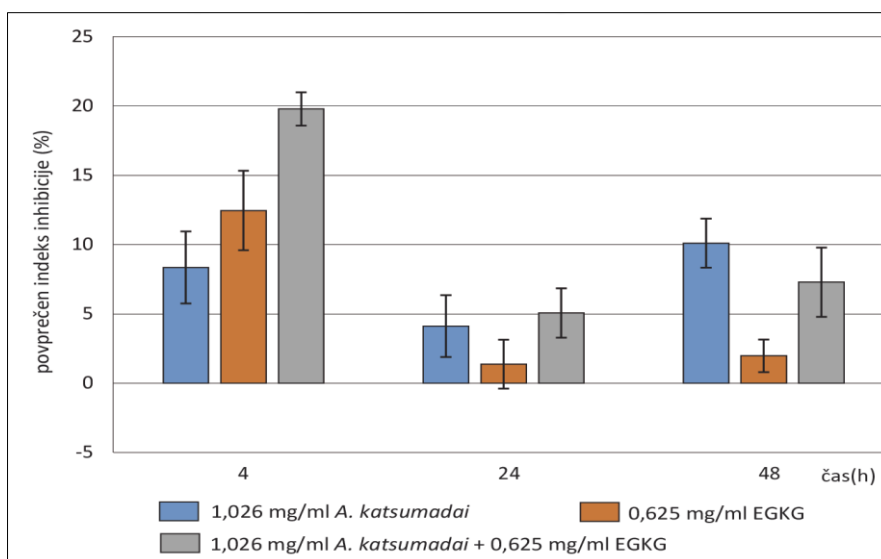
Slika 9: Rast bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 37 °C



Slika 10: Rast bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 8 °C

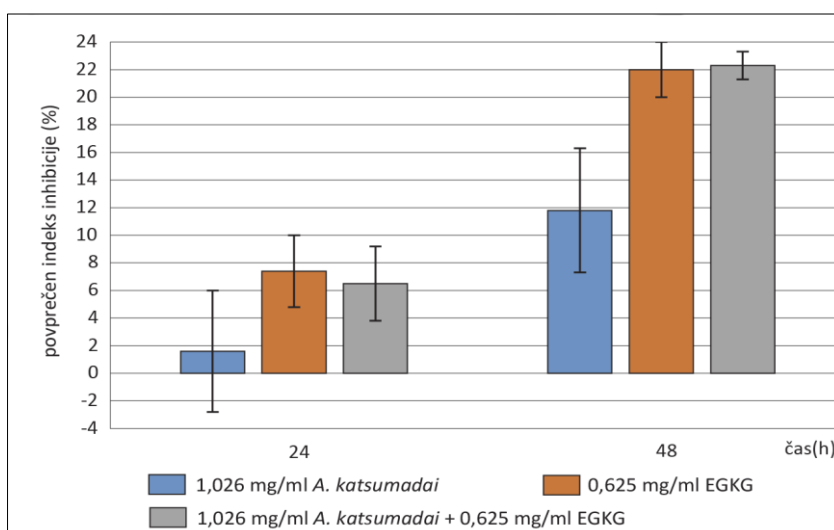
V prilogi G so navedena povprečna števila bakterij vrste *E. coli* pri 37 °C, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga H) z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* pri ekstraktu *A. katsumadai* je po 4 urah bil 8,4 %, po 24 urah 4,1 % in po 48 urah 10,1 %. Indeks inhibicije rasti pri EGKG je bil po 4 urah 12,5 %, po 24 urah 1,4 % in po 48 urah 2,0 %.

Pri skupnem delovanju ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG je bila inhibicija rasti po 4 urah 19,8 %, po 24 urah 5,1 % in po 48 urah 7,3 % (slika 11).



Slika 11: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema

V prilogi I so navedena povprečna števila bakterij vrste *E. coli* pri 8 °C, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga J) z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* pri ekstraktu *A. katsumadai* je po 24 urah bil 1,6 %, po 48 urah 11,8 %. Indeks inhibicije rasti pri EGKG je bil po 24 urah 7,4 %, po 48 urah 22,0 %. Pri skupnem delovanju ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG je bila inhibicija rasti po 24 urah 6,5 %, po 48 urah 22,3 % (slika 12).

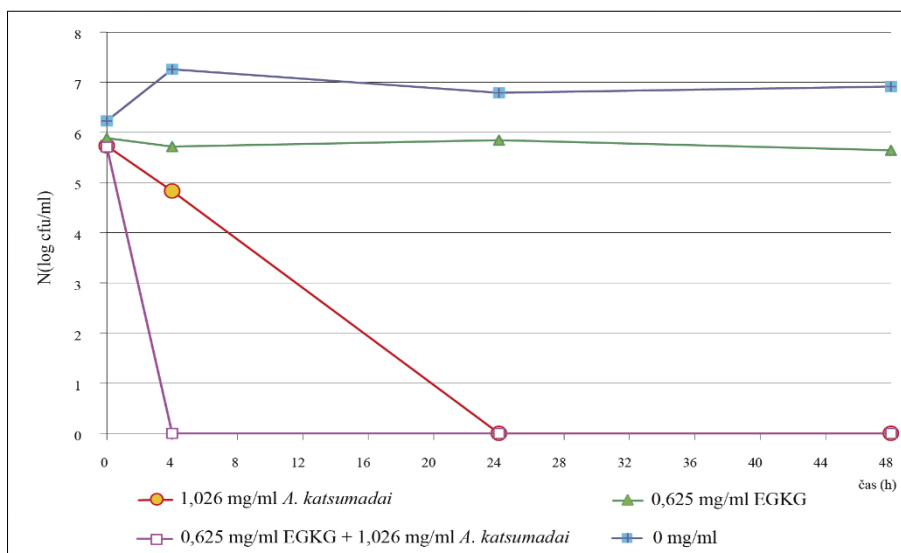


Slika 12: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema

Klančnik in sod. (2014) so tudi dokazali zmanjšanje protimikrobne učinkovitosti kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG na bakterije vrste *E. coli* pri 8 °C.

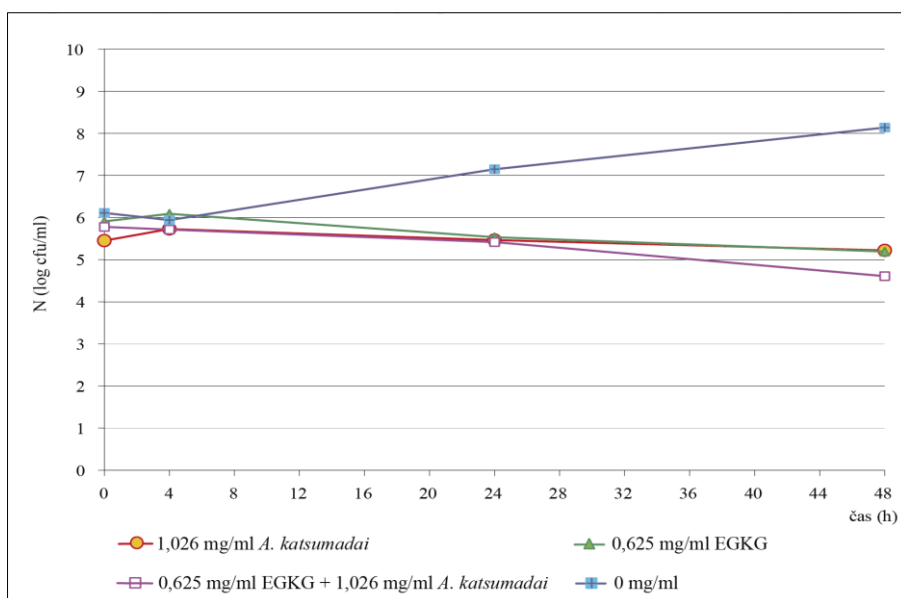
4.3.1.2 Bakterije vrste *L. monocytogenes* pri 37 °C in 8 °C

Ekstrakt *A. katsumadai* (1,026 mg/ml) je v tekočem gojišču MHB pri temperaturi 37 °C v 48 urah zmanjšal rast bakterij vrste *L. monocytogenes* za 7,0 log cfu/ml, 0,625 mg/ml EGKG za 1,0 log cfu/ml, kombinacijo obeh skupaj pa za 7,0 log cfu/ml (slika 13).



