

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja JUG NOVŠAK

**PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH
SPOJIN IZ GROZDNIH TROPIN**

MAGISTRSKO DELO

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PHENOLIC EXTRACTS FROM
GRAPE POMACE**

MASTER OF SCIENCE THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu Senata Univerze v Ljubljani z dne 28. 1. 2013 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina.

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

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Helena ABRAMOVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Branka MOZETIČ VODOPIVEC
Univerza v Novi Gorici, Visoka šola za vinogradništvo in vinarstvo

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.

Katja JUG NOVŠAK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Md
- DK UDK 547.56:663.26:579.24 (043)=163.3
- KG fenolne spojine/rastlinski izvlečki/grozodne tropine/vinska trta/*Vitis vinifera*/protimikrobne snovi/protimikrobna aktivnost/patogeni mikroorganizmi/
/minimalna inhibitorna koncentracija/MIK/
- AV JUG NOVŠAK, Katja, univ. dipl. inž. živ. tehnol.
- SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje živilstva
- LI 2016
- IN PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN IZ GROZDNIH TROPIN
- TD Magistrsko delo
- OP XIII, 89 str., 15 pregl., 23 sl., 4 pril., 167 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Živilska industrija išče produkte z dodano vrednostjo, ki se lahko proizvedejo iz stranskih proizvodov v kmetijstvu. Zato je bil namen magistrske naloge proučiti protimikrobno delovanje izvlečkov fenolnih spojin tropin šestih sort grozdja (*Vitis vinifera* L.) in potrditi, da je učinkovitost odvisna od sorte in vinifikacijskega postopka. Cilj naloge je bil tudi, da na osnovi protimikrobne učinkovitosti izberemo optimalno sorto in ekstrakcijsko topilo ter primerjamo protimikrobno učinkovitost inkapsuliranega in neinkapsuliranega izvlečka. Raziskave so bile usmerjene v sorte, ki so najbolj zastopane na Vipavskem, to so tri bele sorte (zelen, sauvignon, rebula) in tri rdeče sorte (cabernet sauvignon, merlot, modri pinot). Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) smo določili 42 izvlečkom fenolnih spojin, pridobljenih iz tropin šestih sort in s sedmimi različnimi ekstrakcijskimi topili. Uporabili smo pet testnih mikroorganizmov, ki so vključevali po Gramu pozitivne (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) in po Gramu negativne bakterijske vrste (*Escherichia coli* O157:H7 in *Salmonella* Enteritidis). Rezultati so pokazali, da so najvišjo protimikrobno aktivnost pokazali izvlečki tropin sort sauvignon in zelen, pri rdečih sortah je zelo dobro protimikrobno aktivnost pokazal modri pinot. Izvlečki so bili najbolj učinkoviti proti po Gramu pozitivnim bakterijam. Presenetljivo je, da sta bili sorti zelen in sauvignon zelo učinkoviti tudi proti obema po Gramu negativnima bakterijama. Izmed sedmih ekstrakcijskih topil se je kot najbolj optimalen izkazal 50 % etanol. Dokazali smo tudi, da način aplikacije izvlečka vpliva na protimikrobno učinkovitost.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md

DC UDC 547.56:663.26:579.24 (043) = 163.3

CX phenolics/plant extracts/grape pomace/grapevine/*Vitis vinifera*/antimicrobials/antimicrobial activity/pathogens/minimum inhibitory concentration/MIC

AU JUG NOVŠAK, Katja

AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)

PB SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Food Science and Technology

PY 2016

TI ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PHENOLIC EXTRACTS FROM GRAPE POMACE

DT M.Sc. Thesis

NO XIII, 89 p., 15 tab., 23 fig., 4 ann., 167 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The food industry is searching for ways to productively utilize agricultural by-products. The focus of our work was to study antimicrobial activity of phenol compounds extracted from grape pomace of six different varieties of grape. The aim of this master thesis is to confirm that antimicrobial activity of grape pomace extracts depends on the grape variety as well as on the vinification process. The goal of this project is to determine the optimal grape variety on the basis of its antimicrobial activity, to optimize the extraction method of phenol compounds from grape pomace, and to compare antimicrobial activity of soluble phenolic extracts to encapsulated phenolic extracts. Predominant grape varieties in the Vipava Valley wine-producing region (Slovenia) were selected: `Rebula`, `Sauvignon` and `Zelen` as white and `Cabernet Sauvignon`, `Merlot` and `Pinot Noir` as red varieties (all *Vitis vinifera* L.). Broth microdilution method was used to determine minimal inhibitory concentration (MIC) for six cultivars and seven extraction solvents, total 42 extracts. We used five target microorganisms, which included Gram-positive (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis). Our results show that the extracts from white grape varieties `Sauvignon` and `Zelen` had the highest antimicrobial activity. `Pinot Noir` showed the highest antimicrobial activity among the red grape varieties tested. The extracts were most effective against Gram-positive bacteria. Surprisingly white grape varieties `Zelen` and `Sauvignon` were highly effective against both Gram-negative bacteria tested. Out of 7 different solvents tested, we determined that 50 % ethanol was the most efficient. We also showed that the method of application affects antimicrobial efficiency of the extract.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 STRANSKI PROIZVODI IN ODPADKI TER RAVNANJE Z NJIMI	3
2.2 GROZDNE TROPINE	4
2.2.1 Pridelava grozdja in grozdnih tropin v Sloveniji	4
2.2.1.1 Proizvodnja vina	4
2.2.1.2 Maceracija	4
2.2.2 Sestava grozdja in grozdnih tropin	5
2.2.2.1 Kemijska sestava grozdja	5
2.2.2.2 Sestava grozdnih tropin	6
2.2.3 Uporaba grozdnih tropin	8
2.3 RASTLINSKI IZVLEČKI.....	9
2.3.1 Rastlinski izvlečki in izzivi v prihodnosti	10
2.3.2 Protimikrobno delovanje grozdnih tropin	11
2.3.2.1 Mehanizem protimikrobnega delovanja	12
2.3.3 Ekstrakcija fenolnih spojin iz grozdnih tropin	14
2.4 FENOLI	16
2.4.1 Flavonoidi	16
2.4.1.1 Antocianini	17
2.4.1.2 Flavanoli	17
2.4.1.3 Flavonoli	17
2.4.2 Neflavonoidi	18
2.4.2.1 Fenolne kisline.....	18
2.4.2.2 Hlapni fenoli	19
2.4.2.3 Stilbeni.....	19
2.5 BAKTERIJE	19
2.5.1 Značilnosti bakterij vrste <i>Bacillus cereus</i>	19
2.5.2 Značilnosti bakterij vrste <i>Escherichia coli</i> O157:H7	20
2.5.3 Značilnosti bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	20
2.5.4 Značilnosti bakterij roda <i>Salmonella</i> spp.	21

2.5.5 Značilnosti bakterij vrste <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.5.6 Vplivi izvlečkov fenolnih spojin na patogene bakterije	22
2.5.7 Vpliv zunanjih dejavnikov na protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin	24
2.7 INKAPSULACIJA	25
2.7.1 Metode inkapsulacije	25
3 MATERIALI IN METODE	28
3.1 POTEK DELA	28
3.2 MATERIALI	29
3.2.1 Mikroorganizmi	29
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	29
3.2.2.1 Tekoče gojišče Mueller Hinton broth (MHB)	29
3.2.2.2 Trdno gojišče Mueller Hinton agar (MHA)	30
3.2.3 Raztopine in dodatki	30
3.2.3.1 Fiziološka raztopina.....	30
3.2.3.2 Druge kemikalije	30
3.2.4 Izvlečki fenolnih spojin grozdnih tropin	30
3.2.4.1 Priprava testnih raztopin izvlečkov fenolov tropin:	31
3.2.5 Opis postopka priprave fenolnih izvlečkov iz tropin	31
3.2.6 Določitev vsebnosti fenolnih spojin v izvlečku	32
3.2.7 Vrednosti za skupno vsebnost fenolnih spojin	32
3.2.8 Laboratorijska oprema	33
3.3 METODE.....	34
3.3.1 Revitalizacija bakterij	34
3.3.2 Priprava inokuluma	34
3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu	34
3.3.4 Mikrodilucija v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici	35
3.3.5 Krivulja odmiranja	36
3.3.6 Opis metode inkapsulacije izvlečkov grozdnih tropin v β-ciklodekstrin	36
4 REZULTATI	38
4.1 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN GROZDNIH TROPIN GLEDE NA SORTO	38
4.1.1 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte zelen	38
4.1.2 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte sauvignon	40
4.1.3 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte rebula	42
4.1.4 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte cabernet sauvignon	43

4.1.5 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte merlot	44
4.1.6 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte modri pinot	45
4.2 VPLIV EKSTRAKCIJSKEGA TOPILO NA PROTIMIKROBNO UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN GROZDNIH TROPIN	46
4.2.1 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji <i>S. aureus</i>	47
4.2.2 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji <i>L. monocytogenes</i>	48
4.2.3 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji <i>B. cereus</i>	48
4.2.4 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji <i>S. Enteritidis</i>	49
4.2.5 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji <i>Escherichia coli</i> O157:H7	50
4.3 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN GROZDNIH TROPIN GLEDE NA BAKTERIJE	51
4.4 KINETIKA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA	53
4.4.1 Krivulje odmiranja/rasti bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>	54
4.4.2 Krivulje odmiranja/rasti bakterije <i>Listeria monocytogenes</i>	55
4.4.3 Krivulje odmiranja/rasti bakterije <i>Bacillus cereus</i>	56
4.4.4 Krivulje odmiranja/rasti bakterije <i>Escherichia coli</i> O157:H7	57
4.4.5 Krivulje odmiranja/rasti bakterije <i>Salmonella</i> Enteritidis	58
4.5 VPLIV INKAPSULACIJE NA PROTIMIKROBNO UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN TROPIN	58
4.5.1 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije <i>S. aureus</i>	59
4.5.2 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije <i>L. monocytogenes</i>	60
4.5.3 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije <i>B. cereus</i>	60
4.5.4 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije <i>E. coli</i>	61
4.5.5 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije <i>S. Enteritidis</i>	62
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	64
5.1 RAZPRAVA	64
5.1.1 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz grozdnih tropin glede na sorto	64

5.1.2 Vpliv ekstrakcijskega topila na protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin	66
5.1.3 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na bakterije	66
5.1.4 Kinetika protimikrobnega delovanja	68
5.1.5 Vpliv inkapsulacije na protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin	70
5.2 SKLEPI	71
6 POVZETEK (SUMMARY)	72
6.1 POVZETEK	72
6.2 SUMMARY	73
7 VIRI	75
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vsebnost poglavitnih spojin v posameznem delu grozdja (izraženo kot masni delež v %) (Šikovec, 1993)	6
Preglednica 2: Kemijska sestava tropin (izraženo kot masni delež v suhi snovi, %) (Tseng in Zhao, 2013)	7
Preglednica 3: Bakterijski sevi	29
Preglednica 4: Koncentracija SF v izvlečkih fenolnih spojin iz tropin grozdja 6 sort, ekstrahiranih s 7 različnimi topili (v : v) izraženih kot mg GAE/g suhe snovi izvlečka (Trošt in sod., 2011)	33
Preglednica 5: Koncentracija SF liofiliziranih tropin (FDSS) grozdja 6 sort, ekstrahiranih s 7 različnimi topili (v : v), izraženih kot mg GAE/g FDSS (Trošt in sod., 2012)	33
Preglednica 6: Odčitavanje MIK rezultatov za bakterijo <i>S. aureus</i> ŽMJ 343 (povprečna vrednost, n = 2).....	39
Preglednica 7: Primer izračuna na osnovi enačbe 3 za MIK (g FDSS/L gojišča) za sorto zelen pri topilu voda : metanol = 75 : 25 (v : v) za bakterijo <i>S. aureus</i>	47
Preglednica 8: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji <i>S. aureus</i> (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v).....	47
Preglednica 9: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji <i>L. monocytogenes</i> (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v)	48
Preglednica 10: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji <i>B. cereus</i> (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v).....	49
Preglednica 11: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolov tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji <i>S. Enteritidis</i> (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v).....	50
Preglednica 12: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolov tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji <i>E. coli</i> (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v).....	51
Preglednica 13: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolov tropin šestih sort grozdja, pripravljenih z ekstrakcijskim topilom voda : etanol = 50 : 50 (v : v) proti petim bakterijam (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2).....	51
Preglednica 14: Primer izračuna na osnovi enačbe 4 za MIK (g suhega izvlečka/L gojišča) za sorto zelen pri topilu voda : metanol = 75 : 25 (v : v) za bakterijo <i>S. aureus</i>	52

Preglednica 15: Protimikrobna učinkovitost inkapsuliranega in neinkapsuliranega izvlečka sorte zelen proti petim patogenim bakterijam (MIK v mg GAE/mL gojišča) (povprečna vrednost, n = 2).....	59
--	----

KAZALO SLIK

Slika 1: 5-stopenjska hierarhija ravnanja z odpadki (MOP, 2015).....	3
Slika 2: Osnovna struktura flavonoidov (Jackson in sod., 2011).....	17
Slika 3: Dva mehanizma, pri katerem lahko flavonoidi zmanjšajo število CFU bakterij (Cushnie in Lamb, 2011b).....	24
Slika 4: Vgradnja katehina v β -ciklodekstrin (Krishnaswamy in sod., 2012).....	26
Slika 5: Shema poteka eksperimentalnega dela.....	28
Slika 6: Prikaz rezultatov mikrodilucije v mikrotitrski ploščici v dveh paralelkah za bakterijo <i>S. aureus</i>	39
Slika 7: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte zelen v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton.....	40
Slika 8: MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte sauvignon v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton.....	41
Slika 9: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte rebula v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton.....	42
Slika 10: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte cabernet sauvignon v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton.....	43
Slika 11: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte merlot v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton.....	45
Slika 12: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte zelen v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton.....	46
Slika 13: Vrednosti MIK izvlečkov fenolov tropin pri topilu voda : etanol = 50 : 50 (v : v) v odvisnosti od sorte grozdja in testne bakterije (v g suhega fenolnega izvlečka/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2).....	53
Slika 14: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>S. aureus</i> po izpostavitvi izvlečkom fenolnih spojin grozdnih tropin treh sort pri koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2).....	55
Slika 15: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>L. monocytogenes</i> po izpostavitvi izvlečkom fenolnih spojin treh sort pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2).....	56
Slika 16: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>B. cereus</i> po izpostavitvi izvlečkom fenolnih spojin tropin sorte zelen v koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča, tropin sorte sauvignon v koncentraciji 0,094 mg GAE/mL gojišča in tropin sorte modri pinot pri	

koncentraciji 0,094 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)	56
Slika 17: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>E. coli</i> po izpostavitvi izvlečkom fenolnih spojin sorte zelen v koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča ter sorte sauvignon v koncentraciji 0,25 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)	57
Slika 18: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>S. Enteritidis</i> po izpostavitvi izvlečku fenolnih spojin sorte zelen v koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)	58
Slika 19: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>S. aureus</i> po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)	59
Slika 20: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>L. monocytogenes</i> po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)	60
Slika 21: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>B. cereus</i> po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)	61
Slika 22: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>E. coli</i> po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)	62
Slika 23: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije <i>S. Enteritidis</i> po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)	63

KAZALO PRILOG

Priloga A: Antioksidativna aktivnost izvlečkov grozdnih tropin, merjena po metodi DPPH, v odvisnosti od sorte grozdja in ekstrakcijskega topila (Trošt in sod., 2011) Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton

Priloga B: Minimalne inhibitorne koncentracije izvlečkov, ki so pripravljene z ekstrakcijskim topilom voda : etanol = 50 : 50 (v : v) v odvisnosti od sorte in testne bakterije, rezultati so podani v gramih liofiliziranih tropin na L gojišča

Priloga C: Vsebnost fenolnih spojin v mg fenolnih spojin na kg liofiliziranih izvlečkov v treh belih sortah z ekstrakcijo z različnimi topili (Trošt in sod., 2015)

Priloga D: Vsebnost fenolnih spojin v mg fenolnih spojin na kg liofiliziranih izvlečkov v treh rdečih sortah z ekstrakcijo z različnimi topili (Trošt in sod., 2015)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozintrifosfat
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
CD	ciklodekstrin
β-CD	β-ciklodekstrin
CFU	kolonijska enota (angl. colony forming unit)
dH ₂ O	enkrat destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGKG	epigalokatehin galat
EKG	epikatehin galat
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDSS	liofilizirane tropine (angl. freeze dried skins and seeds)
GRAS	oznaka za snovi, ki se dodajajo hrani in so na splošno sprejete kot varne
HBL	hemolitični diarealni toksin
HCK	hidroksicimetna kislina
INT	bakterijski rastni indikator: p-iodo-nitro-tetrazolium violet
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
mg GAE/mL	mg fenolnih spojin, izraženih kot ekvivalent galne kisline na mL gojišča
MHA	gojišče (angl. Mueller Hinton agar)
MHB	gojišče (angl. Mueller Hinton broth)
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	meticilin rezistentna <i>Staphylococcus aureus</i>
NHE	nehemolitični diarealni toksin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	stafilokokni enterotoksin
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>S. Infantis</i>	<i>Salmonella</i> Infantis
STEC	<i>E. coli</i> , ki tvorijo šigove toksine

1 UVOD

Ravnanje z odpadki oz. njihovo odstranjevanje je eden glavnih problemov, s katerimi se sooča večina obratov za predelavo hrane. Zaradi nove zakonodaje se odpadki ne smejo več uporabljati na tradicionalni način v kmetijske namene. Stranski proizvodi so v prehranski industriji dolgo predstavljali breme, zaradi sodobne tehnologije pa so postali odpadki zanimivejši in dandanes postajajo vir dragocenih bioaktivnih snovi (Goula in Lazarides, 2015).

