

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Barbara VOVK

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKA  
ROŽMARINA NA KVASOVKE KVARLJIVKE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Barbara VOVK

**PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKA ROŽMARINA NA  
KVASOVKE KVARLJIVKE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACT  
AGAINST SPOILAGE YEASTS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani v letu 2007.

Za mentorico diplomskega dela je bila imenovana prof. dr. Polona Jamnik in za recenzentko prof. dr. Helena Abramovič.

Mentorica: prof. dr. Polona Jamnik

Recenzentka: prof. dr. Helena Abramovič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Članica:

Članica:

Datum zagovora:

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

Barbara Vovk

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.24:582.282.23:547.9+547.56(043)=163.6
- KG kvasovke/kvasovke kvarljivke/*Saccharomyces cerevisiae/Hanseniaspora uvarum/Zygosaccharomyces bailii/Pichia membranifaciens*/protomikroben delovanje/rastlinski izvlečki/rožmarin/*Rosmarinus officinalis* L.
- AV VOVK, Barbara
- SA JAMNIK, Polona (mentorica) / ABRAMOVIČ, Helena (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2016
- IN PROTOMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKA ROŽMARINA NA KVASOVKE KVARLJIVKE
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIII, 67 str., 8 pregl., 23 sl., 13 pril., 140 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen naloge je bil preveriti protomikroben delovanje izvlečka rožmarina na kvasovke kvarljivke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753. Uporabili smo komercialni izvleček rožmarina Vivox 40, ki smo ga dodali celicam kvasovk do koncentracij 0,1; 0,5; 1,0 in 2,0 g/L. Protomikroben delovanje izvlečka rožmarina smo preverili z določanjem živosti in kultivabilnosti. Uporabili smo hitro metodo določanja živosti LIVE/DEAD® FungaLight™, ki temelji na spremeljanju integritete celične membrane s pomočjo fluorescentnih barvil (SYTO® 9 in propidijev jodid). Izvleček rožmarina je zmanjšal živost in kultivabilnost kvasovk, a sta se po daljšem času izpostavite (20 ur) kvasovk izvlečku pri nižjih koncentracijah tako živost kot kultivabilnost povečali. Izvleček rožmarina je pri koncentraciji 2,0 g/L popolnoma inhibiral rast kvasovk *Z. bailii* in *P. membranifaciens*. Laboratorijski sev kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 753 je bil bolj občutljiv na izvleček rožmarina kot sev *S. cerevisiae* ZIM 739, ki je bil izoliran iz mošta Rebule. Protomikroben delovanje izvlečka rožmarina na kvasovke je odvisno od koncentracije izvlečka, časa izpostavitve, vrste in seva kvasovke.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.24:582.282.23:547.9+547.56(043)=163.6  
CX yeasts/spoilage yeast/ *Saccharomyces cerevisiae/Hanseniaspora uvarum/Zygosaccharomyces bailii/Pichia membranifaciens*/antimicrobial activity/plant extracts/rosemary/*Rosmarinus officinalis* L.  
AU VOVK, Barbara  
AA JAMNIK, Polona (supervisor) / ABRAMOVIČ, Helena (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2016  
TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ROSEMARY EXTRACT AGAINST SPOILAGE YEASTS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XIII, 67 p., 8 tab., 23 fig., 13 ann., 140 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of our research was to investigate the antimicrobial activity of rosemary extract against spoilage yeasts *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 and *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753. We used a commercial rosemary extract Vivox 40, which was added to the yeast cells at concentrations of 0,1; 0,5; 1,0 and 2,0 g/L. Antimicrobial activity of rosemary extract was determined by investigating yeast viability and culturability. We used a rapid method for the determination of viability LIVE/DEAD® FungaLight™, based on monitoring integrity of the cell membrane using fluorescent dyes (SYTO® 9 and propidium iodide). Rosemary extract decreased yeast viability and culturability, but after a longer exposure time (20 hours) of yeast cells to extract at lower concentrations, both viability and culturability increased. Rosemary extract completely inhibited the growth of the yeasts such as *Z. bailii* and *P. membranifaciens* at a concentration of 2,0 g/L. The laboratory strain of the yeast *S. cerevisiae* ZIM 753 was more sensitive to rosemary extract than a strain of *S. cerevisiae* ZIM 739, isolated from the must Rebula. Antimicrobial activity of rosemary extract against yeasts depends on the concentration of the extract, the exposure time, yeast type and yeast strain.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVANJA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 RASTLINSKI IZVLEČKI.....	3
<b>2.1.1 Uporaba rastlinskih izvlečkov v živilstvu.....</b>	<b>5</b>
2.1.1.1 Predpisi o uporabi rastlinskih izvlečkov v živilstvu .....	6
2.1.1.2 Omejitve uporabe rastlinskih izvlečkov v živilstvu.....	6
2.2 ROŽMARIN ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	6
2.2.1 Ekstrakcija in priprava izvlečkov rožmarina .....	7
2.2.2 Kemijska sestava rožmarina .....	7
2.2.3 Protimikrobnlo delovanje rožmarina ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	8
2.2.4 Uporaba izvlečkov rožmarina v živilski industriji .....	9
2.3 KVASOVKE KVARLJIVKE.....	9
2.3.1 Posledice delovanja kvasovk kvarljivk v živilih .....	10
2.3.2 Pomembnejše vrste kvasovk kvarljivk .....	10
2.3.3 Preprečevanje kvara živil, ki ga povzročajo kvasovke .....	12
2.4 <i>IN VITRO</i> METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA RASTLINSKIH IZVLEČKOV NA KVASOVKE .....	13
2.4.1 Metode difuzije .....	13
2.4.2 Metode razredčevanja .....	14
2.4.3 Tankoplastna kromatografija (TLC) – bioavtografija .....	15
2.4.4 ATP bioluminiscenca.....	16
2.4.5 Pretočna citofluorometrija.....	16
2.4.6 Metode spremeljanja kinetike protimikrobnega delovanja .....	16
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 POTEK DELA .....	17
3.2 MATERIAL .....	18
<b>3.2.1 Mikroorganizmi.....</b>	<b>18</b>
3.2.2 Izvleček rožmarina .....	18
3.2.3 Gojišča .....	19

3.2.3.1 Trdno YEPD gojišče.....	19
3.2.3.2 Tekoče YEPD gojišče.....	19
<b>3.2.4 Reagenti in raztopine .....</b>	<b>19</b>
3.2.4.1 Aerobna submerzna kultivacija kvasovk .....	20
3.2.4.2 Štetje celic.....	20
3.2.4.3 Določanje živosti celic.....	20
<b>3.2.5 Oprema in aparature.....</b>	<b>21</b>
3.2.5.1 Steklovina in potrošni material .....	21
3.2.5.2 Aparature .....	21
3.2.5.3 Programska oprema .....	22
<b>3.3 METODE.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.1 Ohranjanje kulture kvasovk .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.2 Spremljanje rasti kvasovk z merjenjem optične gostote .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.3 Štetje celic z Bürker-Türkovo števno ploščico .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.4 Aerobna submerzna kultivacija (glavni poskus) .....</b>	<b>24</b>
3.3.4.1 Kultivacija kvasovk do eksponentne faze rasti in priprava suspenzije celic s koncentracijo $1 \cdot 10^7$ celic/mL .....	24
3.3.4.2 Izpostavitev kvasovk izvlečku rožmarina.....	24
<b>3.3.5 Določanje živosti .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.6 Preverjanje kultivabilnosti .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3.7 Statistična obdelava podatkov.....</b>	<b>26</b>
3.3.7.1 Povprečna vrednost.....	26
3.3.7.2 Standardni odklon.....	27
3.3.7.3 Statistična analiza z računalniškim programom SAS .....	27
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>28</b>
4.1 SPREMLJANJE RASTI KVASOVK IN DOLOČITEV SREDINE EKSPONENTNE FAZE RASTI V GOJIŠČU BREZ DODANEGA IZVLEČKA ROŽMARINA .....	28
4.2 DOLOČANJE ŽIVOSTI PO IZPOSTAVITVI KULTURE KVASOVK IZVLEČKU ROŽMARINA .....	32
4.2.1 Vpliv koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk .....	32
4.2.2 Vpliv izvlečka rožmarina na živost kvasovk: primerjava med kvasovkami znotraj iste koncentracije po določenem času izpostavitve izvlečku.....	35
4.2.3 Vpliv časa izpostavitve izvlečku rožmarina na živost kvasovk .....	38
4.3 PREVERJANJE KULTIVABILNOSTI PO IZPOSTAVITVI KULTURE KVASOVK IZVLEČKU ROŽMARINA .....	43
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>48</b>
5.1 RAZPRAVA.....	48
5.2 SKLEPI.....	52
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>53</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>54</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Glavne protimikrobne snovi rastlinskega porekla z opisom nekaterih znanih načinov protimikrobnega delovanja (Burt, 2004; Cowan, 1999; Friedman in sod., 2002; Gill in Holley, 2006; Holley in Patel, 2005; Pérez-Fons in sod., 2006).....	4
<b>Preglednica 2:</b> Kemijska sestava lista rožmarina (Anadón in sod., 2008; The Merck index, 2006; Patri in Silano, 2002; PDR for herbal medicines, 2007; WHO, 2009) .....	7
<b>Preglednica 3:</b> Vrste kvasovk, ki so najpogosteje povezane s kvarom živil (Fleet, 2011; Pitt in Hocking, 2009) .....	11
<b>Preglednica 4:</b> Sevi kvasovk kvarljivk, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu..	18
<b>Preglednica 5:</b> Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993).....	19
<b>Preglednica 6:</b> Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993) .....	19
<b>Preglednica 7:</b> Sestava 0,1 M PBS pufra (pH = 7,2) .....	20
<b>Preglednica 8:</b> Določitev vrednosti OD <sub>650</sub> in števila celic/mL v sredini eksponentne faze rasti za posamezne kvasovke.....	31

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Shema eksperimentalnega dela.....	17
<b>Slika 2:</b> Shematski prikaz izbranega območja Bürker-Türkove števne ploščice (Incyto, 2010).....	23
<b>Slika 3:</b> Rastna krivulja kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min) .....	29
<b>Slika 4:</b> Rastna krivulja kvasovke <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min) .....	29
<b>Slika 5:</b> Rastna krivulja kvasovke <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min) .....	30
<b>Slika 6:</b> Rastna krivulja kvasovke <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min) .....	30
<b>Slika 7:</b> Rastna krivulja kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min) .....	31
<b>Slika 8:</b> Vpliv koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739, <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117, <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232, <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753 po 2-urni izpostavitvi izvlečku.....	32
<b>Slika 9:</b> Vpliv koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739, <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117, <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232, <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753 po 4-urni izpostavitvi izvlečku.....	33
<b>Slika 10:</b> Vpliv koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739, <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117, <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232, <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753 po 20-urni izpostavitvi izvlečku.....	34
<b>Slika 11:</b> Primerjava med kvasovkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739, <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117, <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232, <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753 znotraj iste koncentracije po 2-urni izpostavitvi izvlečku rožmarina .....	35

<b>Slika 12:</b> Primerjava med kvasovkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739, <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117, <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232, <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753 znotraj iste koncentracije po 4-urni izpostavitevi izvlečku rožmarina .....	36
<b>Slika 13:</b> Primerjava med kvasovkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739, <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117, <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232, <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753 znotraj iste koncentracije po 20-urni izpostavitevi izvlečku rožmarina .....	37
<b>Slika 14:</b> Vpliv časa izpostaviteve izvlečku rožmarina na živost kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739.....	38
<b>Slika 15:</b> Vpliv časa izpostaviteve izvlečku rožmarina na živost kvasovke <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117.....	39
<b>Slika 16:</b> Vpliv časa izpostaviteve izvlečku rožmarina na živost kvasovke <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232 .....	40
<b>Slika 17:</b> Vpliv časa izpostaviteve izvlečku rožmarina na živost kvasovke <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224.....	41
<b>Slika 18:</b> Vpliv časa izpostaviteve izvlečku rožmarina na živost kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753.....	42
<b>Slika 19:</b> Kultivabilnost kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. ....	43
<b>Slika 20:</b> Kultivabilnost kvasovke <i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. ....	44
<b>Slika 21:</b> Kultivabilnost kvasovke <i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. ....	45
<b>Slika 22:</b> Kultivabilnost kvasovke <i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. ....	46
<b>Slika 23:</b> Kultivabilnost kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. ....	47

## KAZALO PRILOG

**Priloga A1:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 739 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min).

**Priloga A2:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *H. uvarum* ZIM 117 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min).

**Priloga A3:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *Z. bailii* ZIM 2232 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min).

**Priloga A4:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *P. membranifaciens* ZIM 2224 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min).

**Priloga A5:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 753 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min).

**Priloga B1:** Izpostavitev kulture kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 739 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas.

**Priloga B2:** Izpostavitev kulture kvasovke *H. uvarum* ZIM 117 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas.

**Priloga B3:** Izpostavitev kulture kvasovke *Z. bailii* ZIM 2232 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas.

**Priloga B4:** Izpostavitev kulture kvasovke *P. membranifaciens* ZIM 2224 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas.

**Priloga B5:** Izpostavitev kulture kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 753 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas.

**Priloga C1:** Določanje vpliva različnih koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 739, *H. uvarum* ZIM 117, *Z. bailii* ZIM 2232, *P. membranifaciens* ZIM 2224 in *S. cerevisiae* ZIM 753 po 2-urni izpostavitvi izvlečku.

**Priloga C2:** Določanje vpliva različnih koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 739, *H. uvarum* ZIM 117, *Z. bailii* ZIM 2232, *P. membranifaciens* ZIM 2224 in *S. cerevisiae* ZIM 753 po 4-urni izpostavitvi izvlečku.

**Priloga C3:** Določanje vpliva različnih koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 739, *H. uvarum* ZIM 117, *Z. bailii* ZIM 2232, *P. membranifaciens* ZIM 2224 in *S. cerevisiae* ZIM 753 po 20-urni izpostavitevi izvlečku.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat
$a_w$	vodna aktivnost
CFU	(ang. colony forming unit)
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>D. anomala</i>	<i>Dekkera anomala</i>
<i>D. bruxelensis</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
ddH <sub>2</sub> O	bistilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (ang. European Food Safety Authority)
FDA	Food and Drug Administration
FRET	fluorescenčni prenos resonančne energije
GLM	splošni linearni model (ang. General Linear Model)
GMP	dobra proizvodna praksa (ang. Good Manufacturing Practices)
GRAS	splošno priznan kot varen (ang. Generally Recognised as Safe)
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti (ang. Human Immunodeficiency Virus)
<i>H. uvarum</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
M	molarnost (mol/L)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
min	minuta
obr./min	obrati na minuto
OD <sub>650</sub>	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
p	statistična značilnost
ppm	število delcev na milijon (ang. parts per million)
PBS	raztopina fosfatnega pufra
PC	papirna kromatografija
PI	propidijev jodid
<i>P. membranifaciens</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
RFU	(ang. relative fluorescense units)
RLU	(ang. relative luminiscense units)
RŽ	relativna živost
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Schiz. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SD	standardna deviacija
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. thin-layer chromatography)
VBNC	žive, a ne-kultivabilne celice (ang. viable but non-culturable)

$V_D$	delovni volumen
YE PD	gojišče (kvasni ekstrakt, pepton, glukoza)
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Z. bailii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov
<i>Z. rouxii</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
% w/v	g/100 mL

## 1 UVOD

Danes prihaja v ospredje minimalno procesiranje živil z namenom zmanjšanja alergenih odgovorov pri potrošniku. Takšna živila pa so bolj dovezeta za rast in prenos številnih novih in tradicionalnih patogenih mikroorganizmov, kar zahteva nove pristope pri konzerviranju. Problem tveganja za zdravje potrošnika zaradi uporabe sintetičnih konzervansov odpira možnost uporabe naravnih protimikrobnih snovi – rastlinskih izvlečkov. V zadnjih desetih letih so bile na področju rastlinskih fenolnih snovi narejene številne študije, ki so dokazale protimikrobnlo in antioksidativno delovanje rastlinskih izvlečkov ter učinkovito aplikacijo le-teh v živilskih sistemih (Burt, 2004; Cowan, 1999; Davidson in Harrison, 2002; Gyawali in Ibrahim, 2014; Klančnik in sod., 2009a, 2009b; Tajkarimi in sod., 2010).

Kvasovkam kvarljivkam se posveča vse več pozornosti v živilski industriji zaradi večjega obsega kvara in posledično velikih ekonomskih izgub (Thomas, 1993; Pinto in sod., 2012). Razlogi za to so uporaba sodobnih tehnologij pri predelavi živil, ki so milejše in težnja k manjši uporabi konzervansov, še posebej tistih, ki učinkujejo na kvasovke (na primer žveplov dioksid in benzojska kislina) (Fleet, 1999; Loureiro in Querol, 1999; Pinto in sod., 2012). Prav tako pa je dokazano, da so nekatere kvasovke odporne na številne kemične konzervanse (Thomas, 1993; Bullerman, 2003). Omejevanje uporabe kemičnih konzervansov s strani Evropske unije in drugih regulativnih teles je spodbudilo živilsko industrijo in raziskovalne inštitucije v živilstvu k iskanju naravnih protimikrobnih snovi, ki so prisotne v rastlinah (Pinto in sod., 2012).

Izvlečki rožmarina (*Rosmarinus officinalis*) se uporablajo v živilski, kozmetični in farmacevtski industriji. Njegove bioaktivne komponente (karnozol, karnozolna kislina, rožmanol, rožmadial in genkvanil) so tekom raziskav pokazale antioksidativno, protimikrobnlo, protivnetno in protitumorsko delovanje (Pérez-Fons, 2006). Največ so raziskovali protimikrobnlo delovanje izvlečka rožmarina na patogenih bakterijah kot tudi na kvasovkah, med slednjimi je najpogostejsa *Candida albicans* (Friedman in sod., 2002; Hammer in sod., 1999; Höfling in sod., 2010; Klančnik in sod., 2009a, 2009b; Moreira in sod., 2005; Prabuseenivasan in sod., 2006; Rožman in Jeršek, 2009; Weckesser in sod., 2007). Zelo malo pa je študij, ki bi vključevale kvasovke, ki najpogosteje povzročajo kvar živil (Conner in Beuchat, 1984; Sacchetti in sod., 2005).

Obstaja več različnih metod določanja protimikrobnne aktivnosti rastlinskih izvlečkov in uveljavljajo se predvsem hitre metode. Delovanje izvlečka rožmarina smo preverili s komercialnim kompletom za določanje živosti kvasovk LIVE/DEAD<sup>®</sup> FungaLight<sup>TM</sup> Yeast Viability Kit. Metoda je enostavna, zanesljiva in se uporablja za kvantitativno ločevanje živil in mrtvih celic kvasovk v zelo kratkem času z uporabo fluorescenčne spektroskopije. Temelji na obarvanju nukleinskih kislin v celicah, kjer žive celice fluorescirajo zeleno, medtem ko mrtve celice fluorescirajo rdeče (Molecular Probes, 2005).

## 1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj naloge je bil testiranje protimikrobnega delovanja izvlečka rožmarina na kvasovkah kvarljivkah (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens*).

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednji hipotezi:

### Hipoteza 1

Izpostavitev celic kvasovk izvlečku rožmarina bo v določeni koncentraciji povzročila zmanjšanje živosti in kultivabilnosti.

### Hipoteza 2

Predvidevamo, da se bo po daljšem času izpostavitve celic izvlečku rožmarina pri nižji koncentraciji živost povečala, ne pa nujno kultivabilnost.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 RASTLINSKI IZVLEČKI

Naravne protimikrobne snovi izolirane iz rastlin se že stoletja uporabljajo pri konzerviranju živil. Prve znanstvene študije o potencialni uporabi začimb pri konzerviranju živil segajo v leto 1880, ko so poročali o protimikrobnem delovanju cimetovega olja na spore bakterije antraks (Tajkarimi in sod., 2010). Od leta 1990 je število raziskav, ki so proučevale potencialno uporabo konzervansov rastlinskega izvora, naraslo. S tem je narasla tudi uporaba začimb in njihovih eteričnih olj kot naravnih konzervansov za podaljšanje roka uporabnosti živil in izboljšanje kakovosti živilskih izdelkov ter zmanjšanje oz. eliminacijo patogenih mikroorganizmov (Burt, 2004; Moriera in sod.; 2007; Simitzis in sod., 2008).

Protimikrobne lastnosti, ki jih imajo rastline, so povezane z njihovo sposobnostjo, da preko sekundarnega metabolizma sintetizirajo kemične spojine razmeroma kompleksnih struktur s protimikrobnim delovanjem. Glavne skupine spojin izoliranih iz rastlin s protimikrobnim delovanjem so fenolne kisline, alkaloidi, flavonoidi, izoflavonoidi, tanini, kumarini, glikozidi, terpeni, fenil propani in organske kisline. Te spojine so pogosto strupene za insekte, patogene mikroorganizme in mikroorganizme, ki povzročajo kvar (Hayek in sod., 2013; Pinto in sod., 2012). Številni rastlinski izvlečki imajo protimikrobeno aktivnost proti različnim bakterijam, kvasovkam in plesnim (Negi, 2012). Gramnegativne bakterije so običajno manj občutljive na protimikrobne snovi rastlinskega izvora v primerjavi z grampozitivnimi bakterijami (Klančnik in sod., 2009a; Stefanello in sod., 2008).

Protimikrobne snovi rastlinskega izvora se pridobivajo z različnimi metodami iz cvetov, popkov, semen, listov, vejic, lubja, zeli, lesa, sadežev in korenin rastlin. Eterična olja rastlin so običajno mešanica več komponent. Za nekatere od teh komponent, ki so prisotne v origanu, nageljnovih žbicah, cimetu, česnu, koriandru, rožmarinu, peteršilju, limonski travi, žajblju in vaniliji so dokazali protimikrobeno delovanje (Angioni in sod., 2004; Arques in sod., 2008; Daferera in sod., 2000; Davidson in Naidu, 2000; Gutierrez in sod., 2008; Holley in Patel, 2005; Kim in sod., 2006; Kim in sod., 1995; Lopes-Lutz in sod., 2008; Naidu, 2000; Periago in sod., 2006; Proestos in sod., 2008; Santos in Rao, 2001; Silva in sod., 2007; Skočibušić in sod., 2006; Yoshida in sod., 1999). Druge začimbe, kot so ingver, črni poper, rdeča paprika, čili v prahu, kumina in kari v prahu so pokazale manjšo protimikrobeno aktivnost (Holley in Patel, 2005).

Komercialni rastlinski izvlečki s protimikrobnim delovanjem se najpogosteje pridobivajo z destilacijo z vodno paro, destilacijo z vodo in alternativnimi metodami, kot je superkritična tekočinska ekstrakcija, ki zagotavlja boljšo topnost in večje hitrosti masnega prenosa. Poleg tega uravnavanje temperature in tlaka omogočata izolacijo posameznih komponent, kadar je to zaželeno (Burt, 2004).

Najpogosteje zastopane spojine pridobljene iz rastlin s protimikrobnim delovanjem so fenolne spojine in njihovi derivati. Rastlinski fenolni izvlečki lahko delujejo protimikrobeno in antioksidativno ter na ta način preprečijo ali zavrejo oksidativni in mikrobiološki kvar živil (Cowan, 1999; Smith-Palmer in sod., 1998; Venturini in sod., 2008; Zaika, 1988; Zink, 1997). Da bi preprečili rast nezaželenih mikroorganizmov, kvar, neželene okuse, žarkost, poslabšanje kakovosti in s tem izboljšali stabilnost in podaljšali rok uporabnosti, morajo imeti izvlečki širok spekter antioksidativnega in protimikrobnega delovanja, ker so živila redko kontaminirana z eno vrsto mikroorganizmov ali pokvarjena zaradi enega vzroka (Gram in sod., 2002). Protimikrobna učinkovitost ter spekter protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov sta odvisna od vrste in strukture prisotnih spojin in njihovih deležev ter morebitnega sinergističnega delovanja, če je prisotnih več aktivnih komponent. Na sestavo in s tem učinkovitost rastlinskih izvlečkov vplivajo številni dejavniki, od bioloških (zrelost, sorta, rastni pogoji in geografsko poreklo rastlin), vsi postopki priprave vzorcev, ekstrakcijske metode, vrste topil, način koncentriranja, dosežene koncentracije do končnega načina uporabe. Na dobljene rezultate lahko močno vpliva tudi izbira mikrobiološke metode testiranja protimikrobne učinkovitosti (Klančnik in sod., 2009b). V preglednici 1 so predstavljene glavne protimikrobenne spojine, ki so prisotne v rastlinskih izvlečkih ter mehanizem njihovega delovanja.

**Preglednica 1:** Glavne protimikrobenne snovi rastlinskega porekla z opisom nekaterih znanih načinov protimikrobnega delovanja (Burt, 2004; Cowan, 1999; Friedman in sod., 2002; Gill in Holley, 2006; Holley in Patel, 2005; Pérez-Fons in sod., 2006).

skupina	podskupina	znani primeri	mehanizem delovanja
<b>fenolne spojine</b>	enostavni fenoli	katehol epikatehin	motnje v transportu hranil in s tem sinteze ATP poškodbe membrane, antiadhezijsko delovanje <i>in vivo</i> (v črevesju)
	fenolne kisline in njihovi estri	kavna in rožmarinska kislina	vezava na lipide in proteine celične membrane, sprememba prepustnosti, izgubljanje protonskega gradiента na membrani
	kinoni	hipericin	reakcija s proteini - vezava na adhezine, celično steno, inaktivacija encimov
	flavonoidi	krizin	vezava na adhezine, tvorba proteinskih kompleksov
	flavoni	abinon	kompleks s celično steno, inaktivacija encimov, inhibicija reverzne transkriptaze HIV
	tanini	elagitanin	vezava na adhezine, polisaharide, inaktivacija encimov, motnje transporta hranil in s tem sinteze ATP, tvorba kompleksa s celično steno, poškodbe membrane, keliranje ionov
	kumarini	varfarin	interakcija z evkariontsko DNA, protivirusno delovanje, stimulacija makrofagov
	terpeni, eterična olja	karnozol in karnozolna kislina, timol, evgenol	poškodbe lipidov membrane, spremembe fluidnosti in s tem funkcionalnih lastnosti membrane, poškodbe membrane in izgubljanje celične vsebine
<b>alkaloidi</b>		berberin, piperin	interkalacija v celično steno in/ali v DNA
<b>lektini in polipeptidi</b>		manoza-specifični aglutinin fabatin	preprečevanje fuzije ali adsorpcije virusov tvorba disulfidnih mostičkov

### **2.1.1 Uporaba rastlinskih izvlečkov v živilstvu**

Rastlinski izvlečki in eterična olja se uporabljajo v farmacevtski, parfumski in živilski industriji (Pinto in sod., 2012). V živilstvu se uporablja več kot 1340 rastlin z dokazanim protimikrobnim delovanjem, a je na voljo le nekaj komercialnih eteričnih olj z ustrezno opredeljenimi lastnostmi konzerviranja (Tajkarimi in Ibrahim, 2012).