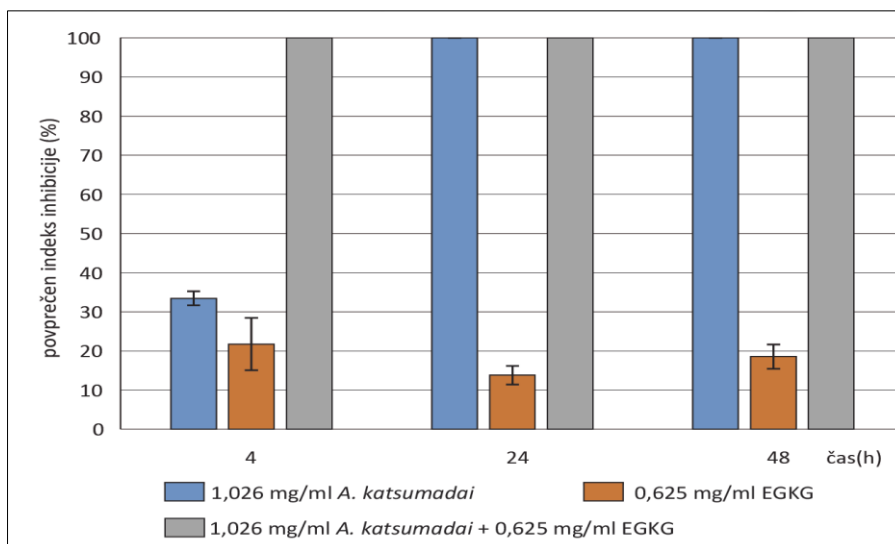
Slika 13: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 37 °C

Na sliki 14 vidimo, da je 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* v tekočem gojišču MHB pri temperaturi 8 °C v 48 urah zmanjšal rast bakterij vrste *L. monocytogenes* za 3,0 log cfu/ml, 0,625 mg/ml EGKG za 3,0 log cfu/ml, kombinacijo obeh skupaj pa za 3,5 log cfu/ml.



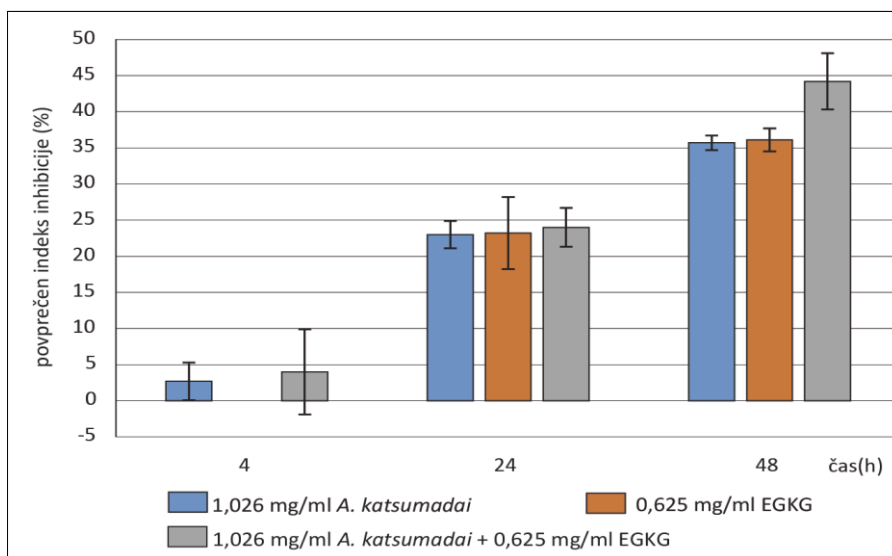
Slika 14: Rast bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 8 °C

V prilogi K so navedena povprečna števila bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 37 °C, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga L) z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri ekstraktu *A. katsumadai* je po 4 urah bil 33,4 %, po 24 urah 13,8 % in po 48 urah 100 %. Indeks inhibicije rasti pri EGKG je bil po 4 urah 21,7 %, po 24 urah 13,8 % in po 48 urah 18,6 %. Pri skupnem delovanju ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG je bila pri vseh časih 100 % (slika 15).



Slika 15: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema

V prilogi M so navedena povprečna števila bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 8 °C, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga N) z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri ekstraktu *A. katsumadai* je po 4 urah bil 2,7 %, po 24 urah 23 % in po 48 urah 35,7 %. Indeks inhibicije rasti pri EGKG je bil po 24 urah 23,2 % in po 48 urah 36,1 %. Pri skupnem delovanju ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG je bila inhibicija rasti po 4 urah 4,0 % po 24 urah 24,0 % in po 48 urah 44,2 % (slika 16).

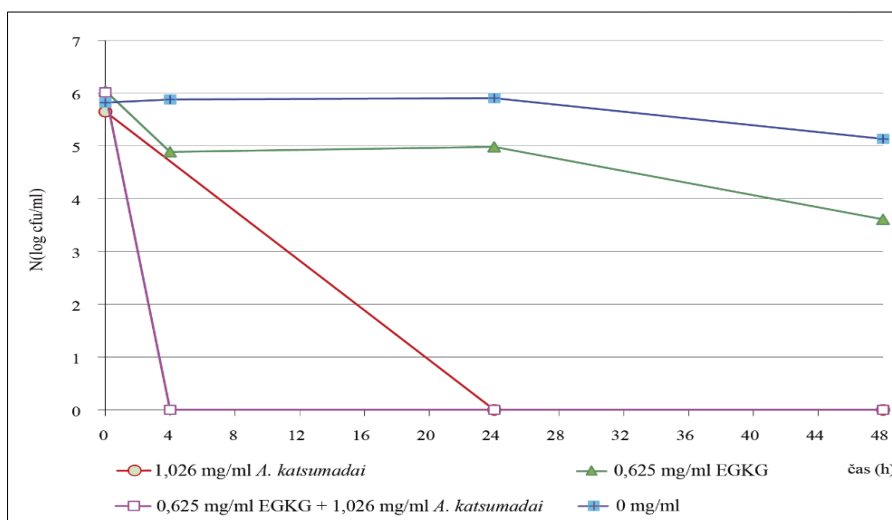


Slika 16: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema

Solomakos in sod. (2007) so prav tako ugotovili močnejšo inhibitorno aktivnost nizina in eteričnega olja timijana na bakterije vrste *L. monocytogenes* pri 10 °C, kot pri 4 °C. Tako kot mi, so tudi Klančnik in sod. (2014) dokazali, da znižanje temperature (iz 37 °C do 8 °C), zmanjša protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG na bakterije vrste *L. monocytogenes*.