Pri predelavi sadja nastane veliko stranskih produktov, po nekaterih ocenah ostane neizkoriščenega približno 25–35 % vsega sadja (Gyawali in Ibrahim, 2014). Največji svetovni pridelek sadja je grozdje (*Vitis vinifera* L.), ki se ga na leto pridelava več kot 60 milijonov ton. Približno 80 % se ga nameni za proizvodnjo vina. Najpomembnejši stranski proizvod te proizvodnje so grozdne tropine, ki vsebujejo veliko bioaktivnih snovi (Bordiga in sod., 2015).

Velika količina bioaktivnih spojin iz grozdja po predelavi v vino ostane neizkoriščenih. Tropine se večinoma zavržejo ali pa se celo nekontrolirano odlagajo na poljih in vodotokih. Ti odpadki predstavljajo obremenitev za okolje zaradi velike vsebnosti sekundarnih rastlinskih metabolitov, ki pa imajo ob pravilni predelavi pozitiven vpliv na človeški organizem. Izkoriščanje sekundarnih rastlinskih metabolitov pomeni relativno poceni surovino in tudi dodano vrednost pridelavi in predelavi grozdja (Trošt in sod., 2011).

Grozdje je bogat vir fenolnih snovi, ki pa so lokalizirani predvsem v kožicah in pečkah, manj v pulpi (Xia in sod., 2010). Fenolne spojine so naravno prisotne protimikrobne snovi, ki delujejo protimikrobno proti širokemu spektru mikroorganizmov (Calo in sod., 2015).

Uporaba naravnih konzervansov, kot so organske kisline, eterična olja, rastlinski ekstrakti in bakteriocini, je dobra alternativa za doseganje varnih živil (Burt, 2004; Holley in sod., 2005; Tiwari in sod., 2009). V zadnjih letih je bilo opravljenih veliko študij, ki so dokazale protimikrobno učinkovitost rastlinskih proizvodov. Zato je uporaba rastlinskih izvlečkov s protimikrobno učinkovitostjo pri postopkih konzerviranja hrane zelo pomembna. Najpomembnejše sestavine, ki vplivajo na protimikrobno učinkovitost, antioksidativne, pa tudi senzorične lastnosti hrane, so fenolne spojine, alkaloidi, terpenoidi, isotiocianati in polipeptidi (Cowan, 1999).

Mikroorganizmi so bili vedno povezani z živili rastlinskega in živalskega izvora. Razen pri industrijsko sterilizirani hrani, so mikroorganizmi povezani z vsemi živilskimi izdelki. Povzročajo lahko zaželeno spremembo v hrani, največkrat kvarjenje s spremembo senzoričnih lastnosti, lahko pa tudi sintezo toksičnih snovi. Za preprečevanje mikrobiološkega kvara je poznanih veliko postopkov konzerviranja, vendar se lahko pri večini teh postopkov poslabšajo senzorične lastnosti hrane. Potrošniki želijo, da je hrana

minimalno predelana, vsebuje čim manj aditivov in da je varna. Sintetični konzervansi so odobreni v mnogih državah, vendar se zaradi mnogih neželenih učinkov, ki jih ti povzročajo, pogosteje uporabljajo naravni konzervansi. Njihova varnost in učinkovitost je v številnih primerih še ne povsem raziskana (Negi, 2012).

Bolezni, ki se prenašajo s hrano, so še vedno povezane z velikimi stroški. Številne bakterije, ki se prenašajo s hrano, so infektivne ali toksinogene ali oboje hkrati. *Staphylococcus aureus* je po Gramu pozitivna bakterija in pogost vzrok za zastrupitve z enterotoksini. Najpogosteje jih bakterije sintetizirajo v beljakovinskih živilih. *Bacillus cereus* je po Gramu pozitivna, sporogena bakterija, ki ima po svetu različno incidenco izbruhov bolezni, ki so pogojeni s hrano (Gutiérrez-Larraínzar in sod., 2012). Bakterije rodu *Salmonella* in vrst *Listeria monocytogenes* ter *Escherichia coli* O157:H7 so še vedno ene najpomembnejših povzročiteljic bakterijskih okužb, ki se prenašajo s hrano (Revichandran in sod., 2011).

1.1 CILJI NALOGE

Cilj te naloge je bil proučiti protimikrobno delovanje izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin, ekstrahiranih s sedmimi različnimi topili treh belih sort (zelen, sauvignon, rebula) in treh rdečih sort (cabernet sauvignon, merlot, modri pinot) na Gram pozitivne bakterije vrst *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* in *Bacillus cereus* ter na Gram negativne bakterije *Escherichia coli* O157:H7 in *Salmonella* Enteritidis, z namenom:

- določiti protimikrobno učinkovitost izvlečkov in primerjati med seboj izvlečke šestih različnih sort ter potrditi, da je učinkovitost odvisna od sorte in vinifikacijskega postopka;
- določiti odvisnost protimikrobne učinkovitosti od vrste ekstrakcijskega topila;
- na osnovi protimikrobne učinkovitosti izbrati optimalno sorto in ekstrakcijsko topilo;
- primerjati protimikrobno učinkovitost inkapsuliranega in neinkapsuliranega izvlečka.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Protimikrobni učinek je odvisen od sorte grozdja in vinifikacijskega postopka, zato bomo med 6 sortami izbrali optimalni postopek in sorto, glede na protimikrobno učinkovitost.
- Protimikrobna učinkovitost je odvisna od vrste ekstrakcijskega topila, zato bomo med 6 testiranimi kombinacijami topil izbrali optimalno.
- Protimikrobna učinkovitost je odvisna od načina aplikacije – potrdili bomo učinkovitost izbranih fenolnih izvlečkov, kapsuliranih v β -ciklodekstrinsko ovojnico.

2 PREGLED OBJAV

2.1 STRANSKI PROIZVODI IN ODPADKI TER RAVNANJE Z NJIMI

Vinska trta (*Vitis vinifera* L.) oz. grozdje je največji svetovni pridelek sadja, ki se ga uporablja za pridelavo vina, soka, namiznega grozdja, rozin itd. (Ali in sod., 2010). V svetu se je leta 2012 po podatkih organizacije FAO (FAO, 2014) pridelalo okoli 67 milijonov ton grozdja, od tega se okoli 80 % uporabi v pridelavi vina. V vinogradniškem sektorju nastajajo stranski produkti, kot so tropine, peclji, droži in listi, ki lahko predstavljajo tudi do 30 % skupne količine predelanega grozdja. Glede na skupno količino pridelanega grozdja nastaja letno približno 20 milijonov ton stranskih produktov. Večina od njih je zavrženih brez kakšnekoli predelave, kar lahko povzroča velik negativen vpliv na okolje (Melo in sod., 2015).

Obstaja podatek, da približno 20 % mase predelanega grozdja ostaja v obliki tropin, to pomeni letno okoli 10 milijonov ton stranskih produktov (Kammerer in sod., 2014). Nekateri viri navajajo količine od 5–7 milijonov ton (Meyer in sod., 1998), drugi pa, da samo v Evropi nastane celo do 14,5 milijonov ton tropin (Torres in Bobet, 2001). Ocene se lahko razlikujejo tudi zato, ker se sestava grozdnih tropin in vsebnost vode spreminja in s tem tudi teža (Schieber in sod., 2001).

Na ravni Evropske unije je bila sprejeta nova okvirna Direktiva 2008/98/EC (2008) o ravnanju z odpadki, ki obravnava tudi stranske proizvode, to so snovi ali predmeti, ki nastanejo pri proizvodnem procesu, katerega glavni namen ni proizvodnja tega izdelka. Omenjena direktiva uveljavlja nov pristop k obravnavi odpadka, ki temelji na hierarhičnem sistemu (slika 1).



Slika 1: 5-stopenjska hierarhija ravnanja z odpadki (MOP, 2015)
Figure 1: The waste management hierarchy (MOP, 2015)

Odpadki so vir surovin (in ne samo nekaj, kar je potrebno čim ceneje odložiti), zato morajo države članice sprejeti ukrepe, da se odpadki v čim večji meri ponovno uporabijo. Do leta 2020 bo potrebno predelati 50–70 % odpadkov (Kammerer in sod., 2014; MOP, 2015).

Fontana in sod. (2013) so poudarili, da ponovna uporaba industrijskih stranskih proizvodov predstavlja alternativno pot industriji k zmanjšanju vpliva odpadkov na okolje. Zaradi nepopolne ekstrakcije tekom maceracije grozdja vsebujejo ti stranski proizvodi vinarstva (grozdne tropine) pomembne količine fenolnih spojin (Bordiga in sod., 2015).

2.2 GROZDNE TROPINE

2.2.1 Pridelava grozdja in grozdnih tropin v Sloveniji

V Sloveniji se letno pridelala okoli 100.000 ton grozdja, od tega se 18 % pridelala na Vipavskem. Značilnost Vipavske doline je pester in številen sortni sestav. V letu 2005 se je na Vipavskem pridelalo največ grozdja sort merlot (21 %), rebula 12,7 %, sauvignon 11 %, cabernet sauvignon 8,6 %, zelen 2,3 % in modri pinot 0,9 %. Sorte zelen se je na tem območju v letih 1999–2004 pridelalo povprečno 300 ton (Škvarč, 2005).

Tudi v Sloveniji v vinarstvu nastaja velika količina stranskih produktov in odpadkov. Zelo malo teh odpadkov se reciklira ali ponovno uporabi. Na splošno se večina rastlinskih odpadkov v Sloveniji brez predhodne obdelave zavrže, uporabi za krmo ali za kompost. Majhen del tropin se v Sloveniji uporablja za pridelavo kisa, poznamo tudi tropinovec, žganje iz grozdnih tropin. V letu 2014 so v Radgonskih gorinah dali na trg prvih 300 stekleničk olja iz grozdnih pečk avtohtone sorte radgonska ranina (Njegova visokost ..., 2014). V Ormožu pa so leta 2011 odprli bioplinarno, ki poleg ostale kmetijske biomase uporablja tudi grozdne tropine (Putarek, 2011).

2.2.1.1 Proizvodnja vina

Kakovost vina se začne z vinsko trto in sorto grozdja. Kemijska sestava grozdja je poleg kakovostnega dednega potenciala odvisna predvsem od naravnih danosti – porekla. Vsem naravnim danostim se pridruži še vinogradniška tehnologija, torej delo vinogradnika, ki lahko vpliva na količino pridelka, zdravstveno stanje in s tem precej tudi na kakovost pridelka. Pridelava vina se začne z ustreznim časom trgatve, pecljanjem, drozganjem, maceracijo, stiskanjem, vrenjem in zorenjem vina (Šikovec, 1993). Glavna razlika med proizvodnjo belega in rdečega vina je v tem, da stiskanje rdečega grozdja poteka po fermentaciji in maceraciji, stiskanje belega grozdja pa poteka pred fermentacijo, kar tudi direktno prispeva k različni kemijski sestavi rdečih in belih tropin (Jackson, 2008).

2.2.1.2 Maceracija

Pri pridelavi belega vina je zaradi oksidacije mošta maceracija čim krajša, maksimalno nekaj ur. Lahko pa se odločimo za kontroliran daljši postopek maceracije, ki odločilno prispeva k izrazitejši aromatici posameznih belih sort. Vpliv maceracije na vino je odvisen od izbrane sorte in pogojev med maceracijo, predvsem temperature in dolžine postopka. Osnovni namen maceracije je obsežnejša ekstrakcija aromatičnih spojin, ki so vezane v kožicah, mesu in pečkih, kar še posebno velja za daljše maceracije pri pridelavi vina iz

manj aromatičnih sort grozdja. Čeprav podaljšana maceracija poveča izločanje fenolnih spojin, to ne vpliva na povečanje grenkega okusa, kot ga opažamo pri rdečemu vinu. Razlog je v odsotnosti antocianinov v belem grozdju. Antocianini so sami po sebi brez okusa, vendar se vežejo s katehini in flavonoidnimi tanini, kar povzroča grenak in trpek okus (Jackson, 2008).

Pri pridelavi rdečega vina potekata maceracija in fermentacija sočasno. Maceracija povzroči ekstrakcijo antocianinov in taninov iz drozge. Najprej se ekstrahirajo antociani, ki so bolj topni v primerjavi s tanini. Ko nastopi fermentacija, nastajajoči etanol zaradi naraščajoče poroznosti membrane še dodatno pospešuje izločanje antocianinov. Čas maceracije je odvisen od stila rdečega vina, običajno pa traja 3–5 dni, lahko pa tudi dlje. Daljša maceracija korelira s povečano koncentracijo visoko molekularnih taninov. Izločanje fenolnih snovi povečuje tudi višja temperatura vrenja, ki je pri rdečih sortah pogosto od 24–27 °C (Jackson, 2008).

2.2.2 Sestava grozdja in grozdnih tropin

Kvaliteta vinske trte je v glavnem odvisna od njenih metabolitov. V rastlinah poznamo dve vrsti metabolizma, primarni in sekundarni. Primarni metabolizem je odgovoren za rast, razvoj in razmnoževanje rastlin, medtem ko sekundarni metabolizem ni direktno povezan s temi procesi, ima pa pomembno ekološko funkcijo, saj sekundarni metaboliti predstavljajo obrambo pred škodljivci, paraziti in boleznimi, vplivajo na medvrstno tekmovanje in s pomočjo različnih vonjev in barv pospešujejo razmnoževalne procese. Med kemijske sestavine grozdja sodi veliko bioaktivnih snovi, kot so vitamin E, flavonoidi, linolenska kislina in procianidini, ki jih je največ v grozdnih pečkih, v manjši količini pa se nahajajo tudi v kožici. Med primarne metabolite sodijo sladkorji, aminokisliline in organske kisline. Sekundarni metaboliti pa predstavljajo fenolne spojine (Ali in sod., 2010).