Zelišča in začimbe imajo zaradi svojega protimikrobnega in antioksidativnega delovanja v živilih dvojno funkcijo, saj poleg arome, okusa in/ali barve, ki jih dajo živilom, tudi preprečujejo kvar (Peter in Nirmal Babu, 2012). Zelišča in začimbe, kot so origano, rožmarin, timijan, žajbelj, bazilika, kurkuma, ingver, česen, muškatni orešček, nageljne žbice, muškatni cvet, šetrnjak in koromač, se uspešno uporabljajo samostojno ali v kombinaciji z ostalimi metodami konzerviranja. Protimikrobne snovi rastlinskega izvora vplivajo na podaljšanje roka uporabe živila in imajo protimikrobnlo delovanje proti različnim grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam. Vendar je njihova učinkovitost odvisna od pH, temperature skladiščenja, količine kisika, koncentracije eteričnih olj in aktivnih komponent (Burt in sod., 2007; Du in Li, 2005; Gutierrez in sod., 2008; Holley in Patel, 2005; Koutsoumanis in sod., 1999; Sandasi in sod., 2008; Svoboda in sod., 2006; Viuda-Martos in sod., 2008).

Začimbe in zelišča se uporabljajo v živilskih sistemih predvsem v koncentracijskem območju 0,05-0,1 % (500-1000 ppm). Nekatere začimbe imajo močnejšo protimikrobnou aktivnost od drugih in so lahko učinkovite pri 1000 ppm, medtem ko druge učinkujejo pri višjih koncentracijah (Ceylan in Fung, 2004). Običajno so za uporabo v živilih potrebne višje koncentracije eteričnih olj v primerjavi s študijami *in vitro* (Burt, 2004; Naidu, 2000). Na učinkovitost protimikrobnega sredstva vpliva tudi metoda aplikacije v živilo (Goni in sod., 2009).

Obstaja več metod, s katerimi lahko protimikrobne snovi rastlinskega izvora vgradimo v živila. Najenostavnejša metoda je direktno dodajanje v živilo (Sultanbawa, 2011). Z novejšimi tehnologijami vključujemo protimikrobne snovi v embalažne materiale namesto direktno v živila. Ta tehnika je primernejša zaradi koncentriranja protimikrobnih snovi na površini živila, kjer so prisotni potencialni patogeni mikroorganizmi ali mikroorganizmi, ki povzročajo kvar (Holley in Patel, 2005). Poleg bioaktivne embalaže s počasnim sproščanjem protimikrobnih snovi se za vključevanje rastlinskih protimikrobnih snovi v živila lahko uporabljajo še inkapsulacija, jedilni filmi in premazi, nanotehnologija ter kombinirane metode (Gyawali in Ibrahim, 2014; Sultanbawa, 2011).

### 2.1.1.1 Predpisi o uporabi rastlinskih izvlečkov v živilstvu

Natančno število protimikrobnih snovi rastlinskega izvora odobrenih za uporabo v živilih je težko določiti zaradi omejene količine razpoložljivih informacij. Aditivi za živilsko uporabo so strogo nadzorovani z zakonodajo po vsem svetu. V Združenih državah Amerike je za to pristojna FDA (Food and Drug Administration), ki opredeljuje rastlinske izvlečke kot splošno varne za uporabo (status GRAS - Generally Recognised as Safe) v zakoniku Code of Federal Regulation (FDA, 2015c). V Evropski uniji je odobrenih relativno malo rastlinskih izvlečkov za uporabo v živilih. Seznam je dostopen na spletni strani Evropske unije (Food additives database, 2016). Za odobritev novih aditivov v Evropski uniji je potrebno zaprositi Evropsko komisijo. Ta pridobi od Evropske agencije za varnost hrane (EFSA) neodvisno znanstveno mnenje o uporabi novih aditivov ali že obstoječih v spremenjenih pogojih (EFSA, 2016).

### 2.1.1.2 Omejitve uporabe rastlinskih izvlečkov v živilstvu

Uporaba zelišč, začimb in eteričnih olj s protimikrobnim delovanjem je v primerjavi s sintetičnimi dodatki omejena zaradi premalo podatkov o njihovih učinkih v živilih, močne arome in visoke cene (Tajkarimi in sod., 2010). Poleg tega sta omejitvi še topnost rastlinskih izvlečkov v kompleksnih živilskih sistemih (Soković in sod., 2010) ter stabilnost protimikrobnih snovi, ki je odvisna od pH (npr. porušenje kemijske zgradbe fenolnih spojin v alkalnem mediju) (Friedman in Jürgens, 2000), temperature, prisotnosti kisika, svetlobe in vsebnosti vode (Hernández in sod., 2016).

## 2.2 ROŽMARIN (*Rosmarinus officinalis* L.)

Rožmarin je gostolisten zimzelen aromatičen trajen grm iz družine ustnatic (*Lamiaceae*). V višino zraste do 2 m in ima 2-3 cm srebrno zelene, igličasto oblikovane liste ter majhne svetlo modre cvetove. Rožmarin že stoletja gojijo kot dišavno zelišče, predvsem v sredozemskih državah, kot so Španija, Maroko, Tunizija, Francija in Italija (Sasikumar, 2004). Uporablja se kot začimba in aroma pri predelavi živil zaradi značilne arume, antioksidativnih lastnosti in v zadnjem času zaradi protimikrobnega delovanja (Lo in sod., 2002; Ouattara in sod., 1997). Rožmarin je bogat vir fenolnih spojin z visoko protimikrobeno aktivnostjo proti grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam (Moreno in sod., 2006). Znano je tudi protiglivno delovanje eteričnega olja rožmarina (Rezzoug in sod., 2005). Na trgu so danes za uporabo v živilskih sistemih na voljo številni izvlečki rožmarina. Uporaba izvlečkov rožmarina, ki imajo tako antioksidativno kot protimikrobeno aktivnost, je lahko koristna za ohranjanje kakovosti mesa, podaljšanje roka uporabnosti in zmanjševanje ekonomskih izgub (Yin in Cheng, 2003).

## 2.2.1 Ekstrakcija in priprava izvlečkov rožmarina

Izvleček rožmarina namenjen za uporabo v živilstvu pridobivamo z ekstrakcijo iz listov rožmarina. Kot topilo pri ekstrakciji se uporablajo aceton, etanol, heksan ali kombinacija heksana in etanola (v dvostopenjskem postopku). Izvleček rožmarina lahko pripravimo tudi iz deodoriziranega ali delno deodoriziranega etanolnega izvlečka rožmarina (Aguilar in sod., 2008; United States Pharmacopeial Convention, 2012). Izvleček rožmarina za uporabo v živilstvu lahko ekstrahiramo z uporabo superkritičnega ogljikovega dioksida. Nadaljnji postopki priprave izvlečka rožmarina so filtracija, čiščenje, izparevanje topila in sušenje. Izvlečku lahko odstranimo vonj in barvo. Izvleček standardiziramo z uporabo razredčil in nosilcev, ki so primerni za uporabo v živilstvu (Bergfeld in sod., 2013).

Eterično olje rožmarina živilske kakovosti se pridobiva z destilacijo z vodno paro iz svežih cvetočih vršičkov ali posušenih in zdrobljenih nadzemnih delov rastline rožmarina (United States Pharmacopeial Convention, 2012). Prav tako se lahko eterično olje rožmarina pridobi z destilacijo z vodo iz zdrobljenih nadzemnih delov rastline rožmarina (Maistro in sod., 2010).

Rožmarinska kislina se pridobiva z ekstrakcijo z vročo vodo iz listov rožmarina. Izvleček se nato še vroč filtrira in nato meša z alkoholno mešanico (Eggensperger in sod., 1998). Relativno velik delež proizvodnje rožmarinske kisline je mogoče dobiti iz celične kulture *Coleus blumei* Benth. (Al-Sereiti in sod., 1999).

## 2.2.2 Kemijska sestava rožmarina

**Preglednica 2:** Kemijska sestava lista rožmarina (Anadón in sod., 2008; The Merck index, 2006; Patri in Silano, 2002; PDR for herbal medicines, 2007; WHO, 2009)

<b>Eterično olje</b> (1,0-2,5 %)	1,8-cineol (15-55 %), kafra (5-25 %), $\alpha$ -pinen (9-26 %), kampen (2,5-12 %), $\beta$ -pinen (2-9 %), borneol (1,5-6 %), limonen (1,5-5 %), bornil acetat (1-5 %), izobutil acetat, $\beta$ -kariofilen, p-cimen, linalol, mircen, $\alpha$ -terpineol (12-24 %), verbenol
<b>Diterpeni fenoli</b> (do 4,6 %)	Karnozolna kislina, karnozol, izorožmanol, rožmadiol, rožmaridifenol, rožmanol, rožmarikinon, triacetilrožmanol, dimetilrožmanol
<b>Triterpeni</b>	Oleanolna kislina (10 %), ursolna kislina (2-5 %), $\alpha$ -amirin, $\beta$ -amirin, epi- $\alpha$ -amirin, 19- $\alpha$ -ursolna kislina, 2 $\beta$ -hidroksioleanolna kislina, betulin
<b>Fenolne kisline</b> (2-3 %)	Rožmarinska kislina (3,5 %), klorogenska kislina, neo-klorogenska kislina, kavna kislina, labiatna kislina
<b>Flavonoidi</b>	Genkvanin, kirzimarin, diozmetin, diozmin, apigenin, luteolin, nepetin, nepitrin, diozmin, hesperidin, homoplantiginin, fegopolin
<b>Alkaloidi</b>	Rožmaricin, izorožmaricin
<b>Tanini</b>	
<b>Saponini</b>	Glikolna in glicerinska kislina
<b>Vitamini</b>	Vitamin C in vitamin P
	Holin

Rožmarin sestavljajo številne spojine, predvsem fenolne kisline, flavonoidi, monoterpeni, diterpeni, diterpenoidi, triterpeni in rožmarinska kislina (preglednica 2). Najpomembnejši spojni izvlečka rožmarina, ki imata antioksidativno in protimikrobnlo delovanje, sta fenolna diterpena karnozol in karnozolna kislina (Bergfeld in sod., 2013; Del Campo in sod., 2000). Izvleček rožmarina živilske kakovosti je označen glede na vsebnost karnozolne kisline in karnozola (United States Pharmacopeial Convention, 2012). Na kemijsko sestavo izvlečkov rožmarina vplivajo razvojna faza rastline, sorta rožmarina, čas žetve, izvor rastline in metoda ekstrakcije (Bergfeld in sod., 2013).

### 2.2.3 Protimikrobnlo delovanje rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

Zadnje čase se veliko raziskuje biološko in protimikrobnlo delovanje izvlečkov rožmarina (Abramovič in sod., 2012; Božin in sod., 2007; Celiktas in sod., 2007; Kalemba in sod., 2012; Rožman in Jeršek, 2009; Teruel in sod., 2015). Dokazano je njegovo protimikrobnlo delovanje na številne bakterije (Del Campo in sod., 2000; Moreno in sod., 2006; Prabuseenivasan in sod., 2006) in kvasovke (Celiktas in sod., 2007; Mangena in Muyima, 1999). Sacchetti in sod. (2005) so poročali o protimikrobnem delovanju rožmarina na kvasovke kvarljivke (*Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lypolitica*).

Velik delež protimikrobnne aktivnosti izvlečka rožmarina pripisujejo karnozolni kislini in karnozolu (Del Campo in sod., 2000), medtem ko so  $\alpha$ -pinen, bornil acetat, kafra in 1,8-cineol najpomembnejše protimikrobnne snovi eteričnega olja rožmarina (Daferera in sod., 2000; 2003; Pintore in sod., 2002).

Učinek fenolnih spojin v izvlečku rožmarina je odvisen od koncentracije. Nizke koncentracije fenolnih spojin vplivajo na encimsko aktivnost, še zlasti na aktivnost tistih encimov, ki so pomembni za nastajanje energije v celici. Višje koncentracije fenolov pa povzročijo denaturacijo proteinov celične membrane (López-Malo Vigil in sod., 2005). Fenolne spojine imajo vpliv na permeabilnost celične membrane, kar je za celico usodno (Burt, 2004). Lahko vplivajo tudi na membranske proteine, tako da spremenijo njihovo strukturo in s tem uničijo njihovo funkcionalnost. Ko fenolne spojine pridejo v celično membrano, se vežejo z membranskimi encimi in proteini in s tem ovirajo tok protonov, kar zmanjša celično aktivnost (López-Malo Vigil in sod., 2005).

## 2.2.4 Uporaba izvlečkov rožmarina v živilski industriji

Rožmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je splošno priznan kot varen (status GRAS) kot začimba in aroma za prehrano ljudi (FDA, 2015a). Prav tako imajo status GRAS za prehrano ljudi eterično olje rožmarina, njegova smola (brez topil) in naravni izvlečki (vključno z destilati) (FDA, 2015b). Sprejemljiv dnevni vnos (ADI vrednost) rožmarina oz. njegovega izvlečka zaradi premalo podatkov o njegovi toksičnosti ni določen, saj po mnenju EFSA ni nevarnosti, da bi s hrano zaužili prevelike količine omenjenih snovi (Commission Directive, 2010).

Listi rožmarina se uporabljamjo kot začimba v kulinariki. Eterično olje rožmarina se uporablja kot začimba in aroma za živila (Leung in Foster, 1996). Izvlečki rožmarina imajo svoje E-število (E 392), so aditiv živilom, in sicer se uporabljamjo kot antioksidant. Na voljo so v olju topni oblici, kot suh prašek, vodotopni in takšni, ki se mešajo z vodo (Aguilar in sod., 2008; Božin in sod., 2007). Glavne skupine živil, kjer se izvlečki rožmarina uporabljamjo so: maščobe in olja, predelano sadje in zelenjava, žvečilni gumi, fini pekovski izdelki, predelano meso, ribe, juhe, omake, predelani oreščki, prigrizki in prehranska dopolnila. Izvlečki vsebujejo spojine, ki dokazano delujejo antioksidativno. Te spojine sodijo predvsem v skupino fenolnih kislin, flavonoidov, diterpenenov (karnozol in karnozolna kislina) ter triterpenov (Aguilar in sod., 2015). Izvlečki rožmarina se lahko uporabljamjo za preprečevanje žarkosti maščob in olj, pekovskih izdelkov, mesa, dehidriranih juh in krompirja, kakor tudi prehranskih dodatkov, kot je npr. ribje olje (Aguilar in sod., 2008). Rožmarinovo olje ima tudi protimikrobnlo aktivnost (Leung in Foster, 1996), a se v živilski industriji še ne uporablja zaradi njegovega protimikrobnega delovanja, saj zaenkrat iz strani EFSA še ni odobren kot protimikrobnna snov (EFSA, 2016).

## 2.3 KVASOVKE KVARLJIVKE

Kvasovke so že od nekdaj eden ključnih mikroorganizmov v mnogih panogah živilske industrije, vendar pa lahko nekatere kvasovke povzročajo tudi nezaželene spremembe v živilih (James in Stratford, 2003; Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003a; Lowes in sod., 2000). S pojmom »kvasovke kvarljivke« označujemo tiste vrste kvasovk, ki lahko povzročijo kvar živil proizvedenih v skladu s standardi dobre proizvodne prakse (GMP) (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003b).

Kvar živil, ki ga povzročajo kvasovke, se pojavlja predvsem pri proizvodih, kjer določene lastnosti živila, pogoji predelave ter skladiščenja živila bodisi upočasnijo ali preprečijo rast sicer hitreje rastučih bakterij. Značilno je, da so kisla živila, t.j. živila z nizkim pH, izdelki z visoko vsebnostjo sladkorja (npr. več kot 10 % w/v), soli (več kot 5 % NaCl) ali alkohola, živila konzervirana s šibkimi kislinami (npr. sorbinska, benzojska, ocetna kislina)

in dalj časa zamrznjena živila nagnjena h kvaru, ki ga povzročajo kvasovke (Fleet, 2006, 2011).

Kvasovke kvarljivke predstavljajo resen problem za živilsko industrijo, saj so odgovorne za velike gospodarske izgube (Thomas, 1993) in imajo lahko tudi, čeprav redko, negativen vpliv na človekovo zdravje (Loureiro in Querol, 1999), zato se jim v zadnjih letih posveča vse več pozornosti v živilstvu (Deak, 2007; Fleet, 1992, 2011; James in Stratford, 2003; Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003a, 2003b, Loureiro in Querol, 1999; Pitt in Hocking, 2009; Stratford, 2006; Tudor in Board, 1993; Thomas, 1993).

### **2.3.1 Posledice delovanja kvasovk kvarljivk v živilih**

Posledica rasti kvasovk v živilu je lahko kvar živila. Komponente živila kvasovke uporabijo kot substrat in jih pretvarjajo v številne metabolne produkte ter tako spremenijo kemične, fizikalne in senzorične lastnosti živila. Kvar, ki ga povzročajo kvasovke, je razviden na več načinov, odvisno od izdelka (Stratford, 2006; Tudor in Board, 1993).

Delovanje kvasovk kvarljivk v živilu lahko opazimo kot rast na površini, diskoloracije, produkcijo plina, megleko/motnost, tvorbo sedimenta, filma, neželenih priokusov ter spremembo tekture živila. Najbolj znane spremembe se pojavljajo v kislih pijačah, z ali brez sladkorja, kjer je značilna obilna tvorba plina, kar lahko povzroči napihovanje, deformacijo in navsezadnje eksplozijo embalaže (Loureiro in Querol, 1999). Vizualne značilnosti kvara običajno spremelja razvoj vonja po kvasu, alkoholu ter druge tuje vonjave in priokusi v izdelku (Fleet, 2011). V nekaterih primerih kvara zaradi delovanja kvasovk kvarljivk ni tako enostavno razločiti, predvsem pri fermentiranih živilih, kot so npr. vino, pivo, črne olive, sojina omaka, kjer nastali metaboliti prispevajo k okusu in aromi izdelkov (Loureiro in Querol, 1999). Kot navaja Fleet (1992), je včasih le rahla meja med tem, kar se dojema bodisi kot kvar ali koristno delovanje kvasovk. Kvar postane najprej opazen, ko rast kvasovk doseže okrog  $10^4$ - $10^5$  CFU/g (mL) in očiten pri  $10^7$ - $10^8$  CFU/g (mL) (Fleet, 2011).

### **2.3.2 Pomembnejše vrste kvasovk kvarljivk**

Medtem ko je bilo iz hrane in pijače izoliranih od 100-150 različnih vrst kvasovk, je le okoli 15-20 takih, ki so povezane s kvarom živil (Fleet, 2011). Pomembnejše vrste kvasovk, ki v živilih povzročajo kvar, so predstavljene v preglednici 3.

**Preglednica 3:** Vrste kvasovk, ki so najpogosteje povezane s kvarom živil (Fleet, 2011; Pitt in Hocking, 2009)

vrsta kvasovke	pomembne lastnosti kvasovke	živilski izdelek	značilnosti kvara
<i>Debaryomyces hansenii</i> ( <i>Candida famata</i> ) <sup>a</sup>	tolerira visoke koncentracije soli	soljeni mesni izdelki, siri, zelenjava v slanici	tvorba biofilma na površini, neželeni priokusi
<i>Dekkera/Brettanomyces</i> <sup>a</sup> (npr. <i>D. anomala</i> , <i>D. bruxellensis</i> )	počasna rast, tolerira prisotnost etanola in CO <sub>2</sub>	alkoholne in gazirane pijače	motnost, ocetni cik, vonj po miševini, hlapni fenoli
<i>Hanseniaspora uvarum</i> ( <i>Kloeckera apiculata</i> ) <sup>a</sup>	tolerira zelo kisle pogoje	sveže in predelano sadje, sadni izdelki	fermentativni kvar
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ( <i>Candida kefyr</i> ) <sup>a</sup>	fermentacija laktoze, pektinolitična in proteolitična aktivnost, rast pri 40-45 °C in temperaturah hlajenja	mlečni in rastlinski izdelki	fermentativni kvar, pektinoliza, proteoliza
<i>Wickerhamomyces (Pichia) anomalus</i> ( <i>Candida pelliculosa</i> ) <sup>a</sup>	tolerira kislo in slano	mlečni, sadni in pekovski izdelki	prisotne visoke koncentracije etil acetata
<i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Candida krusei</i> ) <sup>a</sup>	tolerira kislo, odporna na konzervanse	izdelki z nizko pH vrednostjo	fermentativni kvar, tvorba biofilma na površini
<i>Pichia membranifaciens</i> ( <i>Candida valida</i> ) <sup>a</sup>	oksidativna, tolerira prisotnost etanola, odporna na konzervanse	olive v slanici, kisle kumarice, omake, kislo zelje, razsolice sira,...	tvorba biofilma na površini, neželeni priokusi
<i>Rhodotorula</i> spp.	oksidativna, lipolitična, proteolitična in pektinolitična aktivnost	mlečni, mesni, sadni, zelenjavni in pekovski izdelki	tvorba rdeče-roza kolonij na površini, lipoliza, proteoliza, pektinoliza
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ubikvitarna, nekateri sevi odporni na konzervanse	živila, ki vsebujejo mono- in disaharide	fermentativni kvar
<i>Kazachstania exiguum</i> ( <i>Candida holmi</i> ) <sup>a</sup>	zmerno tolerira konzervanse, ocetno kislino in sol	sadni sokovi, gazirane pijače, majoneza, zelenjavne solate, mlečni in mesni izdelki	fermentativni kvar
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	tolerira visoke koncentracije sladkorja in etanola, odporna na konzervanse	živila z visoko vsebnostjo sladkorja, alkoholne pijače	fermentativni kvar
<i>Yarrowia lipolytica</i> ( <i>Candida lipolytica</i> ) <sup>a</sup>	oksidativna, močna proteolitična in lipolitična aktivnost, zmerno tolerira nizek pH ter visoke koncentracije soli in konzervansov	mesni in mlečni izdelki	neželeni priokusi, sprememba tekture
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	odporna na konzervanse, tolerira kislo in prisotnost etanola	sadni sokovi, sadni koncentrati in sirupi, omake, alkoholne pijače	fermentativni kvar
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	po lastnostih in kvaru nekako vmes med <i>Z. bailii</i> in <i>Z. rouxii</i>		
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	tolerira zelo visoke koncentracije sladkorja in soli, odporna na konzervanse	koncentrati soka, sladkorni sirupi, med, marmelade, slaščičarski izdelki, suho sadje	fermentativni kvar

<sup>a</sup> anamorfno ime

### 2.3.3 Preprečevanje kvara živil, ki ga povzročajo kvasovke

Kvasovke so v okolju zelo razširjene in lahko kontaminirajo večino živil (Fleet, 2011). Mikrobiološki kvar živil lahko preprečimo s "sistemom konzerviranja". Sistem konzerviranja lahko obravnavamo kot sklop dejavnikov, ki so značilni za živila (intrinzični dejavniki), fizikalno in kemično konzerviranje, higiena in pakiranje. Običajno je živilo zaščiteno z več kot enim postopkom konzerviranja (Stratford, 2006).

Intrinzični dejavniki, ki zavirajo rast mikroorganizmov, so nizek pH, nizka vodna aktivnost ( $a_w$ ), pomanjkanje hrani in prisotnost eteričnih olj. Medtem ko nizek pH neposredno ne ščiti živil pred kvasovkami pa je izrednega pomena v kombinaciji z drugimi metodami konzerviranja (npr. dodatek šibkih kislin). Tudi nizka  $a_w$  vrednost ni nujno omejitveni dejavnik za rast kvasovk kvarljivk, saj nekatere vrste kvasovk (osmotolerantne kvasovke) dobro uspevajo pri visokih koncentracijah sladkorja in soli (Stratford, 2006).

Fizikalni postopki konzerviranja so uporaba visokih temperatur, shranjevanje pri nizkih temperaturah, gaziranje in modificirana atmosfera (Stratford, 2006). Kvasovke niso toplotno odporne in jih zlahka uničimo z večino toplotnih postopkov (Bullerman, 2003). Hlajenje živil ne preprečuje kvara (ga le upočasni), saj večina kvasovk dobro uspeva tudi pri nizkih temperaturah (James in Stratford, 2003). Vakuumsko pakiranje preprečuje rast aerobnih kvasovk, ne prepreči pa rasti fermentativnih vrst (Bullerman, 2003).

Za nadzor kvasovk kvarljivk se lahko hrani in pihačam dodajajo številni konzervansi. Največ se uporabljo šibke kislina, kot so sorbinska, benzojska, ocetna in propionska kislina ter žveplov dioksid. Učinkovitost teh konzervansov je odvisna od njihove koncentracije, pH živila in ostalih lastnosti živila, kot sta koncentracija sladkorja in soli. Občutljivost na konzervanse variira glede na vrsto kvasovke. Vrste iz rodu *Zygosaccharomyces* so odporne na konzervanse, predvsem *Z. bailii*, ki lahko tolerira tudi maksimalne zakonsko dovoljene koncentracije. Druge vrste kvasovk z relativno visoko odpornostjo so *C. krusei*, *P. membranifaciens*, *Y. lipolytica* in *Schiz. pombe*, kot tudi nekateri sevi *S. cerevisiae*. Žveplov dioksid se uporablja za preprečevanje rasti divjih tipov kvasovk v suhem sadju in pri pridelavi vina (Bullerman, 2003).

Možne nove tehnologije konzerviranja so uporaba ultra visokega pritiska, iradiacije, visoko intenzitetne svetlobe, pulzirajočega električnega polja in eteričnih olj. Vendar pa nekatere nove tehnologije niso dovolj učinkovite pri eliminaciji patogenih mikroorganizmov oz. preprečevanju kvara (Fleet, 2011; Stratford, 2006; Tajkarimi in Ibrahim, 2012). Rastlinski izvlečki inhibirajo rast kvasovk ter drugih mikroorganizmov in se pogosto proučujejo kot naravna alternativa konvencionalnim konzervansom (Fleet, 2011). Številne raziskave navajajo več kot 5 log<sub>10</sub> CFU redukcijo patogenih mikroorganizmov z uporabo rastlinskih

protimikrobnih snovi v kombinaciji z obstoječimi procesnimi tehnikami (Tajkarimi in Ibrahim, 2012).