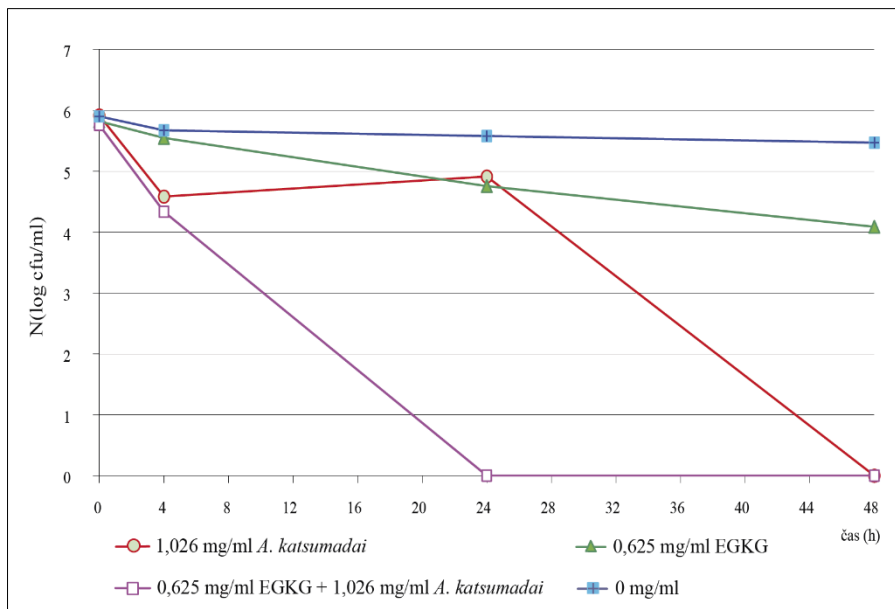
4.3.1.3 Bakterije vrste *C. jejuni* pri 37 °C in 8 °C

Ekstrakt *A. katsumadai* je v tekočem gojišču MHB pri temperaturi 37 °C v 48 urah zmanjšal rast bakterij vrste *C. jejuni* za 5,1 log cfu/ml, 0,625 mg/ml EGKG za 1,4 log cfu/ml, kombinacija obeh skupaj pa za 5,1 log cfu/ml (slika 17).



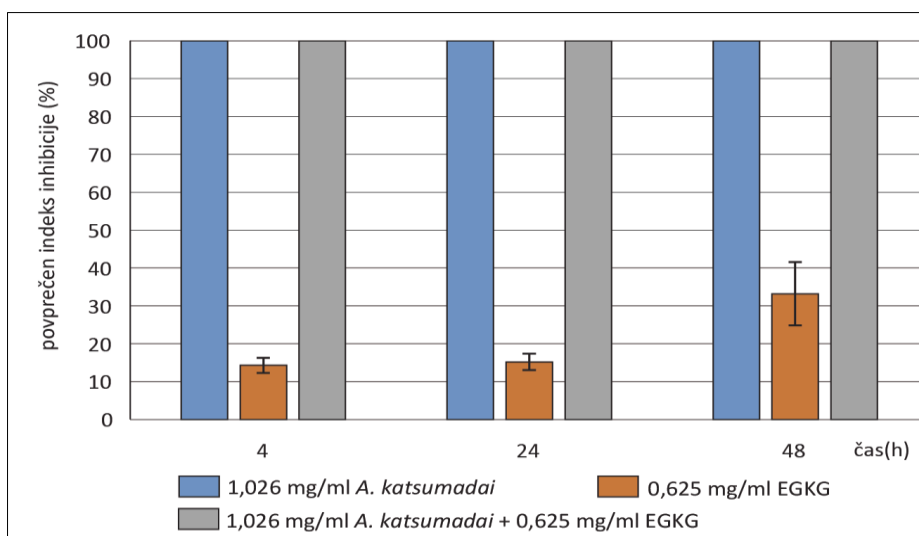
Slika 17: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 37 °C

Na sliki 18 vidimo, da je 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* v tekočem gojišču MHB pri temperaturi 8 °C v 48 urah zmanjšal rast bakterij vrste *C. jejuni* za 5,5 log cfu/ml, 0,625 mg/ml EGKG za 1,5 log cfu/ml, kombinacijo obeh skupaj pa tudi za 5,5 log cfu/ml.



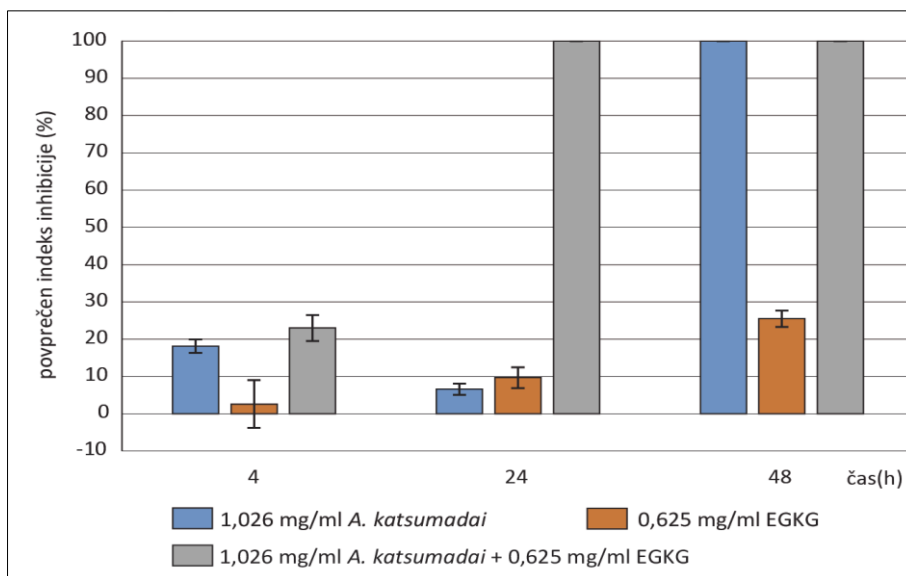
Slika 18: Rast bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema pri 8 °C

V prilogi O so navedena povprečna števila bakterij vrste *C. jejuni* pri 37 °C, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga P) z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri ekstraktu *A. katsumadai* je po 4 urah bil pri vseh časih 100 %. Indeks inhibicije rasti pri EGKG je bil po 4 urah 14,3 %, po 24 urah 15,2 % in po 48 urah 33,2 %. Pri skupnem delovanju ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG je bila inhibicija rasti pri vseh časih 100 % (slika 19).



Slika 19: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema

V prilogi Q so navedena povprečna števila bakterij vrste *C. jejuni* pri 8 °C, iz katerih smo izračunali indekse inhibicije rasti (priloga R) z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG. Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri ekstraktu *A. katsumadai* je po 4 urah bil 18,1 %, po 24 urah 6,6 % in po 48 urah 100 %. Indeks inhibicije rasti pri EGKG je bil po 4 urah 2,6 %, po 24 urah 9,7 % in po 48 urah 25,5 %. Pri skupnem delovanju ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG je bila inhibicija rasti po 4 urah 23,0 %, po 24 in 48 urah pa 100 % (slika 20).