2.2.2.1 Kemijska sestava grozdja

Glavne sestavine grozdja so voda, sladkorji in kisline. Grozdje vsebuje največ vode (81–87 %), ogljikovih hidratov (12–18 %), proteinov (0,5–0,6 %) in maščob (0,3–0,4 %). Grozdje vsebuje tudi pomembno količino kalija (0,1–0,2 %), vitamina C (0,01–0,02 %), vitamina A (0,001–0,0015 %) in tudi nekaj kalcija (0,01–0,02 %) ter fosforja (0,08–0,01 %) (Yadav in sod., 2009). Grozdje je tudi eden glavnih virov drugih hranilnih snovi, kot je bor (Demir in Serindač, 2006).

V preglednici 1 je podana vsebnosti poglavitnih spojin v posameznem delu grozda izražena kot masni delež. Jagode v grozdu predstavljajo 93–98 %, medtem ko pa peclji predstavljajo 2–7 % masnega deleža grozda. Podrobneje predstavljajo znotraj jagod jagodno meso od 75–85 %, kožica pa 15–20 % masnega deleža. Znotraj pecljev pa predstavljajo pečke 3–6 %, peclji pa 2–7 % masnega deleža grozda (Šikovec, 1993).

Preglednica 1: Vsebnost poglavitnih spojin v posameznem delu grozdja (izraženo kot masni delež v %) (Šikovec, 1993)

Table 1: The content of the main compounds in a specific part of the grapes (expressed as a percentage of mass fraction) (Šikovec, 1993)

Sestavine	Masni delež (%)			
	Jagodno meso	Kožica	Pečke	Peclji
Voda	65–85	60–75	25–45	55–85
Sladkorji	10–30	-	-	-
Organske kisline	0,6–1,8	0,4	0,5–1	1–2
Celuloza	0,5	30	40	50
Mineralne snovi	0,1–1	1–3	1–4	5–6
Taninske snovi	-	0,5–5	5–9	1–3,5
Olje	-	-	10–20	-
Dušikove snovi	0,2–0,5	1–2	4–7,5	1–2

Legenda: znak »–« pomeni razpon med posameznimi vrednostmi

2.2.2.2 Sestava grozdnih tropin

Grozne tropine so stranski produkt pri pridelavi grozdnega soka ali vina (Sagdic in sod., 2011b). Sestavljene so iz grozdnih kožic, pečk in pecljev ter so bogat vir spojin kot so tartrati in malati, citronske kisline, olja grozdnih pečk in hidrokolidov (Arvanitoyannis in sod., 2006), vsebujejo pa tudi vlaknine, kot so pektin in celuloza ter sladkorje (Deng in sod., 2011).

Sestava grozdnih tropin (Nerantzis in Tataridis, 2006):

- Količina: 11–15 % grozdja
- Sestava:
 - vlaga (70 %);
 - pečke predstavljajo 30 % vlažnih tropin;
 - vlaknine (celuloza), pektin, minerali, organske kisline;
 - sladkorji (do 150 g/kg);
 - fenoli (tanini, antociani), pigmenti (9 kg/t pri rdečih grozdnih tropinah);
 - tartrati (50-75 kg/t).

V letu 2013 je bil objavljen članek, v katerem so podali kemijsko sestavo grozdnih tropin sorte modri pinot (Tseng in Zhao, 2013) (preglednica 2).

Preglednica 2: Kemijska sestava tropin sorte modri pinot (izraženo kot masni delež v suhi snovi, %) (Tseng in Zhao, 2013)

Table 2: Chemical composition of grape pomace of variety 'Pinot Noir' (expressed as a percentage of dry matter) (Tseng and Zhao, 2013)

Sestavina	Masni delež (%)
Vsebnost vlage	5,63
Pepel	5,07
Roteini	10,32
Maščobe	11,09
Topni sladkorji	3,89
Pektin	3,68
Tanini	12,11
Vlaknine	61,32

Zelo pomembna sestavina tropin so tudi polifenoli, ki se slabo ekstrahirajo med pridelavo vina. Fenolne spojine so v glavnem locirane v pečkih in kožici jagode. 60–70 % polifenolov je v pečkih, okoli 25 % v kožici in 10 % v jagodnem mesu. Ti fenoli so glavne sestavine grozdja, ki so odgovorne za barvo, okus in občutek v ustih, oksidacijo in ostale kemične reakcije v vinu (Shi in sod., 2003).

Na sintezo polifenolov v grozdju vpliva veliko dejavnikov, kot so sorta grozdja (Katalinić in sod., 2010), genetsko ozadje in izvor (Zhu in sod., 2012). Na koncentracijo fenolnih snovi vplivajo tudi klimatski pogoji, obdobje rasti – čas obiranja, zrelost grozdja (Ivanova in sod., 2011), geografska lokacija vinograda in specifično mesto, boleznj trte, predvsem okuženost s plesnijo ter vrsta zemlje. V sušnih predelih namakanje poveča vitalnost vinske trte, velikost jagod in donos (Mulero in sod., 2010). Opravljena je bila tudi študija, ki je dokazala vpliv vinogradniške prakse (odstranjevanje listov – defoliacija v coni grozdja) na mikroklimo grozda in s tem na koncentracijo antocianinov in flavonolov (Sternad Lemut in sod., 2011).

Polifenoli so eni izmed najpomembnejših sestavin grozdnih tropin, opravljene pa so bile tudi toksikološke študije, ki so pokazale, da so izvlečki polifenolov iz grozdnih tropin varni (Bentivegna in sod., 2002), kot tudi izvlečki proantocianidinov iz grozdnih pečk (Yamakoshi in sod., 2002).

Porazdelitev polifenolov v kožici in pečkih je različna. Nahajajo se v monomerni ali polimerni obliki. V kožici se nahaja veliko antocianinov (v rdečih kožicah), flavan-3-oli, flavonoli, dihidroflavonoli, hidroksicimetne kisline, hidroksibenzojne kisline in hidroksistilbeni. V pečkih najdemo flavan-3-ole in galno kislino (Ivanova in sod., 2011). Vsebnost skupnih fenolov je v belih tropinah običajno nižja, ker bele sorte ne sintetizirajo antocianinov. Vsebujejo pa veliko flavonoidov in stilbenov (Corrales in sod., 2010).

Glavni polifenoli v tropinah so fenolne kisline, kot sta galna in elagična, flavonoidi, kot sta katehin in epikatehin, procianidini in antocianini (Tseng in Zhao, 2013).

Narejenih je bilo nekaj raziskav, ki so ugotovljale vsebnost polifenolov v grozdnih tropinah. Tako je bilo v grozdnih tropinah ugotovljenih 13 antocianinov (samo v rdečih grozdnih tropinah), 11 hidroksibenzojnih in hidroksicimetnih kislin ter 13 katehinov in flavonolov (Kammerer in sod., 2004). V tropinah sorte chardonnay so izolirali 17 polifenolov (Lu in Foo, 1999), v tropinah rdeče sorte grozdja iz Sicilije so identificirali 10 antocianinov, 5 piranoantocianinov, 16 flavonolov ali glikozidov flavonola (Amico in sod., 2004). V 5 turških sortah, dveh belih in treh rdečih, so identificirali 18 fenolnih spojin (Sagdic in sod., 2011b).

2.2.3 Uporaba grozdnih tropin

Grozdne tropine so stranski proizvod v predelave grozdja v vino. Sestavljene so v glavnem iz pečk, pecljev in kožice, predstavljajo okoli 20–25 % mase zmletega grozdja. Pečke so bogat vir fenolnih antioksidantov, kot so fenolne kisline, flavonoidi, procianidini in resveratrol, medtem ko kožica vsebuje veliko antocianinov. Pozitivni učinki polifenolov grozdnih tropin na zdravje so že dolgo znani in predmet številnih študij. Poleg polifenolov pa tropine vsebujejo tudi veliko lipidov, proteinov, neprebavljive vlaknine in minerale. Veliko raziskav je dokazalo pozitivni vpliv polifenolov iz pečk na zdravje; še posebej antimutageno, antikancerogeno, antioksidativno in protivnetno delovanje ter zakasnitev in preprečitev srčno-žilnih bolezni (Yu in Ahmenda, 2013).

Živilska industrija išče produkte z dodano vrednostjo, ki se lahko proizvedejo iz stranskih proizvodov v kmetijstvu. Zlasti so stranski proizvodi v vinogradništvu primerni kot prehranska dopolnila ali kot sestavine v funkcionalnih živilih. Ker imajo tropine veliko bioaktivnih snovi, so uporabne tudi v farmacevtski in kozmetični industriji (Rosales Soto in sod., 2012).

Nekateri polifenoli se že dolgo uporabljajo v živilstvu, na primer antocianini iz grozdja in jagod se uporabljajo kot živilske barve. Izvlečki grozdnih tropin so priznani kot GRAS (oznaka za snovi, ki se dodajajo hrani in so na splošno sprejete kot varne) in se lahko uporabljajo kot barvila v sokovih in kot antioksidanti v aromatiziranih pijačah. Grozdne tropine so uporabili v pekovskih izdelkih, npr. v kruhu so s tem povečali antioksidativno delovanje in izboljšali prehranske vrednosti. Tropine pa so uporabili tudi v surovem in pečenem piščancu in s tem preprečili oksidacijo lipidov (Sayago-Ayerdi in sod., 2009; Peng in sod., 2009; Hayta in sod., 2014; Smith in Yu, 2015). Pridobivanje čistih polifenolnih izvlečkov je običajno drago. Pri pridobivanju izvlečkov se uporabljajo organska topila, kot so etanol, etil acetat in aceton, ki predstavljajo tveganje za delavce, obremenjujejo pa tudi okolje (Yu in Ahmedna, 2013). Zato so grozdne tropine, ki delujejo kot nosilec polifenolov, direktno dodali nekaterim živilom, ki so jih hoteli obogatiti z antioksidanti oz. polifenoli. Grozdne tropine so neposredno dodali piškotom v deležu 0, 5, 7,5 in 10 % in s tem povečali vsebnost vlaknin in pepela, kljub temu tropine niso spremenile organoleptične sprejemljivosti. Z višjim dodatkom tropin pa se je spremenila prebavljivost piškotov. Sprememba prebavljivosti je, kot razlagajo Canett Romero in sod.,

(2004), verjetno posledica inhibitornega vpliva polifenolov grozdnih tropin na prebavne encime.

Zaradi ustrezne sestave se tropine lahko uporabljajo tudi kot kompost ali kot učinkovit adsorbent za adsorpcijo težkih kovin (Arvanitoyannis in sod., 2006). Ustrezno predelane se lahko uporabijo tudi za živalsko krmo (Rodin in sod., 1997), kot barvila in izvlečke tanina, za črnilo in pigmente, protibakterijske snovi, proizvode za osebno nego, mila, proizvode za filtriranje, zaščitna sredstva za les, biogorivo in njegove aditive (Nerantzis in Tataridis, 2006).

V Italiji iz grozdnih tropin destilirajo poznano žgano pijačo, ki jo imenujejo grappa (Bordiga in sod., 2015).

Po ekstrakciji vode se lahko grozdne tropine uporabijo kot fermentacijski medij za proizvodnjo enoceličnih proteinov in mikrobne celuloze. S pomočjo fermentacije trdnega substrata se iz grozdnih tropin lahko pridobi veliko različnih spojin, kot so etanol, citronska kislina, glukonska kislina, karotenoidi, ksantan (Hang in sod., 1986; Díaz in sod., 2007; Rodríguez in sod., 2010).

Rastlinski polifenoli so predmet številnih preučevanj tudi v farmaciji. Antibiotiki so biološke snovi, ki jih proizvajajo bakterije ali ostali mikroorganizmi z namenom, ubiti ali zavreti rast in razmnoževanje ostalih bakterij. Zaradi tega so številni raziskovalci mnenja, da bi se polifenoli kot sekundarni metaboliti rastlin, ki delujejo kot obramba proti rastlinojednim insektom, plesnim ali bakterijam, lahko uporabili v kombinaciji z antibiotiki in s tem povečali njihovo učinkovitost ali znižali potrebno dozo (Daglia, 2012). Opravljena je bila raziskava, ki je dokazala sinergistični učinek dveh flavonolov (kampferol in kvercetin) v kombinaciji z rifampicinom (makrolid) proti rifampicin in meticilin rezistentni bakteriji *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Lin in sod., 2008).

2.3 RASTLINSKI IZVLEČKI

Naravni proizvodi, kot so rastlinski izvlečki, lahko zaradi svoje različne kemijske strukture ponujajo neomejene možnosti nadzora nad rastjo mikroorganizmov. Poleg protimikrobnega delovanja se veliko rastlinskih izvlečkov uporablja tudi na drugih področjih, kot so tradicionalna medicina, funkcionalna živila, prehranska dopolnila in proizvodnja rekombinantnih proteinov. Rastlinske kemijske spojine, še posebej flavonoidi, polifenoli, antocianini, karotenoidi, zavzemajo veliki tržni delež. V svetu se spreminjajo zdravstveni trendi, saj se vedno več potrošnikov odloča za preventivo in raje kupujejo funkcionalna živila kot pa zdravila. Prodaja funkcionalnih živil na svetu naj bi iz 75 milijard dolarjev v letu 2007 do leta 2015 zrastle na 130 milijard dolarjev (Negi, 2012).

Čeprav imajo naravne protimikrobne snovi na področju konzerviranja hrane ogromen potencial, je večina literarnih podatkov pridobljenih v laboratorijskem mediju ali modelu živil. Koncentracije, potrebne za doseganje zadovoljive učinkovitosti v živilih, so lahko

bistveno višje v primerjavi z *in vitro* pogoji, kar pa lahko negativno vpliva na senzorične lastnosti živila (Negi, 2012).

Rastlinski izvlečki so se izkazali kot zelo uporabni na različnih področjih v živilski industriji, veliko izvlečkov ima status varnih dodatkov (GRAS) (Negi, 2012). Imajo širok spekter delovanja (protibakterijskega, antioksidativnega, protiglivnega, protivnetnega, antitumorigenega itd.) (Kähkönen in sod., 1999; Quiroga in sod., 2001; Murthy in sod., 2002; Cherdshewasart in sod., 2009; Sagdic in sod., 2011b). Protimikrobne učinkovine rastlinskih izvlečkov so različne spojine, ki delujejo na različna mesta znotraj celice oz. na membrani celice (Negi, 2012).

Za ugotavljanje protimikrobne učinkovitosti rastlinskih izvlečkov je bilo narejenih veliko študij *in vitro*, zelo malo študij pa je bilo narejenih v modelih živil, kjer se rastlinski izvlečki niso izkazali enako učinkovito. Zmanjšana učinkovitost je verjetno posledica uporabe neekstrahiranih izvlečkov v študijah. Ti običajno vsebujejo flavonoide v glikozidni obliki, kjer pa sladkorni del molekule zmanjša učinkovitost proti nekaterim bakterijam (Kapoor in sod., 2007; Parvathy in sod., 2009).