## 2.4 *IN VITRO* METODE DOLOČANJA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA RASTLINSKIH IZVLEČKOV NA KVASOVKE

Protimikrobeno delovanje rastlinskih izvlečkov in čistih snovi na kvasovke lahko ugotavljamo z inhibicijo rasti kvasovk, ki so v stiku s preučevanim vzorcem. Na voljo je več metod za določanje protimikrobnega delovanja, a nimajo enake občutljivosti ali ne temeljijo na enakem principu, zato so rezultati močno odvisni od izbire metode (Scorzoni in sod., 2007). Prav tako je primerjava rezultatov različnih študij protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov pogosto težavna zaradi uporabe različnih nestandardiziranih pristopov, tehnik priprave inokuluma, količine inokuluma, rastnega medija, pogojev inkubacije in končne točke določanja. Za določanje *in vitro* protimikrobnega delovanja izvlečkov ali posameznih snovi se lahko uporabljo številne metode (Balouiri in sod., 2016). Največ se uporabljo bioavtografija, difuzija v trdnem gojišču z diskami in metode razredčevanja v trdnem ali tekočem gojišču (Balouiri in sod., 2016; Scorzoni in sod., 2007). Za študije protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov Balouiri in sod. (2016) priporočajo pretočno citofluorometrijo.

### 2.4.1 Metode difuzije

Najbolj poznani in uporabljeni sta metodi difuzije v trdnem gojišču z diskami in z luknjicami, ki sta primerni tudi za ugotavljanje protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov na kvasovke.

Pri metodi difuzije v trdnem gojišču z diskami gojišče z umešanim inokulumom preiskovanega mikroorganizma prelijemo na petrijeve plošče. Na površino trdnega gojišča nato namestimo diske iz filtrnega papirja (premera cca. 6 mm), ki so prepojeni s preiskovanim rastlinskim izvlečkom pri izbrani koncentraciji. Petrijeve plošče nato inkubiramo v primernih pogojih glede na izbran mikroorganizem. Protimikrobna snov difundira v trdno gojišče in inhibira rast preiskovanega mikroorganizma (Balouiri in sod., 2016). Na površinah, kjer je protimikrobeno sredstvo, nastanejo inhibicijske cone, kar pomeni, da ni mikrobne rasti. Prednosti metode sta tehnična enostavnost in ponovljivost. Metoda je cenovno ugodna in ne zahteva posebne opreme, poleg tega omogoča določanje kvalitativnih rezultatov (občutljiv, vmesen, odporen) (Klančnik in sod., 2009b). Metoda ni primerna za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) (Nijs in sod., 2003).

Metoda difuzije v trdnem gojišču z luknjicami se pogosto uporablja za določanje protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov (Magaldi in sod., 2004). Podobno kot pri

prejšnji metodi prelijemo petrijeve plošče z gojiščem z umešanim inokulumom preiskovane kulture. S sterilnim svedrom ali tipsom naredimo v trdno gojišče v aseptičnih pogojih luknjice premera 6-8 mm. V luknjice nato odpipetiramo določen volumen (20-100  $\mu\text{L}$ ) raztopine rastlinskega izvlečka izbrane koncentracije. Petrijeve plošče inkubiramo v primernih pogojih glede na izbran mikroorganizem. Protimikrobena snov difundira v trdno gojišče in inhibira rast preiskovanega mikroorganizma, nastanejo t.i. inhibicijske cone (Balouiri in sod., 2016).

#### 2.4.2 Metode razredčevanja

So najprimernejše metode za določanje MIC vrednosti, saj omogočajo oceno koncentracije preizkušene protimikrobine snovi v trdnem gojišču (metoda razredčevanja v trdnem gojišču) in v tekočem gojišču (makrodilucija ali mikrodilucija). Obe metodi razredčevanja, tako v trdnem kot v tekočem gojišču, se lahko uporablja za kvantitativno določanje *in vitro* protimikrobnega delovanja na bakterije in glive. MIC vrednost je definirana kot najmanjša koncentracija protimikrobine snovi, ki inhibira vidno rast preizkušanega mikroorganizma (Pfaller in sod., 2004).

Metoda razredčevanja v tekočem gojišču (mikro- ali makrodilucija) je ena izmed osnovnih metod za določanje protimikrobnega delovanja. Postopek vključuje pripravo dvakratnika razredčitev protimikrobine snovi (npr. 1, 2, 4, 8, 16, in 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) v tekočem gojišču v epruvetah z volumnom 2 mL (makrodilucija) ali v mikrotitrski plošči s 96 vdolbinami (mikrodilucija). Inokulum pripravimo v istem gojišču po razredčitvi standardizirane mikrobne suspenzije. Sledi dodatek inokuluma v vsako epruveto ali vdolbino, mešanje in inkubacija v primernih pogojih za izbran mikroorganizem (Balouiri in sod., 2016). Glavne pomanjkljivosti makrodilucije so zamudnost, ročno delo, tveganje za napake pri pripravi protimikrobnih raztopin za vsak preizkus, veliko število reagentov in potreben prostor (Jorgensen in Ferraro, 2009). Medtem ko so ponovljivost, manjše število reagentov ter izvedba na majhnem prostoru glavne prednosti mikrodilucije (CLSI, 2012). Za določanje MIC vrednosti uporabljamo čitalce mikrotitrskih plošč, ki olajšajo branje rezultatov mikrodilucijskih metod in imajo visoko občutljivost zaznavanja mikrobne rasti v vdolbinach mikrotitrsko plošče. Za določitev končne točke MIC se uporablja barvila, kot so: tetrazolijeve soli, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT) in 2,3-bis {2-metoksi-4-nitro-5-[sulfenilamino] karbonil]-2H-tetrazolijev-hidroksid} (XTT), kot tudi resazurin (Balouiri in sod., 2016).

Metoda razredčevanja v trdnem gojišču temelji na vključitvi različnih želenih koncentracij protimikrobine snovi v trdno gojišče. Običajno se uporablja zaporedje dvakratnih razredčitev, čemur sledi inokulacija petrijevih plošč s trdnim gojiščem z izbranim mikroorganizmom. MIC vrednost določimo kot najnižjo koncentracijo protimikrobine

snovi, ki popolnoma zavre rast preiskovanega mikroorganizma pri ustreznih pogojih inkubacije. Ta tehnika je primerna za določanje protimikrobnega delovanja pri bakterijah in glivah (Balouiri in sod., 2016).

#### **2.4.3 Tankoplastna kromatografija (TLC) – bioavtografija**

Več znanstvenih študij poroča o uporabi te metode za preverjanje protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov na kvasovke (Rahalison in sod., 1991; Runyoro in sod., 2006). Metoda je enostavna, učinkovita in poceni. Omogoča ločevanje kompleksnih mešanic in istočasno določanje aktivnih komponent na TLC plošči (Marston, 2011). TLC-bioavtografija je hitra metoda, ki omogoča določanje bioaktivnega delovanja velikega števila vzorcev (Dewanjee in sod., 2015). Metoda ni primerna za določanje protimikrobnega delovanja, ki je produkt sinergije dveh ali več komponent (Scorzoni in sod., 2007). Uporabljo se tri bioavtografske tehnike: kontaktna, direktna in imerzijska bioavtografija.

Pri kontaktni tehniki gre za prenos protimikrobne snovi iz kromatograma (PC ali TLC) z difuzijo na agarno ploščo, ki smo jo predhodno inokulirali s testiranim mikroorganizmom. Po nekaj minutah ali urah odstranimo kromatogram in agarno ploščo inkubiramo. Na mestih, kjer so protimikrobne snovi difundirale v agar, se pojavijo inhibicijske cone rasti. Ta tehnika se izmed omenjenih najmanj uporablja (Marston, 2011).

Najpogosteje se uporablja direktna bioavtografija, kjer na razvito TLC ploščo nanesemo mikroben suspenzijo in nato bioavtogram inkubiramo 48 ur pri 25 °C (Dewanjee, 2015). Za vizualno določitev mikroben rasti se pogosto uporabljo tetrazolijeve soli, ki se ob prisotnosti dehidrogenaz iz živih celic, pretvorijo v formazan (Choma in Grzelak, 2011; Grzelak in sod., 2011). Te soli nanesemo na bioavtogram z razprševanjem in ga ponovno inkubiramo 24 ur pri 25 °C (Silva in sod., 2005) ali 3-4 ure pri 37 °C (Runyoro in sod., 2006).

Imerzijska bioavtografija je kombinacija obeh prej omenjenih tehnik. TLC plošča je prekrita z agarnim medijem. Plošče pred inkubacijo za nekaj ur hranimo pri nizkih temperaturah z namenom boljše difuzije testiranih protimikrobnih snovi v agar. Po inkubaciji v primernih pogojih za testiran mikroorganizem slediobarvanje s tetrazolijevim barvilom (Balouiri in sod., 2016). Ta tehnika zagotavlja dobro definirane inhibicijske cone rasti in ni občutljiva za kontaminacijo (Marston, 2011).

#### **2.4.4 ATP bioluminiscanca**

Metoda temelji na merjenju adenozin trifosfata (ATP), ki ga proizvajajo mokroorganizmi. ATP je kemična oblika energije vseh živih celic in je prisotna v več ali manj enaki količini v celici. Merjenje ATP se uporablja za oceno mikrobne populacije v vzorcu. D-luciferin se ob prisotnosti ATP pretvori s pomočjo luciferaze v oksiluciferin, ki proizvaja svetlobo. Količino oddane svetlobe merimo z luminometrom izraženo v RLU (ang. relative light unit). Živost celic in luminiscanca, ki jo merimo sta v linearinem razmerju. Metoda je kvantitativna in hitra, kar je njena glavna prednost (Balouiri in sod., 2016). Metoda omogoča preverjanje protimikrobnega delovanja tudi *in vivo* (Vojtek in sod., 2014).

#### **2.4.5 Pretočna citofluorometrija**

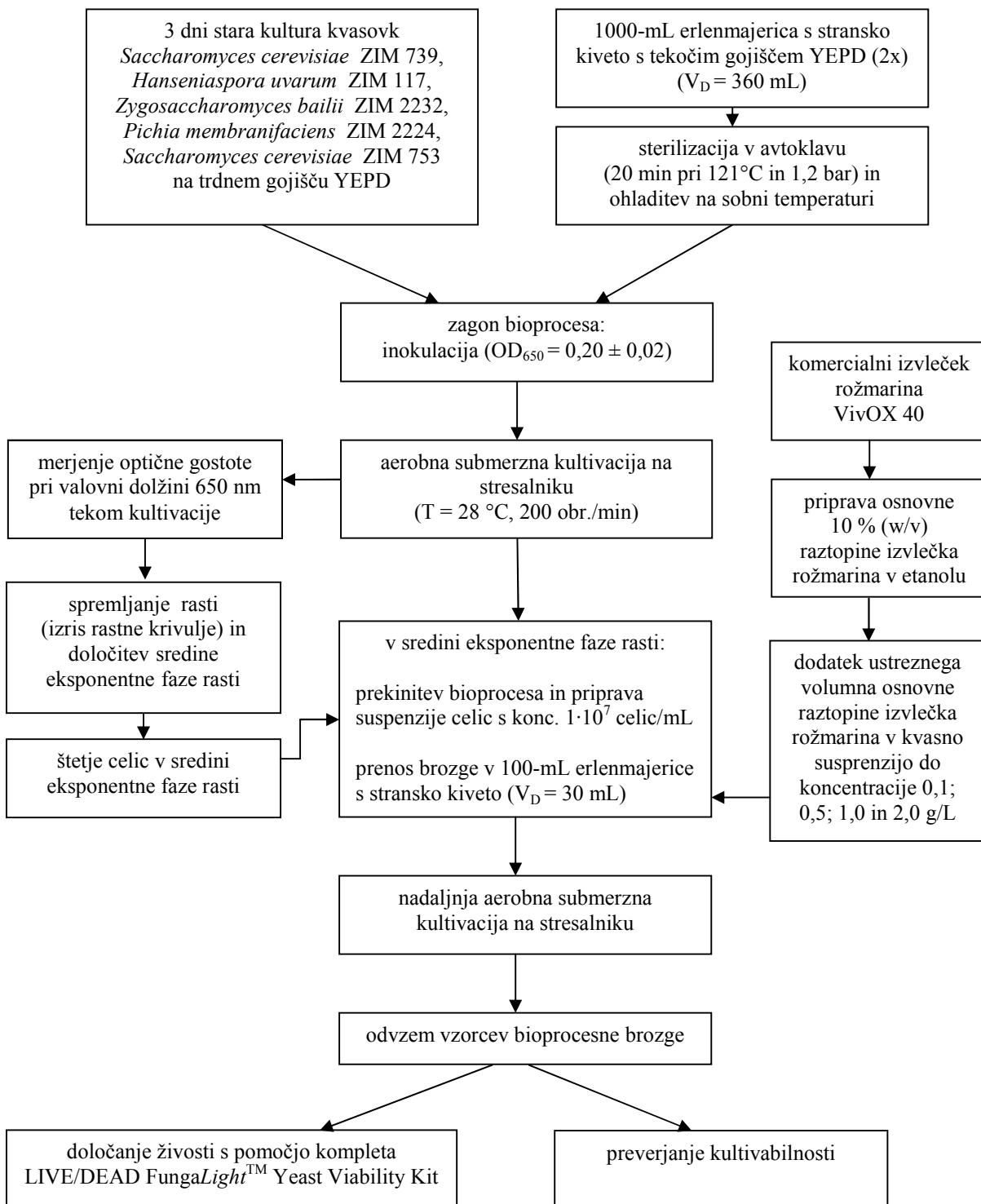
Metoda je hitra in temelji na uporabi ustreznih barvil zaobarvanje nukleinskih kislin. Propidijev jodid (PI) je fluorescentno barvilo in interkalacijsko sredstvo, ki se najpogosteje uporablja za obarvanje DNA (Ramani in Chaturvedi, 2000). S to metodo lahko jasno ločimo med mrtvimi, živimi in poškodovanimi celicami. Poškodovane celice so celice pod stresom, ki imajo poškodovane celične strukture in posledično oslabljeno reproduktivno rast (Yousef in Courtney, 2003). Določanje števila poškodovanih celic se uporablja v živilski mikrobiologiji, kadar te poškodovane celice predstavljajo nevarnost, da se ob določenih pogojih skladiščenja lahko opomorejo (Paparella in sod., 2008). Pretočna citofluorometrija omogoča odkrivanje protimikrobnene odpornosti in ocenjevanje vpliva testiranih molekul na živost in poškodbe celic testiranih mikroorganizmov (Tang in Stratton, 2013). Poleg tega daje ponovljive rezultate v zelo kratkem času (2-6 ur), v primerjavi z mikrodilucijsko metodo, ki daje rezultate v 24-72 urah (Ramani in Chaturvedi, 2000). Slabost te metodologije je draga oprema, a se kljub temu veliko uporablja (Balouiri in sod, 2016). Na voljo so številni komercialni kompleti za določanje živih/mrtvih celic s pretočno citometrijo, ki se lahko uporabijo tudi s čitalcem mikrotitrskih ploščic.

#### **2.4.6 Metode spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja**

Zgoraj opisane metode testiranja protimikrobnega delovanja temeljijo na končni točki merjenja, pa vendar je zelo pomembna tudi hitrost in/ali trajanje protimikrobnega delovanja, torej kinetika. Rezultate pridobimo z analizami krivulj preživetja, oziroma odmiranja mikrobnene kulture v odvisnosti od časa po dodatku protimikrobnega sredstva. Najpogosteje uporabljene metode so merjenje optične gostote in štetje živih oz. kultivabilnih celic z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču (Burt, 2004).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 POTEK DELA



Slika 1: Shema eksperimentalnega dela.

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Mikroorganizmi

Uporabili smo pet različnih sevov kvasovk kvarljivk iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Preglednica 4: Sevi kvasovk kvarljivk, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu

oznaka seva	vir seva
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739	mošt Rebule, Slovenija
<i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117	tipski sev
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232	pokvarjen sadni sirup, Slovenija
<i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224	pokvarjena slanica pri zorenju sira, Slovenija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753	tipski sev

Kvasovke smo hranili na petrijevih ploščah s trdnim YEPD gojiščem v inkubatorju pri temperaturi 28 °C. Za inokulacijo smo uporabljali tri dni staro kulturo.

### 3.2.2 Izvleček rožmarina

Uporabili smo komercialno pripravljen izvleček rožmarina VivOX 40 v prahu (Vitiva d.d., Slovenija).

Pripravili smo 10 % (w/v) osnovno raztopino izvlečka rožmarina, tako da smo raztopili ustrezno količino izvlečka v absolutnem etanolu (Merck).

Končne koncentracije izvlečka rožmarina, s katerimi smo tretirali preučevane kvasovke kvarljivke, so bile 0,1; 0,5; 1,0; in 2,0 g/L.

### 3.2.3 Gojišča

#### 3.2.3.1 Trdno YEPD gojišče

Za hranjenje in precepljanje kulture kvasovk smo uporabljali trdno YEPD gojišče.

**Preglednica 5:** Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

sestavina	masa (g)
glukoza (Kemika)	20,0
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
agar (Biolife)	20,0
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar. Po sterilizaciji smo gojišče nekoliko ohladili in ga aseptično razlili v petrijeve plošče.

#### 3.2.3.2 Tekoče YEPD gojišče

Tekoče YEPD gojišče smo uporabljali za aerobno submerzno kultivacijo kvasovk na stresalniku.

**Preglednica 6:** Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

sestavina	masa (g)
glukoza (Kemika)	20,0
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar v erlenmajericah s stransko kiveto. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili in ga uporabili za kultivacijo preučevanih kvasovk kvarljivk na stresalniku.

### 3.2.4 Reagenti in raztopine

Reagenti in raztopine, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu, so razvrščeni glede na posamezne metode:

### 3.2.4.1 Aerobna submerzna kultivacija kvasovk

- **Protipenilec (Carl Becker Chemie)**

### 3.2.4.2 Štetje celic

- **0,9 % (w/v) NaCl (fiziološka raztopina)**

1,80 g trdnega NaCl (Merck) smo v 200 mL stekleni bučki dopolnili z destilirano vodo do oznake. Po 9 mL raztopine smo odpipetirali v steklene epruvete, jih pokrili s kovinskimi pokrovčki, avtoklavirali in hranili pri sobni temperaturi.

### 3.2.4.3 Določanje živosti celic

- **0,1 M PBS pufer**

**Preglednica 7:** Sestava 0,1 M PBS pufra (pH = 7,2)

sestavina	masa (g)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	1,09
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Merck)	0,42
NaCl (Merck)	9,00
ddH <sub>2</sub> O	do 100 mL

S HCl smo pH pufra uravnali na 7,2. Pufer smo sterilizirali s filtracijo in ga hranili v sterilni laboratorijski steklenici pri sobni temperaturi.

0,01 M PBS pufer smo pripravili z ustrezno razredčitvijo 0,1 M PBS pufra, ga sterilizirali s filtracijo in hranili pri sobni temperaturi.

- **Komplet : LIVE/DEAD® FungLight™ Yeast Viability Kit (Molecular Probes)**

- barvilo SYTO® 9: 3,34 mM, raztopina v DMSO
- barvilo propidijev jodid: 20 mM, raztopina v DMSO

Komplet smo hranili zaščitenega pred svetlobo pri temperaturi -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi.

### 3.2.5 Oprema in aparature

#### 3.2.5.1 Steklovina in potrošni material

- alufolija
- centrifugirke kapacitete 50 mL
- cepilne zanke (Bioster)
- čaše
- epruvete
- erlenmajerice s stransko kiveto in enim utorom kapacitet 100 mL (Borosilicate) in 1000 mL (Shott Duran)
- injekcijska brizgalka (Sartorius)
- kovinske žličke
- kovinski pokrovčki za epruvete
- laboratorijske steklenice kapacitet 200 mL in 1000 mL (Shott Duran)
- meritelne bučke kapacitet 100 mL in 200 mL
- meritelni valji kapacitet 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1000 mL
- mikrocentrifugirke kapacitet 1,5 mL in 2 mL (Eppendorf)
- mikrotitrski plošče (črne) za merjenje fluorescence (Nunc)
- nastavki za pipeto
- petrijeve plošče (Golias)
- skalpel
- spatule
- sterilni membranski filtri s premerom por 0,2 µm (Sartorius)
- števna ploščica Bürker-Türk (Brand)
- vata

#### 3.2.5.2 Aparature

- avtoklav (Sutjeska)
- avtomatske pipete (Gilson)
- brezprašna komora (Iskra PIO SMBC 122)
- centrifuge (Eppendorf 5415C, Tehnica Železniki Centric 322A)
- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- fotoaparat (Sony DSC-W30)
- hladilnik (LTH)
- inkubator (I-50 VPC, Kambič)
- magnetno mešalo (Tehnica Železniki 550 M), magnetki
- mikroskop (Leica ATC 2000)
- pH meter (Mettler Toledo SevenMulti)
- plinski gorilnik
- rotacijski stresalnik (Tehnica Železniki VRVI-403)
- spektrofotometer za merjenje optične gostote (Iskra MA 9520)

- tehtnica (Sartorius analytic)
- tehtnica (Sartorius exellence)
- vrtinčnik (Tehtnica Železniki Vibromix 104 EV)
- zamrzovalna skrinja (Gorenje)

### 3.2.5.3 Programska oprema

- Magellan (Tecan)

## 3.3 METODE

### 3.3.1 Ohranjanje kulture kvasovk

Kulture izbranih sevov kvasovk kvarljivk (*Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753) smo dvakrat tedensko v laminariju precepljali na sterilne petrijeve plošče s trdnim YEPD gojiščem. Delali smo v dveh paralelkah. Posamezne izolate kvasovk na petrijevih ploščah smo hranili v inkubatorju pri temperaturi 28 °C in jih po treh dneh kultivacije uporabili za inokulacijo tekočega YEPD gojišča ter za nadaljnja precepljanja.

### 3.3.2 Spremljanje rasti kvasovk z merjenjem optične gostote

Rast kvasovk smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm ( $OD_{650}$ ). Pred vsako meritvijo smo spektrofotometer umerili s kontrolo (samo gojišče YEPD).

V 100-mL erlenmajericah s stransko kiveto in enim utorom smo avtoklavirali 30 mL sveže pripravljenega tekočega YEPD gojišča in ga ohladili na sobno temperaturo. Tri dni staro kulturo kvasovk na trdnem YEPD gojišču smo s cepilno zanko prenesli v 30 mL tekočega YEPD gojišča do  $OD_{650}$  0,20 ( $\pm 0,02$ ).

Aerobna submerzna kultivacija je potekala na rotacijskem stresalniku pri temperaturi 28 °C in 200 obr./min. Rast kvasovk smo spremljali z merjenjem  $OD_{650}$  vsaki 2 uri do  $t = 14$  h, zadnja meritev je bila izvedena po 24 urah. Delali smo v dveh paralelkah.

Iz rastnih krivulj za posamezne seve kvasovk smo določili vrednosti  $OD_{650}$ , ki so ustrezale sredini eksponentne faze rasti. Vrednosti  $OD_{650}$  za posamezne seve kvasovk v sredini eksponentne faze so nam služile v nadaljevanju poskusa.

### 3.3.3 Štetje celic z Bürker-Türkovo števno ploščico

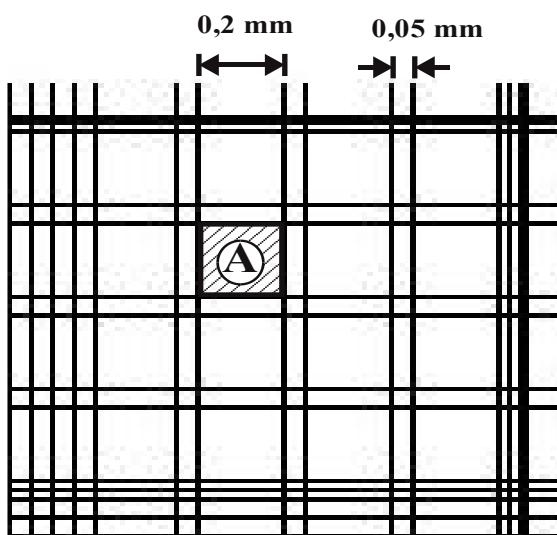
Za vse izbrane seve kvasovk smo določili število celic na mililiter brozge v sredini eksponentne faze rasti s pomočjo Bürker-Türkove števne ploščice. V sredini eksponentne faze smo odvzeli bioprosesno brozgo in pripravili razredčitev ( $10^{-1}$ ) po Kochu, tako da smo 1 mL brozge prenesli v 9 mL fiziološke raztopine ter premešali na vrtinčniku. Kapljico tako pripravljenih raztopin smo kanili na Bürker-Türkovo števno ploščico ter pod mikroskopom prešteli celice v petih različnih kvadratkih (tak kvadratek označen z A na sliki 2). Po enačbi (1) smo izračunali povprečno število celic na kvadratek.

$$\bar{N} = \frac{\sum N}{n} \quad \dots (1)$$

$\bar{N}$  - povprečno število celic na kvadratek

N - število preštetih celic

n - število preštetih kvadratkov



Slika 2: Shematski prikaz izbranega območja Bürker-Türkove števne ploščice (Incyto, 2010).

Z upoštevanjem povprečnega števila celic na kvadratek ( $\bar{N}$ ), faktorja razredčitve ( $R = 10$ ) in faktorja števne ploščice za izbrano območje štetja ( $f = 2,5 \cdot 10^5$ ) smo po enačbi (2) določili število celic v mililitru brozge.

$$\text{število celic/mL} = \bar{N} \cdot R \cdot f \quad \dots (2)$$

### **3.3.4 Aerobna submerzna kultivacija (glavni poskus)**

#### **3.3.4.1 Kultivacija kvasovk do eksponentne faze rasti in priprava suspenzije celic s koncentracijo $1 \cdot 10^7$ celic/mL**

V 1000-mL erlenmajerici s stransko kiveto in enim utorom smo avtoklavirali 360 mL sveže pripravljenega tekočega YEPD gojišča in ga ohladili na sobno temperaturo. Tri dni staro kulturo kvasovk na trdnem YEPD gojišču smo s cepilno zanko aseptično prenesli v 360 mL tekočega YEPD gojišča do OD<sub>650</sub> 0,20 ( $\pm 0,02$ ). Delali smo v dveh paralelkah.

Aerobna submerzna kultivacija je potekala na rotacijskem stresalniku pri temperaturi 28 °C in 200 obr./min. Ko je optična gostota (OD<sub>650</sub>) dosegla vrednost, ki je ustrezala sredini eksponentne faze rasti, smo prekinili bioprocес. Del bioprocесne brozge smo prenigli v 50-mL centrifugirke in centrifugirali 5 min pri 4000 obr./min. Na osnovi podatka o številu celic na mililiter brozge smo iz izhodne brozge in supernatanta pripravili izhodno suspenzijo celic s koncentracijo  $1 \cdot 10^7$  celic/mL.

#### **3.3.4.2 Izpostavitev kvasovk izvlečku rožmarina**

30 mL izhodne suspenzije celic s koncentracijo  $1 \cdot 10^7$  celic/mL smo aseptično prenesli v sterilne 100-mL erlenmajerice s stransko kiveto in takoj dodali ustrezne volumne osnovne raztopine izvlečka rožmarina do koncentracije 0,1; 0,5; 1,0 in 2,0 g/L. Kontrola je vsebovala le 30 mL izhodne suspenzije celic, brez dodatka rožmarinskega izvlečka. Delali smo v dveh paralelkah. Erlenmajerice smo inkubirali na stresalniku pri 28 °C in 200 obr./min in po času t = 0; 2; 4 in 20 h odvzeli vzorce za določanje živosti kvasovk in preverjanje kultivabilnosti.