Slika 20: Povprečen indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai*, 0,625 mg/ml EGKG in z obema protimikrobnima snovema

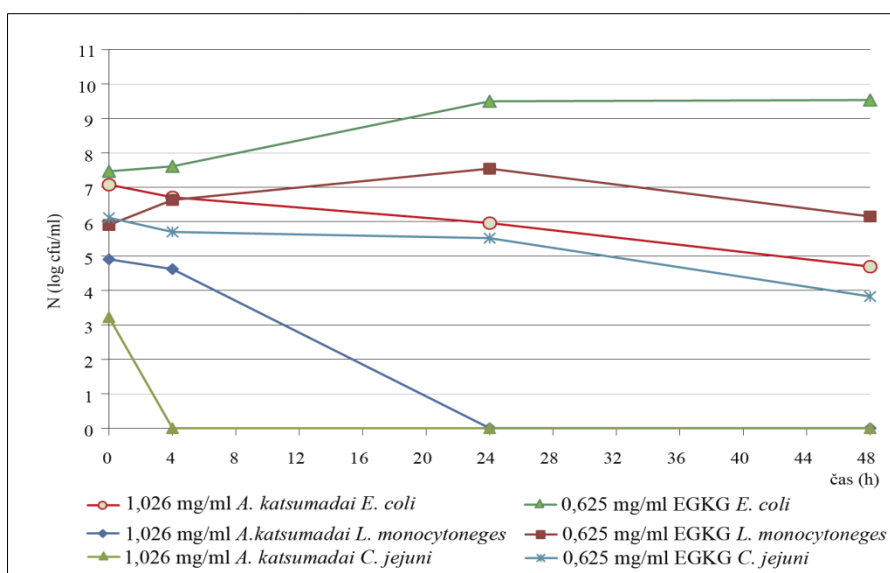
Klančnik in sod. (2014) so tudi dokazali zmanjšanje protimikrobne učinkovitosti kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG na bakterije vrste *C. jejuni* znižane iz 37 °C na 8 °C.

V našem primeru smo ugotovili, da temperatura vpliva na protimikrobno aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG. Za bakterije vrste *E. coli* v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG ni bilo večjih razlik glede na temperaturo (8 °C in 37 °C). Večje razlike smo opazili pri bakteriji vrste *L. monocytogenes*, kjer je bila protimikrobna aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* samega in v kombinaciji z EGKG pri 37 °C v 48 urah glede na indeks inhibicije rasti 100 %, medtem ko je pri 8 °C dosegla le 35,7 % za ekstrakt *A. katsumadai* in 44,2 % v kombinaciji z EGKG. Pri bakteriji vrste *C. jejuni* je bila protimikrobna aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* samega in v kombinaciji z EGKG pri 37 °C že 100 %, medtem ko je bila pri 8 °C veliko manjša.

4.4 PROTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTA *A. katsumadai* IN EGKG NA BAKTERIJSKI KOKTAIL V MLETIM MESU

V mletem mesu smo preverili aktivnost 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG v mletem mesu na bakterijskem koktailu sestavljenem iz vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*.

Pri bakterijah vrste *E. coli* vidimo (slika 21), da je 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* zmanjšalo rast v 48 urah v mletem mesu za 2 logaritemski enoti, medtem ko EGKG po 24 urah ni zaviral rasti, po 48 urah pa je bila rast tudi inhibirana. Ekstrakt *A. katsumadai* je v mletem mesu v 48 urah zmanjšal rast bakterij vrste *L. monocytogenes* za 5 log cfu/ml, medtem ko EGKG po 48 urah ni zaviral rasti. Ekstrakt *A. katsumadai* je v mletem mesu v 48 urah zmanjšal rast bakterij vrste *C. jejuni* za 3 log cfu/ml, EGKG pa za 2 log cfu/ml.



Slika 21: Rast bakterij vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v mletem mesu z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG pri 37 °C

4.5 PRIMERJAVA PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKTA *A. katsumadai* IN EGKG NA BAKTERIJSKI KOKTAIL V GOJIŠČU MHB IN MLETIM MESU

Opazili smo, da pride do razlik rasti bakterijskega koktaila glede na vrsto medija (preglednica 18). Pri bakterijah vrste *E. coli* je bila večja protimikrobna aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml) v mletem mesu, medtem ko je bila pri bakterijah vrst *L. monocytogenes* in *C. jejuni* protimikrobna aktivnost enaka v gojišču MHB in v mletem mesu. EGKG (0,625 mg/ml) je imel večji protimikrobni učinek na bakterije vrst *E. coli* in *L. monocytogenes* v gojišču MHB kot v mletem mesu, medtem ko pri bakterijah vrste *C. jejuni* ni bilo razlike glede na vrsto gojišča.

Preglednica 18: Povprečno število bakterij po 48 urah v gojišču MHB in mletem mesu z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* in EGKG

Protimikrobna snov	Gojišče	Povprečno število bakterij po 48 urah $\pm$ SD (log cfu/ml)		
		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. jejuni</i>
<i>A. katsumadai</i>	MHB	8,08 $\pm$ 0,16	< 2	< 2
	Mleto meso	4,62 $\pm$ 0,29	< 2	< 2
		p<0,001	/	/
EGKG	MHB	8,81 $\pm$ 0,11	5,60 $\pm$ 0,21	3,40 $\pm$ 0,43
	Mleto meso	9,47 $\pm$ 0,26	6,12 $\pm$ 0,18	3,82 $\pm$ 0,00
		p<0,001	p<0,001	p=0,145

V preglednici 19 vidimo, da je bila rast bakterij vrste *E. coli* v koktailu v mletem mesu ob dodatku ekstrakta *A. katsumadai* bolj inhibirana v primerjavi z inhibicijo rasti v gojišču MHB, medtem ko je bila rast bakterij vrst *L. monocytogenes* in *C. jejuni* manj zavta v mletem mesu kot v gojišču MHB. EGKG je v gojišču MHB zaviral rast bakterij vrste *L. monocytogenes* in *C. jejuni*, bakterije vrste *E. coli* pa so rasle. V mletem mesu je EGKG inhibiral le rast bakterij vrste *C. jejuni*.

Preglednica 19: Povprečna razlika med številom bakterij v gojišču MHB in mletem mesu z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* in EGKG

Protimikrobna snov	Gojišče	Povprečna razlika med številom bakterij ($N_{48}-N_0$) $\pm$ SD (log cfu/ml)		
		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>C. jejuni</i>
<i>A. katsumadai</i>	MHB	2,44 $\pm$ 0,24	-5,71 $\pm$ 0,15	-5,55 $\pm$ 0,31
	Mleto meso	-2,37 $\pm$ 0,18	-4,90 $\pm$ 0,07	-1,61 $\pm$ 1,76
		p<0,001	p<0,001	p<0,001
EGKG	MHB	3,20 $\pm$ 0,20	-0,26 $\pm$ 0,26	-2,44 $\pm$ 0,68
	Mleto meso	2,10 $\pm$ 0,28	0,26 $\pm$ 0,23	-4,06 $\pm$ 2,07
		p<0,001	p=0,005	p=0,099

Mikrobna rast hlajenih izdelkov (meso, mesni izdelki) je glavni vzrok pokvarljivosti živil. To lahko preprečimo s protimikrobnimi premazi ali spreji na površini proizvoda. S tem izboljšamo varnost in obstojnost živila. Da bi lahko dosegli učinkovito protimikrobno aktivnost, bi morali živilu dati visoke koncentracije eteričnih olj, to pa bi lahko vplivalo na izgled in okus izdelka. Med najbolj učinkovita protimikrobna sredstva v mesu sodita timijanovo in origanovo eterično olje, kar je mogoče pripisati prisotnosti fenolnih spojin, predvsem timola in karvakrola (Emiroglu in sod., 2010).

β -pinen, 1,8-cineol in *p*-ment-1-en-ol iz rastline *A. katsumadai* imajo močno protimikrobno aktivnost (Juliani in sod., 2002; Faleiro in sod., 2003; Kim in sod., 2003).