Spojine, ki jih rastline proizvajajo za lastno zaščito, pa imajo lahko pozitiven vpliv tudi na druge izdelke, katerim jih dodajamo, nenazadnje na človeške celice – zato jih pogosto uporabljajo kot dodatke živilom, prehranska dopolnila ali pa v kozmetični industriji. Uporabljajo se kot vitamini, provitamini, antioksidanti ali kot inhibitorji encimov. V zadnjem času so bile opravljene raziskave specifičnih sekundarnih metabolitov, ki jih vsebujejo nekatere avtohtone in domače slovenske sorte grozdja, kot so zelen in rebula (Mozetič in sod., 2006). Omenjene sorte grozdja so bogat vir kaftarne kisline ter različnih flavonoidov (Trošt in sod., 2011).

Fenolne spojine imajo poleg protimikrobnega delovanja kot lovilci prostih radikalov tudi antioksidativno delovanje. Njihovo antioksidativno delovanje je odvisno od števila in razporeditve hidroksilnih skupin in obsega njihove konjugacije. Spojina s trojnim delovanjem, protimikrobnim (delovanje proti patogenim bakterijam in kvarljivcem), antioksidativnim (preprečevanje kemijskega kvara) in kot aroma, bi bila za živilsko industrijo zelo zanimiva, saj bi se tako zmanjšalo število skupnih aditivov (Gutiérrez-Larraínzar in sod., 2012).

2.3.1 Rastlinski izvlečki in izzivi v prihodnosti

Rastline vsebujejo tisoče sestavin in so pomemben vir novih in biološko aktivnih molekul s protimikrobnimi lastnostmi. Na področju naravnih konzervansov se že dolgo uporablja zelo malo število protimikrobnih snovi, zato je za zagotavljanje varne in kvalitetne hrane potrebno ta seznam razširiti. Obstaja veliko kandidatov, ki bi lahko postali naravni konzervansi prihodnosti, vendar obstaja v živilstvu za izključno uporabo naravnih konzervansov veliko ovir. Zelo malo je naravnih konzervansov, ki se lahko uporabijo kot

nadomestilo za obstoječe konzervanse, predvsem zaradi njihove manjše učinkovitosti, višjih stroškov pridobivanja in poslabšanja senzoričnih lastnosti živila. Naravna protimikrobna snov mora poleg učinkovitosti kot konzervans ustrezati tudi vsem regulatornim zahtevam. Ko pridobi status aditiva, mora ustrezati tudi potrošnikom. Potrošnike bo potrebno o novih alternativnih dodatkih tudi izobraziti in poleg učinkovitega trženja prilagoditi zakonodajo (Negi, 2012).

Trenutni podatki kažejo, da različni rastlinski izvlečki učinkovito zmanjšajo ali inhibirajo rast patogenih bakterij in kvarljivcev, zato so lahko dobra alternativa obstoječim sintetičnim protimikrobnim snovem. Razvoj stroškovno učinkovite izolacije in postopkov čiščenja, ki preprečujejo izgubo funkcionalnih lastnosti aktivnih spojin, bo pomagal k širši uporabi in sprejemljivosti rastlinskih izvlečkov. Biološka aktivnost rastlinskih izvlečkov je ponavadi kombinacija sinergističnega delovanja različnih spojin, zato se ni smiselno osredotočiti na samostojne učinkovine, ampak na njihovo kombinacijo. Prihodnost je tudi v kombinaciji uporabe naravnih konzervansov z ostalimi tehnologijami, kombinirano konzerviranje lahko poveča učinkovitost naravnih protimikrobnih snovi (Negi, 2012).

Nadalje je treba raziskovati fenolne spojine in možnosti dostave teh spojin v ali na živilo tudi s pomočjo naprednih tehnologij, kot je elektrostatsko pršenje ali nanotehnologije (Perumalla in Hettiarachchy, 2011).

Pričakuje se povečana uporaba naravnih protimikrobnih snovi v prihodnosti, saj tudi potrošniki zahtevajo minimalno procesirano hrano in naravno konzerviranje (Negi, 2012).

2.3.2 Protimikrobno delovanje grozdnih tropin

Fenoli, polifenoli, flavonoidi in tanini so eni glavnih protimikrobnih snovi, ki jih proizvajajo rastline, veliko pa jih je tudi v v grozdnih peškah in tropinah (Cowan, 1999; Sagdic in sod., 2011a).

Opravljenih je bilo nekaj raziskav, ki so ugotovljale protimikrobno učinkovitost izvlečkov grozdnih tropin, njihove ugotovitve pa so bile različne. Ozkan in sod. (2004) so ugotovili, da je G+ bakterija *Staphylococcus aureus* bolj občutljiva na izvleček grozdnih tropin kot *E. coli* O157:H7 pri isti koncentraciji. Podobno so ugotovili tudi v raziskavi Corrales in sod. (2009), kjer so izvleček grozdnih semen vključili v zaščitni film, ki je inhibiral G+, ne pa tudi G- bakterij. Deng in Zhao (2011) pa sta vključila izvleček grozdnih tropin sorte merlot v zaščitni film in ugotovila, da je bil film učinkovit tako proti G+ in G- bakterijam, vendar bolj proti G- bakteriji (*E. coli*). Jayaprakasha in sod. (2003) so testirali učinkovitost izvlečkov dveh sort grozdnih pečk pri šestih bakterijah. Izvlečka sta bila bolj učinkovita proti G+ kot proti G- bakterijam. Podobno so odkrili tudi v nadaljnjih študijah (Furiga in sod., 2009; Kao in sod., 2010; Adámez in sod., 2012).

Ena izmed odmevnih študij na tem področju je bila opravljena leta 2010. Izvedli so jo Katalinić in sod. na fenolnih izvlečkih grozdnih kožic dalmatinskih rdečih in belih sort

grozdja. Čeprav so bili izvlečki pripravljani laboratorijsko, so dobro protimikrobno in antioksidativno učinkovitost pokazale bele sorte. Ker v industrijski proizvodnji vina belo grozdje v procesu vinifikacije ni podvrženo maceraciji, lahko zadrži večjo količino fenolnih spojin kot rdeče sorte, je bil ta rezultat še toliko bolj zanimiv za praktično uporabo. V tej raziskavi so poročali tudi, da so izvlečki grozdnih kožic učinkoviti tako proti G+ kot G- bakterijam. Znano je, da imajo fenolne spojine v različnih delih grozdja različno protimikrobno delovanje. Nekatere študije so pokazale, da imajo izvlečki iz grozdnih pečk večjo protimikrobno učinkovitost v primerjavi z izvlečki iz ostalih delov grozdja. Ostali deli grozdja, kot je listje, kožica, fermentirane tropine ali izvleček celega grozdja, imajo manjšo protimikrobno učinkovitost v tem padajočem vrstnem redu (Xia in sod., 2010; Katalinić in sod., 2013). Izvleček iz pulpe grozdja ni pokazal nobene protimikrobne učinkovitosti (Yigit in sod., 2009).

Anastasiadi in sod. (2009) so ugotavljali protimikrobno učinkovitost fenolnih izvlečkov stranskih produktov (pečk, tropin in pecljev) dveh rdečih in dveh belih grških sort. Vzorci so bili odvzeti po sami trgatvi in vinifikacijskem postopku. Rezultati so pokazali visoko vsebnost flavan-3-olov in njihovih derivatov v pečkah, medtem ko so tropine in izvlečki pecljev vsebovali več flavonoidov, stilbenov in fenolnih kislin. Zanimivo je tudi to, da je bila vsebnost polifenolov v izvlečkih belih in rdečih sort primerljiva, čeprav ponavadi rdeče sorte vsebujejo več skupnih polifenolov. Največje protimikrobno delovanje so pokazali izvlečki pečk in pecljev rdečih sort.

Özkan in sod. (2004) so ugotovili, da je protimikrobna učinkovitost grozdnih tropin odvisna od sorte grozdja, ekstrakcijske metode, koncentracije fenolov v izvlečku in metode za določanje protibakterijskega učinka. Odvisna pa je tudi od sestave fenolov v izvlečku. Sagdic in sod. (2011a) so testirali učinek grozdnih tropin na mikrobiološko kvaliteto hamburgerja iz mletega govejega mesa. Mletemu mesu so dodali različne koncentracije izvlečkov in inokulirali patogene bakterije in kvarljivce. Število mikroorganizmov je pri vseh izvlečkih padlo, najbolj pa so bili inhibirani pri 10 % koncentraciji fenolnih izvlečkov. Protimikrobno učinkovitost fenolnih izvlečkov istih turških sort grozdja so testirali tudi proti bakterijama *S. aureus* in *E. coli* v zelenjavni juhi in ugotovili, da sta bili najbolj učinkoviti rdeči sorti proti obema bakterijama, vendar je bila bakterija *S. aureus* bolj občutljiva. Tudi v tej raziskavi sta bili bakteriji inhibirani pri 10 % koncentraciji fenolnih izvlečkov. Dodatek 10 % koncentracije fenolnih izvlečkov grozdnih tropin v zelenjavno juho se je na senzoričnem testu izkazal kot senzorično sprejemljiv (Sagdic in sod., 2012). Učinkovitost fenolnih izvlečkov grozdnih tropin so potrdili tudi *in vitro* in *in situ* (jabolčni in pomarančni sok) proti kvasovkam *Zygosaccharomyces rouxii* in *Z. bailii* (Sagdic in sod., 2011b).

2.3.2.1 Mehanizem protimikrobnega delovanja

Mehanizem protimikrobnega delovanja rastlinskih izvlečkov še ni popolnoma pojasnjen. Točno mesto delovanja protimikrobnih snovi običajno ni znano ali točno definirano, zelo

težko je tudi določiti točno specifično mesto delovanja, ker veliko reakcij poteka hkrati. V rastlinskih izvlečkih je tudi veliko različnih kemičnih spojin, ki delujejo na različna mesta znotraj celice oz. na membrani celice (Negi, 2012).

Inhibicija delovanja celične membrane

Polifenoli delujejo protibakterijsko na ta način, da z vezavo na membrano povzročijo motnje njenega delovanja in posledično uhajanje celične vsebine. Opazili so tudi veliko korelacijo med toksičnostjo in hidrofobnostjo različnih fenolnih spojin. Fenol povzroči spremembo delovanja membrane in vpliva na razmerje med proteini in lipidi na membrani ter sproži iztok kalijevih ionov.

Ikigai in sod. (1993) so preiskovali protibakterijske učinke epigalokatehin galata, katehina. Katehini so skupina flavonoidov, ki imajo večjo afiniteto do G⁺ kot do G⁻ bakterij in bolje delujejo v alkalnem kot kislem mediju (Nakayama in sod., 2012). V študiji so kot model bakterijske membrane uporabljali liposome in ugotovili, da je epigalokatehin galat povzročil uhajanje majhnih molekul iz znotrajceličnega prostora liposoma. Na podlagi tega so zaključili, da katehini primarno delujejo na bakterijsko membrano tako, da vplivajo na zunanjo polarno cono lipidnega dvosloja in povzročajo motnje delovanja membrane ali povzročijo zlitanje membrane in s tem uhajanje znotrajcelične vsebine. To teorijo so potrdili tudi Stapleton in sod. (2004), ki so z zamenjavo verig C₈ z C₁₀ povečali protibakterijski učinek izbranega flavan-3-ola.

Dokazali so tudi, da kvercetin (flavonol) povzroči povečano prepustnost notranje bakterijske membrane in zmanjšanje membranskega potenciala. Elektrokemijski gradient protonov na membrani je pomemben za vzdrževanje ATP sinteze, membranskega transporta in gibljivosti. Kvercetin naj bi z vplivanjem na prepustnost in potencial membrane vplival na celotno protibakterijsko učinkovitost in zmanjšal rezistenco na druge protibakterijske snovi. Dokazali so, da kvercetin in naringenin močno zmanjšata gibljivost bakterije, kar nakazuje na to, da je moten protonski gradient (Mirzoeva in sod., 1997).

Flavonoidi poleg perforacije povzročajo tudi zmanjšanje membranske fluidnosti, kar so dokazali Tsuchiya in sod. (2000). Soforaflavanon G je pri modelnih liposomih povzročil naraščanje fluorescenčne polarizacije, kar nakazuje na spremembo fluidnosti membrane na hidrofilnih in hidrofobnih delih. Zato so zaključili, da soforaflavanon G zmanjša fluidnost zunanjšega in notranjšega sloja membrane.

Arakawa in sod. (2004) so ugotovili, da epigalokatehin galat (EGKG) reagira z raztopljenim kisikom v vodni raztopini in tvori vodikov peroksid, kar poškoduje celično steno in membrano bakterij. EGKG ima tudi močno afiniteto do lipidnega dvosloja, ker se s pomočjo vodikove vezi veže na površino lipidnega dvosloja, nekateri manjši katehini pa celo prodrejo skozi membrano (Sirk in sod., 2008).

Flavonoli povzročajo tudi iztek kalijevih ionov skozi poškodovano membrano, kar so dokazali na bakteriji *S. aureus*. Bakterijo so 12 h inkubirali v mediju s flavonolom (galangin) in opazili 60- kratno zmanjšanje v številu CFU in 20 % manj kalija v primerjavi s kontrolo (Cushnie in Lamb, 2005b).

Inhibicija sinteze nukleinske kisline

Že leta 1997 so Bernard in sod. odkrili mehanizem inhibicije sinteze nukleinske kisline. Ugotovili so, da glikoliziran flavonol rutin inhibira topoizomerozo tip II v *E. coli*.

Gradišar in sod. (2007) so ugotovili, da katehini inhibirajo bakterijsko DNK girazo s tem, da se na podenoti giraze B vežejo na vezavno mesto ATP. Testirali so štiri vrste katehinov, med katerimi so bili najbolj aktivni epigalokatehin galat (EGKG), epikatehin galat (EKG) in epigalokatehin. Molekularni izračuni kažejo, da benzopirenski obroč EGKG prodre globoko do aktivnega mesta, medtem ko ga galoil molekula zasidra na razpoko v interakciji s hidroksilno skupino, kar tudi pojasni večjo aktivnost EGKG kot EKG.

Poročali so, da epigalokatehin-3-galat, ki je tudi prisoten v semenu grozdja, inhibira aktivnost dihidrofolat reduktaze. Ta folatni encim je ključen pri metabolizmu folata, ki je vključen v biosintezo pomembnih biomolekul, kot so nukleinske kisline, aminokisline, nevrotrosmeterji in S-adenozilmetion (Navarro Martinez in sod., 2005). Leta 2010 so Kao in sod. (2010) dokazali, da izvleček iz grozdnih pečk inhibira aktivnost dihidrofolat reduktaze in rast bakterije *S. aureus*. Opazili so tudi zmanjšanje znotrajcelične koncentracije tetrahidrofolata.

Inhibicija celičnega metabolizma

Haarguchi in sod. (1998) so preiskovali protimikrobni učinek flavonoida likokalcona A in B ter ugotovili, da ta dva flavonoida učinkovito inhibirata NADH-citokrom *c* reduktazo. Mesto inhibicije naj bi bilo med CoQ in citokrom *c* v bakterijski dihalni verigi. Thimothé in sod. (2007) so pokazali, da izvlečki fenolnih spojin grozdja (antocijanini in flavonoli) 70–85 % inhibirajo glukoziltransferazo B in C v bakteriji *Streptococcus mutans*. Opazili so tudi zmanjšano aktivnost F-ATPaze. Flavonoidi inhibirajo tudi ATP sintazo. Ugotovili so, da flavonoidi, med katerimi se je kot najbolj potenten izkazal morin, zavirajo F1-ATPazo kot tudi sintezo ATP v *E. coli* (Chinnam in sod., 2010).