### **3.3.5 Določanje živosti**

Živost celic smo določali s pomočjo komercialnega kompleta LIVE/DEAD® *FungaLight™ Yeast Viability Kit*, ki omogoča enostavno, hitro, zanesljivo in kvantitativno ločevanje živih in mrtvih celic kvasovk. Komplet vsebuje raztopini dveh barvil, zeleno fluorescenčno barvilo SYTO® 9 in rdeče fluorescenčno barvilo propidijev jodid (PI). Barvili se razlikujeta v valovni dolžini fluorescence in zmožnosti vstopa v celico. SYTO® 9 lahko prehaja skozi membrano, zato obarva vse kvasne celice, celice s poškodovano in nepoškodovano membrano. Barvilo vstopi v celice in prodre do nukleinskih kislin, s katerimi ustvari kompleks, ki fluorescira. V nasprotju pa PI vstopa le v celice s poškodovano membrano ter prav tako tvori kompleks z nukleinskimi kislinami, vendar pa zaradi t.i. fluorescenčnega prenosa resonančne energije (ang. FRET) povzroči

zmanjšanje fluorescence barvila SYTO® 9. Metoda torej temelji na obarvanju nukleinskih kislin v celicah, kjer žive celice t.j. celice z nepoškodovano membrano fluorescirajo zeleno, medtem ko mrtve t.j. celice s poškodovano membrano fluorescirajo rdeče (Molecular Probes, 2005; Stocks, 2004).

Živost kvasovk smo merili pred izpostavitvijo kulture izvlečku rožmarina (ob času  $t = 0$  h) ter po 2-urni, 4-urni in 20-urni izpostavitvi kvasovk izvlečku.

Po 1 mL bioprosesne brozge smo odpipetirali v mikrocentrifugirke in 3 minute centrifugirali pri 14000 obr./min. Supernatant smo odlili, sediment pa sprali v 1 mL 0,01 M PBS. Ponovno smo centrifugirali pri enakih pogojih, odlili supernatant in sediment resuspendirali v 1 mL 0,01 M PBS. Tako smo pripravili suspenzijo celic v pufru ( $\sim 10^7$  do  $10^8$  celic/mL). Za določanje živosti z uporabo kompleta LIVE/DEAD® *FungaLight™ Yeast Viability Kit* smo potrebovali suspenzijo celic s koncentracijo v območju  $10^6$  celic/mL. Sledila je priprava 100 x razredčitve celične suspenzije, kjer smo v nove mikrocentrifugirke z 990  $\mu\text{L}$  0,01 M PBS odpipetirali 10  $\mu\text{L}$  prej pripravljene suspenzije celic. Enemu mililitru tako pripravljene suspenzije celic smo v temi dodali 1  $\mu\text{L}$  barvila SYTO® 9 in 1  $\mu\text{L}$  PI ter dobro premešali. Slepoto probo smo pripravili, tako da smo 1 mL 0,01M PBS dodali 1  $\mu\text{L}$  barvila SYTO® 9 in 1  $\mu\text{L}$  PI. Mikrocentrifugirke smo inkubirali 20 min v temi pri 37 °C. Po inkubaciji smo suspenzijo ponovno premešali in iz vsake mikrocentrifugirke prenesli po 200  $\mu\text{L}$  suspenzije v dve jamici mikrotitrskih plošč ter izmerili fluorescenco s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč Safire 2.

Parametri merjenja fluorescence s čitalcem mikrotitrskih plošč:

a) barvilo SYTO® 9

- valovna dolžina vzbujanja: 488 nm
- valovna dolžina merjenja imitirane fluorescence: 530 nm
- razmik med valovnimi dolžinami (»bandwidth«): 15 nm
- »gain«: 81
- »z-position«: 8619  $\mu\text{m}$

b) barvilo PI

- valovna dolžina vzbujanja: 488 nm
- valovna dolžina merjenja imitirane fluorescence: 650 nm
- razmik med valovnimi dolžinami (»bandwidth«): 15 nm
- »gain«: 94
- »z-position«: 8619  $\mu\text{m}$

Rezultate meritev smo dobili na izpisu iz računalniškega programa Magellan in so bili podani kot fluorescenčna intenziteta (RFU) (Priloge B1-B5). Iz podatkov o fluorescenčni intenziteti smo izračunali relativno živost (%).

Izvleček rožmarina, s katerim smo tretirali kvasovke kvarljivke, je bil raztopljen v etanolu, zato smo poleg izvlečka rožmarina preverili tudi vpliv samega topila na živost kvasovk.

Barvili SYTO® 9 in PI se v kompletu LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability Kit nahajata kot raztopini v dimetil sulfoksidu (DMSO), ki veže vodo in tako ščiti barvili pred izgubo aktivnosti.

### 3.3.6 Preverjanje kultivabilnosti

Kultivabilnost kvasovk smo preverjali z razmazovanjem suspenzije kvasovk s cepilno zanko po trdnem YEPD gojišču in fotografiranjem plošč po inkubaciji. Znano je, da na gojišču zrastejo le kultivabilne oz. reprodukcijsko sposobne celice.

Za preverjanje kultivabilnosti kvasovk po tretiranju z izvlečkom rožmarina smo uporabili suspenzijo celic, ki je ostala v mikrocentrifugirkah po določanju živosti s pomočjo barvili SYTO® 9 in PI. Del suspenzije celic smo cepilno zanko prenesli na ploščo s trdnim YEPD gojiščem in razmazali. Gojišče smo pred nacepljanjem po sredini prerezali s skalpelom in na eno ploščo cepili po dve paralelki. Petrijeve plošče smo inkubirali 3 dni pri 28 °C. Po inkubaciji smo plošče fotografirali.

Po istem postopku smo preverili tudi vpliv etanola kot topila na kultivabilnost kvasovk.

### 3.3.7 Statistična obdelava podatkov

#### 3.3.7.1 Povprečna vrednost

Meritve smo pri spremeljanju rasti kvasovk in štetju celic izvedli v dveh paralelnih vzorcih, medtem ko smo določanje živosti izvedli v štirih ponovitvah. Rezultate meritve smo obdelali z računalniškim programom Microsoft Excel in jih podali kot povprečno vrednost ( $\bar{X}$ ), izračunano po enačbi (3) (Košmelj, 2001).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots (3)$$

$n$  - število vzorcev

$X_i$  - vrednost  $i$ -te meritve

### 3.3.7.2 Standardni odklon

Za oceno variabilnosti rezultatov smo izračunali standardni odklon (SD) po enačbi (4) (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \dots (4)$$

### 3.3.7.3 Statistična analiza z računalniškim programom SAS

Rezultate določanja relativne živosti kvasovk smo z določenimi statističnimi operacijami pripravili in uredili v računalniškem programu Microsoft Excel in jih nato statistično analizirali s programom SAS (SAS Software, 1999) s postopkom GLM (splošni linearni model; ang. General Linear Model) in TTEST (t-test). Pričakovane povprečne vrednosti so bile izračunane z uporabo testa mnogoterih primerjav (Duncanov test) in primerjane pri 5 % tveganju. T-test je bil opravljen v paru med rezultati za živost po tretiranju z izvlečkom rožmarina in rezultati za živost po tretiranju s samim topilom (etanol) pri 0,01 % tveganju.

## 4 REZULTATI

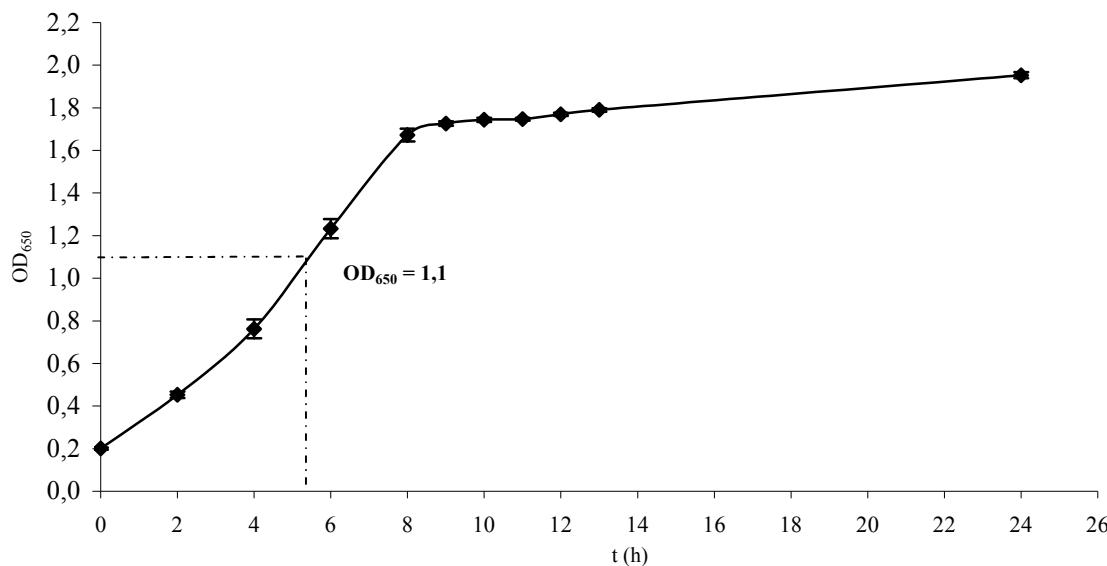
Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil v času od maja do decembra 2007.

Skladno z delovno hipotezo smo skušali dokazati, da izpostavitev celic kvasovk izvlečku rožmarina v določeni koncentraciji povzroči zmanjšanje živosti in kultivabilnosti. Predvidevali smo tudi, da se bo po daljšem času izpostavitev celic izvlečku rožmarina pri nižji koncentraciji živost povečala, ne pa nujno kultivabilnost. Najprej smo spremljali rastne krivulje kvasovk kvarljivk z merjenjem optične gostote. Po izpostavitvi kulture kvasovk izvlečku rožmarina smo določali živost celic s pomočjo kompleta LIVE/DEAD® *FungaLight™ Yeast Viability Kit* in preverjali kultivabilnost kvasovk.

### 4.1 SPREMLJANJE RASTI KVASOVK IN DOLOČITEV SREDINE EKSPONENTNE FAZE RASTI V GOJIŠČU BREZ DODANEGA IZVLEČKA ROŽMARINA

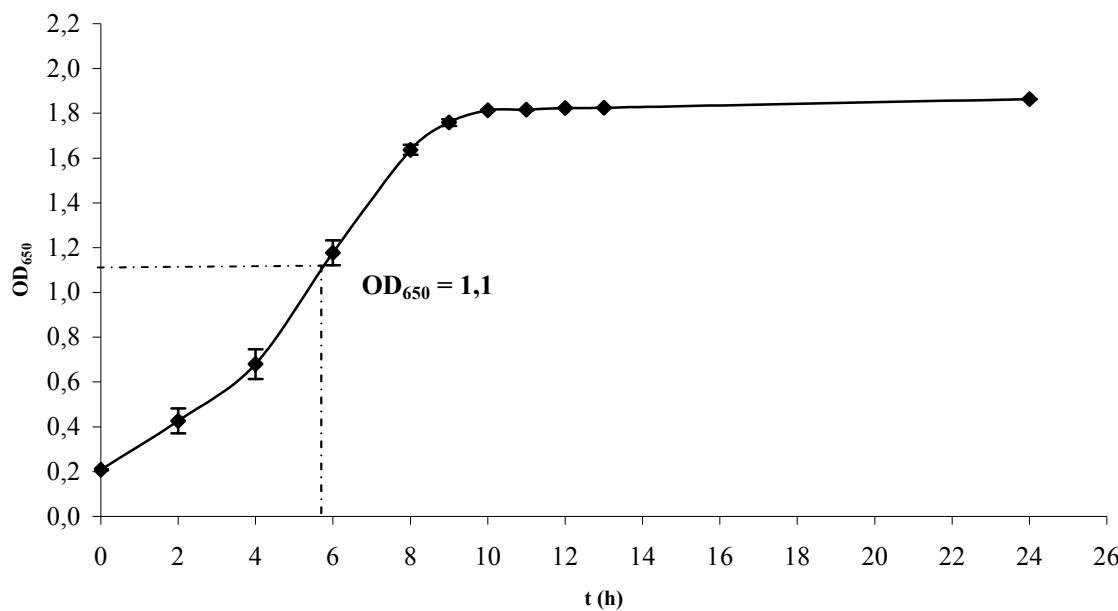
Rast kvasovk smo spremljali z merjenjem optične gostote ( $OD_{650}$ ) do stacionarne faze rasti. Aerobna submerzna kultivacija rasti je potekala na stresalniku pri  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 200 obr./min.

Na podlagi rastnih krivulj smo določili sredine eksponentne faze rasti kvasovk. Ker so v tej fazi rasti kvasovke v dobrem fiziološkem stanju z visoko metabolno aktivnostjo, smo pri optični gostoti, ki je značilna za sredino eksponentne faze, bioprocес prekinili in pripravili suspenzijo celic kvasovk z določeno koncentracijo celic, kot je opisano pod točko 3.3.4.1.



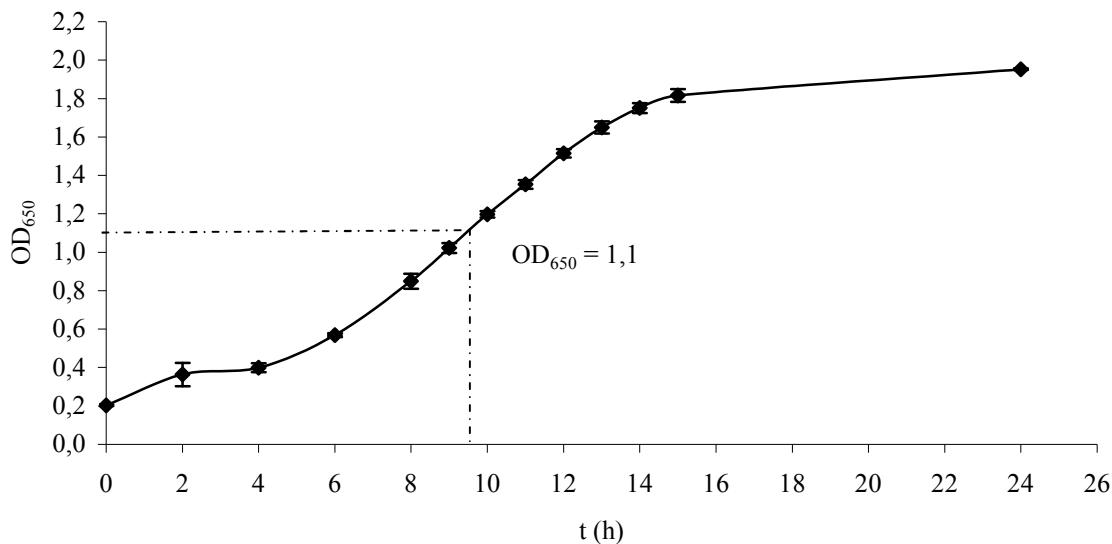
Slika 3: Rastna krivulja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28 \text{ } ^\circ\text{C}$ , 200 obr./min). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti  $\text{OD}_{650} \pm \text{SD}$  dveh ponovitev.

Slike 3 je razvidno, da je sredina eksponentne faze rasti za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 pri vrednosti  $\text{OD}_{650}$  1,1.



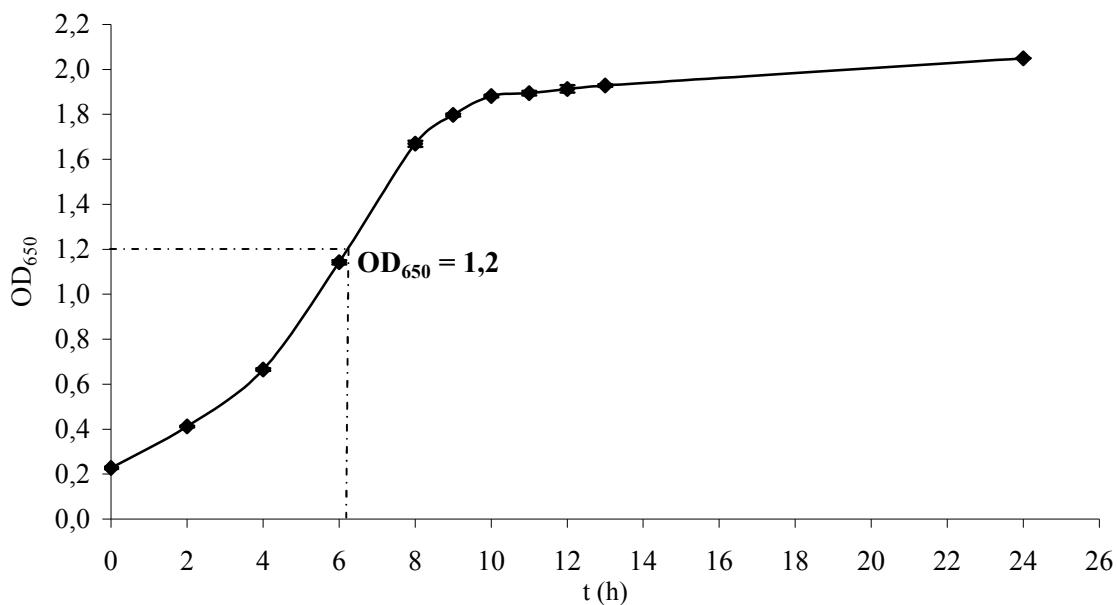
Slika 4: Rastna krivulja kvasovke *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28 \text{ } ^\circ\text{C}$ , 200 obr./min). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti  $\text{OD}_{650} \pm \text{SD}$  dveh ponovitev.

Sredina eksponentne faze rasti je za kvasovko *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117 pri vrednosti  $\text{OD}_{650}$  1,1 (slika 4).



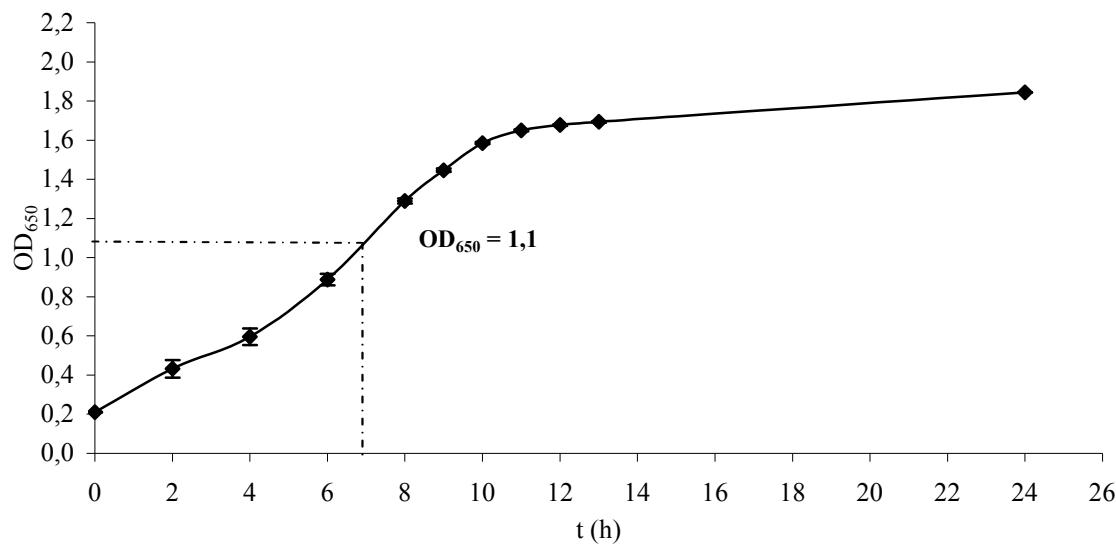
Slika 5: Rastna krivulja kvasovke *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28^\circ\text{C}$ , 200 obr./min). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti  $\text{OD}_{650} \pm \text{SD}$  dveh ponovitev.

Sredina eksponentne faze rasti je za kvasovko *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232 pri vrednosti  $\text{OD}_{650}$  1,1 (slika 5).



Slika 6: Rastna krivulja kvasovke *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28^\circ\text{C}$ , 200 obr./min). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti  $\text{OD}_{650} \pm \text{SD}$  dveh ponovitev.

Sredina eksponentne faze rasti je za kvasovko *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 pri vrednosti  $\text{OD}_{650}$  1,2 (slika 6).



**Slika 7:** Rastna krivulja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 v tekočem YEPD gojišču med aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ( $T = 28^\circ\text{C}$ , 200 obr./min). Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti  $\text{OD}_{650} \pm \text{SD}$  dveh ponovitev.

Sredina eksponentne faze rasti je za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 pri vrednosti  $\text{OD}_{650}$  1,1 (slika 7).

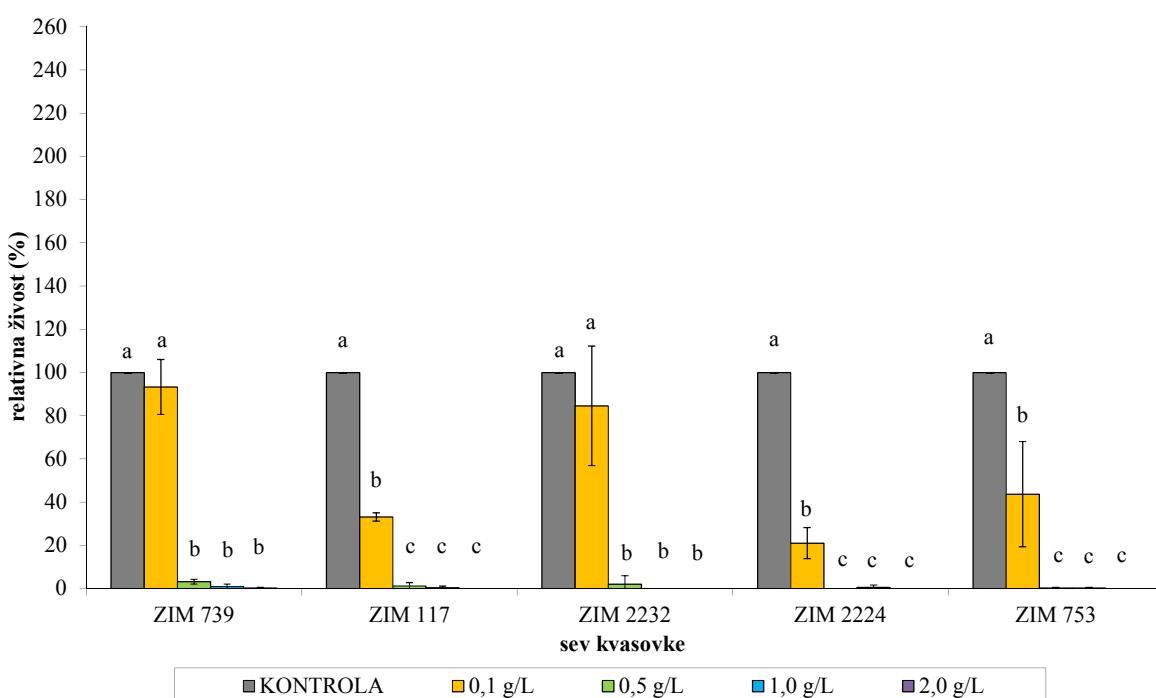
**Preglednica 8:** Določitev vrednosti  $\text{OD}_{650}$  in števila celic/mL v sredini eksponentne faze rasti za posamezne kvasovke

sev kvasovke	$\text{OD}_{650}$ v sredini eksponentne faze rasti	število celic/mL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 739	1,1	$3,48 \cdot 10^7$
<i>Hanseniaspora uvarum</i> ZIM 117	1,1	$9,73 \cdot 10^7$
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> ZIM 2232	1,1	$5,15 \cdot 10^7$
<i>Pichia membranifaciens</i> ZIM 2224	1,2	$5,83 \cdot 10^7$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 753	1,1	$2,98 \cdot 10^7$

## 4.2 DOLOČANJE ŽIVOSTI PO IZPOSTAVITVI KULTURE KVASOVK IZVLEČKU ROŽMARINA

Vpliv izvlečka rožmarina na rast kvasovk smo preverjali s hitro metodo za določanje živosti kvasovk, kot je opisano pod točko 3.3.5. Delovanje izvlečka rožmarina smo preverili v koncentracijah 0,1; 0,5; 1,0 in 2,0 g/L po 2-, 4- in 20-urni izpostavitvi kulture kvasovk izvlečku.