Klančnik in sod. (2014) so dokazali protimikrobni učinek ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG posamezno in skupaj v piščančjem soku in v sterilnem mletem mesu pri bakterijah vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*.

Gupta in Ravishankar (2005) sta testirala protimikrobni učinek različnih past, kot so česnova, ingverjeva, korenčkova in kurkumina na bakterije vrste *E. coli* O157:H7 v mletem govejem mesu. Za komercialno ingverjevo pasto v mletem govejem mesu so tudi dokazali protimikrobni učinek pri bakterijah vrste *E. coli* O157:H7. Solomakos in sod. (2007) so prav tako pokazali protimikrobno aktivnost eteričnega olja timijana in nizina na bakterije vrste *L. monocytogenes* v mletem govejem mesu.

Selim (2011) je dokazal, da ima eterično olje timijana protimikrobni učinek na bakterije vrste *E. coli* O175:H7 v feta siru in mletem govejem mesu in tako bi lahko eterično olje timijana potencialno uporabljali kot naravni konzervans v živilih.

Kotzekidou in sod. (2008) so ugotovili, da rastlinski ekstrakti in eterična olja izgubijo protimikrobno učinkovitost pri bakterijah vrst *E. coli* in *L. monocytogenes*, ko so dodane k živilu.

4.6 SENZORIČNA ANALIZA MLETEGA MESA Z DODANIM EKSTRAKTOM *A. katsumadai*

Namen naloge je bil tudi ugotoviti, ali lahko ekstrakt *A. katsumadai* uporabimo v mletem govejem mesu v koncentraciji, ki bi imela na izbrane patogene bakterije protimikrobni učinek.

Pri senzorični analizi smo ocenjevali pečeno mleto goveje meso z dodanim ekstraktom *A. katsumadai*, ki je bil enkrat raztopljen v DMSO, drugič pa v EtOH. Ocenjevali smo okus in vonj. 0 točk je pomenilo neznačilen vonj, 5 točk pa značilen vonj po govejem mesu. Za okus je prav tako 0 točk pomenilo neznačilen okus, 5 točk pa značilen okus po govejem mesu.

Preglednica 20: Senzorična analiza mletega mesa z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* raztopljenim v DMSO

Številka vzorca	mg <i>A. katsumadai</i> /g mletega mesa	DMSO (%)	Vonj (0-5 točk)	Okus (0-5 točk)
1	0	0	5	5
2	/	0	5	5
3	/	0,1875	2	2
4	/	0,375	1	1
5	/	0,75	0	0
6	/	1,5	0	0
7	/	3,0	0	0
8	0,016	0,1875	3,5	2,5
9	0,032	0,375	2	1,5
10	0,064	0,75	2	0
11	0,12825	1,5	1	0
12	0,2565	3,0	0	0
13	0,513	6,0	0	0

Vzorca 1 in 2, ki nista vsebovala nobene protimikrobne snovi sta imela značilen vonj in okus po mesu (5 točk). Pri vzorcih 8-13, kjer je bil dodan ekstrakt *A. katsumadai* raztopljen

v DMSO, so rezultati pokazali, da je vzorec 8 sprejemljiv, medtem ko so ostali vzorci 10-13, kjer je bila koncentracija *A. katsumadai* in DMSO večja, nesprejemljivi. Vzorci so imeli vonj po *A. katsumadai* in DMSO. Vzorci 3-7, kjer je bil mletemu mesu dodan samo DMSO so bili po vonju in okusu nesprejemljivi. Vzorci 5, 6, 7, 12 in 13 so bili že toplotno neobdelani nesprejemljivi zaradi zelo neprijetnega vonja.

Preglednica 21: Senzorična analiza mletega mesa z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* raztopljenim v EtOH

Vzorec	mg <i>A. katsumadai</i> /g mletega mesa	70% EtOH (%)	Vonj (0-5 točk)	Okus (0-5 točk)
1	0	0	5	5
2	/	0	5	5
3	/	0,694	4,5	3,5
4	/	1,39	2,5	2,0
5	/	2,78	0	0
6	/	5,55	0	0
7	/	11,0	0	0
8	0,032	0,347	2,5	0
9	0,064	0,694	0	0
10	0,12825	1,39	0	0
11	0,2565	2,78	0	0
12	0,513	5,55	0	0
13	1,026	11,0	0	0

Vzorci 5, 6, 7, 12 in 13 so bili že toplotno neobdelani nesprejemljivi zaradi zelo neprijetnega vonja. Pri vzorcih 8-13, kjer je bil dodan ekstrakt *A. katsumadai* raztopljen v EtOH, smo ugotovili, da so vsi vzorci nesprejemljivi. Večja ko je bila dodana koncentracija ekstrakta *A. katsumadai*, bolj je bil vonj in okus neprijeten. Pri vzorcih 3-7, kjer je bila dodan samo EtOH je bil samo vzorec 3, kjer je bila koncentracija EtOH najmanjša, po okusu in vonju sprejemljiv, vzorec 11 je bil še na meji sprejemljivega, medtem ko so bili ostali vzorci nesprejemljivi. Edino vzorca 1 in 2 sta imela značilen vonj, saj ni bilo dodane ne *A. katsumadai* in ne EtOH.

Solomakos in sod. (2007) so v svojem eksperimentalnem delu senzorično ocenjevali mleto goveje meso z dodatkom eteričnega olja timijana. Meso so zavili v aluminijasto folijo in kuhali v parni posodi. Rezultati so pokazali, da je bilo meso z nizko vsebnostjo (0,3 % in 0,6 %) eteričnega olja timijana sprejemljivo, medtem ko meso z 0,9 % eteričnega olja timijana ni bilo več sprejemljivo.

Skandamis in Nychas (2001) sta raziskovala videz in vonj mešanega mletega mesa z dodatkom 1 % eteričnega olja origana ter ugotovila, da sta videz in vonj mesa sprejemljiva.

V našem poskusu je bilo mleto meso po okusu in vonju sprejemljivo pri najnižji koncentraciji ekstrakta *A. katsumadai* (0,016 mg/ml) raztopljenim v DMSO in kjer je bilo mletemu govejemu mesu dodan samo etanol (0,694 %). Vzorci mletega mesa, kjer je bila koncentracija ekstrakta *A. katsumadai* od 0,032 mg/ml do 1,026 mg/ml, so bili senzorično nesprejemljivi. Vzorci mesa so imeli močan vonj in okus po ekstraktu *A. katsumadai*, DMSO ali etanolu.

5 SKLEPI

- Ekstrakt *A. katsumadai* ima protimikrobni učinek na bakterije vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* v gojišču MHB.
- Protimikrobni učinek izbranih kombinacij ekstrakta *A. katsumadai* in Vivox, Vivox 70 in EGKG v gojišču MHB ni sinergističen.
- Ekstrakt *A. katsumadai* ima protimikrobni učinek na bakterijski koktail v gojišču MHB po 48 urah, saj popolnoma inhibira rast bakterij vrst *L. monocytogenes* in *C. jejuni*, minimalno pa tudi bakterije vrste *E. coli*.
- Znižanje pH (7,0 do 5,3) ne vpliva na protimikrobni učinek ekstrakta *A. katsumadai* na bakterijski koktail v gojišču MHB po 48 urah.
- Znižanje temperature (37 °C do 8 °C) zmanjša protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG v gojišču MHB po 48 urah na bakterijski koktail pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* in *C. jejuni*.
- Ekstrakt *A. katsumadai* deluje protimikrobno na bakterije vrst *L. monocytogenes*, *E. coli* in *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v mletem mesu.
- Senzorične lastnosti mletega mesa z dodanim ekstraktom *A. katsumadai* v protimikrobno učinkoviti koncentraciji so nesprejemljive.