2.3.3 Ekstrakcija fenolnih spojin iz grozdnih tropin

Prvi korak pri pridobivanju fenolnih spojin iz rastlin je ekstrakcija. Poznamo več ekstrakcijskih metod, najpogosteje se uporabljata ekstrakcija s topili in superkritična ekstrakcija (Ignat in sod., 2011). Izbrana ekstrakcijska metoda mora popolnoma ekstrahirati iskano spojino in ne sme povzročiti njene kemijske spremembe (Turkmen in sod., 2006). Ekstrakcija s topili je zelo uporabna, saj topilo predstavlja fizični nosilec pri

transportu tarčne molekule med različnimi fazami (npr. trdne, tekoče, pare) (Galanakis, 2012).

Veliko študij je dokazalo, da se vsebnost polifenolov razlikuje glede na polarnost topil (Trabelsi in sod., 2010). Po drugi strani pa je stabilnost različnih izvlečkov iz iste surovine odvisna od uporabljenega topila. Lahko pa se isti izvlečki zelo razlikujejo glede na njihove koncentracije antioksidantov in aktivnosti (Akowuah in sod., 2005). Posledično je topnost fenolnih spojin odvisna od vrste uporabljenega topila, stopnje polimerizacije fenolov in od interakcije fenolov z ostalimi sestavinami v surovinah ter oblikovanjem netopnega kompleksa (Trabelsi in sod., 2010). Učinkovitost ekstrakcije je odvisna tudi od procesnih pogojev. Na koncentracijo zelene sestavine v izvlečku pa vplivajo temperatura, razmerje med tekočino in trdno snovjo, pretok in velikost delcev. Poročali pa so tudi o vplivu časa trajanja ekstrakcije in stanju shranjevanja vzorcev (Ignat in sod., 2011).

Izkoristek, sestava in čistost pridobljenih fenolov iz rastlin je odvisna od kemijske sestave (enostavni ali sestavljeni fenoli), velikosti vzorca, ekstrakcijske metode, časa in pogojev shranjevanja ter prisotnosti motečih substanc (Cheng in sod., 2012). Čisti izvlečki fenolnih spojin vsebujejo mešanico različnih tipov fenolov, ki so različno topni v ekstrakcijskih topilih. Za pridobivanje polifenolov iz rastlinskega materiala se običajno uporabljajo topila kot so aceton, etilacetat, etanol, metanol, propanol, dimetilformamid, njihove mešanice in mešanice z vodo (Chavan in sod., 2001).

Pri metodi ekstrakcije s topili pa obstajajo tudi omejitve, kot so visoki stroški energije, povečana uporaba topil, visoke temperature in možno uničenje termolabilnih snovi ter ostanki topila v topljencu (Oliveira in sod., 2013).

Opravljenih je bilo veliko raziskav, ki so za ekstrakcijo bioaktivnih snovi uporabile mešanico vode z organskim/alkoholnim topilom. Prisotnost vode namreč poveča prepustnost celičnega tkiva in s tem povečanje masnega transporta z molekularno difuzijo, kot tudi pridobivanje vodotopnih bioaktivnih snovi (Cheng in sod., 2012). Aceton, etanol in metanol so topila, ki so se največkrat uporabljala pri ekstrakciji stranskih proizvodov vinarstva. V živilski industriji je etanol bolj uporaben, ker je bolj prijazen do okolja in ni toksičen, čeprav literatura navaja, da so ostala topila bolj učinkovita. Ostaja pomislek pri njihovi uporabi za ekstrakcijo izvlečkov, ki bi se uporabljali v živilstvu (Lapornik in sod., 2005; Yilmaz in sod., 2006).

Mešanica acetona in vode naj bi v primerjavi z ostalimi topili iz grozdnih pečk bolje ekstrahirala procianidine (Yilmaz in sod., 2006), metanol pa naj bi iz grozdnih pečk najbolje ekstrahirala katehine, epikatehine in epigalokatehine (Cheng in sod., 2012). Pri ekstrakciji antocianinov iz grozdne pulpe je bil metanol za 20 % bolj učinkovit od etanola (Ignat in sod., 2011). Bucić–Kojićeva s sod. (2009) je v svoji raziskavi dobila najboljše rezultate z uporabo 50 % etanola pri 80 °C, ki je iz grozdnih pečk najbolje ekstrahirala

katehin (45,11 %), epikatehin (34,34 %), procianidin B₂ (12,9 %), galno kislino, galokatehin in epikatehin galat.

2.4 FENOLI

Fenoli so sekundarni metaboliti v rastlinah. Sintetizirajo se preko fenilpropanoidne poti. Izraz fenol je kemijsko definiran kot substanca, ki je sestavljena iz aromatskega obroča, na katerega je vezana ena ali več hidroksilnih skupin, vključno s funkcionalnimi derivati. Polifenoli so spojine, ki vsebujejo več kot eno hidroksilno spojino, vezano na aromatski obroč. Večina fenolov v hrani ima več kot eno hidroksilno skupino, vezano na aromatični obroč. V živilih poznamo štiri glavne skupine fenolov – fenolne kisline, flavonoidi, lignani in stilbeni (Koyama in sod., 2012; Yu in Ahmedna, 2013).

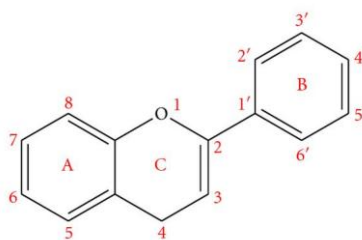
Skupna količina fenolov v vinu narašča tekom maceracije med katero poteka tudi fermentacija in s tem nastanek alkohola v drozgi. Najhitreje se ekstrahirajo derivati hidroksicimetnih in hidroksibenzojnih kislin, potem flavonoli in antocianini, najpočasneje se ekstrahirajo flavanoli oz. katehini in njihovi polimeri (procianidini in kondenzirani tanini). Ekstrakcija je odvisna od časa oz. trajanja kontakta s pečkami in kožicami (Jackson, 2008).

2.4.1 Flavonoidi

Flavonoidi so prisotni v vseh fotosintetskih celicah, najdemo jih v sadju, zelenjavi, oreščkih, semenih, steblih in cvetju, kot tudi v čaju, vinu, propolisu in medu. Flavonoidi so v cvetovih prisotni zato, ker so obarvani cvetovi privlačni za opraševalce. Liste naj bi varovali pred plesnijo in UVB-žarki (Cushnie in Lamb, 2005a).

Flavonoidi so največja in najbolj preučevana skupina polifenolov. Za flavonoide je značilna struktura C₆-C₃-C₆, sestavljena iz dveh fenolnih obročev (A in B), povezanih s centralnim piranovim obročem (C). Lahko se nahajajo v prosti obliki ali v polimerni obliki z ostalimi flavonoidi, sladkorji, neflavonoidi ali v kombinaciji le-teh. Na osnovi njihovih molekularnih struktur se delijo v sedem podskupin: flavoni, flavanoni, flavonoli, izoflavoni, antocianini, flavanoli (ali katehini oz. procianidini) in kalkoni. Obstaja še skupina flavonoidov, ki ni vključena v to klasifikacijo, to so proantocianidini (ali procianidini ali kondenzirani tanini). Flavonoidi prevladujejo v rdečih vinih, kjer predstavljajo več kot 85 % skupnih fenolov, medtem ko je količina flavonoidov v belih vinih manj kot 20 % skupnih fenolov. Ostalo predstavljajo v glavnem neflavonoidi, to so predvsem fenolne kisline, kot je kavna kislina (Jackson, 2008).

Flavonoidi so predmet številnih preučevanj. Dokazano imajo veliko pozitivnih učinkov, med drugim delujejo protivnetno, protimikrobno, antioksidativno, protialergijsko, protitumorno in inhibitorno za encime (Cushnie in Lamb, 2005a).



Slika 2: Osnovna struktura flavonoidov (Jackson in sod., 2011)
Figure 2: Basic flavonoid structure (Jackson et al., 2011)

2.4.1.1 Antocianini

Antocianini se v glavnem nahajajo v jagodni kožici. So odgovorni za rdečo in vijolično barvo, ki nastaja tekom zorenja v kožici rdečih sort. Antocianini obstajajo v grozdju kot glikozidi, flavonoid se veže s sladkorjem. Aglikoni se imenujejo antocianidini. Glikozidna vez poveča njihovo stabilnost in topnost. Klasifikacija antocianinov v osnovi temelji na mestu hidroksilne in metilne skupine na B-obroču antocianidina. Antocianini, ki se nahajajo v grozdju, so v glavnem 3-*O*-monoglikozidi in 3-*O*-acilirani monoglukozidi petih glavnih antocianidinov – delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina in malvidina. (Jackson, 2008; Monagas in Bartolome, 2009; Koyama in sod., 2012).

2.4.1.2 Flavanoli

Flavanole poznamo tudi pod imenom flavan-3-oli. Prisotni so v različnih rastlinskih tkivih, v grozdju se nahajajo predvsem v pečkah in kožici. Najpogostejši monomeri v grozdju so (+)-katehin in njegovi derivati, (-)-epikatehin in epikatehin 3-galat. V grozdju se nahaja še galokatehin, katehin 3-galat in galokatehin 3-galat. Oligomeri in polimeri flavanolov se imenujejo tudi kondenzirani tanini ali proantocianidini (Terrier in sod., 2009).

2.4.1.3 Flavonoli

Flavonoli so rumeni pigmenti, ki nastajajo od cvetenja do zgodjega razvoja jagod in tekom zorenja. V grozdju se nahajajo v kožici in listih, njihova funkcija je zaščita pred UV-žarki. Nekatere flavanole so odkrili tudi v pulpi, v pečkah pa ne. V celicah kožice se flavonoli nahajajo v vakuolah epidermisa in zunanega hipodermisa, kjer absorbirajo UV-žarke. V kožici rdečih vinskih sort je bilo odkritih pet glikonskih oblik flavanolov: kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-glukoronid, miricetin-3-glukozid, izoramnetin-3-glikozid in kempferol-3-glikozid. V kožicah belih sort so do sedaj odkrili kvercetin-3-glukoronid, kvercetin-3-glukozid in kempferol-3-glukozid. Vsebnost flavanolov v grozdju je odvisna od razvojne stopnje, genetskih in vplivov okolja. Glede na skupne fenole je vsebnost flavanolov med 1–10 %. Biosinteza flavanolov poteka med cvetenjem in zorenjem zaradi izpostavitve UV-žarkom (Vrhovšek, 1996; Jackson, 2008; Terrier in sod., 2009; Koyama in sod., 2012).

2.4.2 Neflavonoidi

V to skupino uvrščamo fenolne kisline (hidroksicimetne in hidroksibenzojske), hlapne fenole, stilbene in razne spojine, kot so lignani in kumarini. Neflavonoidi v grozdju se sintetizirajo iz fenilalanina (Jackson, 2008).

2.4.2.1 Fenolne kisline

Fenolne kisline delimo na hidroksicimetne in hidroksibenzojske kisline (Yu in Ahmedna, 2013).

Hidroksicimetne kisline

Hidroksicimetne kisline (HCK) so najpomembnejša skupina neflavonoidov, tako v rdečih kot tudi v belih vinih. Imajo C_6-C_3 skelet in formalno spadajo med fenilpropanoide. V grozdni jagodi se nahajajo v celični vakuoli kožice in pulpe, tekom mletja se zlahka izločijo. Medtem ko so v rdečih vinih najpogostejši fenoli flavonoidi, so HCK kisline najpomembnejši fenoli belih vin. Te kisline so v grozdju glavni fenoli grozdnega soka in zaradi tega glavni fenoli belega vina, pridelanega brez maceracije. Vina se lahko kar precej razlikujejo v vsebnosti HCK, na kar ima velik vpliv sorta in način vinifikacije. Grozdje vsebuje estre HCK kislin kavne, *p*-kumarne in ferulne kisline z vinsko kislino. Profil teh kislin v soku, pecljevini in pečkih je v večini primerov konstanten, pri čemer je značilna prevladujoča kaftarna kislina (več kot 50 %). Prostih kislin (kavna, *p*-kumarna in ferulna kislina) v grozdju ni, vendar se sprostijo zaradi esterazne aktivnosti med vinifikacijo (Vrhovšek, 1996; Rentsch in sod., 2009; Yu in Ahmedna, 2013).

Hidroksibenzojske kisline

So derivati benzojske kisline, za katere je značilna struktura C_6-C_1 . Glavne proste hidroksibenzojske kisline v vinu so galna, vanilinska, siringinska, najdemo pa še gentinsko kislino, *p*-hidroksibenzojsko kislino, protokatehujsko kislino in salicilno kislino (Rentsch in sod., 2009). Siringinska in vanilinska kislina se ekstrahirata iz jagodne kožice in celičnega soka, ne pa iz pečk (Vrhovšek, 1996).

Galna kislina

Galna kislina in njeni estri vsebujejo tri proste hidroksilne skupine, zaradi česar je ta kislina izredno močan antioksidant. Galna kislina je glavna hidroksibenzojska kislina, ekstrahira se iz grozdnih pečk. Ekstrakcija galne kisline je razmeroma počasna, višje vrednosti lahko dosežemo z daljšim maceriranjem (Vrhovšek, 1996).

2.4.2.2 Hlapni fenoli

Hlapni fenoli so v vinu prisotni v najmanjši koncentraciji. Imajo pa zaradi svojega vonja velik vpliv na senzorične lastnosti vina. Najbolj poznana med hlapnimi fenoli sta vinil in etilfenol (Rentsch in sod., 2009).

2.4.2.3 Stilbeni

Stilbeni se kot podskupina fenolnih spojin nahajajo v različnih rastlinah, sta pa grozdje in vino najpomembnejša vira teh spojin. Glavni stilbeni v rastlinah so resveratrol in njegovi derivati.

Resveratrol (3,5,4-trans-trihidroksistilben) je fitoaleksin, ki nastaja v listnem tkivu rastlin kot odgovor na stres, npr. mikrobo no okužbo in UV-žarke. Najdemo ga v pečkah in jagodni kožici ter v vinu. V rdečem vinu je zaradi maceracije prisoten v večji koncentraciji. Količina resveratrola je odvisna od sorte grozdja, vinogradniške tehnologije, geografske regije, klimatskih pogojev, okužbe s plesnijo, vinifikacije. Sintetizira se iz fenilalanina preko šikimske poti, pri tem sodelujejo trije encimi, katerih biosintezo sproži biotski ali abiotski stres (Fernandez-Mar in sod., 2012). V naravi se resveratrol nahaja v dveh izomernih oblikah (*cis*- in *trans*-konfiguraciji) v prosti in v β -glukokonjugirani obliki (Rentsch in sod., 2009).

2.5 BAKTERIJE

2.5.1 Značilnosti bakterij vrste *Bacillus cereus*

B. cereus je po Gramu pozitivna, sporogena, gibljiva, aerobna bakterija, ki dobro raste tudi v anaerobnih pogojih (Granum in Lund, 1997). Vegetativne celice so velikosti od 0,5 in 1,2 do 2,5 in 10 μ m v premeru. Optimalna temperatura rasti je od 25 do 37 °C, čeprav lahko termofilni in psihrofilni sevi rastejo pri visokih (75 °C) ali pri nizkih (3 °C) temperaturah. Nekatere vrste lahko rastejo tudi v alkalnih ali kislih medijih, od pH 2 do 10 (Granum, 2005). Večina sevov je katalaza pozitivnih, imajo peritrihe flagele, sporulirajo na zraku (Drobniewski, 1993).

B. cereus povzroča dve različni vrsti bolezni: diarealni in emetični sindrom. Prvi nastane največkrat 10 do 12 ur po uživanju mesne hrane, zelenjavnih jedi, sladice, omak in juh. Spremljajo ga lahko tudi dolgotrajne sluzno krvave driske. Hemolitični diarealni toksin (HBL) ali nehemolitični diarealni toksin (NHE) tvori bakterija med razmnoževanjem v tankem črevesu. Emetični toksin povzroča bruhanje eno do šest ur po zaužitju hrane, največkrat riža in testenin, če stoji hrana na sobni temperaturi in so ji dodana tudi jajca. V tem primeru gre za zastрупitev, saj se toksin tvori že v živilu (Godič Torkar, 2009).