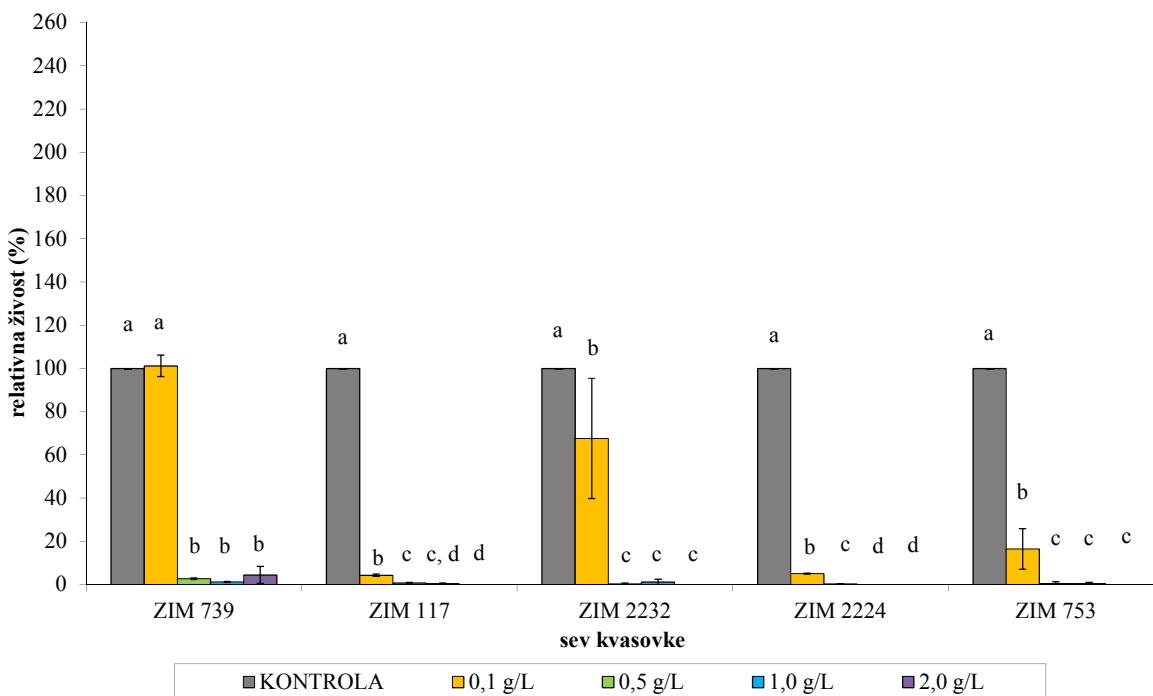
### 4.2.1 Vpliv koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk



**Slika 8:** Vpliv koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 po 2-urni izpostaviti izvlečku. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za isto kvasovko pri različnih koncentracijah izvlečka rožmarina označene z različnimi indeksi (a, b, c), se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

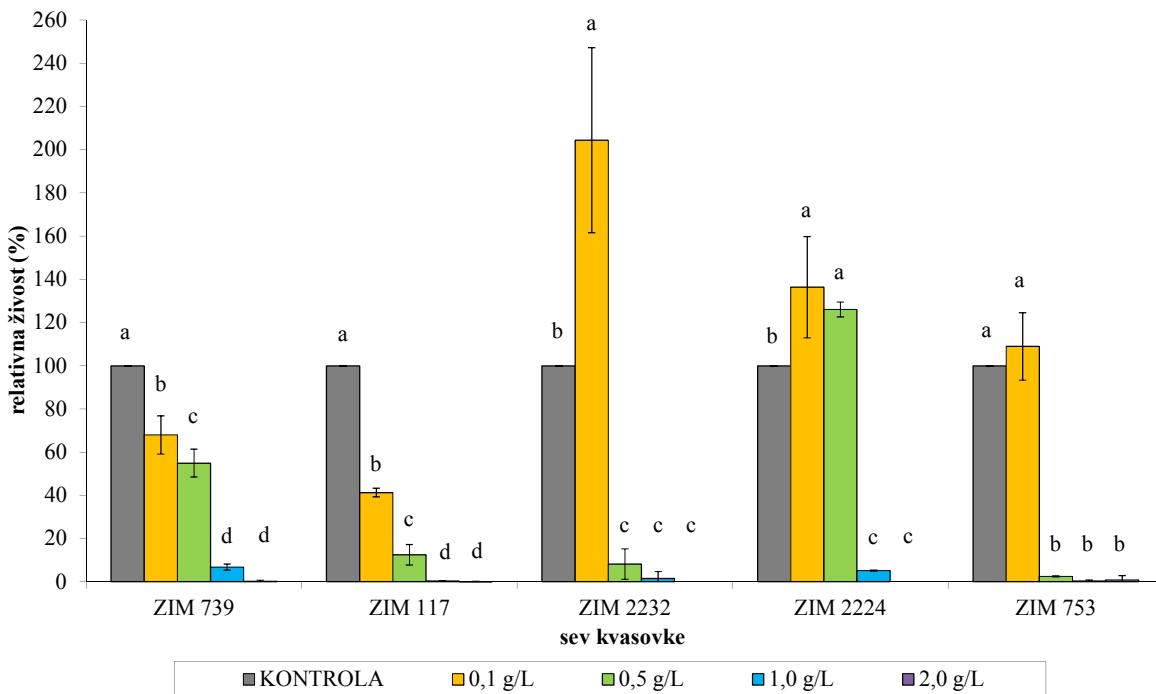
S slike 8 je razvidno, da izvleček rožmarina po 2-urni izpostaviti kvasovk v koncentracijah izvlečka  $\geq 0,1$  g/L statistično značilno zmanjša živost v primerjavi s kontrolo pri kvasovkah *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753. Medtem ko je pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 in *Zygosaccharomyces bailii* prišlo do statistično značilnega zmanjšanja živosti v koncentracijah izvlečka  $\geq 0,5$  g/L ( $p \leq 0,05$ ). Stoodstotni padec v živosti smo po 2-urni izpostaviti kvasovk izvlečku rožmarina določili v koncentraciji 0,5 g/L pri *Pichia membranifaciens*; v koncentraciji izvlečka 1,0 g/L pri kvasovki

*Zygosaccharomyces bailii*; v koncentraciji 2,0 g/L pa pri vseh kvasovkah, razen pri *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739.



**Slika 9:** Vpliv koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 po 4-urni izpostavitevi izvlečku. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za isto kvasovko pri različnih koncentracijah izvlečka rožmarina označene z različnimi indeksi (a, b, c, d), se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

S slike 9 je razvidno, da izvleček rožmarina po 4-urni izpostavitevi kvasovk v koncentracijah izvlečka  $\geq 0,1$  g/L statistično značilno zmanjša živost v primerjavi s kontrolo pri vseh kvasovkah razen pri *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 ( $p \leq 0,05$ ). Pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 pride do zmanjšanja živosti v koncentracijah izvlečka  $\geq 0,5$  g/L. Stodstotni padec v živosti smo po 4-urni izpostavitevi kvasovk izvlečku rožmarina določili v koncentraciji 1,0 g/L pri kvasovki *Pichia membranifaciens*; v koncentraciji 2,0 g/L pa pri vseh kvasovkah, razen pri *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739.

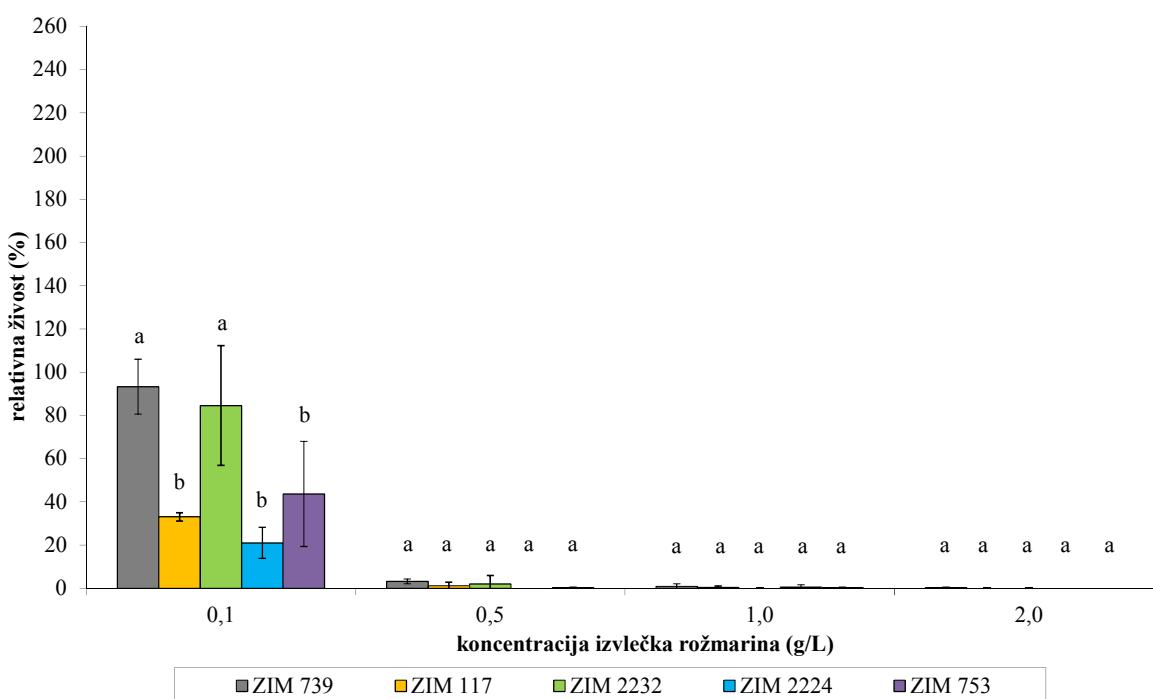


**Slika 10:** Vpliv koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 po 20-urni izpostavitevi izvlečku. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za isto kvasovko pri različnih koncentracijah izvlečka rožmarina označene z različnimi indeksi (a, b, c, d), se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

S slike 10 je razvidno, da izvleček rožmarina po 20-urni izpostavitevi kvasovk izvlečku v koncentracijah  $\geq 0,1$  g/L statistično značilno zmanjša živost v primerjavi s kontrolo pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 in *Hanseniaspora uvarum*. Pri kvasovkah *Zygosaccharomyces bailii* in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 je prišlo do statistično značilnega zmanjšanja živosti v koncentracijah izvlečka  $\geq 0,5$  g/L. Pri kvasovki *Pichia membranifaciens* pa v koncentracijah izvlečka  $\geq 1,0$  g/L ( $p \leq 0,05$ ). Stoodstotni padec živosti smo določili pri kvasovkah *Zygosaccharomyces bailii* in *Pichia membranifaciens*, in sicer v koncentraciji izvlečka 2,0 g/L.

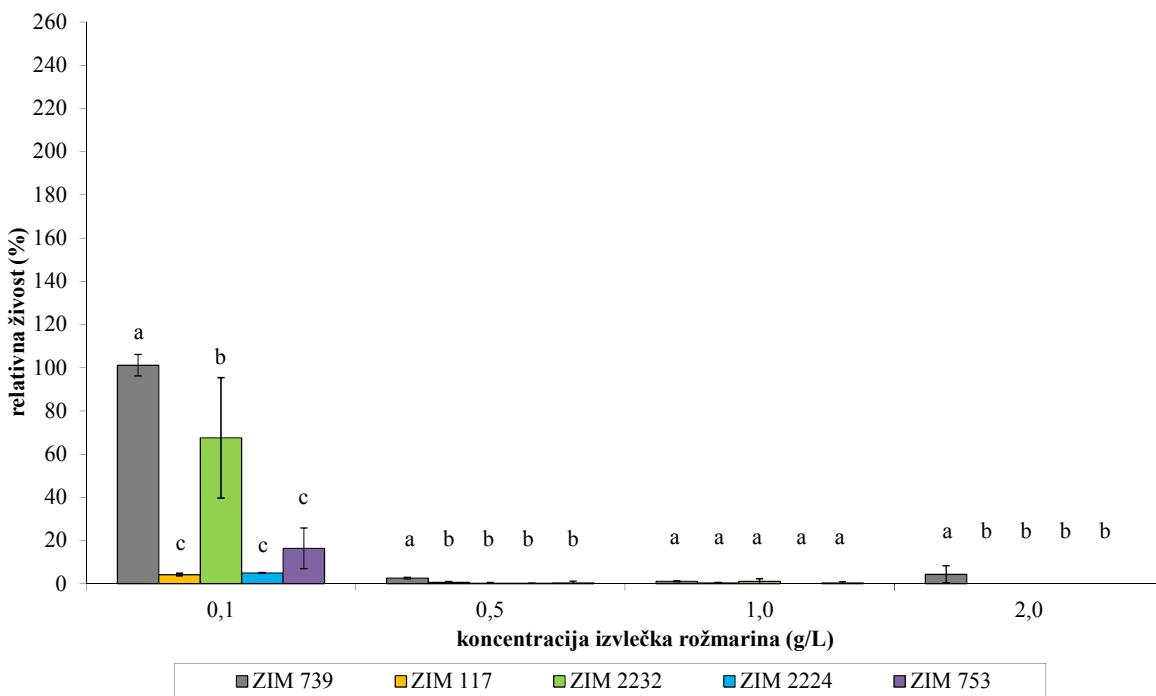
Po 20-urni izpostavitevi izvlečku rožmarina v koncentraciji 0,1 g/L je pri kvasovkah *Zygosaccharomyces bailii* in *Pichia membranifaciens* prišlo do statistično značilnega povečanja živosti ( $p \leq 0,05$ ). Do statistično značilnega povečanja živosti v primerjavi s kontrolo je prišlo tudi v koncentraciji izvlečka 0,5 g/L, in sicer pri kvasovki *Pichia membranifaciens*.

#### 4.2.2 Vpliv izvlečka rožmarina na živost kvasovk: primerjava med kvasovkami znotraj iste koncentracije po določenem času izpostavitve izvlečku



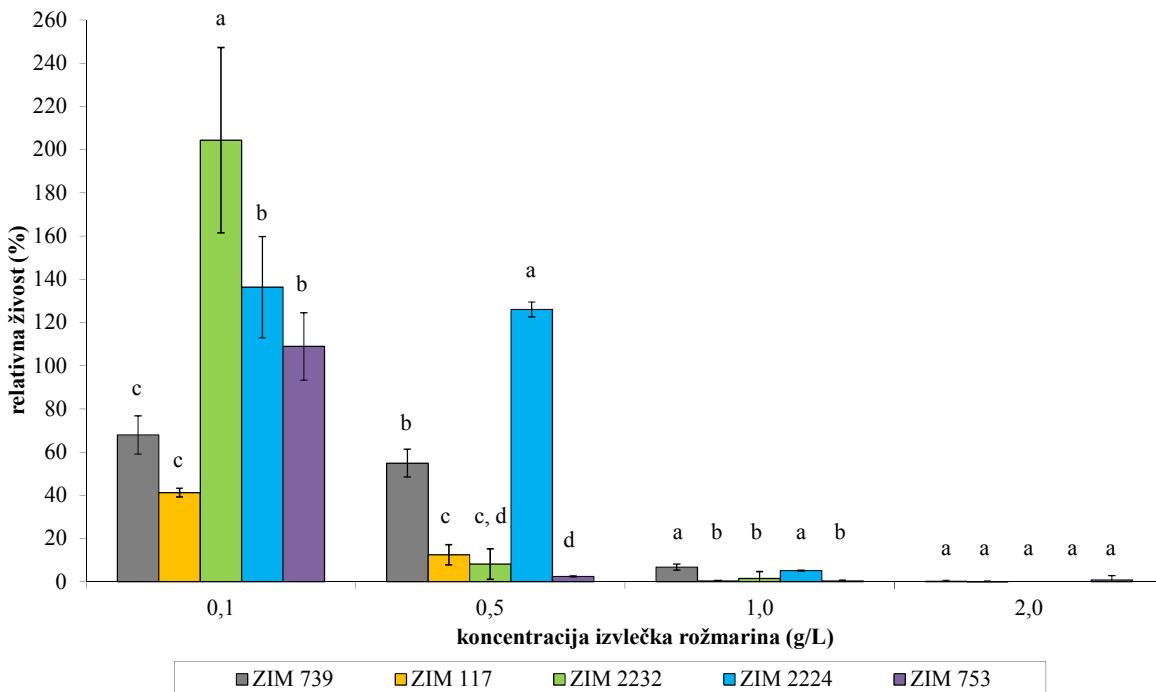
**Slika 11:** Primerjava med kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 znotraj iste koncentracije po 2-urni izpostavitevi izvlečku rožmarina. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za različne kvasovke pri isti koncentraciji izvlečka rožmarina označene z indeksoma a in b, se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

Slike 11 je razvidno, da se živost po 2-urni izpostavitevi izvlečku v najnižji koncentraciji statistično značilno najbolj zmanjša pri kvasovkah *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753, medtem ko v koncentracijah izvlečka  $\geq 0,5$  g/L razlika v živosti testiranih kvasovk ni več opazna.



**Slika 12:** Primerjava med kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 znotraj iste koncentracije po 4-urni izpostavitevi izvlečku rožmarina. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za različne kvasovke pri isti koncentraciji izvlečka rožmarina označene z različnimi indeksi (a, b, c), se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

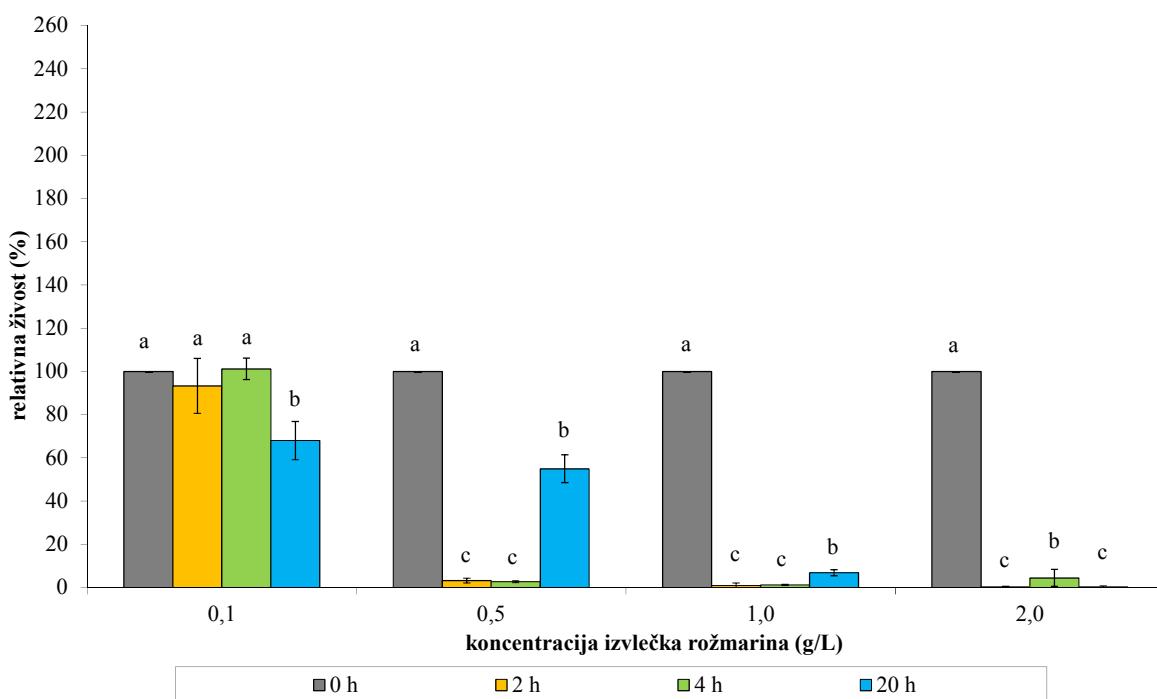
Po 4-urni izpostavitevi kvasovk izvlečku se v najnižji koncentraciji živost statistično značilno najbolj zmanjša pri kvasovkah *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens* in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753, medtem ko se v koncentracijah izvlečka  $\geq 0,5$  g/L enako učinkovito zmanjša živost pri vseh kvasovkah razen pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 (slika 12).



**Slika 13:** Primerjava med kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 znotraj iste koncentracije po 20-urni izpostavitevi izvlečku rožmarina. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za različne kvasovke pri isti koncentraciji izvlečka rožmarina označene z različnimi indeksi (a, b, c, d), se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

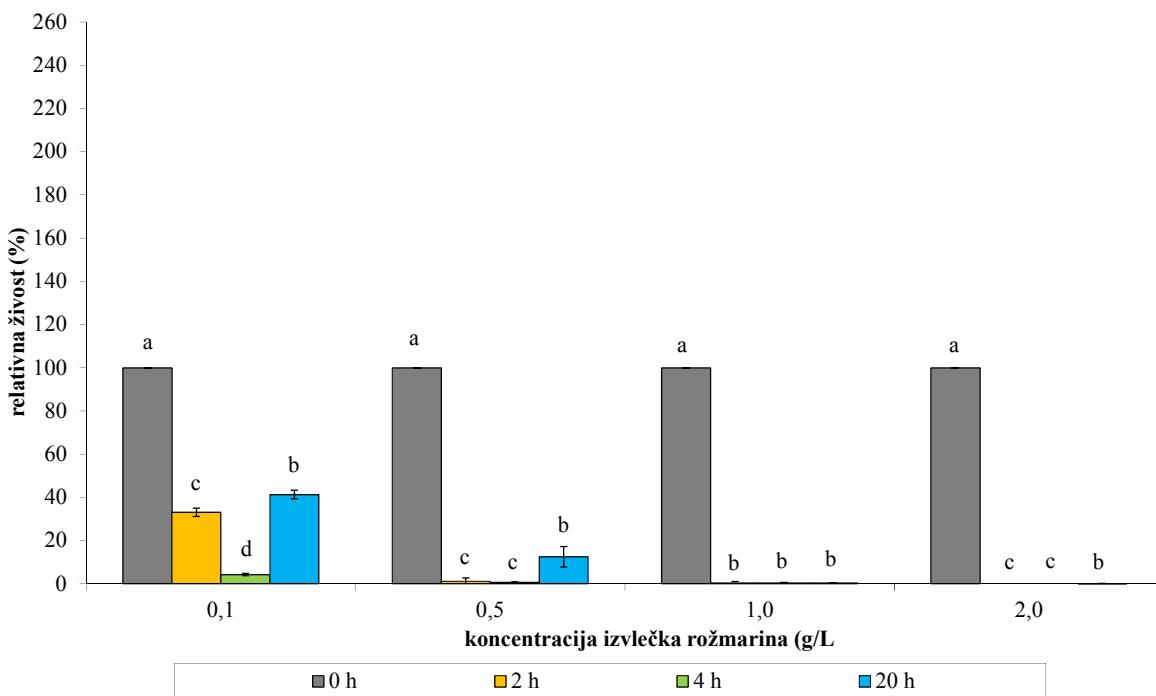
Po 20-urni izpostavitevi kvasovk 0,1 g/L izvlečka rožmarina le-ta statistično značilno najbolj zmanjša živost pri kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 in *Hanseniaspora uvarum*, medtem ko so kvasovke *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia membranifaciens* in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 manj občutljive na delovanje izvlečka. V koncentraciji izvlečka rožmarina 0,5 g/L pride do največjega zmanjšanja živosti pri kvasovkah *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753, medtem ko je *Pichia membranifaciens* najmanj občutljiva. Enako učinkovito zmanjšanje živosti za vse kvasovke je v koncentraciji izvlečka 2,0 g/L (slika 13).

#### 4.2.3 Vpliv časa izpostavitve izvlečku rožmarina na živost kvasovk



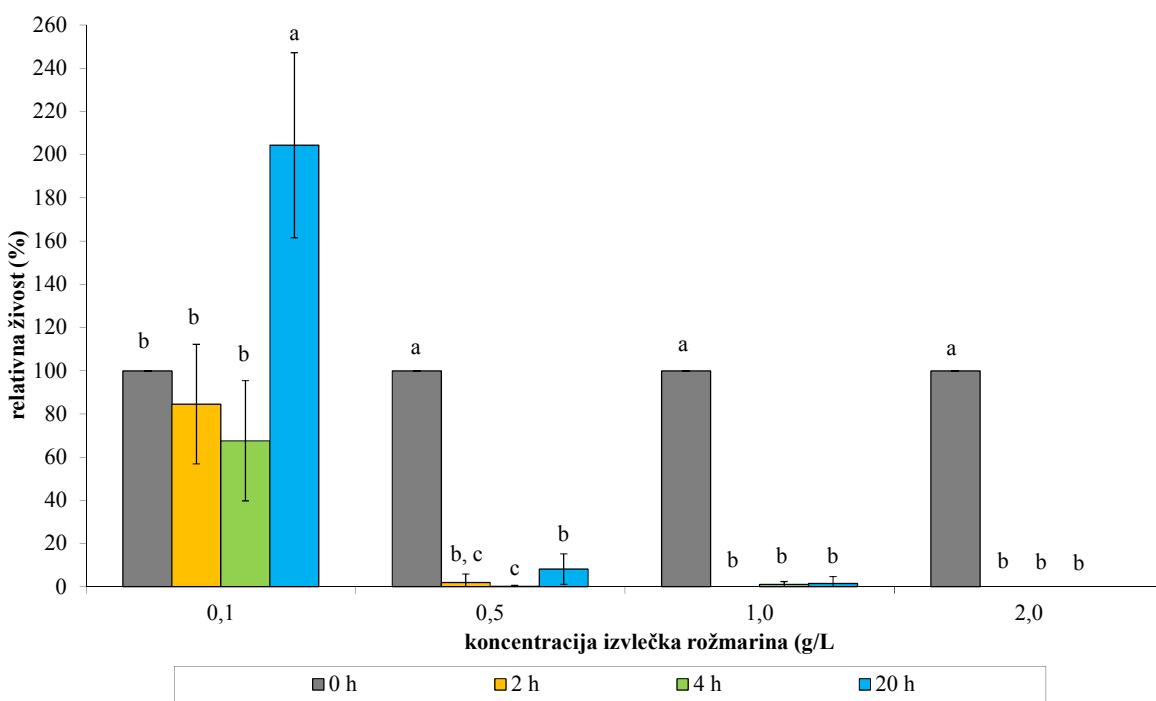
Slika 14: Vpliv časa izpostavitve izvlečku rožmarina na živost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za izbrano kvasovko pri isti koncentraciji izvlečka rožmarina in različnih časih izpostavitve izvlečku označene z različnimi indeksi (a, b, c), se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

Po krajšem času izpostavitve (2 in 4 ure) kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 izvlečku pride v koncentracijah 0,5 in 1,0 g/L do statistično značilnega zmanjšanja živosti, a se po daljšem času izpostavitve (20 ur) živost poveča. V najvišji koncentraciji ni povečanja živosti po daljšem času izpostavitve celic kvasovk (slika 14).



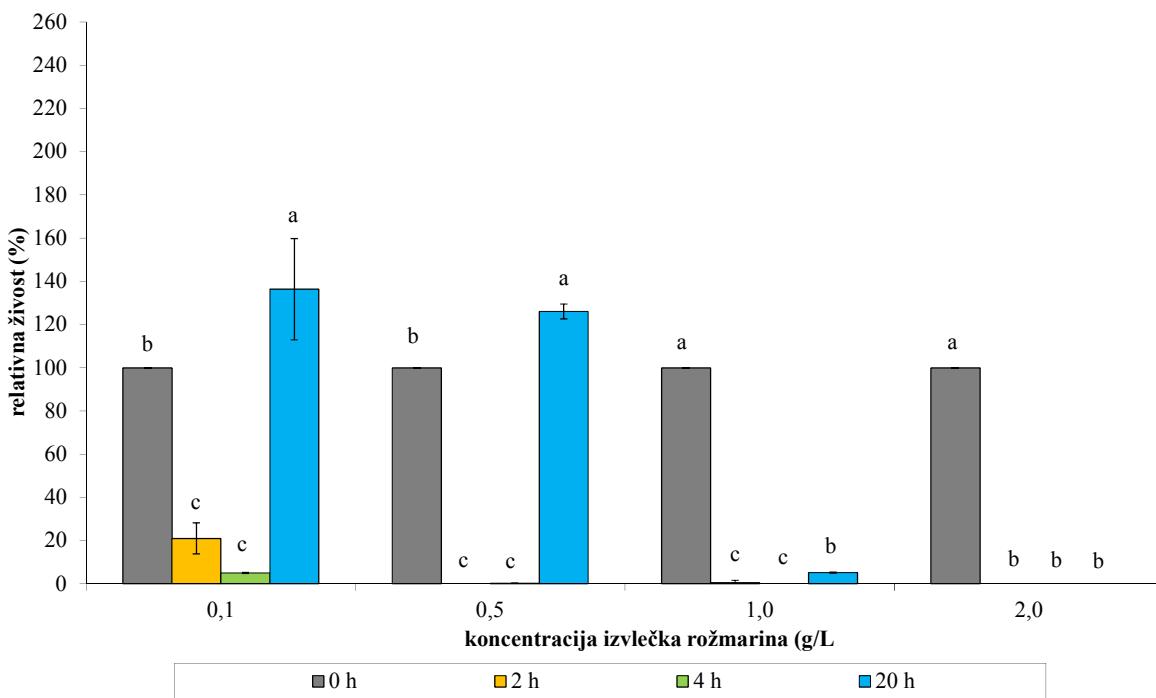
**Slika 15:** Vpliv časa izpostavitev izvlečku rožmarina na živost kvasovke *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za izbrano kvasovko pri isti koncentraciji izvlečka rožmarina in različnih časih izpostavitev izvlečku označene z različnimi indeksi (a, b, c, d) se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

Slike 15 je razvidno, da se pri kvasovki *Hanseniaspora uvarum* v nižjih koncentracijah izvlečka (0,1 in 0,5 g/L) živost zmanjšuje s časom izpostavitev (2 in 4 ure), a se po 20-urni izpostavitvi zopet poveča. V koncentraciji izvlečka rožmarina 1,0 g/L ne pride do povišanja živosti po daljšem času izpostavitev, medtem ko je v najvišji koncentraciji izvlečka zaznati minimalno povečanje živosti kvasnih celic.