6 POVZETEK

Ljudje stremimo k zdravemu načinu življenja in s tem tudi k zdravemu načinu prehranjevanja. Živila morajo biti varna, da ne ogrožajo zdravja potrošnikov preko kemijskih in bioloških onesnaževal. Vsako živilo ima rok uporabe, ki je največkrat podaljšan z različnimi tehnološkimi postopki in tudi s sintetičnimi konzervansi. Vendar danes želimo potrošniki čim manj sintetičnih konzervansov, zato se išče vedno več naravnih konzervansov, kot so razna zelišča, začimbe in drugi dodatki naravnega izvora.

Glavni namen konzerviranja je upočasnitev oziroma inhibicija mikrobne rasti. To lahko naredimo z različnimi postopki, ki vključujejo na primer hlajenje, zmrzovanje, sušenje, liofilizacijo, soljenje, konzerviranje s sladkorjem, vakuumsko pakiranje in dodatek konzervansov. Zaradi vse večje odpornosti mikroorganizmov na protimikrobna sredstva, se iščejo vedno nova protimikrobna sredstva.

V eksperimentalnem delu smo uporabili naravne protimikrobne snovi rastlinskega izvora. Spremljali smo protimikrobno aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* ter kombinacijo ekstrakta in EGKG pri bakterijah vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* in pri bakterijskem koktailu omenjenih bakterij.

Glede na dobljene rezultate z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici smo izbranim kombinacijam ekstrakta *A. katsumadai* (1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml) in EGKG (0,625 mg/ml) določili protimikrobno učinkovitost na bakterijskem koktailu v gojišču MHB.

Preverili smo tudi, če okoljska dejavnika, pH in temperatura, vplivata na protimikrobno aktivnost ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG na bakterijski koktail. Ugotovili smo, da znižanje pH ne vpliva na protimikrobno delovanje ekstrakta *A. katsumadai* pri bakterijah vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB. Znižanje temperature je zmanjšalo protimikrobno delovanje kombinacije ekstrakta *A. katsumadai* in EGKG pri bakterijah vrst *L. monocytogenes* in *C. jejuni*. Pri bakterijah vrste *E. coli* je bilo večje protimikrobno delovanje pri 8 °C.

Protimikroben učinek ekstrakta *A. katsumadai* na bakterijski koktail smo dokazali tudi v mletem mesu pri bakterijah vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*.

S senzorično analizo smo ocenjevali mleto meso, kateremu je bil enkrat dodan ekstrakt *A. katsumadai*, ki je bil raztopljen v DMSO, drugič pa v EtOH. Ugotovili smo, da ima pečeno mleto meso neprijeten okus po *A. katsumadai*, DMSO ali EtOH, ki se je z večanjem koncentracije *A. katsumadai*, DMSO ali EtOH stopnjeval. Edino vzorec mesa, ki mu je bila dodana najmanjša koncentracija ekstrakta *A. katsumadai* (0,016 mg/ml) raztopljenim v DMSO je bil senzorično sprejemljiv.

Povzamemo lahko, da je ekstrakt *A. katsumadai* imel protimikrobni učinek na bakterije vrst *E. coli*, *L. monocytogenes* in *C. jejuni*, dokazali smo tudi protimikrobni učinek ekstrakta *A. katsumadai* v kombinaciji z EGKG na bakterijski koktail. Senzorična analiza je pokazala, da ekstrakta *A. katsumadai* v koncentraciji, ki bi zavirala rast omenjenih bakterij, ne moremo uporabiti v mletem mesu zaradi neprijetnega vonja in okusa.

7 VIRI

- 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
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 564-582
- Das S., Tanwar J., Hamees S., Fatima Z. 2014. Antimicrobial potential of epigallocatechin-3-gallate (ECGC): a green tea polyphenol. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, 2: 167-174
- Davidson P.M., Branen J.K. 2005. Food antimicrobials – an introduction. V: *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A. L. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis group: 1-9
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G. 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 101-109
- Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21: 703-714
- Dortet L., Veiga-Chacon E., Cossart P. 2009. *Listeria monocytogenes*. V: *Encyclopedia of microbiology*. 3rd ed. Schaechter M. (ed.). San Diego, Academic Press: 182-198
- EFSA. 2013. The European Union report on trends and sources of zoonoses, zoonotic and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11, 4: 3129, 10.2903/j.efsa.2013:250 str.
- Emeršič A., Pirtošek Z., Štampelj M., Štrukelj B. 2013. Zdravljenje Alzheimerjeve bolezni. *Farmacevtski vestnik*, 64: 202-207
- Emiroglu Z.K., Yemis G.P., Coskun B.K., Candogan K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86: 283-288

- Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Ta-vares 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
- Gardner J.R. 1977. Principles of antimicrobial activity. V: Disinfection, sterilization and Preservation. 2nd ed. Block S.S. (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger: 1049 str.
- Golob T., Jamnik M., Bertoncelj J., Doberšek U. 2005. Senzorična analiza: metode in preskuševalci. Acta agriculturae Slovenica, 85: 55-66
- Golob T., Bertoncelj J., Doberšek U., Jamnik M. 2006. Senzorična analiza živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Gordon N.C., Wareham D.W. 2010. Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. International Journal of Antimicrobial Agents, 36: 129-131
- Guévremont E., Lamoureux L., Ward P., Villeneuve S. 2015. Survival of *Campylobacter jejuni* on fresh spinach stored at 4 °C or 12 °C. Food Control, 50: 736-739
- Gupta S., Ravishankar S. 2005. A comparison of the antimicrobial activity of garlic, ginger, carrot, and turmeric pastes against *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory buffer and ground beef. Foodborne Pathogens and Disease, 2: 330-340
- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. 2009. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiology, 26: 142-150
- Gyawali R., Ibrahim Salam A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. Food Control, 46: 412-429
- Hessen M.T., Kaye D. 2004. Principles of use of antibacterial agents. Infectious Disease Clinics of North America, 18: 435-450
- Huang W.Z., Zhang C.F., Zhang M., Wang Z.T. 2007. A new biphenylpropanoid from *Alpinia katsumadai*. Journal of Chinese Chemical Society, 54: 1553-1556
- Issabeagloo E., Kermanizadeh P., Taghizadieh M., Forughi R. 2012. Antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against *Staphylococcus* spp. African Journal of Microbiology Research, 6: 5039-5042
- Jeon J., Kim J.H., Lee C.K., Oh C.H., Song H.J. 2014. The antimicrobial activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate and green tea extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolated from skin wounds. Annals of Dermatology, 26: 564-569