2.5.2 Značilnosti bakterij vrste *Escherichia coli* O157:H7

E. coli so po Gramu negativne, nesporogene, paličaste bakterije, ki sodijo v družino *Enterobacteriaceae*. Večinoma so gibljive s peritrihimi flageli, lahko imajo kapsulo ali mikrokapsulo. *E. coli* so fakultativno anaerobne, kemoorganotrofne, optimum rasti imajo pri 37 °C. Prvi je bakterijo opisal Theodor Escherich, ki jo je izoliral iz otroškega blata (Smith in Fratamico, 2005). Nekateri sevi *E. coli* lahko imajo tudi fimbrije, ki jih je lahko od 100 do 1000, sodelujejo pa pri pritrjevanju bakterije na gostiteljsko celico, in pile, ki sodelujejo pri izmenjavi DNK med dvema bakterijama tekom konjugacije. Zunanja membrana nekaterih sevov je lahko prekrita s polisaharidno kapsulo, sestavljeno iz K antigenov (Schaechter, 2009). *E. coli* ima somatske 'O', flagelarne 'H' in kapsularne 'K' antigene, katerih kombinacije predstavljajo več serotipov (Adegoke, 2004).

Večina sevov *E. coli* je nepatogenih, ob zmanjšani odpornosti gostitelja, pomanjkljivem imunskem odzivu ali ob vstopu v telesne predele, kjer običajno ni mikrobov, pa lahko povzročajo oportunistične okužbe (Berce in sod., 2008). Nevirulentni sevi *Escherichie coli* so del normalne črevesne flore debelega črevesa, kjer s svojo prisotnostjo zavirajo rast patogenih bakterij. Virulentni sevi povzročajo različne infekcijske bolezni, meningitis, najpogosteje okužbe sečil in prebavnega trakta (Blatnik in sod., 2002). Seve, ki povzročajo črevesne okužbe, delimo v različne skupine predvsem glede na klinično sliko bolezni, ki jo povzročajo, in specifične virulentne dejavnike. Te skupine so: enteropatogene (EPEC), enterotoksigene (ETEC), enteroinvazivne (EIEC), enteroagregativne (EAaggEC), difuzno adherentne (DAEC) in *E. coli*, ki izdelujejo šigove toksine (STEC) ali verocitotoksine (VTEC). Med slednje sodijo tudi enterohemoragične *E. coli* (EHEC) (Berce in sod., 2008). EHEC *E. coli* serotip O157:H7 je zelo patogena, leta 1982 je bila prvič opisana kot povzročiteljica krvave driske pri človeku. Vir okužbe je pogosto goveje meso, ker je govedo naravni nosilec verotoksične bakterije *E. coli*. Pomemben izvor okužbe so navzkrižno kontaminirana živila – prenos bakterije s primarno okuženega na še neokuženo živilo (Blatnik in sod., 2002).

2.5.3 Značilnosti bakterij vrste *Listeria monocytogenes*

Rod *Listeria* sodi v družino *Listeriaceae* in red *Bacillales* (Liu in Zhang, 2011). *L. monocytogenes* je majhna, po Gramu pozitivna, nesporogena, gibljiva, fakultativno anaerobna, paličasta bakterija. Je katalaza pozitivna, oksidaza negativna bakterija, ki se prenaša s hrano in izloča hemolizin, ki povzroča uničenje rdečih krvnih celic. Raste pri temperaturi med -0,4 in 50 °C. Pri temperaturi nad 60 °C je uničena (Xi in sod., 2011). Bakterija ima 1 do 5 flagel, ki ji dajejo gibljivost pri nizkih temperaturah (20 °C). Mnogo listerij je pri 37 °C negibljevih zaradi pomanjkanja izražanja flagelina pri tej temperaturi. Zelo dobro se upira ekstremnim pogojem, lahko raste pri pH 4,5 do 9 in pri 10 % NaCl, vendar je optimalna temperatura rasti pri nevtralnem pH in 0,5 % NaCl (Dortet in sod., 2009).

Je ubikvitarna bakterija, saj jo najdemo povsod v okolju, v zemlji, vodi, rastlinah, živalih, izolirali so jo tudi iz silaže, mleka, odplak in iztrebkov različnih domačih ter divjih živali. Z *L. monocytogenes* so lahko kontaminirana številna živila, nepasterizirano mleko in mlečni izdelki, surovo sadje in zelenjava, meso, ribe, perutnina in hitro pripravljena hrana (Farber in Peterkin, 1991). Bakterijo je prvič opisal E. G. D. Murray leta 1926 na osnovi šestih primerov nenadne smrti pri mladih zajcih (Kramer in Jones, 1969).

L. monocytogenes povzroča invazivno infekcijo listeriozo. Je zoonoza, ki je razširjena po vsem svetu. V Sloveniji je redko prijavljena nalezljiva bolezen (Poročilo o zoonozah ..., 2011), obolevajo predvsem nosečnice, starostniki, novorojenčki in imunokompromitirani bolniki. Običajno se listerioza ne pojavlja v epidemični obliki, ampak posamično (Dortet in sod., 2009).

2.5.4 Značilnosti bakterij roda *Salmonella* spp.

Rod *Salmonella* sodi v razred *Enterobacteriaceae* in red *Enterobacteriales*. Po Gramu so negativne, nesporogene, paličaste bakterije (velikosti od 0,5 μm do 1–3 μm). Fakultativno anaerobne, katalaza-pozitivne, oksidaza-negativne, običajno gibljive s pomočjo peritrihih flagelov. Rastejo pri temperaturi od 5 °C do 47 °C, optimalna temperatura je pri 37 °C. So toplotno občutljive, temperatura pasterizacije jih uniči. V zamrznjeni hrani število živih salmonel upada počasi, s padanjem temperature pada tudi število bakterij. Minimalna a_w za rast je okoli 0,93, vendar celice preživijo tudi v posušeni živilih (Adams in Moss, 2008). Optimalni pH za rast je 7, bakterija pa raste med pH 4 in 9. Težko prenašajo višjo koncentracijo NaCl, več kot 9 % NaCl deluje baktericidno (Jay in sod., 2005).

Poznanih je okoli 2400 serotipov, vse pa so razdeljene med dve vrsti, *S. enterica* in *S. bongori* (Jay in sod., 2005). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis je eden glavnih povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo s hrano. Od ostalih sevov se razlikuje po sposobnosti direktne okužbe piščančjih rumenjakov, še preden nastane jajčna lupina (Agron in sod., 2001). V Sloveniji so pri ljudeh leta 2010 daleč najpogosteje izolirali serovar Enteritidis (53 %), nato pa še serovare Typhimurium (12,7 %), Coeln (5,8 %), Mbandaka (3,5 %) in nekatere druge (25 %). V letu 2010 je bilo v Sloveniji prijavljenih 347 primerov salmoneloze pri ljudeh (Poročilo o zoonozah ..., 2011).

Primarni habitat bakterije je prebavni trakt živali, kot so ptice, plazilci, domače živali, občasno insekti in tudi človek (Jay in sod., 2005). Človek se običajno okuži po fekalno-oralni poti. Najpogosteje so vir okužbe premalo toplotno obdelano meso, mleko, jajca, lahko pa navzkrižno kontaminirajo že pripravljeno hrano (Adams in Moss, 2008).

2.5.5 Značilnosti bakterij vrste *Staphylococcus aureus*

Rod *Staphylococcus* sodi v družino *Micrococcaceae*. Do danes je poznanih 53 vrst in podvrst rodu *Staphylococcus*. *S. aureus* je po Gramu pozitivna, fakultativno anaerobna, negibljiva, nesporogena bakterija, ki ima obliko koka. Lahko se pojavljajo samostojno, v

parih ali v skupkih podobnih grozdu. Optimalna temperatura rasti je 37 °C, čeprav lahko raste med 6 in 48 °C. Lahko raste pri pH od 4,2 do 9,3, optimalna pH vrednost je od 7 do 7,5. V primerjavi z ostalimi mezofilnimi bakterijami lahko raste pri a_w vrednostih nižjih od 0,86, v prisotnosti NaCl in saharoze celo pri 0,83. *S. aureus* je zelo odporen na zamrzovanje, saj lahko preživi v zamrznjenih živilih pri temperaturi do –20 °C. Odporen je tudi na sušenje (Seo in Bohach, 2010).

Stafilokoki so ubikvitarni mikroorganizmi, saj jih najdemo v zraku, prahu, odplakah, vodi, mleku in v veliko živilih in živilski opremi. Primarni rezervovar bakterije pa sta človek in živali. *S. aureus* najdemo na sluznici v nosu pri 30 % populacije (Seo in Bohach, 2010).

S. aureus je pomemben patogen, zaradi svoje invazivnosti, rezistence na antibiotike in izločanja toksinov. Pri človeku lahko poleg različnih okužb (predvsem gnojne okužbe kože in notranjih organov) povzroči tudi zastupitve z živili. Stafilokokno zastupitev s hrano lahko povzročijo tiste vrste *S. aureus*, ki izločajo enterotoksine. Poznanih je okoli 14 različnih vrst stafilokoknih enterotoksinov (SE). SE so kratki proteini, ki se izločajo v medij, so topni v vodi in slanah raztopinah. So zelo stabilni in odporni na večino proteolitičnih encimov, kot sta pepsin in tripsin, in zato tudi aktivni v prebavnem traktu. SE so visoko toplotno stabilni, če so prisotni v majhni koncentraciji, jih sterilizacija uniči (Le Loir in sod., 2003).

S. aureus se je sposoben genetsko prilagoditi in pridobiti odpornost na težke kovine, protimikrobne snovi, konzervanse. V živilstvu je zelo problematičen, saj se je zaradi osmotolerance sposoben razrasti v živilih z nizko a_w vrednostjo, kjer je zaustavljena rast ostalih patogenih bakterij (Seo in Bohach, 2010). Živila, v katerih najdemo *S. aureus*, so surovo in predelano meso, surovo mleko in mlečni izdelki, perutnina, jajca, pekarski izdelki, pripravljena živila (solate, majoneza, kremne sladice, sladoled). Glavni vir zastupitve s hrano je človek, ki je lahko koloniziran z bakterijo in pri pripravi hrane ne upošteva osnovnih higienskih načel (Le Loir in sod., 2003).

2.5.6 Vplivi izvlečkov fenolnih spojin na patogene bakterije

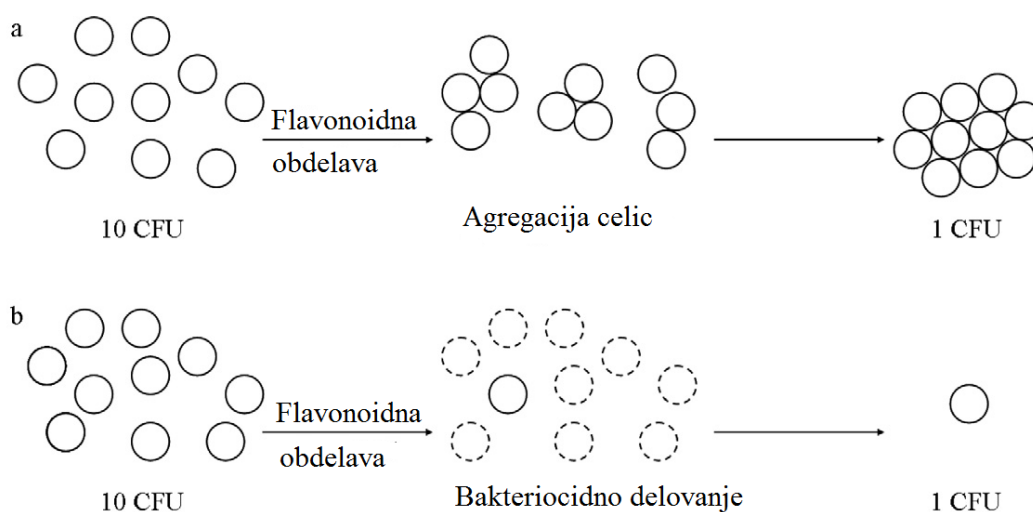
Fenolne spojine so ponavadi bolj učinkovite proti po Gramu pozitivnim kot po Gramu negativnim bakterijam. Zunanja membrana Gram negativnih bakterij (*E. coli* in *Salmonella*) je zaradi prisotnosti lipopolisaharidnih molekul hidrofilna. Majhni hidrofilni topljenci lahko prehajajo zunanjo membrano skozi proteinske porinske hidrofilne kanalčke. Po drugi strani pa zunanja hidrofilna membrana predstavlja oviro za prehod makromolekul in hidrofobnih substanc. Zunanja membrana pa ni čisto neprepustna za hidrofobne molekule, nekatere lahko počasi prehajajo skozi porine. Prepustnost zunanje membrane pa je predpogoj za protimikrobno delovanje. Protimikrobno delovanje je potrebno preizkusiti tudi v živilu, zato ker so nizko molekularne lipofilne spojine, kljub njihovi omejeni topnosti v vodi, sposobne penetrirati G– bakterije in vplivati na njihovo razmnoževanje v prehrani (Kotzekidou in sod., 2008). Nohynek in sod. (2006) so v svoji raziskavi

demonstrirali, da lahko galna kislina učinkovito prehaja zunanjo membrano bakterije *Salmonella* in na osnovi kelacije divalentnih kationov povzroči njen razpad.

Že leta 1996 so Ramos-Nino in sod. ugotovili, da lipofilnost in stopnja ionizacije fenolnih kislin določa njihovo učinkovitost proti listeriji. Zunanja in notranja membrana bakterije je hidrofilna, notranjost pa hidrofobna, zato na prehod spojine skozi lipidni dvosloj vpliva njena lipofilnost. Majhne molekule kislin lahko lažje prehajajo membrano v primerjavi z večjimi molekulami, kar razlaga večji inhibitorni učinek benzojske in protokatehulne kisline proti patogenim bakterijam. Večje molekule, kot sta flavanola epikatehin in katehin, se lahko tekom inkubacije oborijo in tako zmanjšajo učinkovitost. Vzrok za zgodnjo inhibicijo patogenih bakterij s fenolnimi spojinami oz. njihovo slabo protimikrobno aktivnost proti koncu inkubacije je lahko zmanjšanje aktivnosti fenolov ali razvitje rezistence patogenih bakterij na fenolne spojine tekom rasti (Ravichandran in sod., 2011). Rodriguez Vaquero in sod. so leta 2007 objavili članek, ki to tezo potrjuje. Preizkušali so učinek čistih fenolnih spojin na rast *L. monocytogenes* in ugotovili, da dosega kavna kislina večji inhibitorni učinek na njeno rast. Hidroksicimetne kisline so zaradi propenoidne stranske verige manj polarne kot hidroksibenzojne kisline.

Izvedenih je bilo nekaj študij, v katerih so primerjali minimalne inhibitorne koncentracije fenolnih izvlečkov proti številnim sevom vrst *S. aureus*, *B. cereus* in *E. coli* (še posebej STEC), izoliranih iz različnih vrst živil in z različnimi virulentnimi sevi (*S. aureus* in STEC). Večina študij o učinkovitosti fenolnih izvlečkov proti tem bakterijam je uporabila samo en ali dva referenčna seva. Nedavno so izpostavili, da so lahko značilnosti rasti ali odmiranja bakterij med vrstami ali celo sevi iste vrste zelo različne (Gutiérrez-Larraínzar in sod., 2012). Potrebne so nadaljnje študije, ki bi primerjale rasti in odmiranja bakterij različnih sevov iste vrste bakterij.