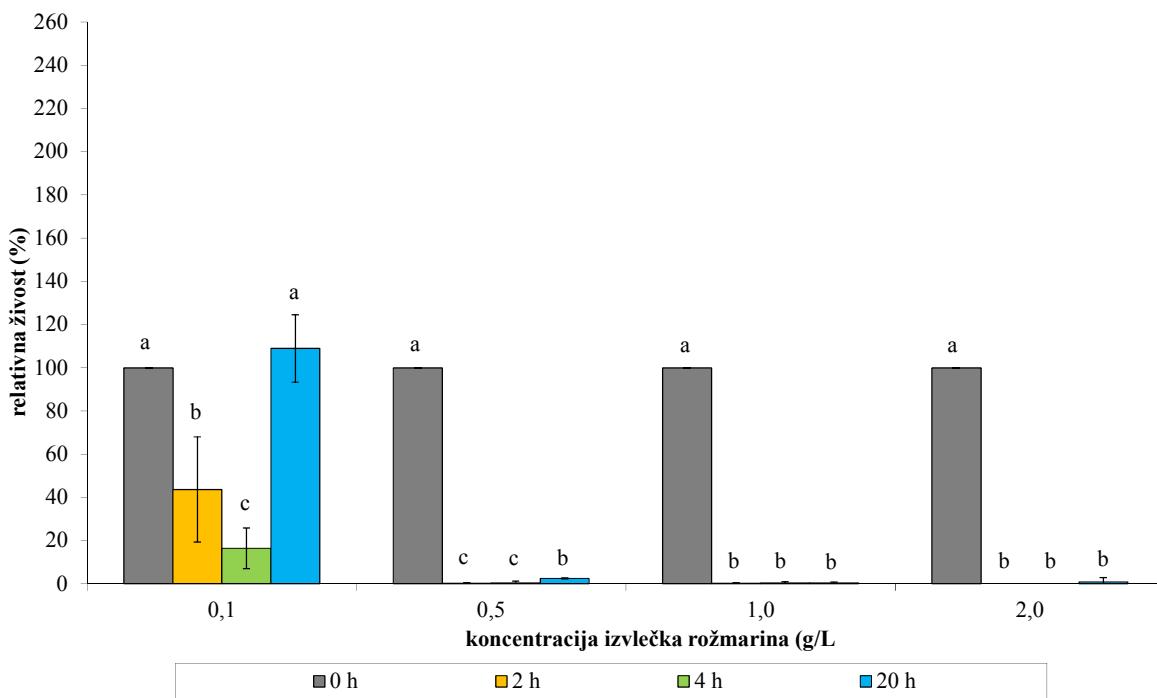
**Slika 16:** Vpliv časa izpostavitve izvlečku rožmarina na živost kvasovke *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za izbrano kvasovko pri isti koncentraciji izvlečka rožmarina in različnih časih izpostavitve izvlečku označene z različnimi indeksi (a, b, c) se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

Slike 16 je razvidno, da pride v nižjih koncentracijah izvlečka rožmarina po daljšem času izpostavitve celic kvasovke *Zygosaccharomyces bailii* do statistično značilnega povečanja živosti. V najnižji koncentraciji je po daljšem času izpostavitve opaziti celo večjo živost kot pri času 0. V višjih koncentracijah izvlečka rožmarina po daljši izpostavitvi ni povečanja živosti.



**Slika 17:** Vpliv časa izpostavitve izvlečku rožmarina na živost kvasovke *Pichia membranifaciens* ZIM 2224. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za izbrano kvasovko pri isti koncentraciji izvlečka rožmarina in različnih časih izpostavitve izvlečku označene z različnimi indeksi (a, b, c) se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

Izvleček rožmarina v nižjih koncentracijah in krajsih časih izpostavitve (2 in 4 ure) statistično značilno zmanjša živost, a se ta po daljši izpostaviti celic kvasovk *Pichia membranifaciens* ponovno poveča, celo nad vrednost časa 0. Tudi v koncentraciji 1,0 g/L izvlečka rožmarina pride po daljši izpostaviti do rahlega povečanja živosti, medtem ko v najvišji koncentraciji izvlečka povečanja živosti nismo zaznali (slika 17).

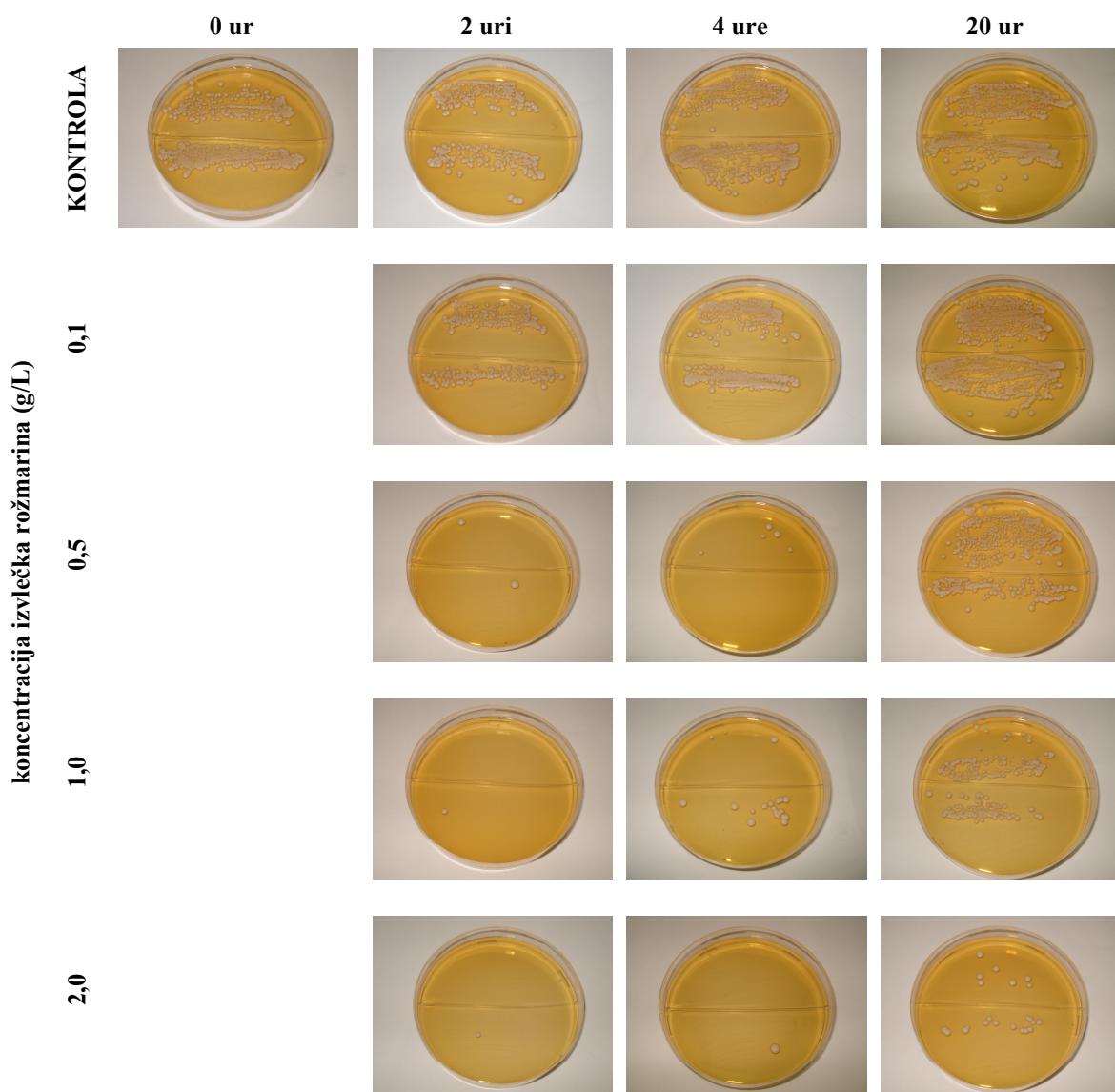


**Slika 18:** Vpliv časa izpostavitev izvlečku rožmarina na živost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev. Povprečne vrednosti, ki so za izbrano kvasovko pri isti koncentraciji izvlečka rožmarina in različnih časih izpostavitev izvlečku označene z različnimi indeksi (a, b, c) se med seboj statistično razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ .

Izvleček rožmarina v nižjih koncentracijah in po krajših časih izpostavitev zmanjša živost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753, a se ta po daljšem času izpostavitev ponovno poveča. V višjih koncentracijah ne pride do povečanja živosti (slika 18).

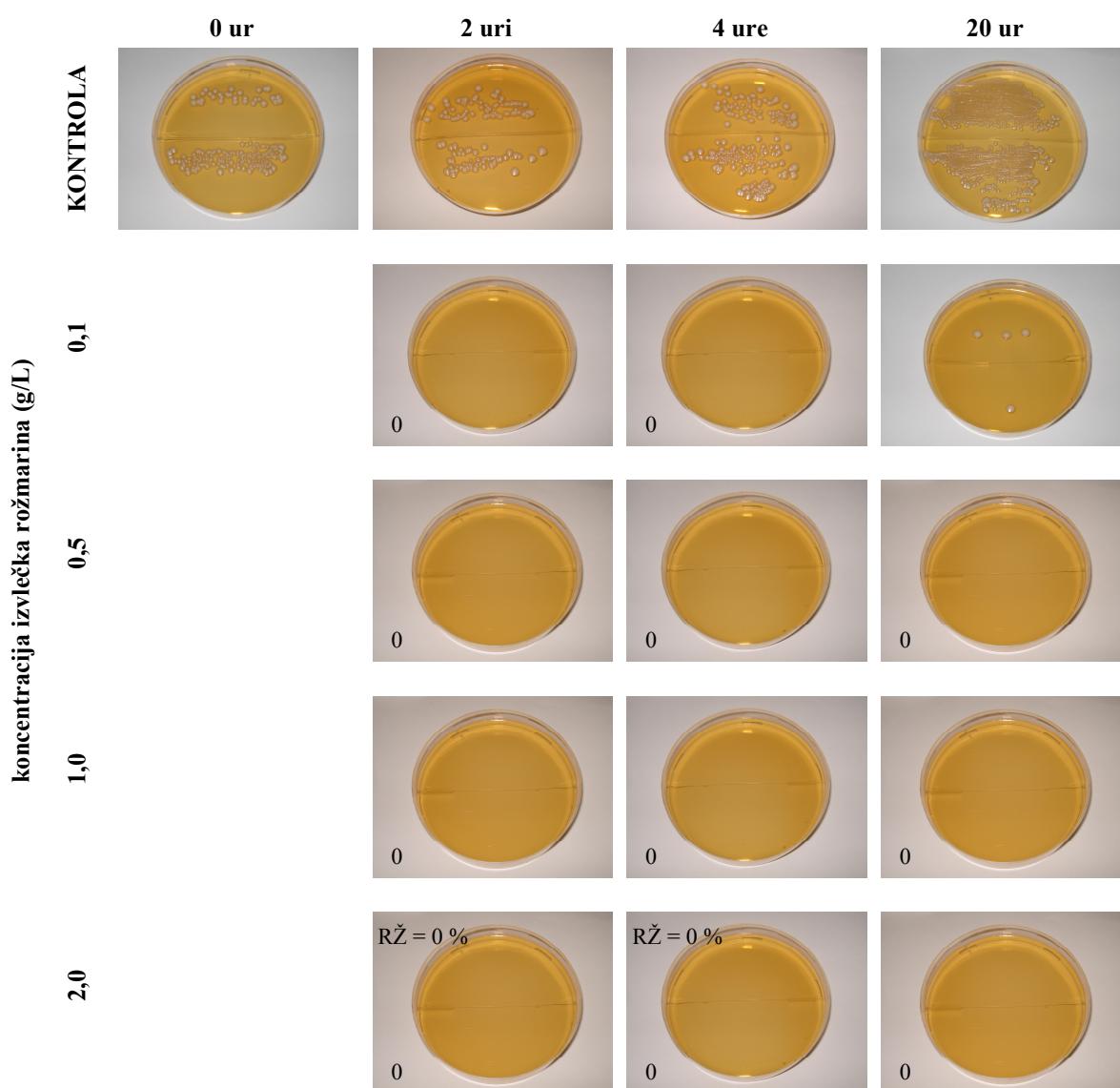
#### 4.3 PREVERJANJE KULTIVABILNOSTI PO IZPOSTAVITVI KULTURE KVASOVK IZVLEČKU ROŽMARINA

Kultivabilnost kvasovk smo preverjali z razmazovanjem suspenzije kvasovk s cepilno zanko po trdnem YEPD gojišču in fotografiranjem plošč po inkubaciji, kot je opisano pod točko 3.3.6. Na gojišču zrastejo le kultivabilne oz. za reprodukcijo sposobne celice.



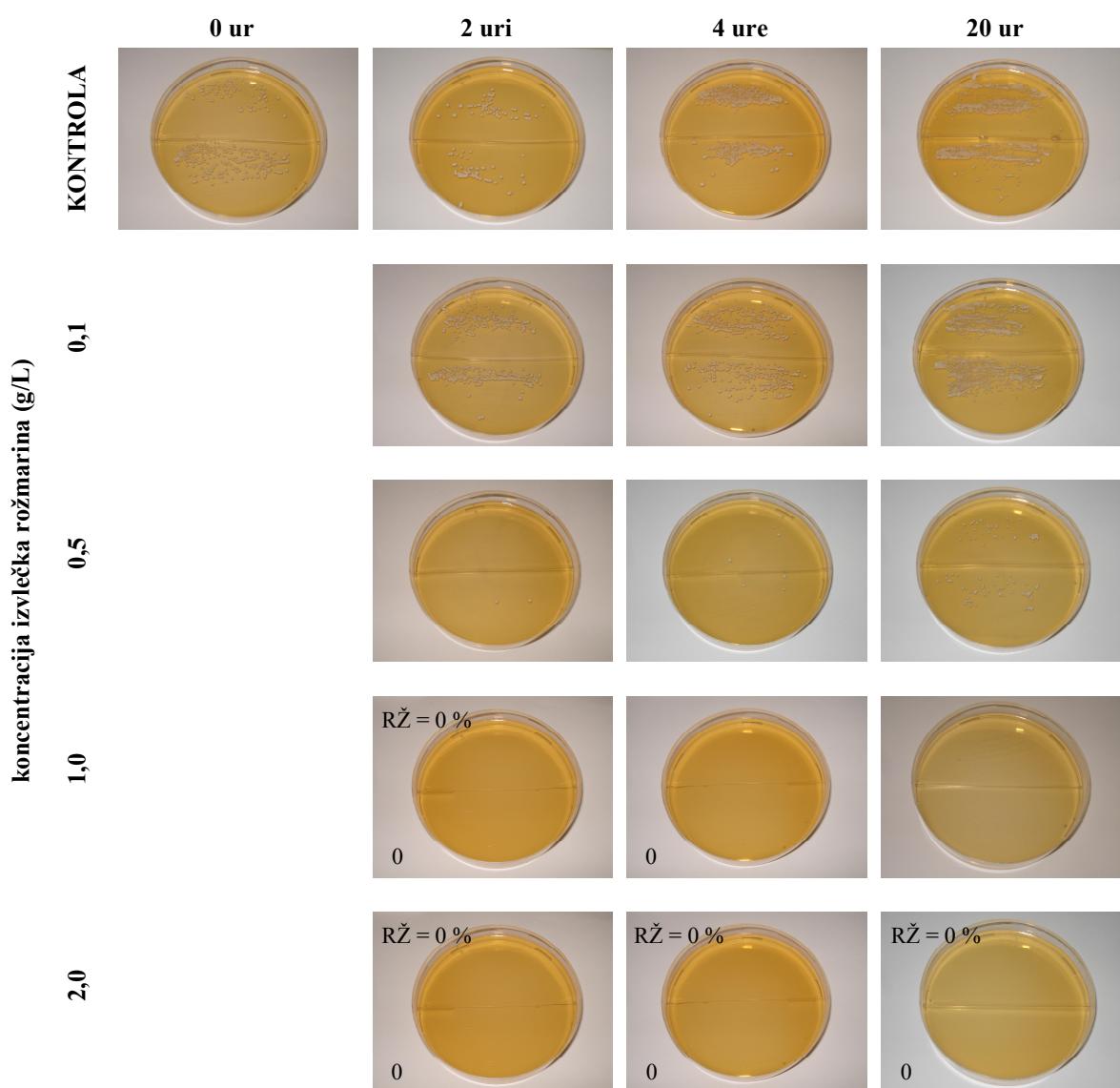
**Slika 19:** Kultivabilnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitvi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. Na eni petrijevki sta dve ponovitvi.

Slike 19 je razvidno, da kultivabilnost celic z naraščajočo koncentracijo izvlečka rožmarina pada. Z daljšo izpostavitvijo (20 ur) kulture kvasovk izvlečku pa v vseh koncentracijah kultivabilnost narašča.



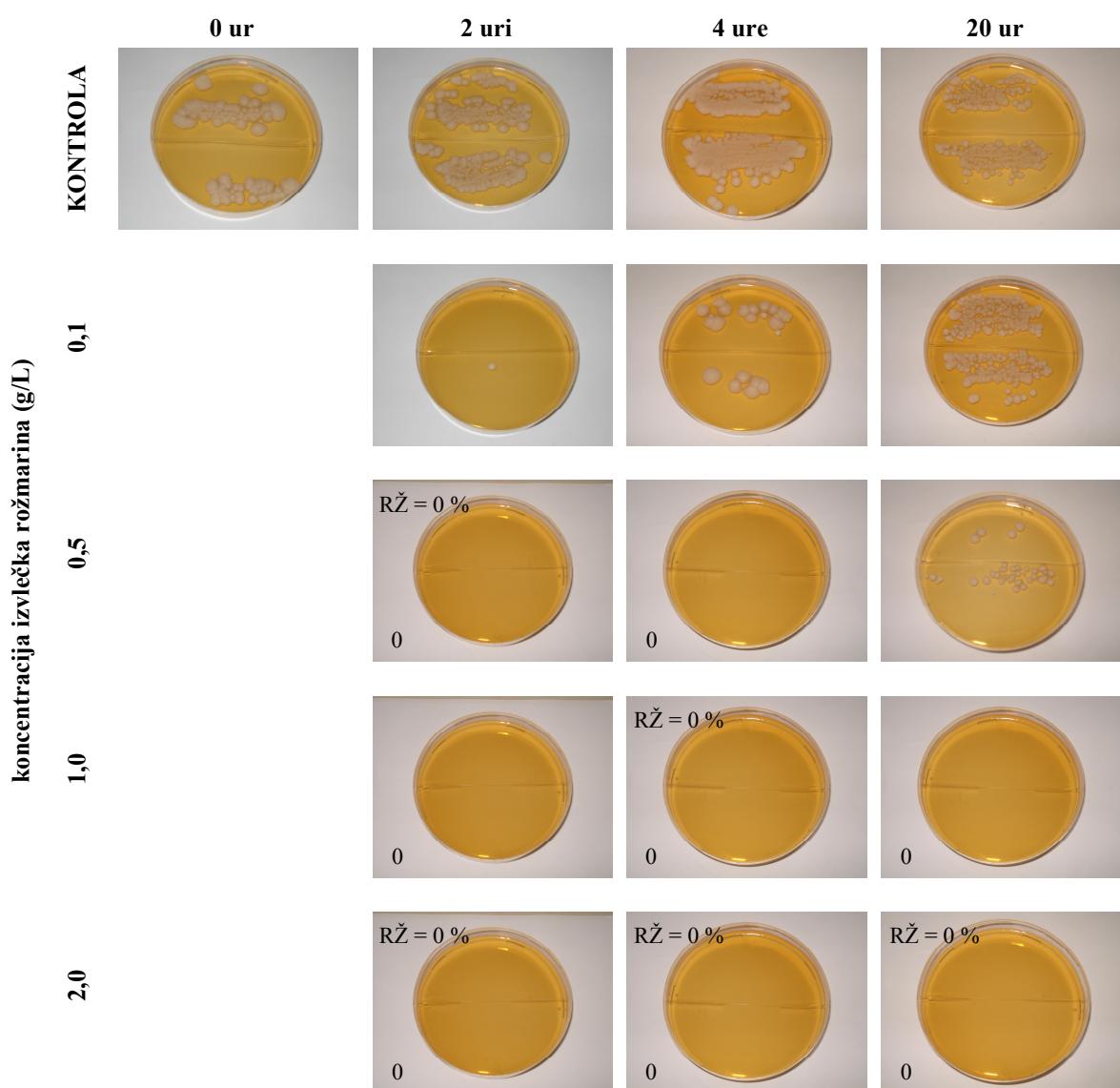
**Slika 20:** Kultivabilnost kvasovke *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. Na eni petrijevki sta dve ponovitvi. Posamezne slike petrijevk, na katerih ni zrasla nobena kolonija kvasovk, so označene z 0; z RŽ = 0 % so označene slike, kjer smo z metodo določanja živosti določili stodstotni padec živosti.

Pri kvasovki *Hanseniaspora uvarum*, ki je bila izpostavljena izvlečku rožmarina, smo določili kultivabilne celice le po 20-urni izpostavitevi kulture izvlečku rožmarina v koncentraciji 0,1 g/L (slika 20).



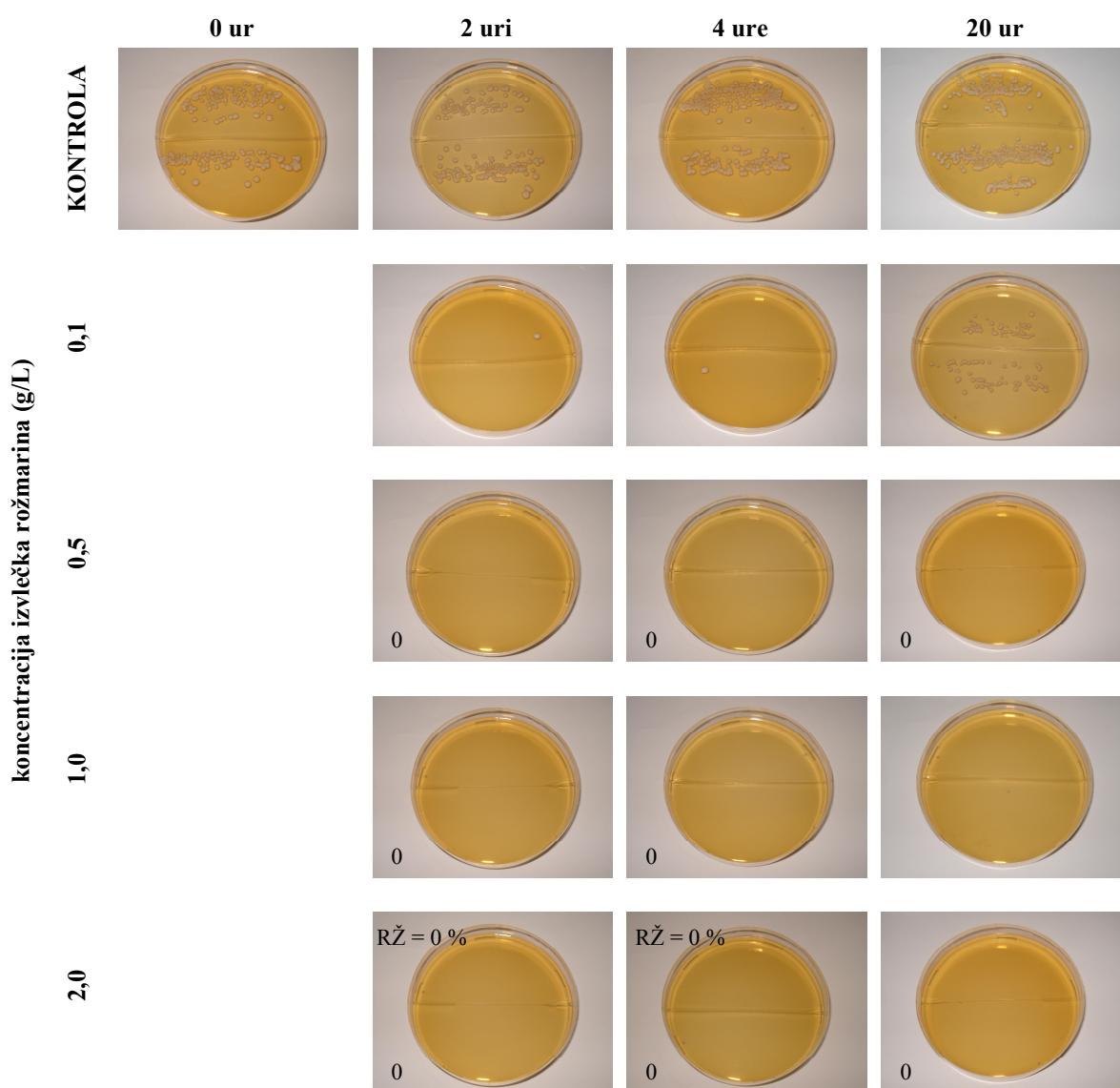
**Slika 21:** Kultivabilnost kvasovke *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. Na eni petrijevki sta dve ponovitvi. Posamezne slike petrijevk, na katerih ni zrasla nobena kolonija kvasovk, so označene z 0; z RŽ = 0 % so označene slike, kjer smo z metodo določanja živosti določili stodstotni padec živosti.

Slike 21 je razvidno, da smo po 20-urni izpostavitevi kvasovke *Zygosaccharomyces bailii* izvlečku rožmarina v vseh koncentracijah izvlečka, razen v 2,0 g/L, določili kultivabilne celice, vendar z višanjem koncentracije izvlečka kultivabilnost pada. Po 2- in 4-urni izpostavitevi kvasovk izvlečku rožmarina pa v koncentraciji izvlečka 1,0 in 2,0 g/L nismo določili nobene kultivabilne celice.