- 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 essential oil of *Lantana xenica*. *Planta Medica*, 68: 762-764
- 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
- Kaper J.B., Nataro J.B., Mobley H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 123-140
- Klančnik A., Groblacher B., Kovač J., Bucar F., Smole Možina S. 2012. Anti-Campylobacter and resistance-modifying activity of *Alpinia katsumadai* seed extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 5: 1249-1262
- Klančnik A., Piskernik S., Bučar F., Vučkovič D., Smole Možina S., Jeršek B. 2014. Reduction of microbiological risk in minced meat by a combination of natural antimicrobials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94: 2758-2756
- 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
- Klein G., Rüben C., Upmann M. 2013. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current Microbiology*, 67: 200-208
- Kotzekidou P., Giannakidis P., Boulamatsis A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 119-127
- Kovač J., Gavarić N., Bucar F., Smole Možina S. 2014. Antimicrobial and resistance modulatory activity of *Alpinia katsumadai* seed phenolic extract, essential oil and post-distillation extract. *Food Technology and Biotechnology*, 52: 248-254
- Lahlou S., Figueiredo A.F., Magalhaes P.J.C., Leal-Cardoso J.H. 2002. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, on normotensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80: 1125-1131
- Lee M.Y., Lee N.H., Lee J.A., Jung D., Kim J.H., Shin H.K. 2010. *Alpinia katsumadai* seed extract attenuate oxidative stress and asthmatic activity in a mouse model of allergic asthma. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 1746-1752
- Li H., Yoo K. Y., Lee H.C., Choi J. H., Hwang I. K., Kim J. D., Kim Y. M., Kang I. J., Won M. H. 2011. Neuroprotective Effects of *Alpinia katsumadai* against neuronal damage in the Gerbil Hippocampus Induced by Transient Cerebral Ischemia. *International Journal of Neuroscience*, 121: 490-496

- Liu H., Lu L., Pan Y., Sun X., Hwang C.A., Zhao Y., Wu V.C.H. 2015. Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*, 52: 78-84
- Lopez-Malo Vigil A., Palou E., Parish M.E., Davidson P.M. 2005. Methods for activity assay and evaluation of results. V: *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A. L. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis group: 650-677
- Magajma B. A., Schraft H. 2015. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VNBC) in low nutrient conditions at 4 °C more quickly than their planktonic counterparts. *Food Control*, 50: 45-50
- Menghua W., Ping G., Sze W.T., Hubiao C., Zhongzen Z. 2012. An ethnobotanical survey of medical spices used in Chinese hotpot. *Food Research International*, 48: 226-232
- Müller-Premru M. 2002. Nesporogeni po Gramu pozitivni bacili. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 255-264
- Nan P., Hu Y., Zhao J., Feng Y., Zhong Y. 2004. Chemical composition of the essential oils of two *Alpinia* species from Hainan Island, China. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 157-160
- Novy P., Rondevaldova J., Kourimska L., Kokoska L. 2013. Synergistic interactions of epigallocatechin gallate and oxytetracycline against various drug resistant *Staphylococcus aureus* strains *in vitro*. *Phytomedicine*, 20: 432-435
- Ojeda-Sana A.M., Baren C.M., Elechosa M.A., Juarez M.A., Moreno S. 2013. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control*, 31: 189-195
- 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., Pallens M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Villet A.H.M., Whitehead S., Barrell B. G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403: 665-668
- Peter K.V., Nirmal Babu K. 2004. Introduction. V: *Handbook of herbs and spices*. Vol. 2. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 1-8
- Pillai S.K., Moellering R.C., Eliopoulos G.M. 2005. Antimicrobial combinations. V: *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. Lorian V. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 365-440
- Rates S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613

- Rozman B., Gašperlin M., Kristl J. 2006. Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov. *Medicinski razgledi*, 45: 141-153
- Rožman T., Jeršek B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 91,1: 51-58
- Schaechter M. 2009. *Escherichia coli*. V: Encyclopedia of microbiology. 3rd ed. Schaechter M. (ed.). San Diego, Academic Press: 125-132
- Si W., Gong J., Tsao R., Kalab M., Yanf R., Yin Y. 2006. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 1125: 204-210
- Selim S. 2011. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (VRE) and *Escherichia coli* O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 187-196
- Skandamis P.N., Nychas G.-J.E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modifies atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 1011-1022
- Skvarča M. 1999. *Gastronomija: osnove prehranjevanja, senzorične lastnosti hrane, sodobne tehnologije hrane*. Maribor, Višja strokovna šola za gostinstvo; Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 9-18
- Solomakos N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. 2007. 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
- Spanu C., Scarano C., Ibba M., Spanu V. 2015. Occurrence and traceability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from sheep's milk cheese-making plants environment. *Food Control*, 47: 318-235
- Starčič-Erjavec M., Križan-Hergouth V., Gubina B., Žgur-Bertok D. 2008. Prevalence of toxin encoding genes in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in Slovenia. *Zdravniški vestnik*, 6-7: 427-432
- Strober W. 2011. Adherent-invasive *E. coli* in Chron disease: bacterial «agent provocateur». *Journal of Clinical Investigation*, 121,3: 841-844
- Taguri T., Tanaka T., Kuono I. 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27: 1965-1969

- Välimaa A.L., Timisjärvi A.T., Virtanen E. 2015. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain-A review. *Food Control*, 55: 103-114
- Volokhov D., Rasooly A., Chumakov K., Chizhikov V. 2002. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 4720-4728
- Yap X.S.P., Lim S.H.E., Hu C.P., Yiap B.C. 2013. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferre multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*, 20: 710-713
- Zorman T., Heyndrickx M., Uzunović-Kamberović S., Smole Možina S. 2006. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 24-33

ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici prof. dr. Barbari Jeršek za strokovne nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu ter pri nastajanju diplomske naloge. Hvala za vso podporo in potrpežljivost.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Lei Demšar za hiter in natančen pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala je namenjena moji družini za vso pomoč, podporo in razumevanje ter fantu Roku za vsakodnevne spodbude in potrpežljivost v času študija.

PRILOGE

Priloga A: Povprečno število bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

pH	Povprečno število bakterij vrste <i>E. coli</i> ± SD (log cfu/ml)											
	Brez dodatka <i>A. katsumadai</i>				Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 0,513 mg/ml				Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 1,026 mg/ml			
	0 h	4 h	24 h	48 h	0 h	4 h	24 h	48 h	0 h	4 h	24 h	48 h
7,0	5,41±0,1	8,33±0,1	8,70±0,1	8,38±0,1	5,53±0,2	8,05±0,1	7,95±0,6	8,74±0,1	5,40±0,1	7,19±0,1	8,26±0,1	8,14±0,2
6,0	5,54±0,1	8,26±0,1	7,67±0,0	8,62±0,1	5,49±0,2	8,07±0,2	8,38±0,1	8,46±0,2	5,57±0,2	7,28±0,2	8,17±0,2	8,13±0,1
5,3	5,55±0,1	8,16±0,1	8,55±0,2	8,58±0,2	5,66±0,1	7,87±0,1	8,45±0,1	8,47±0,1	5,49±0,2	7,59±0,3	7,99±0,1	8,11±0,1

Priloga B: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

pH	Indeks inhibicije (%) rasti bakterij vrste <i>E. coli</i>					
	Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 0,513 mg/ml			Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 1,026 mg/ml		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
7,0	3,4±1,3	8,6±6,4	/	13,6±1,7	5,1±1,3	2,8±2,9
6,0	2,4±1,9	/	1,9±2,3	11,9±1,9	/	5,7±1,3
5,3	3,4±1,8	1,2±1,5	1,3±1,6	6,9±3,7	6,5±1,2	5,4±1,0

Legenda: /, ni inhibicije rasti

Priloga C: Povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3 pri pH=7,0, 6,0, 5,3

pH	Povprečno število bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> ± SD (log cfu/ml)											
	Brez dodatka <i>A. katsumadai</i>				Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 0,513 mg/ml				Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 1,026 mg/ml			
	0 h	4 h	24 h	48 h	0 h	4 h	24 h	48 h	0 h	4 h	24 h	48 h
7,0	6,03±0,1	7,58±0,2	6,32±0,4	6,66±0,2	5,72±0,1	3,79±0,2	0,00±0,0	0,00±0,0	5,65±0,2	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0
6,0	6,01±0,1	7,47±0,1	6,51±0,1	6,53±0,2	5,79±0,1	5,47±0,1	0,00±0,0	0,00±0,0	5,65±0,1	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0
5,3	6,04±0,1	7,27±0,2	6,09±0,4	6,63±0,2	5,78±0,2	4,71±0,1	0,00±0,0	0,00±0,0	5,64±0,2	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0