Z naraščajočim številom imunokompromitiranih bolnikov narašča tudi interes identifikacije bakteriocidnih spojin in ne le tistih, ki inhibirajo rast bakterij. Veliko raziskovalcev poskuša s spremljanjem bakterijskega odmiranja določiti, ali fenoli delujejo bakteriocidno ali bakteriostatično. Te metode so bile pri testiranju protimikrobne učinkovitosti flavonoidov velikokrat uporabljene in pogosto je bilo ugotovljeno bakteriocidno delovanje. Študije z modelnimi membranami nakazujejo, da flavonoidi povzročajo agregacijo, ta učinek na bakteriji so s flavonolom galanginom tudi dokazali. Poleg galangina naj bi agregacijo povzročal tudi epikatehin galat. Posledično konvencionalne metode niso zadostne pri ugotavljanju bakteriocidnega delovanja flavonoidov. Zmanjšanje števila CFU je lahko posledica združevanja celic in ne celične smrti (Cushnie in Lamb, 2011b).



Slika 3: Dva mehanizma, pri katerem lahko flavonoidi zmanjšajo število CFU bakterij (Cushnie in Lamb, 2011b)

Figure 3: Two mechanisms by which flavonoids may reduce colony-forming unit (CFU) numbers of bacteria in time-kill (Cushnie and Lamb, 2011b)

2.5.7 Vpliv zunanjih dejavnikov na protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin

Na splošno je protimikrobna učinkovitost rastlinskih izvlečkov odvisna od njihove kemijske strukture in koncentracije sestavin. Za uporabo rastlinskih izvlečkov za nadzor nad patogenimi organizmi in kvarljivci je potrebno oceniti njihovo učinkovitosti proti tem organizmom in določiti vpliv na senzorične lastnosti hrane. Večina raziskav, ki so ugotovljale protimikrobno učinkovitost izvlečkov, je bilo narejenih v *in vitro* pogojih v laboratorijskem mediju, posledično njihova učinkovitost v živalskih sistemih ni dobro raziskana. Glavna področja nadaljnjega raziskovanja uporabe naravnih protimikrobnih snovi v hrani so uporaba točno določenega mikroorganizma, smiselna uporaba kombinacij učinkovin za doseganje njihovega sinergističnega delovanja v različnih pogojih obdelave in skladiščenja živil (Tiwari in sod., 2009).

Različne sestavine hrane lahko bistveno spremenijo protimikrobno učinkovitost izvlečkov. Na učinkovitost lahko vpliva prisotnost maščob, ogljikovih hidratov, koncentracija proteinov, soli in različne vrednosti pH (Holley in Patel, 2005). Nizka vrednost pH namreč poveča hidrofobnost eteričnega olja in s tem se poveča njegova topnost na celični membrani bakterij. Pomemben dejavnik je tudi dostopnost vode. Nižja dostopnost vode zmanjša protimikrobno delovanje eteričnih olj. Izziv za praktično uporabo izvlečkov je razviti optimalno kombinacijo z majhno koncentracijo izvlečka, ker lahko visoke koncentracije vplivajo na senzorične lastnosti, s čimer postane izdelek neuporaben. Izdelek mora biti varen, z zadovoljivim rokom trajanja in tudi cenovno dostopen (Tiwari in sod., 2009).

2.7 INKAPSULACIJA

Mikroinkapsulacija je tehnologija pakiranja trdnih snovi, tekočin, plinov v majhne, zaprte kapsule, ki lahko v posebnih pogojih nadzorovano sprostijo vsebino. Cilj inkapsuliranja je zaščita osnovne surovine pred neželenimi vplivi iz okolja, kot so svetloba, vlaga, kisik. S tem se podaljša obstojnost proizvodov. Drugi cilj inkapsulacije je nadzorovano sproščanje vsebine inkapsulata (Fang in Bhandari, 2010). Inkapsulacija je lahko definirana tudi kot proces, kjer se aktivna substanca ujame znotraj druge substance (Nedović in sod., 2011).

V živilstvu se inkapsulacija lahko uporablja za:

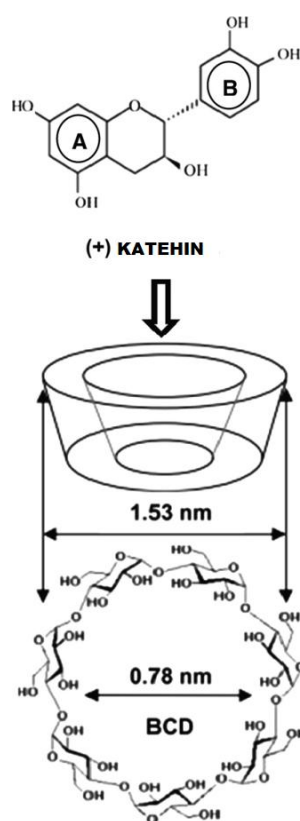
- zaščito osnovne surovine pred razgradnjo, s tem da zmanjša njegovo reagiranje z zunanjim okoljem;
- zmanjšanje izhlapevanja ali prenosa osnovne surovine v okolje;
- spremembo fizikalnih lastnosti osnovne surovine za lažje ravnanje;
- počasnejše sproščanje surovine ali sproščanje ob točno določenem času;
- prikritje nezaželenih okusov ali arome;
- ločevanje sestavin, ki bi sicer medsebojno reagirale (Desai in Park, 2005).

Inkapsulacija je v živilstvu zelo uporabna metoda, ker izboljša prenos bioaktivnih molekul (antioksidantov, mineralov, vitaminov, fitosterolov, luteina, maščobnih kislin, likopena) in živih celic (npr. probiotikov) v živilo (Nedović in sod., 2011).

2.7.1 Metode inkapsulacije

Poznanih je več različnih metod inkapsulacije, v živilstvu se v glavnem uporabljajo sušenje z razprševanjem, hlajenje z razprševanjem, centrifugalna ekstruzija, koacervacija, kokristalizacija, nanukapsulacija, emulgiranje, procesi vgradnje (v liposome, ciklodekstrine, celice kvasa) (Fang in Bhandari, 2010).

Pri metodi s procesom vgradnje se molekularna vgradnja doseže z uporabo ciklodekstrinov (slika 4). Ciklodekstrini (CD) so ciklični oligosaharidi, kjer so molekule glukoze povezane z α (1→4) glikozidnimi vezmi in tvorijo cilindrično strukturo (Ratnasooriya in Rupasinghe, 2012). Zunanji del ciklodekstrinske molekule je hidrofilni, notranji pa hidrofobni, zaradi tega so CD primerni medij za inkapsuliranje manj polarnih molekul (Fang in Bhandari, 2010).



Slika 4: Vgradnja katehina v β -ciklodekstrin (Krishnaswamy in sod., 2012)

Figure 4: Molecular inclusion of catechin with beta-cyclodextrin (Krishnaswamy et al., 2012)

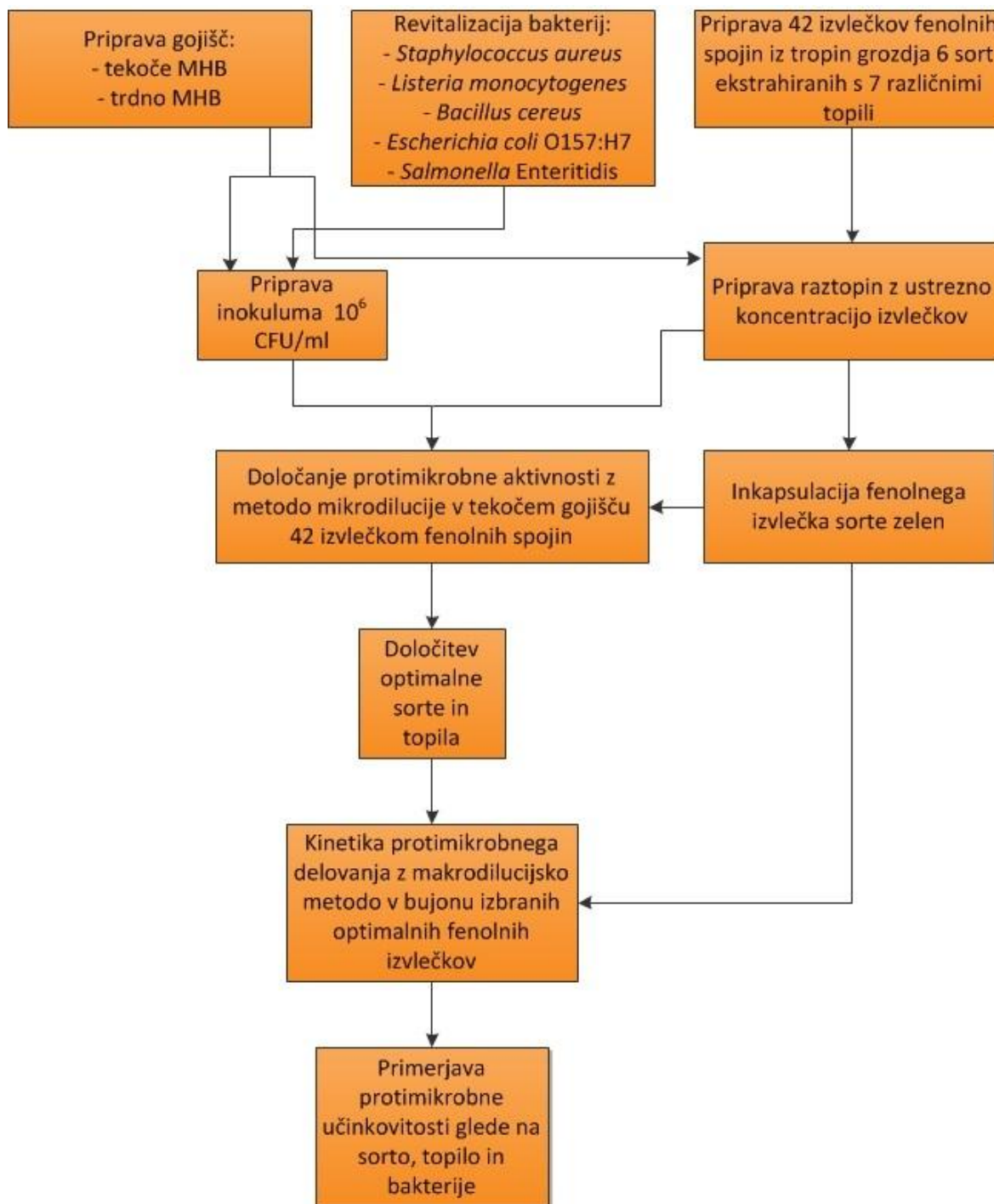
Naravni polifenoli so zaradi svojih lastnosti zelo zanimivi, vendar so v svoji prosti obliki zelo slabo topni v vodi. Veliko polifenolov ima neprijeten okus, ki ga je treba pred dodatkom v živila ali v peroralna zdravila prikriti. Odmerek fenolne spojine je potrebno uporabiti v takšni obliki, ki bo obdržala strukturno obliko polifenolov do njihove zaužitve ali uporabe, prikrila okus, povečala topnost v vodi in biorazpoložljivost ter ohranila ali celo izboljšala dostopnost bakterijam. Med obstoječimi stabilizacijskimi metodami je inkapsulacija zelo primerna (Munin in sod., 2011).

K večji obstojnosti fenolov v rastlinskih izvlečkih med skladiščenjem, termično obdelavo in prehodom skozi prebavni trakt, kot tudi ohranitvi ali celo povečanju protimikrobne učinkovitosti, lahko prispeva inkapsulacija v ustrezne ovojnice. Opravljene so bile raziskave, ki so testirale protimikrobno učinkovitost pred in po inkapsulaciji. Piercey in sod. (2012) so dokazali, da je alil izotiocianat, učinkovina iz semena gorčice, po inkapsulaciji v beta ciklodekstrin bolj učinkovita proti bakterijam *E. coli* in *L. monocytogenes* ter plesni *Penicillium expansum*. Arana-Sanchez in sod. (2010) so dokazali, da je inkapsulacija eteričnega olja origana v beta ciklodekstrin ohranila protimikrobno in povečala antioksidativno učinkovitost. Prav tako je inkapsulacija izvlečka *Origanum dictamnus* v liposom povečala protimikrobno in antioksidativno učinkovitost (Gortzi in sod., 2007).

Ravichandran in sod. (2011) so raziskovali inhibitorni učinek nanodelca-inkapsuliranega 1 % izvlečka grozdnih semen in 1 % jabolčne kisline, na bakterije *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* in *E. coli* O157:H7. Nanodelci so pokazali učinkovito inhibitorno delovanje proti *L. monocytogenes* pri 72 h (zmanjšanje za 5,5 log CFU/mL) in podobno zmanjšanje pri *E. coli* ter *S. Typhimurium* (5,2 in 4,9 log CFU/mL).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 5: Shema poteka eksperimentalnega dela
Figure 5: Scheme of experimental work

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizmi

Pri našem raziskovalnem delu smo uporabili 5 različnih sevov bakterij in sicer tri po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* in *Staphylococcus aureus* ter dve po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* O157:H7 in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (preglednica 3).

Preglednica 3: Bakterijski sevi

Table 3: Bacterial strains

Oznaka seva	Vir seva
<i>Bacillus cereus</i> ŽMJ164	WSBC-10530 – klinični sev
<i>Listeria monocytogenes</i> ŽM58	živilski sev
<i>Staphylococcus aureus</i> ŽMJ343	klinični sev
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ŽM370	klinični izolat
<i>Salmonella</i> Enteritidis ŽM351	živilski sev

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Tekoče gojišče Mueller Hinton broth (MHB)

Sestavine:

- MHB (Oxoid, CM0405, Anglija)
- dH₂O

Priprava:

V 1000 ml steklenico smo natehtali 10,5 g osnovnega medija in ga raztopili v 500 mL dH₂O. V epruvete smo odpipetirali 4, 5 in 10 mL tako pripravljenega gojišča ter preostanek prelili v 250 mL steklenico. Epruvete in steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C. Po steriliziranju smo gojišče ohladili na sobno temperaturo in ga hranili v hladilniku pri 4 °C.

Uporaba:

Gojišče odmerjeno v epruvete po 4 mL smo uporabili za revitalizacijo kultur *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis in *Escherichia coli* O157:H7. Gojišče odmerjeno v epruvete po 5 in 10 mL smo uporabili za pripravo inokuluma, tekoče gojišče v steklenici pa smo uporabili za pripravo potrebnih koncentracij izvlečkov in kot gojišče pri mikrodiluciji ter pri krivuljah rasti/odmiranja.

3.2.2.2 Trdno gojišče Mueller Hinton agar (MHA)

Sestavine:

- MHA (Oxoid, CM0337, Anglija)
- dH₂O

Priprava:

V 1000 mL steklenico smo natehtali 19 g osnovnega medija in ga raztopili v 500 ml dH₂O. Steklenico s sestavinami smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C, nato smo sterilizirano gojišče v inkubatorju ohladili na 45 °C in ga aseptično razlili v sterilne petrijevke. Ohlajene petrijevke smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Uporaba:

Gojišče smo uporabili za precepljanje vseh kultur, da so bile vsak teden sveže, za določanje koncentracije celic v inokulumu in pri krivulji rasti/odmiranja.

3.2.3 Raztopine in dodatki

3.2.3.1 Fiziološka raztopina

Sestavine za pripravo fiziološke raztopine KH₂PO₄:

- KH₂PO₄ (Kemika, 11161, Hrvaška)
- destilirana voda

Priprava: 3,4 g KH₂PO₄ smo raztopili v 100 mL destilirane vode in umerili pH na 7,2 ter tako dobili osnovno raztopino. 1,25 mL te osnovne raztopine smo odpipetirali v 1000 mL destilirane vode, dobro premešali in razdelili v dve steklenici po 500 mL ter sterilizirali 15 min na 121 °C.