Slika 22: Kultivabilnost kvasovke *Pichia membranifaciens* ZIM 2224 po 2-, 4- in 20-urni izpostavivti kulture kvasovke izvlečku rožmarina. Na eni petrijevki sta dve ponovitvi. Posamezne slike petrijevk, na katerih ni zrasla nobena kolonija kvasovk, so označene z 0; z RŽ = 0 % so označene slike, kjer smo z metodo določanja živosti določili stodstotni padec živosti.

Za reprodukcijo sposobne celice smo pri kvasovki *Pichia membranifaciens* določili po 2-, 4- in 20-urni izpostavivti izvlečku rožmarina v koncentraciji 0,1 g/L in po 20-urni izpostavivti v koncentraciji 0,5 g/L (slika 22).



**Slika 23:** Kultivabilnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi kulture kvasovke izvlečku rožmarina. Na eni petrijevki sta dve ponovitvi. Posamezne slike petrijevk, na katerih ni zrasla nobena kolonija kvasovk, so označene z 0; z RŽ = 0 % so označene slike, kjer smo z metodo določanja živosti določili stodstotni padec živosti.

Slike 23 je razvidno, da smo pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753 določili kultivabilne celice po 2-, 4- in 20-urni izpostavitevi izvlečku rožmarina v koncentraciji 0,1 g/L in po 20-urni izpostavitevi v koncentraciji 1,0 g/L.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V skladu z delovno hipotezo, ki pravi, da izpostavitev celic kvasovk izvlečku rožmarina v določeni koncentraciji povzroči zmanjšanje živosti in kultivabilnosti, smo v dveh neodvisnih poskusih preverili protimikrobnno delovanje izvlečka rožmarina na kvasovkah kvarljivkah (*Saccharomyces cerevisiae* ZIM 739, *Hanseniaspora uvarum* ZIM 117, *Zygosaccharomyces bailii* ZIM 2232, *Pichia membranifaciens* ZIM 2224, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 753) z določanjem živosti in kultivabilnosti kvasovk po izpostavitvi le-teh izvlečku rožmarina. Delovno hipotezo smo potrdili. Predvidevali smo tudi, da se bo po daljšem času izpostavitve celic izvlečku rožmarina pri nižji koncentraciji živost povečala, ne pa nujno kultivabilnost, kar smo delno potrdili.

### 5.1 RAZPRAVA

Dobro je znano, da imajo fenolne snovi rastlinskih izvlečkov protimikrobnno delovanje (Beuchat, 1994; Cowan, 1999; Klančnik in sod., 2009b; López-Malo Vigil in sod., 2005). V naši raziskavi smo želeli proučiti protimikrobnno delovanje izvlečka rožmarina na kvasovke kvarljivke, da bi doprinesli k novim podatkom v podporo uporabi izvlečka rožmarina kot naravnega konzervansa s protimikrobnim delovanjem. Nekatere raziskave kažejo, da so za protimikrobnno delovanje izvlečkov rožmarina odgovorne predvsem nepolarne fenolne spojine (Proestos in sod., 2005). Moreno in sod. (2006) so poročali, da so izvlečki rožmarina bogat vir fenolnih snovi z visoko antioksidativno aktivnostjo in protimikrobnim delovanjem na grampozitivne, gramnegativne bakterije, kot tudi na kvasovke. Velik delež protimikrobnega delovanja pripisujejo karnozolni kislini in karnozolu. Znano je, da imajo izvlečki rožmarina številne bioaktivne lastnosti (Del Campo in sod., 2000), a njihovo protimikrobnno delovanje na kvasovke kvarljivke še ni bilo dovolj podrobno opisano. Metodologija določanja protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov ni standardizirana, prav tako so tudi definicije protimikrobnih učinkov različne, kar predstavlja problem pri primerjavi različnih raziskav (Klančnik in sod., 2009b).

Kvasovke smo tretirali z izvlečkom rožmarina v sredini eksponentne faze rasti, ker so v tej fazi rasti v dobrem fiziološkem stanju z visoko metabolno aktivnostjo. Za vse testirane kvasovke smo v tej fazi pripravili izhodno suspenzijo celic kvasovk s koncentracijo  $1 \cdot 10^7$  celic/mL in jih izpostavili izvlečku rožmarina v koncentracijah 0,1; 0,5; 1,0 in 2,0 g/L. Preverili smo vpliv izvlečka rožmarina na živost in kultivabilnost testiranih kvasovk. Izvleček rožmarina, s katerim smo tretirali kvasovke kvarljivke, je bil raztopljen v etanolu, zato smo poleg izvlečka rožmarina preverili tudi vpliv samega topila na živost in kultivabilnost kvasovk. Ugotovili smo, da topilo ni imelo vpliva na živost in kultivabilnost kvasovk.

Izvleček rožmarina je po krajšem času izpostavite (2 in 4 ure) že v koncentraciji 0,5 g/L inhibiral rast vseh testiranih kvasovk (slika 8, 9), medtem ko je po daljši izpostavitevi (20 ur) celic kvasovk prišlo do inhibicije rasti vseh testiranih kvasovk v koncentraciji 1,0 g/L (slika 10). Ugotovili smo torej, da izvleček rožmarina po krajšem času izpostavite (2 in 4 ure) kvasovk zmanjša živost pri nižjih koncentracijah v primerjavi z daljšo izpostavitvijo (20 ur).

Po 20-urni izpostaviti celic kvasovk izvlečku rožmarina smo pri nižjih koncentracijah izvlečka (0,1 in 0,5 g/L) določili večjo živost, kar je v skladu z našo drugo hipotezo, da se bo po daljšem času izpostavite celic izvlečku rožmarina pri nižji koncentraciji živost povečala. Pri naši raziskavi smo uporabili izvleček rožmarina VivOX 40 (Vitiva d.d., Markovci), ki vsebuje karnozolno kislino (40,694 %), karnozol (9,675 %), metil-karnozol (1,876 %) in oleanolno kislino (1,432 %). Pérez-Fons in sod. (2006) so za karnozolno kislino, ki je bila glavna učinkovina v našem izvlečku rožmarina, kot tudi za karnozol, dokazali, da povzročata poškodbe celične membrane. Tako predvidevamo, da je zaradi delovanja izvlečka rožmarina pri kvasnih celicah prišlo do poškodb celične membrane. Celice s poškodovano membrano so z metodo LIVE/DEAD® *FungaLight™ Yeast Viability Kit* ovrednotene kot mrtve celice (Molecular Probes, 2005), kajti metoda temelji na spremljanju integritete celične membrane. Tako smo pri nižjih koncentracijah izvlečka rožmarina po krajšem času izpostavite (2 in 4 ure) izmerili nižjo živost, kot po daljšem času (20 ur) izpostavite. Po daljšem času izpostavite celic izvlečku rožmarina so se celice verjetno opomogle (obnovile poškodovano membrano) in smo zaradi tega določili večjo živost. Kvasovke, ki poškodovano membrano obnovijo, so lahko ponovno zmožne razmnoževanja.

Z metodo določanja živosti smo ugotovili, da so bile testirane kvasovke različno občutljive na delovanje izvlečka rožmarina. Po krajšem času izpostavite (2 in 4 ure) sta se na najnižjo koncentracijo izvlečka kot manj občutljivi izkazali kvasovki *S. cerevisiae* ZIM 739 in *Z. bailii*, medtem ko je bilo protimikrobnlo delovanje izvlečka rožmarina pri ostalih koncentracijah podobno za vse testirane kvasovke. Po daljšem času izpostavite (20 ur) pa smo opazili, da izvleček rožmarina pri nižji koncentraciji celo stimulira rast kvasovk *Z. bailii* in *P. membranifaciens* (slika 10).

Kultivabilnost kvasovk smo preverjali kvalitativno z razmazovanjem suspenzije kvasovk s cepilno zanko po trdnem YEPD gojišču in fotografiranjem plošč po inkubaciji, kot je opisano pod točko 3.3.6. Na gojišču zrastejo le kultivabilne oz. za reprodukcijo sposobne celice.

Izvleček rožmarina je vplival na zmanjšanje kultivabilnosti vseh testiranih kvasovk, a je bil učinek pri posameznih kvasovkah različen. Opazili smo, da je kultivabilnost z naraščajočo koncentracijo izvlečka rožmarina padala in z daljšo izpostavitvijo kulture kvasovk izvlečku

naraščala (slike 19-23). Izvleček rožmarina je pri kvasovki *S. cerevisiae* ZIM 739 vplival na zmanjšanje kultivabilnosti, a v nobeni testirani koncentraciji izvlečka ni popolnoma inhibiral rasti, saj smo pri vseh koncentracijah izvlečka določili kultivabilne celice. Najbolj učinkovito je izvleček rožmarina vplival na zmanjšanje kultivabilnosti pri kvasovki *H. uvarum*, kjer smo kultivabilne celice določili le pri najnižji koncentraciji po 20-urni izpostavitvi kulture kvasovk. Najnižja koncentracija izvlečka, pri kateri je prišlo do popolne inhibicije rasti po 2-, 4- in 20-urni izpostavitvi celic kvasovk, je bila 0,5 g/L. Najnižja koncentracija izvlečka, pri kateri je prišlo do popolne inhibicije rasti pri kvasovki *P. membranifaciens* po 2-, 4- in 20-urni izpostavitvi celic kvasovk izvlečku, je bila 1,0 g/L; medtem ko je pri kvasovki *Z. bailii* prišlo do popolne inhibicije rasti pri najvišji koncentraciji izvlečka rožmarina. Najnižja koncentracija izvlečka, pri kateri je prišlo do popolne inhibicije rasti po 2-, 4- in 20-urni izpostavitvi celic kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 753 izvlečku, je bila 0,5 g/L, a smo pri višji koncentraciji (1,0 g/L) pri enem od paralelnih vzorcev določili kultivabilne celice.

Potrebno je poudariti, da smo kultivabilnost kvasovk določali zgolj kvalitativno, kar nam je dalo določen vpogled, za bolj natančno določitev pa bi morali izbrati klasičen postopek določanja kultivabilnosti s štetjem kolonij in določitvijo CFU/mL.

Kultivabilnost je z daljšo izpostavljenostjo kvasovk izvlečku rožmarina naraščala. Čeprav pri krajsih časih izpostavitve kvasovk kvarljivk izvlečku rožmarina pri določenih koncentracijah nismo določili kultivabilnih celic, je lahko prišlo do ponovne rasti po daljšem času izpostavitve (20 ur), kar smo ugotovili tudi z metodo določanja živosti. Predvidevamo, da so se kvasne celice po daljšem času izpostavitve izvlečku rožmarina opomogle in se je kultivabilnost zato povečala.

Testirali smo dva različna seva kvasovke *S. cerevisiae*. Kvasovka *S. cerevisiae* ZIM 753 (laboratorijski sev) je bila bolj občutljiva na izvleček rožmarina kot kvasovka *S. cerevisiae* ZIM 739 (izolirana iz mošta Rebule), kar smo potrdili z obema metodama.

Če primerjamo vpliv izvlečka rožmarina na živost in kultivabilnost kvasovk, lahko zaključimo, da izvleček rožmarina sicer zmanjša živost in kultivabilnost vseh testiranih kvasovk, a popolnoma ne inhibira rasti pri vseh kvasovkah. Izvleček rožmarina popolnoma inhibira rast kvasovk *Z. bailii* in *P. membranifaciens* v koncentraciji izvlečka 2,0 g/L, kjer z metodo določanja živosti po 2-, 4- in 20-urni izpostavitvi izvlečku nismo detektirali živih celic in hkrati nismo določili kultivabilnih celic. Pri kvasovkah *S. cerevisiae* ZIM 739, *H. uvarum* in *S. cerevisiae* ZIM 753 pa izvleček rožmarina po daljšem času izpostavitve (20 ur) ni popolnoma inhibiral rasti.

Kadar po tretiranju kvasovk z izvlečkom rožmarina nismo detektirali živih celic, hkrati tudi nismo določili kultivabilnih celic. V primeru, ko pa nismo določili kultivabilnih celic,

relativna živost ni bila nujno 0 %. Iz tega lahko sledi, da kvasovke v nekaterih primerih, kljub temu, da so bile z metodo določanja živosti ovrednotene kot žive (celice z nepoškodovano membrano), niso bile sposobne razmnoževanja (vendar ni nujno, da se jim sposobnost razmnoževanja ne bo vrnila). Do takšnega pojava je prišlo v našem primeru pri kvasovkah *H. uvarum*, *Z. bailii*, *P. membranifaciens* in *S. cerevisiae* ZIM 753. Neujemanja med rezultati pridobljenimi z metodami, ki vključujejo gojenje, in molekularnimi metodami najpogosteje razlagamo kot posledico neustreznega medija, nizkega deleža določene vrste v celotni mikrobnji populaciji ali prisotnosti v stanju VBNC (ang. viable but non-culturable) (Phister in Mills, 2003; Oelofse in sod., 2008; Rodrigues in sod., 2001). Pomembno je, da za preverjanje protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov, uporabimo več metod.

Naša raziskava podaja dodatne podatke v podporo uporabi izvlečkov rožmarina v živilstvu zaradi njihovega protimikrobnega delovanja. Koncentracija rožmarinskega izvlečka, ki je bila učinkovita za kvasovki *Z. bailii* in *P. membranifaciens*, je bila 2,0 g/L, kar je približno 0,2 %. Potrebno je upoštevati, da so za uporabo v zapletenih živilskih sistemih, potrebne višje koncentracije izvlečka zaradi številnih dejavnikov, ki v takih sistemih vplivajo na učinkovitost izvlečka. Začimbe in zelišča se uporablajo v predvsem v koncentracijskem območju 0,05-0,1 % (500-1000 ppm) (Ceylan in Fung, 2004). Izvleček rožmarina kot naravni konzervans samostojno ni dovolj učinkovito protimikrobro sredstvo, ampak v kombinaciji z ostalimi tehnikami konzerviranja. Vendar pa so potrebne nadaljnje raziskave, da se preveri protimikrobnu učinkovitost izvlečkov rožmarina v različnih živilskih sistemih, kot tudi oceni njihovo učinkovitost v povezavi s podaljšanjem obstojnosti živilskih izdelkov.

## 5.2 SKLEPI

- Potrdili smo protimikrobnlo delovanje izvlečka rožmarina na kvasovke kvarljivke: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* in *Pichia membranifaciens*.
- Z daljšo izpostavitvijo (20 ur) celic kvasovk izvlečku rožmarina sta se v nižjih koncentracijah živost in kultivabilnost povečali.
- Laboratorijski sev kvasovke *S. cerevisiae* je bil bolj občutljiv na izvleček rožmarina kot sev *S. cerevisiae*, ki je bil izoliran iz mošta Rebule.
- Izvleček rožmarina popolnoma inhibira rast kvasovk *Z. bailii* ZIM 2232 in *P. membranifaciens* ZIM 2224 v koncentraciji 2,0 g/L.
- V nekaterih primerih so kvasovke po tretiraju z izvlečkom rožmarina z metodo določanja živosti ovrednotene kot žive, a v hranielnem mediju niso sposobne razmnoževanja.
- Protimikrobnlo delovanje izvlečka rožmarina na kvasovke je odvisno od koncentracije izvlečka, časa izpostavitve, vrste in seva kvasovke.

## 6 POVZETEK

Uporaba sodobnih tehnologij pri predelavi živil, ki so milejše in težnja k manjši uporabi sintetičnih konzervansov, še posebej tistih, ki učinkujejo na kvasovke (na primer žveplov dioksid in benzojska kislina) so priveli do povečanega obsega kvara živil in posledično do velikih ekonomskih izgub. Omejevanje uporabe kemičnih konzervansov s strani EU in drugih regulativnih teles je spodbudilo živilsko industrijo in raziskovalne inštitucije v živilstvu k iskanju naravnih protimikrobnih snovi, ki so prisotne v rastlinah. Rastlinski fenolni izvlečki imajo velik potencial za uporabo v živilstvu zaradi antioksidativnih in protimikrobnih lastnosti, saj lahko preprečijo ali zavrejo oksidativni in mikrobiološki kvar živil. Izvlečki rožmarina (E 329) se uporabljajo v živilski industriji kot naravni antioksidant, v zadnjem času pa so zanimivi tudi zaradi njihovega protimikrobnega delovanja. Najpomembnejši protimikrobni spojini v nehlapnem izvlečku rožmarina sta karnozolna kislina in karnozol, medtem ko so  $\alpha$ -pinen, bornil acetat, kafra in 1,8-cineol najpomembnejše protimikrobne snovi eteričnega olja rožmarina. Za določanje *in vitro* protimikrobnega delovanja izvlečkov se največ uporablajo klasične metode. Vedno bolj pa se uveljavljajo hitre metode, ki temeljijo na spremeljanju metabolne aktivnosti celic in spremeljanju integritete celične membrane. Ker metodologija določanja protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov ni standardizirana, prav tako so tudi definicije protimikrobnih učinkov različne, to predstavlja problem pri primerjavi različnih raziskav.

V diplomske nalogi smo preverili protimikrobeno delovanje izvlečka rožmarina na kvasovke, ki povzročajo kvar živil: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces bailii* in *Pichia membranifaciens*. Testirali smo komercialni izvleček rožmarina. Uporabili smo hitro metodo določanja živosti za kvasovke LIVE/DEAD<sup>®</sup> *FungaLight*<sup>TM</sup>, ki temelji na spremeljanju integritete celične membrane. S pomočjo fluorescentnih barvil SYTO<sup>®</sup> 9 in propidijev jodid določamo celice z nepoškodovano membrano (ovrednotene kot žive celice) in celice s poškodovano membrano (ovrednotene kot mrtve celice). Poškodovane celice so celice pod stresom, ki imajo poškodovane celične strukture in posledično je rast populacije oslabljena. Hkrati smo preverjali tudi kultivabilnost kvasovk po izpostavitvi le-teh izvlečku rožmarina. Suspenzijo celic kvasovk s koncentracijo  $1 \cdot 10^7$  celic/mL smo izpostavili izvlečku rožmarina v eksponentni fazi rasti. Delovanje izvlečka smo preverili v koncentracijah 0,1; 0,5; 1,0 in 2,0 g/L po 2, 4 in 20 urah izpostavitve. Izvleček rožmarina je zmanjšal živost in kultivabilnost kvasovk, a sta se po daljšem času izpostavitve (20 ur) kvasovk pri nižjih koncentracijah izvlečka, tako živost kot kultivabilnost povečali. Izvleček rožmarina je popolnoma inhibiral rast kvasovk *Z. bailii* ZIM 2232 in *P. membranifaciens* ZIM 2224 v koncentraciji izvlečka 2,0 g/L. Laboratorijski sev kvasovke *S. cerevisiae* je bil bolj občutljiv na izvleček rožmarina kot sev *S. cerevisiae*, ki je bil izoliran iz mošta Rebule. Protimikrobeno delovanje izvlečka rožmarina na kvasovke je odvisno od koncentracije izvlečka, časa izpostavitve, vrste in seva kvasovke.

## 7 VIRI

- Abramović H., Terpinc P., Generalić I., Skroza D., Klančnik A., Katalinić V., Smole Možina S. 2012. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and vine (*Vitis vinifera*) leaves. Croatian Journal of Food Science and Technology, 4, 1: 1-8.
- Adeboye P.T., Bettiga M., Olsson L. 2014. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. AMB Express, 4: 46, doi: 10.1186/s13568-014-0046-7: 10 str.
- Aguilar F., Autrup H., Barlow S., Castle L., Crebelli R., Dekant W., Engel K.H., Gontard N., Gott D., Grilli S., Gürtler R., Larsen J.C., Leclercq C., Leblanc J.C., Malcata F.C., Mennes W., Milana M.R., Pratt I., Rietjens I., Tobback P., Toldrá F. 2008. Use of rosemary extracts as a food additive: scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. EFSA Journal, 6, 6: 721, doi: 10.2903/j.efsa.2008.721: 29 str.
- Aguilar F., Crebelli R., Domenico A.D., Dusemund B., Frutos M.J., Galtier P., Gott D., Gundert-Remy U., Lambré C., Leblanc J.C., Lindtner O., Moldeus P., Mortensen A., Mosesso P., Massin D.P., Oskarsson A., Stankovic I., Waalkens-Berendsen I., Woutersen R.A., Wright M., Younes M.. 2015. Extension of use of extracts of rosemary (E 392) in fat-based spreads. EFSA Journal, 13, 5: 4090, doi:10.2903/j.efsa.2015.4090: 22 str.
- Al-Sereiti M.R., Abu-Amer K.M., Sen P. 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental Biology, 37, 2: 124-130.
- Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Martínez M.A., Ares I., García-Risco M.R., Señoráns F.J., Reglero G. 2008. Acute oral safety study of rosemary extracts in rats. Journal of Food Protection, 71, 4: 790-795.
- Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson D.J., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 11: 3530-3535.
- Atlas R.M. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press: 1006-1007.

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6: 71-79.

Bergfeld W.F., Belsito D.V., Hill R.A., Klaassen C.D., Liebler D.C., James G., Shank R.C., Slaga T.J., Snyder P.W., Scientific S. 2013. Safety assessment of *Rosmarinus Officinalis* (rosemary) - derived ingredients as used in cosmetics. Washington, Cosmetic Ingredient Review Expert Panel: 43 str.  
[www.cir-safety.org/sites/default/files/rosmar122013TR.pdf](http://www.cir-safety.org/sites/default/files/rosmar122013TR.pdf) (maj 2016)

Beuchat L.R. 1994. Antimicrobial properties of spices and their essential oils. V: Natural antimicrobial systems and food preservation. Dillon Y.M., Board R.G. (eds.). Oxon, CAB International: 167-179.

Božin B., Mimica-Dukić N., Samojlik I., Jovin E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 19: 7879-7885.

Bullerman L.B. 2003. Spoilage/fungi in food – an overview. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 9. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 5511-5522.

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

Burt S.A., Der Zee R.V., Koets A.P., De Graaff A.M., Van Knapen F., Gaastra W., Haagsman H.P., Veldhuizen E.J. 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 14: 4484-4490.

Celiktas O.Y., Bedir E., Sukan F.V. 2007. *In vitro* antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 101: 1457-1464.

Ceylan E., Fung, D.Y.C. 2004. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 12, 1: 1-55.

Choma I.M., Grzelak E.M. 2011 Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 19: 2684-2691.

CLSI. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 9<sup>th</sup> ed. CLSI document M07-A9. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute: 88 str.

Commission Directive 2010/69/EU of 22 October 2010 amending the Annexes of the European Parliament and Council Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners. Official Journal of the European Union, L279: 22-31.

Conner D.E., Beuchat L.R. 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 49 : 429-434.

Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12: 564-582.

Daferera D.J., Basil N., Ziogas N., Polissiou M.G. 2003. The effectiveness of plant essential oils on *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22, 1: 39-44.

Daferera D.J., Ziogas B.N., Polissiou M. G. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6: 2576-2581.

Davidson P.M., Harrison M.A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*, 56, 11: 69-78.

Davidson P.M., Naidu A.S. 2000. Phytophenols. V: Natural food antimicrobial systems. Naidu A.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 265-295.

Deak T. 2007. *Handbook of food spoilage yeasts*. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press: 352 str.

Del Campo J., Amiot M.J., Nguyen-The C. 2000. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*, 10: 1359-1368.

Dewanjee S., Gangopadhyay M., Bhattacharya N., Khanra R., Dua T.K. 2015. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5, 2: 75-84.

Du H., Li H. 2008. Antioxidant effect of cassia essential oil on deep-fried beef during the frying process. *Meat Science*, 78: 461-468.

EFSA. 2016. Food additives. Parma, European Food Safety Authority: 5 str.  
[www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives](http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives) (junij 2016)

Eggensperger H., Wilker M., Bauer P. 1998. Rosmarinic acid. A natural multiactive substance for cosmetics and dermatology. Part 2. Combinations of rosmarinic acid with other natural ingredients. SOFW Journal, 124, 10: 634-640.

FDA. 2015a. CFR-Code of federal regulations; title 21: food and drugs; chapter I: food and drugs administration; subchapter B: food for human consumption; part 182: substances generally recognized as safe; subpart A: general provisions; sec. 182.10: Spices and other natural seasonings and flavorings. Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration: 3 str.  
[www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.10](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.10) (julij 2016)

FDA. 2015b. CFR-Code of federal regulations; title 21: food and drugs; chapter I: food and drugs administration; subchapter B: food for human consumption; part 182: substances generally recognized as safe; subpart A: general provisions; sec. 182.20: Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration: 5 str.  
[www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.20) (julij 2016)

FDA. 2015c. GRAS Substances (SCOGS) Database. Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration: 2 str.  
[www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm2006852.htm](http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm2006852.htm) (junij 2016)

Fleet G.H. 1992. Spoilage yeasts. Critical Reviews in Biotechnology, 12, 1-2: 1-44.

Fleet G.H. 2006. The commercial and community significance of yeasts in food and beverage production. V: Yeasts in food and beverages. Querol A., Fleet G.H. (eds.). Heidelberg, Springer: 1-12.

Fleet G.H. 2011. Yeast spoilage of foods and beverages. V: The yeasts, a taxonomic study. Vol. 1. 5<sup>th</sup> ed. Kurtzman C.P., Fell J.W, Boekhout T. (eds.). Oxford, Elsevier Science: 53-63.

Food additives database. 2016. Brussels, European Commission: baza podatkov  
[https://webgate.ec.europa.eu/sanco\\_foods/main/?event=substances.search&substances.pagination=1](https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/?event=substances.search&substances.pagination=1) (junij 2016)

- Friedman M., Henika P.R., Mandrell R.E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 65, 10: 1545-1560.
- Friedman M., Jürgens H.S. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 6: 2101-2110.
- Gill A.O., Holley R.A. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. International Journal of Food Microbiology, 108: 1-9.
- Goni P., Lopez P., Sanchez C., Gomez-Lus R., Becerril R., Nerin, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry, 116: 982-989.
- Gram L., Ravn L., Rash M., Bruhn J.B., Christensen A.B., Givskov M. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology, 78, 1-2: 79-97.
- Grzelak E.M., Majer-Dziedzic B., Choma I.M. 2011. Development of a novel direct bioautography-thin-layer chromatography test: optimization of growth conditions for gram-negative bacteria, *Escherichia coli*. Journal of AOAC International, 94, 5: 1567-1572.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology, 124, 1: 91-97.
- Gyawali R., Ibrahim S.A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. Food Control, 46: 412-429.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86: 985-990.
- Hayek S.A., Gyawali R., Ibrahim, S.A. 2013. Antimicrobial natural products. V: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Vol. 2. Méndez-Vilas A. (ed.). Badajoz, Formatec Research Center: 910-921.