Priloga D: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

pH	Indeks inhibicije (%) rasti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>					
	Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 0,513 mg/ml			Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 1,026 mg/ml		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
7,0	49,9±3,1	100,0±0,0	100,0±	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
6,0	26,8±1,8	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
5,3	35,2±1,9	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Priloga E: Povprečno število bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

pH	Povprečno število bakterij vrste <i>C. jejuni</i> ± SD (log cfu/ml)											
	Brez dodatka <i>A. katsumadai</i>				Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 0,513 mg/ml				Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 1,026 mg/ml			
	0 h	4 h	24 h	48 h	0 h	4 h	24 h	48 h	0 h	4 h	24 h	48 h
7,0	5,65±0,1	5,79±0,1	6,20±0,3	5,64±0,1	7,49±0,1	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0	6,18±0,1	3,30±0,3	0,00±0,0	0,00±0,0
6,0	5,69±0,1	5,72±0,1	6,43±0,2	5,63±0,1	6,26±0,2	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0	6,32±0,1	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0
5,3	5,72±0,2	5,73±0,1	6,49±0,1	5,61±0,1	6,55±0,1	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0	6,32±0,2	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0

Priloga F: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml in 0,513 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* pri pH= 7,0, 6,0, 5,3

pH	Indeks inhibicije (%) rasti bakterij vrste <i>C. jejuni</i>					
	Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 0,513 mg/ml			Vsebnost <i>A. katsumadai</i> 1,026 mg/ml		
	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
7,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	43,0±5,2	100,0±0,0	100,0±0,0
6,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
5,3	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Priloga G: Povprečno število bakterij vrste *E. coli* pri 37 °C v bakterijskem koktailu gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Povprečno število bakterij vrste <i>E. coli</i> (log cfu/ml)			
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	0 h	4 h	24 h	48 h
0	0	5,57±0,2	8,05±0,3	8,68±0,1	8,99±0,1
1,026	0	5,64±0,2	7,38±0,2	8,32±0,2	8,08±0,2
0	0,625	5,62±0,2	7,04±0,2	8,56±0,2	8,81±0,1
1,026	0,625	5,67±0,3	6,45±0,1	8,24±0,2	8,34±0,2

Priloga H: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Povprečno število bakterij vrste <i>E. coli</i> (log cfu/ml)		
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	4 h	24 h	48 h
1,026	0	8,4±2,6	4,1±2,2	10,1±1,8
0	0,625	12,5±2,9	1,4±1,8	2,0±1,2
1,026	0,625	19,8±1,2	5,1±1,8	7,3±2,5

Priloga I: Povprečno število bakterij vrste *E. coli* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Povprečno število bakterij vrste <i>E. coli</i> (log cfu/ml)			
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	0 h	4 h	24 h	48 h
0	0	5,66±0,1	5,55±0,1	6,07±0,1	6,63±0,2
1,026	0	5,61±0,2	5,62±0,2	5,97±0,3	5,84±0,3
0	0,625	5,71±0,1	5,74±0,1	5,62±0,2	5,17±0,1
1,026	0,625	5,59±0,1	5,84±0,0	5,67±0,2	5,15±0,1

Priloga J: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *E. coli* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Indeks inhibicije (%) bakterij vrste <i>E. coli</i>		
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	4 h	24 h	48 h
1,026	0	/	1,6±4,4	11,8±4,5
0	0,625	/	7,4±2,6	22,0±2,0
1,026	0,625	/	6,5±2,7	22,3±1,0

Legenda: /, ni inhibicije rasti

Priloga K: Povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Povprečno število bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (log cfu/ml)			
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	0 h	4 h	24 h	48 h
0	0	6,04±0,4	7,23±0,2	6,75±0,2	6,87±0,2
1,026	0	5,71±0,2	4,81±0,1	0,00±0,0	0,00±0,0
0	0,625	5,86±0,2	5,66±0,5	5,82±0,2	5,59±0,2
1,026	0,625	5,53±0,5	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0

Priloga L: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Indeks inhibicije (%) bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>		
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	4 h	24 h	48 h
1,026	0	33,4±1,8	100,0±0,0	100,0±0,0
0	0,625	21,7±6,7	13,8±2,4	18,6±3,1
1,026	0,625	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Priloga M: Povprečno število bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Povprečno število bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> (log cfu/ml)			
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	0 h	4 h	24 h	48 h
0	0	6,10±0,1	5,87±0,3	7,08±0,3	8,10±0,2
1,026	0	5,51±0,2	5,71±0,1	5,45±0,1	5,21±0,1
0	0,625	5,90±0,1	6,05±0,2	5,43±0,4	5,18±0,1
1,026	0,625	5,77±0,1	5,63±0,3	5,38±0,2	4,52±0,3

Priloga N: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Indeks inhibicije (%) bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>		
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	4 h	24 h	48 h
1,026	0	2,7±2,6	23,0±1,9	35,7±1,0
0	0,625	/	23,2±5,0	36,1±1,6
1,026	0,625	4,0±5,9	24,0±2,7	44,2±3,9

Legenda: /, ni inhibicije rasti

Priloga O: Povprečno število bakterij vrste *C. jejuni* pri 37 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Povprečno število bakterij vrste <i>C. jejuni</i> (log cfu/ml)			
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	0 h	4 h	24 h	48 h
0	0	5,75±0,3	5,69±0,5	5,86±0,2	5,09±0,2
1,026	0	5,55±0,3	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0
0	0,625	5,84±0,4	4,88±0,1	4,97±0,1	3,40±0,4
1,026	0,625	5,79±0,5	0,00±0,0	0,00±0,0	0,00±0,0

Priloga P: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri 37 °C v bakterijskem koktailu gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Indeks inhibicije (%) bakterij vrste <i>C. jejuni</i>		
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	4 h	24 h	48 h
1,026	0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
0	0,625	14,3±2,0	15,2±2,2	33,2±8,4
1,026	0,625	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Priloga Q: Povprečno število bakterij vrste *C. jejuni* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Povprečno število bakterij vrste <i>C. jejuni</i> (log cfu/ml)			
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	0 h	4 h	24 h	48 h
0	0	5,89±0,1	5,58±0,3	5,57±0,1	5,46±0,1
1,026	0	5,91±0,1	4,57±0,1	5,201±0,1	0,00±0,0
0	0,625	5,78±0,2	5,44±0,4	5,04±0,2	4,07±0,1
1,026	0,625	5,72±0,2	4,29±0,2	0,00±0,0	0,00±0,0

Priloga R: Indeks inhibicije rasti bakterij vrste *C. jejuni* pri 8 °C v bakterijskem koktailu v gojišču MHB z 1,026 mg/ml ekstrakta *A. katsumadai* in 0,625 mg/ml EGKG

Vsebnost protimikrobne snovi (mg/ml)		Indeks inhibicije (%) bakterij vrste <i>C. jejuni</i>		
<i>A. katsumadai</i>	EGKG	4 h	24 h	48 h
1,026	0	18,1±1,8	6,6±1,5	100,0±0,0
0	0,625	2,6±3,5	9,7±6,4	25,5±2,2
1,026	0,625	23,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0