- Hernández M.D., Sotomayor J.A., Hernández Á., Jordán M.J. 2016. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oils. V: Essential oils in food preservation, flavor and safety. 1<sup>st</sup> ed. Preedy V.R. (ed.). San Diego, Academic Press: 677-688.
- Hintz T., Matthews K.K., Di R. 2015. The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. BioMed Research International, 2015: ID 246264, doi: 10.1155/2015/246264: 12 str.
- Höfling J.F., Anibal P.C., Obando-Pereda G.A., Peixoto I.A.T., Furletti V.F., Foglio M.A., Gonçalves R.B. 2010. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. Brazilian Journal of Biology, 70, 4: 1065-1068.
- Holley R.A., Patel D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology, 22, 4: 273-292.
- Incyto. 2010. Hemacytometer DHC-B02 (Burker Turk). Seonggeo-gil, Incyto: 1 str. [www.incyto.com/product/product04\\_detail.php](http://www.incyto.com/product/product04_detail.php) (julij, 2016)
- James S.A., Stratford M. 2003. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. V: Yeasts in food, beneficial and detrimental aspects. Boekhout T., Robert V. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 171-192.
- Jorgensen J.H., Ferraro M.J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases, 49, 11: 1749-1755.
- Kalemba D., Matla M., Smetek A. 2012. Antimicrobial activities of essential oils. V: Dietary phytochemicals and microbes. Patra A.K. (ed.). Dordrecht, Springer: 157-183.
- Kim J., Wei C.I., Marshall M.R. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. Journal of Agricultural Food Chemistry, 43, 11: 2839-2845.
- Kim S., Kubec R., Musah R.A. 2006. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. Journal of Ethnopharmacology, 104: 188-192.
- Klančnik A., Guzej B., Kolar H., Abramovič H., Smole-Možina S. 2009a. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. Journal of Food Protection, 72, 8: 1744-1752.

Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2009b. Protimikrobn delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na patogene bakterije V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Raspor P., Petkovič H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 145-158.

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 249 str.

Koutsoumanis K., Lambropoulou K., Nychas G.J.E. 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. International Journal of Food Microbiology, 49, 1-2: 63-74.

Leung A.Y., Foster S. 1996. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons: 649 str.

Lo A.H., Liang Y.C., Lin-Shiau S.Y., Ho C.T., Lin J.K. 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-κB in mouse macrophages. Carcinogenesis, 23: 983-991.

Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. Phytochemistry, 69, 8: 1732-1738.

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

Loureiro V., Malfeito Ferreira M. 2003a. Spoilage yeasts in spoilage. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 9. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 5530-5537.

Loureiro V., Malfeito Ferreira M. 2003b. Spoilage yeast in the wine industry. International Journal of Food Microbiology, 86, 1-2: 23-50.

Loureiro V., Querol A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. Trends in Food Science & Technology, 10, 11: 356-365.

Lowes K.F., Shearman C.A., Payne J., MacKenzie D., Archer D.B., Merry R.J., Gasson M.J. 2000. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. Applied and Environmental Microbiology, 66, 3: 1066-1076.

Magaldi S., Mata-Essayag S., Hartung de Capriles C., Perez C., Collela M.T., Olaizola C., Ontiveros Y. 2004. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. International Journal of Infectious Diseases, 8, 1: 39-45.

Maistro E.L., Mota S.F., Lima E.B., Bernardes B.M., Goulart F.C. 2010. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells *in vivo*. Genetics and Molecular Research, 9, 4: 2113-2122.

Mangena T., Muyima N.Y.O. 1999. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. Letters of Applied Microbiology, 28: 291-296.

Marston A. 2011. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. Journal of Chromatography A, 1218, 19: 2676-2683.

Molecular Probes. 2005. Product information: LIVE/DEAD<sup>®</sup> *FungaLight*<sup>TM</sup> Yeast Viability Kit. Eugene, Molecular Probes: 4 str.  
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp34952.pdf> (julij 2016)

Moreira M.R., Ponce A.G., del Valle C.E., Roura S.I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT Food Science and Technology, 38, 5: 565-570.

Moreira M.R., Ponce A.G., del Valle C.E., Roura S.I. 2007. Effects of clove and tea tree oils on *Escherichia coli* O157:H7 in blanching spinach and minced cooked beef. Journal of Food Processing and Preservation, 31, 4: 379-391.

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

Naidu A.S. 2000. Overview. V: Natural food antimicrobial systems. Naidu A.S. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 1-16.

Negi P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. International Journal of Food Microbiology, 156: 7-17.

- Nijs A., Cartuyvels R., Mewis A., Peeters V., Rummens J.L., Magerman K. 2003. Comparison and evaluation of Osiris and SirScan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 8: 3627-3630.
- Oelofse A., Pretorius I. S., du Toit M. 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29, 2: 128-144.
- Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.-P., Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37: 155-162.
- Paparella A., Taccogna L., Aguzzi I., Chaves-López C., Serio A., Marsilio F., Suzzi G. 2008. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 19, 12: 1174-1182.
- Patri F., Silano V. 2002. Plants in cosmetics. Plants and plant preparations used as ingredients for cosmetic products. Vol. 1. Strasbourg, Council of Europe Publishing: 218 str.
- PDR for herbal medicines. 2007. 4<sup>th</sup> ed. Montvale, Thomson Healthcare: 1035 str.
- Pérez-Fons L., Aranda F.J., Guillén J., Villalaín J., Micol V. 2006. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453: 224-236.
- Periago P.M., Conesa R., Delgado B., Fernández P.S., Palop, A. 2006. *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 1: 17-23.
- Peter K.V., Nirmal Babu K. 2012. Introduction to herbs and spices: medicinal uses and sustainable production. V: Handbook of herbs and spices. Vol. 2. 2<sup>nd</sup> ed. Peter K.V. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing: 1-16.
- Pfaller M.A., Sheehan D.J., Rex J.H. 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 2: 268-280.

- Phister T. G., Mills D. A. 2003. Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. Applied and Environmental Microbiology, 69, 12: 7430-7434.
- Pinto V.F., Patriarca A., Pose G. 2012. Plant extracts as natural antifungals: alternative strategies for mold control in foods. V: Novel technologies in food science. Vol. 7: Integrating food science and engineering knowledge into the food chain. McElhatton A., Sobral P.J.A. (eds.). New York, Springer: 205-218.
- Pintore G., Usai M., Bradesi P., Juliano C., Boatto G., Tomi F., Chessa M., Cerri R., Casanova J. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oil from Sardinia and Corsica. Flavour and Fragrance Journal, 17, 1: 15-19.
- Pitt J.I., Hocking A.D. 2009. Fungi and food spoilage. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Springer: 536 str.
- Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine, 6: 39, doi: 10.1186/1472-6882-6-39: 8 str.
- Proestos C., Boziaris I., Kapsokefalou S.M., Komaitis, M. 2008. Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. Food Technology and Biotechnology, 46: 151-156.
- Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G.J., Komaitis M. 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 1190-1195.
- Rahalison L., Hamburger M., Hostettmann K., Monod M., Frenk E. 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemical Analysis, 2, 5: 199-203.
- Ramani R., Chaturvedi V. 2000. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 10: 2752-2758.
- Rezzoug S.A., Boutekedjiret C., Allaf K. 2005. Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by fast controlled pressure drop process using response surface methodology. Journal of Food Engineering, 71: 9-17.

- Rodrigues N., Gonçalves G., Pereira-da-Silva S., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 4: 588-599.
- Rožman T., Jeršek B. 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 93: 51-58.
- Runyoro D.K.B., Matee M.I.N., Ngassapa O.D., Joseph C.C., Mbwambo Z.H. 2006. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6: 11, doi: 10.1186/1472-6882-6-11: 10 str.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
- Sandasi M., Leonard C.M., Viljoen A.M. 2008. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19, 4: 1070-1075.
- Santos F.A., Rao V.S.N. 2001. 1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. *Digestive Diseases and Science*, 46, 2: 331-337.
- SAS Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute: software.
- Sasikumar B., 2004. Rosemary. V: *Handbook of herbs and spices*. Vol. 2. Peter K.V. (ed). Abington, Woodhead Publishing: 243-255.
- Scorzoni L., Benaducci T., Almeida A.M.F., Silva D.H.S., Bolzani V.S., Gianinni M.J. 2007. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 391-397.
- Silva F.G., Oliveira C.B.A., Pinto J.E.B.P., Nascimento V.E., Santos S.C., Seraphin J.C., Ferri P.H. 2007. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 18: 990-997.
- Silva M.T., Simas S.M., Batista T.G., Cardarelli P., Tomassini T.G. 2005. Studies on antimicrobial activity, *in vitro*, of *Physalis angulata* L. (*Solanaceae*) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 7: 779-782.

Simitzis P.E., Deligeorgis S.G., Bizelis J.A., Dardamani A., Theodosiou I., Fegeros K. 2008. Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. Meat Science, 79, 2: 217-223.

Skočibušić M., Bezić N., Dunkić, V. 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. Food Chemistry, 96, 1: 20-28.

Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology, 26: 118-122.

Smole Možina S., Klančnik A., Raspor P. 2009. Protimikrobne snovi v živilih in živilstvu. V: Protimikrobne snovi. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 29. in 30. januar 2009, Ljubljana. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-45.

Soković M., Glamočlija J., Marin P.D., Brkić D., Griensven, L.J. 2010. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. Molecules, 15, 11: 7532-7546.

Stefanello M.E.A., Cervi A.C., Ito I.Y., Salvador M.J., Wisniewski A. Jr., Simionatto, E.L. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). Journal of Essential Oil Research, 20, 1: 75-78.

Stocks S.M. 2004. Mechanism and use of the commercially available viability stain, *BacLight*. Cytometry A, 61, 2: 189-195.

Stratford M. 2006. Food and beverage spoilage yeasts. V: Yeasts in food and beverages. Querol A., Fleet G.H. (eds.). Heidelberg, Springer: 335-379.

Sultانبawa Y. 2011. Plant antimicrobials in food applications: minireview. V: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Méndez-Vilas A. (ed.). Badajoz, Formatec Research Center: 1084-1093.

Svoboda K., Brooker J.D., Zrustova, J. 2006. Antibacterial and antioxidant properties of essential oils: their potential applications in the food industries. Acta Horticulturae, 709: 35-43.

Tajkarimi M., Ibrahim S.A. 2012. Phytochemicals as anti-microbial food preservatives. V: Dietary phytochemicals and microbes. Patra A.K. (ed.). New York, Springer: 207-235.

Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21: 1199-1218.

Tang Y.W., Stratton C.W. 2013. Advanced techniques in diagnostic microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Springer: 937 str.

Teruel M.R., Garrido M.D., Espinosa M.C., Linares M.B. 2015. Effect of different format-solvent rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis*) on frozen chicken nuggets quality. Food Chemistry, 172: 40-46.

The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 2006. 14<sup>th</sup> ed. O'Neil M.J. (ed.). Whitehouse Station, Merck: 2564 str.

Thomas D.S. 1993. Yeasts as spoilage organisms in beverages. V: The yeasts. Vol. 5: Yeast technology. 2<sup>nd</sup> ed. Rose A.H., Harrison J.S. (eds.). London, Academic Press: 517-561.

Tudor E.A., Board R.G. 1993. Food spoilage yeasts. V: The yeasts. Vol. 5: Yeast technology. 2<sup>nd</sup> ed. Rose A.H., Harrison J.S. (eds.). London, Academic Press: 435-516.

United States Pharmacopeial Convention. 2012. Food chemicals codex. 8<sup>th</sup> ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention: 1636 str.

Venturini M.E., Rivera C.S., Gonzalez C., Blanco D. 2008. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. Journal of Food Protection, 71: 1701-1706.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Angel Perez-Alvarez J. 2008. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in mediterranean diet. International Journal of Food Science and Technology, 43,3: 526-531.

Vojtek L., Dobeš P., Büyükgüzel E., Atosuo J., Hyršl P. 2014. Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. European Journal of Entomology, 111, 3: 335-340.

Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp C.M. 2007. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. Phytomedicine, 14, 7-8: 508-516.

WHO. 2009. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 4. Geneva, WHO Press: 456 str.

- Yin M.C., Cheng W.S. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*, 63, 1: 23-28.
- Yoshida H., Katsuzaki H., Ohta R., Ishikawa K., Fukuda H., Fujino T., Suzuki A. 1999. Antimicrobial activity of the thiosulfinate isolated from oil-macerated garlic extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 3: 591-594.
- Yousef A.E., Courtney P.D. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. V: *Microbial stress adaptation and food safety*. Yousef A.E., Juneja V.K. (eds.). Washington, CRC Press: 2-8.
- Zaika L.L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9: 97-118.
- Zink D.L. 1997. The impact of consumer demands and trends on food processing. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 4: 467-469.

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Poloni Jamnik, da je sprejela mentorstvo in mi omogočila nastanek tega dela ter tako želeni zaključek študija. Hvala za strokovno vodenje in pomoč tekom eksperimentalnega dela, za prijetne pogovore, prijaznost, vzpodbudne besede, nasvete ter za strokoven in hiter pregled naloge.

Recenzentki prof. dr. Heleni Abramovič se zahvaljujem za strokoven, temeljit in hiter pregled diplomske naloge.

Hvala Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, da mi je omogočila izvedbo eksperimentalnega dela diplomske naloge in osebju za prijetno vzdušje.

Hvala tudi prof. dr. Lei Demšar za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov.

Za tehnični pregled naloge se zahvaljujem knjižničarki Barbari Slemenik in vodji knjižnice Lini Burkan Makivić.

Posebno se zahvaljujem staršema, ki sta mi omogočila študij, me pri tem podpirala in vzpodbujala. Hvala sestri Darji, da si je vedno vzela čas za pregled mojih pisnih izdelkov in sestri Janji za pomoč pri urejanju podatkov.

Iz srca se zahvaljujem razumevajočemu možu Klemnu za pomoč in podporo med pisanjem diplomskega dela. Hčerki Ani hvala, ker mi je dala moč, da sem to delo uspešno dokončala. Obema se zahvaljujem za potrežljivost, ko sta bila med pisanjem tega dela prikrajšana za ženo in mamico. Hvala tudi Silvi in Stanetu za nesebično pomoč, ko sem jo najbolj potrebovala.

Hvala prav vsem, ki so mi v tem času kakorkoli pomagali, verjeli vame in mi stali ob strani.

Največja zahvala pa gre Njemu za vse darove in talente in ker vse tako čudovito vodi.

## PRILOGE

**Priloga A1:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 739 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min). V preglednici so povprečne vrednosti  $OD_{650} \pm SD$  dveh ponovitev.

<b>t [h]</b>	<b><math>OD_{650} \pm SD</math></b>
0	0,201 ± 0,005
2	0,453 ± 0,016
4	0,763 ± 0,045
6	1,233 ± 0,045
8	1,672 ± 0,030
9	1,726 ± 0,010
10	1,744 ± 0,009
11	1,747 ± 0,006
12	1,770 ± 0,008
13	1,790 ± 0,008
24	1,953 ± 0,014

**Priloga A2:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *H. uvarum* ZIM 117 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min). V preglednici so povprečne vrednosti  $OD_{650} \pm SD$  dveh ponovitev.

<b>t [h]</b>	<b><math>OD_{650} \pm SD</math></b>
0	0,208 ± 0,003
2	0,427 ± 0,056
4	0,680 ± 0,066
6	1,178 ± 0,056
8	1,637 ± 0,023
9	1,759 ± 0,015
10	1,814 ± 0,001
11	1,816 ± 0,002
12	1,823 ± 0,000
13	1,825 ± 0,001
24	1,864 ± 0,000

**Priloga A3:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *Z. bailii* ZIM 2232 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min). V preglednici so povprečne vrednosti  $OD_{650} \pm SD$  dveh ponovitev.

<b>t [h]</b>	<b><math>OD_{650} \pm SD</math></b>
0	0,203 ± 0,004
2	0,364 ± 0,060
4	0,399 ± 0,023
6	0,569 ± 0,010
8	0,850 ± 0,039
9	1,022 ± 0,025
10	1,197 ± 0,017
11	1,353 ± 0,023
12	1,515 ± 0,021
13	1,650 ± 0,032
14	1,751 ± 0,026
15	1,817 ± 0,033
24	1,953 ± 0,004

**Priloga A4:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *P. membranifaciens* ZIM 2224 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min). V preglednici so povprečne vrednosti  $OD_{650} \pm SD$  dveh ponovitev.

<b>t [h]</b>	<b><math>OD_{650} \pm SD</math></b>
0	0,227 ± 0,004
2	0,412 ± 0,004
4	0,665 ± 0,006
6	1,143 ± 0,009
8	1,670 ± 0,013
9	1,798 ± 0,006
10	1,881 ± 0,006
11	1,895 ± 0,010
12	1,914 ± 0,016
13	1,928 ± 0,006
24	2,050 ± 0,001

**Priloga A5:** Spreminjanje optične gostote ( $OD_{650}$ ) med kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 753 v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku ( $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 obr./min). V preglednici so povprečne vrednosti  $OD_{650} \pm SD$  dveh ponovitev.

<b><math>t</math> [h]</b>	<b><math>OD_{650} \pm SD</math></b>
0	0,210 ± 0,001
2	0,432 ± 0,045
4	0,596 ± 0,042
6	0,888 ± 0,029
8	1,289 ± 0,013
9	1,447 ± 0,009
10	1,586 ± 0,005
11	1,650 ± 0,005
12	1,677 ± 0,004
13	1,694 ± 0,004
24	1,844 ± 0,000

**Priloga B1:** Izpostavitev kulture kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 739 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas. Vrednostim fluorescenčne intenzitete je že odšteta vrednost slepega vzorca.

Sev kvasovke	Koncentracija izvlečka rožmarina (g/L)	Čas (h)	Fluorescenčna intenziteta (RFU)			
			Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4
<i>S. cerevisiae</i> ZIM 739	0	0	7391	7812	8436	8446
	0	2	18455	19119	19980	21025
	0	4	20189	20590	24607	24035
	0	20	32527	34172	25091	25052
	0	0	7391	7812	8436	8446
	0,1	2	19591	19529	16637	17147
	0,1	4	20853	22064	23669	23563
	0,1	20	18869	*	17861	18736
	0,1	0	7391	7812	8436	8446
	0,5	2	532	929	433	618
	0,5	4	546	629	532	674
	0,5	20	16092	16876	14978	15366
	1	0	7391	7812	8436	8446
	1	2	187	492	0	0
	1	4	271	294	194	276
	1	20	2780	2533	1490	1340
	2	0	7391	7812	8436	8446
	2	2	0	152	0	0
	2	4	127	350	1641	2117
	2	20	0	0	75	246

Legenda: \* - ni podatka

**Priloga B2:** Izpostavitev kulture kvasovke *H. uvarum* ZIM 117 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas. Vrednostim fluorescenčne intenzitete je že odšteta vrednost slepega vzorca.

Sev kvasovke	Koncentracija izvlečka rožmarina (g/L)	Čas (h)	Fluorescenčna intenziteta (RFU)			
			Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4
<i>H. uvarum</i> ZIM 117	0	0	2774	3105	2835	3095
	0	2	7492	7627	6916	7560
	0	4	29459	29731	31498	32311
	0	20	61485	*	60760	61573
	0	0	2774	3105	2835	3095
	0,1	2	2438	2731	2269	2366
	0,1	4	1490	1200	1355	1199
	0,1	20	23793	25145	25994	26452
	0,1	0	2774	3105	2835	3095
	0,5	2	256	113	0	0
	0,5	4	326	200	218	47
	0,5	20	9940	10452	5197	5160
	1	0	2774	3105	2835	3095
	1	2	0	0	81	0
	1	4	57	188	138	0
	1	20	318	221	288	133
	2	0	2774	3105	2835	3095
	2	2	0	0	0	0
	2	4	0	0	0	0
	2	20	154	117	96	10

Legenda: \* - ni podatka

**Priloga B3:** Izpostavitev kulture kvasovke *Z. bailii* ZIM 2232 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas. Vrednostim fluorescenčne intenzitete je že odšteta vrednost slepega vzorca.

Sev kvasovke	Konzentracija izvlečka rožmarina (g/L)	Čas (h)	Fluorescenčna intenziteta (RFU)			
			Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4
<i>Z. bailii</i> ZIM 2232	0	0	736	955	918	824
	0	2	2305	2521	1845	3943
	0	4	2517	2598	5019	5051
	0	20	2571	2510	3935	3680
	0	0	736	955	918	824
	0,1	2	2087	2057	2151	1955
	0,1	4	1813	2728	2187	2510
	0,1	20	6407	5823	6339	6445
	0,1	0	736	955	918	824
	0,5	2	0	0	0	315
	0,5	4	22	0	0	0
	0,5	20	441	224	304	255
	1	0	736	955	918	824
	1	2	0	0	0	0
	1	4	2	44	141	0
	1	20	0	0	0	234
	2	0	736	955	918	824
	2	2	0	0	0	0
	2	4	0	0	0	0
	2	20	0	0	0	0

**Priloga B4:** Izpostavitev kulture kvasovke *P. membranifaciens* ZIM 2224 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas. Vrednostim fluorescenčne intenzitete je že odšteta vrednost slepega vzorca.

Sev kvasovke	Koncentracija izvlečka rožmarina (g/L)	Čas (h)	Fluorescenčna intenziteta (RFU)			
			Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4
<i>P. membranifaciens</i> ZIM 2224	0	0	2943	2745	2557	2505
	0	2	13340	11078	8473	8608
	0	4	41600	42273	37713	40658
	0	20	18237	*	17598	18404
	0	0	2943	2745	2557	2505
	0,1	2	1836	1772	2209	2431
	0,1	4	2116	2019	1984	2118
	0,1	20	27969	29122	20234	21616
	0,1	0	2943	2745	2557	2505
	0,5	2	0	0	0	0
	0,5	4	146	112	115	43
	0,5	20	23301	22214	22825	23003
	1	0	2943	2745	2557	2505
	1	2	0	0	154	0
	1	4	0	0	0	0
	1	20	959	985	955	892
	2	0	2943	2745	2557	2505
	2	2	0	0	0	0
	2	4	0	0	0	0
	2	20	0	0	0	0

Legenda: \* - ni podatka

**Priloga B5:** Izpostavitev kulture kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 753 izvlečku rožmarina v različnih koncentracijah za različen čas. Vrednostim fluorescenčne intenzitete je že odšteta vrednost slepega vzorca.

Sev kvasovke	Koncentracija izvlečka rožmarina (g/L)	Čas (h)	Fluorescenčna intenziteta (RFU)			
			Paralelka 1	Paralelka 2	Paralelka 3	Paralelka 4
<i>S. cerevisiae</i> ZIM 753	0	0	9568	11332	9349	10645
	0	2	11362	9921	13571	14913
	0	4	10403	11552	17552	19494
	0	20	9093	10418	9979	10967
	0	0	9568	11332	9349	10645
	0,1	2	6983	6721	3304	3145
	0,1	4	2840	*	1905	2181
	0,1	20	11511	12240	9622	10436
	0,1	0	9568	11332	9349	10645
	0,5	2	86	0	0	28
	0,5	4	9	19	0	328
	0,5	20	249	*	230	277
	1	0	9568	11332	9349	10645
	1	2	0	68	0	51
	1	4	0	0	65	245
	1	20	87	0	51	47
	2	0	9568	11332	9349	10645
	2	2	0	0	0	0
	2	4	0	0	0	0
	2	20	351	0	0	0

Legenda: \* - ni podatka

**Priloga C1:** Določanje vpliva koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 739, *H. uvarum* ZIM 117, *Z. bailii* ZIM 2232, *P. membranifaciens* ZIM 2224 in *S. cerevisiae* ZIM 753 po **2-urni** izpostavitevi izvlečku. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev.

Vrsta kvasovke	Koncentracija izvlečka rožmarina (g/L)	Povprečne vrednosti relativne živosti (%) $\pm$ SD				
		kontrola	0,1	0,5	1,0	2,0
<i>S. cerevisiae</i> ZIM 739	100 $\pm$ 0	93 $\pm$ 13	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	0,2 $\pm$ 0,4	
<i>H. uvarum</i> ZIM 117	100 $\pm$ 0	33 $\pm$ 2	1 $\pm$ 2	0,4 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 0,0	
<i>Z. bailii</i> ZIM 2232	100 $\pm$ 0	85 $\pm$ 28	2 $\pm$ 4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	
<i>P. membranifaciens</i> ZIM 2224	100 $\pm$ 0	21 $\pm$ 7	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 1,1	0,0 $\pm$ 0,0	
<i>S. cerevisiae</i> ZIM 753	100 $\pm$ 0	44 $\pm$ 24	0,2 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0	

**Priloga C2:** Določanje vpliva koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 739, *H. uvarum* ZIM 117, *Z. bailii* ZIM 2232, *P. membranifaciens* ZIM 2224 in *S. cerevisiae* ZIM 753 po **4-urni** izpostavitevi izvlečku. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev.

Vrsta kvasovke	Koncentracija izvlečka rožmarina (g/L)	Povprečne vrednosti relativne živosti (%) $\pm$ SD				
		kontrola	0,1	0,5	1,0	2,0
<i>S. cerevisiae</i> ZIM 739	100 $\pm$ 0	101 $\pm$ 5	2,7 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,3	4 $\pm$ 4	
<i>H. uvarum</i> ZIM 117	100 $\pm$ 0	4,3 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	
<i>Z. bailii</i> ZIM 2232	100 $\pm$ 0	68 $\pm$ 28	0,2 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 1	0,0 $\pm$ 0,0	
<i>P. membranifaciens</i> ZIM 2224	100 $\pm$ 0	5,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	
<i>S. cerevisiae</i> ZIM 753	100 $\pm$ 0	16 $\pm$ 9	0,5 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0	

**Priloga C3:** Določanje vpliva koncentracij izvlečka rožmarina na živost kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 739, *H. uvarum* ZIM 117, *Z. bailii* ZIM 2232, *P. membranifaciens* ZIM 2224 in *S. cerevisiae* ZIM 753 po 20-urni izpostavitevi izvlečku. Rezultati so izraženi kot relativna živost (%) glede na kontrolo in so predstavljeni kot povprečne vrednosti relativne živosti  $\pm$  SD štirih ponovitev.

Vrsta kvasovke	Koncentracija izvlečka rožmarina (g/L)	Povprečne vrednosti relativne živosti (%) $\pm$ SD			
		kontrola	0,1	0,5	1,0
<i>S. cerevisiae</i> ZIM 739	100 $\pm$ 0	68 $\pm$ 9	55 $\pm$ 6	7 $\pm$ 1	0,3 $\pm$ 0,5
<i>H. uvarum</i> ZIM 117	100 $\pm$ 0	41 $\pm$ 2	13 $\pm$ 5	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
<i>Z. bailii</i> ZIM 2232	100 $\pm$ 0	204 $\pm$ 43	8 $\pm$ 7	2 $\pm$ 3	0,0 $\pm$ 0,0
<i>P. membranifaciens</i> ZIM 2224	100 $\pm$ 0	136 $\pm$ 23	126 $\pm$ 3	5,2 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,0
<i>S. cerevisiae</i> ZIM 753	100 $\pm$ 0	109 $\pm$ 16	2,5 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 2