3.2.3.2 Druge kemikalije

- absolutni etanol (Merck, 1.00983.100, Nemčija)
- bakterijski rastni indikator: p-iodo-nitro-tetrazolium violet – INT (Sigma, Švica)
- destilirana voda

3.2.4 Izvlečki fenolnih spojin grozdnih tropin

V našem eksperimentu smo testirali izvlečke fenolnih spojin iz tropin grozdja 6 sort iz Vipavske doline, avtohtone bele sorte zelen ter sorti rebula in sauvignon, modri pinot, cabernet sauvignon in merlot. Izvlečke fenolov iz tropin smo pripravili iz vsake navedene sorte tako, da smo jih izpostavili ekstrakciji s sedmimi različnimi topili, kar je predstavljeno tudi v nadaljevanju. Kot topila smo uporabljali:

- voda : metanol = 75 : 25 (v : v)
- voda : metanol = 50 : 50 (v : v)
- voda : metanol = 25 : 75 (v : v)
- metanol
- voda : etanol = 50 : 50 (v : v)
- etanol
- metanol : etanol = 50 : 50 (v : v)

Izvečke so pripravili in kemijsko okarakterizirali v Centru za raziskave vina na Univerzi v Novi Gorici.

Med trgatvijo 2010 so bili na različnih lokacijah v Vipavski dolini odvzeti vzorci tropin različnih sort grozdja. Grozdje je bilo obdelano s tipičnimi tehnološkimi postopki maceracije in fermentacije za posamezno sorto. Tako je bilo grozdje sorte zelen in sauvignon po mletju v stiku s kožicami najkrajši čas (2 uri), ostale sorte pa so bile izpostavljene maceraciji malce dlje Tako je bilo grozdje rebula predelano po postopku podaljšane maceracije (14 dni), rdeče sorte pa so bile v stiku s kožicami do konca fermentacije (10 dni) (Trošt in sod., 2011).

Vzorčene tropine (kožice in pečke) smo zamrznili in jih v roku 24 ur izpostavili liofilizaciji. Liofilizati so na nadaljno obravnavo čakali v zmrzovalniku na -20 °C.

3.2.4.1 Priprava testnih raztopin izvlečkov fenolov tropin:

- etanol
- liofilizirani izvlečki v falkonkah z znano koncentracijo fenolov (mg GAE/g suhe snovi liofiliziranih izvlečkov tropin)
- žlička

Liofilizirane izvlečke fenolov tropin smo najprej mehansko zdrobili z žličko in jih raztopili v 50 % etanolu do koncentracije 6 mg GAE/mL. Izvlečke smo poskusili topiti tudi z absolutnim etanolom, vendar se liofilizirani izvlečki niso popolnoma raztopili. Raztopine so bile tudi motne, zato smo se odločili, da vse izvlečke topimo s 50 % etanolom, saj so se vsi lepo raztopili.

3.2.5 Opis postopka priprave fenolnih izvlečkov iz tropin

Po prešanju so bile tropine (kožice in pečke) liofilizirane in zmlete in dispergirane v topilih z različno polarnostjo. Za ekstrakcijska topila so bile izbrane mešanice metanola in vode, etanola in vode ter acetona in metanola v volumskih razmerjih, ki so bili opisani že prej (točka 3.2.4). Ekstrakcija je potekala iz 0,5 g liofilizata tropin z 10 mL ekstrakcijskega topila. Postopek ekstrakcije je bil preverjen na tropinah sorte zelen in je potekal do konstantne koncentracije po postopku: dvakratno premešanje in 40 minutno soniciranje v ultrazvočni kopeli, stabilizacija preko noči na 4 °C ter ponovitev dvakratnega mešanja in

soniciranja. Po končani ekstrakciji so bili vzorci centrifugirani, 4 mL supernatanta je bilo raztopljeno do 40 mL z deionizirano vodo, zamrznjeno na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in liofilizirano do trdnega ostanka. Tako pripravljenemu fenolnemu izvlečku je bila izmerjena vsebnost skupnih fenolov (Waterhouse, 2002) in glede na rezultat so bili ti vzorci redčeni na delovno koncentracijo 6 mg/mL skupnih fenolov (SF), ki smo jih izrazili kot mg galno kislino (GAE/mL) (Trošt in sod., 2011).

3.2.6 Določitev vsebnosti fenolnih spojin v izvlečku

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v izvlečku je bila določena z uporabo Folin-Ciocalteu metode (Waterhouse, 2002). Kolorimetrična določitev skupnih fenolov temelji na redukciji Folin-Ciocalteu reagenta, ki je mešanica tungstenovih in molibdenovih oksidov. Reducirana oblika kovinskih oksidov je izrazito modre barve in jo lahko detektiramo pri 765 nm. 20 μL vzorca ali raztopine galne kisline smo redčili z 1,58 mL vode. Mešanici smo dodali 100 μL FC reagenta (MERCK, Nemčija). Inkubacija je potekala 5 minut. Sledil je dodatek 300 μL nasičene raztopine natrijevega karbonata (Sigma, Nemčija). Inkubacija je potekala 2 uri. Koncentracijo skupnih fenolov v pridobljenih izvlečkih smo izrazili kot ekvivalent galne kisline (mg GAE/g) suhe snovi tropin (Trošt in sod., 2011).

3.2.7 Vrednosti za skupno vsebnost fenolnih spojin

Rezultati vsebnosti skupnih fenolov (SF) so prikazani v preglednici 4 in 5. Prikazali smo dva različna načina izražanja vrednosti SF rastlinskega materiala, ki smo ga uporabili v naši raziskavi. V preglednici 4 so prikazane vrednosti SF izvlečkov fenolov tropin izraženih kot mg GAE/g suhe snovi izvlečkov. V preglednici 5 so prikazani SF liofiliziranih tropin; kot mg GAE/g liofiliziranih tropin (FDSS) (suha snov tropin). Vrednosti iz obeh preglednic smo uporabili pri preračunavanju vrednosti MIK iz mg GAE/mL gojišča v MIK v g izvlečka/L gojišča (poglavje 4.3) in v MIK v g FDSS/L gojišča (poglavje 4.2). V preglednici so prikazane povprečne vrednosti treh ekstraktij.

Vrednosti za posamezne skupine fenolnih spojin, ki jih je določil Kajetan Trošt iz Univerze v Novi Gorici, so podane v prilogah C in D. Kajetan Trošt je tudi pripravil izvlečke, opravil meritev SF in naredil analizo antioksidativne aktivnosti (priloga A).

Preglednica 4: Koncentracija SF v izvlečkih fenolnih spojin iz tropin grozolja 6 sort, ekstrahiranih s 7 različnimi topili (v : v) izraženih kot mg GAE/g suhe snovi izvlečka (Trošt in sod., 2011)

Table 4: Total phenolic content of the dry phenolics extracts in 6 different varieties, extracted with 7 extraction media (v : v) expressed in mg GAE/g of dry exstrakt (Trošt et al., 2011)

SF (mg GAE/g suhe snovi izvlečka)						
	zelen	sauvignon	rebula	cabernet sauvignon	merlot	modri pinot
voda : metanol = 75 : 25	46,9	53,9	126,6	123,7	143,6	205,2
voda : metanol = 50 : 50	73,5	72,9	273,5	248,0	310,5	355,2
voda : metanol = 25 : 75	81,0	67,3	359,2	248,6	348,2	363,4
metanol	73,4	67,8	174,1	162,0	222,8	272,5
voda : etanol = 50 : 50	82,5	93,4	277,3	249,6	304,7	316,3
etanol	97,6	72,7	200,4	151,0	228,5	281,7
metanol : aceton = 50 : 50	90,0	79,8	176,9	171,6	220,7	263,7

Preglednica 5: Koncentracija SF liofiliziranihtropin (FDSS) grozolja 6 sort, ekstrahiranih s 7 različnimi topili (v : v), izraženih kot mg GAE/g FDSS (Trošt in sod., 2012)

Table 5: Total phenolic content of the phenolics extracts from freeze dried skins and seeds (FDSS) in 6 different varieties (v : v), extracted with 7 extraction media expressed in mg GAE/g FDSS (Trošt et al., 2012)

SF (mg GAE/g FDSS)						
	zelen	sauvignon	rebula	cabernet sauvignon	merlot	modri pinot
voda : metanol = 75 : 25	17,89	26,94	14,77	15,16	20,14	33,85
voda : metanol = 50 : 50	24,02	35,69	28,56	28,44	35,43	54,10
voda : metanol = 25 : 75	29,07	32,02	24,82	27,82	35,12	53,11
metanol	25,34	30,80	20,8	21,20	31,93	50,25
voda : etanol = 50 : 50	29,11	44,03	33,83	33,33	42,46	59,21
etanol	25,08	23,19	21,68	18,00	29,69	47,04
metanol : aceton = 50 : 50	29,93	33,53	20,81	20,44	32,83	48,97

3.2.8 Laboratorijska oprema

- avtoklav (tip 500 × 700, Sutjeska, Jugoslavija)
- avtoklav (tip 1-61-137, Sutjeska, Jugoslavija)
- digitalna tehtnica (PB1502-S, Mettler – Toledo, Švica)
- hladilnik (LAE, Slovenija)
- hladilnik (LTH, Slovenija)

- inkubator (I-115C, Kambič, Slovenija)
- inkubator (SP190, Kambič, Slovenija)
- omara za sušenje steklovine (SO-250, Elektromedicina, Slovenija)
- plinski gorilnik
- stresalnik (Vibriomix 314 EVT, Tehnica, Slovenija)
- vodna kopel (Kambič, Slovenija)
- vrtinčnik (Yellowline, TTS2, Slovenija)
- zaščitna mikrobiološka komora (PIO SMBC 122AV, Iskra PIO, Slovenija)
- splošna mikrobiološka oprema: avtomatske pipete (Gilson, Francija; Eppendorf, Nemčija), cepilne zanke, epruvete, filtri, laboratorijske steklenice (250, 500 in 1000 ml, Duran), merilni valj (Plastibrand, Nemčija), mikrodilucijske ploščice, nastavki za pipete 10, 100 in 1000 μL (Eppendorf, Nemčija), parafilm M (American National Can), petrijeve plošče (Labortehnika Golias, Slovenija), plastični lončki (Labortehnika Golias, Slovenija), stojala in vrečke za smeti, rokavice.

3.3 METODE

3.3.1 Revitalizacija bakterij

Bakterije so shranjene v krioeprevetkah v zamrzovalniku. Pred precepljanjem smo krioeprevetko odtalili na sobni temperaturi in s cepilno zanko prenesli kulturo v 4 mL tekočega gojišča MHB in inkubirali 24 h na stresalniku pri 37 °C in 100 obr./min. Po inkubaciji smo s cepilno zanko prenesli namnoženo kulturo na trdno gojišče MHA in gojišče inkubirali 24 h pri 37 °C. Pred uporabo smo čisto kulturo še enkrat precepili. Kulture smo shranili v hladilniku na 4 °C in jo tedensko precepljali, da smo imeli vedno svežo kulturo.

3.3.2 Priprava inokuluma

Po končani inkubaciji smo preverili rast tipičnih kultur. Po eno do dve koloniji ustrezne kulture smo prenesli v 4 mL tekočega gojišča MHB, premešali na vrtinčnem mešalniku in inkubirali 24 ur pri temperaturi 37 °C na 100 obr./min. Predvidevali smo, da so se bakterije namnožile do koncentracije 10^7 CFU/mL. Za pripravo inokuluma smo iz epruvetk odpipetirali 150 μL kulture in jo razredčili v 10 mL MHB gojišča.

3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

Koncentracijo celic v inokulumu smo določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču. Uporabili smo gojišče MHA. Iz epruvetk, ki smo jih pripravili kot inokulum, smo iz bujona MHB aseptično odpipetirali 100 μL kulture v 900 μL fiziološke raztopine in vsebino premešali na vrtičnem mešalniku. Celoten postopek razredčevanja smo ponavljali do koncentracije $\sim 10^2$ in 10^1 CFU/mL vzorca. Pripravili smo si petrijeve plošče z gojiščem MHA in jih razdelili na 4 enake dele, na spodnjo stran smo si razdelke označili, tako da so predstavljali posamezno razredčitev. V vsak razdelek smo aseptično odpipetirali 5 kapljic

po 10 µL razredčenega vzorčka in tako dobili pet paralelk. Ko se je tekočina vpila v gojišče, smo petrijevke inkubirali 24 ur pri 37 °C. Pri kulturah *E. coli*, *S. Enteritidis* in *B. cereus* smo petrijevke pustili na sobni temperaturi, kar je povzročilo upočasnjeno rast bakterij in s tem je bilo olajšano štetje kolonij. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in izračunali število bakterij N (CFU/mL). Na gojiščih, kjer je zraslo 15-300 kolonij, smo uporabili enačbo 1:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) r} \quad \dots(1)$$

Legenda: $\sum C$ – seštevek vseh kolonij, na vsakem števnem razdelku, n_1 – število števnih paralelk na prvem razdelku, pri prvi redčitvi; n_2 – število števnih paralelk na drugem razdelku, pri drugi redčitvi; r – faktor redčitve pri prvi upoštevani redčitvi; N – število bakterij (CFU/mL).

Rezultate smo podali kot število bakterij vrste *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ali *S. Enteritidis*, pomnoženih z 10^a pri čemer je a faktor razredčitve vzorca.

3.3.4 Mikrodilucija v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici

Z mikrodilucijsko metodo v bujonu (Klančnik in sod., 2010) smo testirali protimikrobno učinkovitost vsem pripravljenim izvlečkom fenolnih spojin iz tropin grozdja šestih sort s sedmimi ekstrakcijskimi topili, skupno torej 42 izvlečkom fenolnih spojin pri bakterijah vrst *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* in *S. Enteritidis*.

Za pripravo testne bakterijske kulture so bile vse bakterije inkubirane 24 ur v gojišču MHB, nato pa redčene do koncentracije 10^6 CFU/mL. Izvlečki grozdnih tropin so bili pripravljeni v založnih raztopinah s koncentracijo fenolnih spojin 3 mg GAE/mL v gojišču MHB. Mikrodilucijo smo opravili na mikrotitrskih ploščicah s 96 luknjicami, v katerih smo pripravili dvakratne serijske razredčitve izvlečkov v koncentracijskem območju med 0,006 do 1,0 mg GAE/mL.

Najprej smo si označili ploščice in pripravili tekoče gojišče MHB. V sterilno ploščico smo od prve kolone naprej aseptično odpipetirali 50 µL sterilnega gojišča MHB, v prvo kolono pa 100 µL začetne koncentracije založne raztopine z izvlečki in 50 % etanol. Nato smo iz prve vrste odpipetirali 50 µL izvlečka in ga prenesli v drugo vrsto, vsebino 8 x premešali s pipeto in tako nadaljevali serijske razredčitve do konca kolone, pri čemer se je v vsaki luknjici preplopolovila koncentracija založne raztopine. Na koncu smo v zadnji luknjici zavrgli 50 µL. V vse luknjice smo dali še 50 µL posamezne kulture.

Vzporedno smo pripravili tudi kontrole. Pri pozitivni kontroli smo v eno luknjico odpipetirali 50 µL gojišča in 50 µL kulture, pri negativni kontroli 50 µL gojišča in prav toliko izvlečka, v tretjo luknjico pa 100 µL gojišča. Na koncu smo ploščico pokrili s pokrovom in jo 1 minuto stresali na stresalniku za mikrotitrski ploščice. Ploščice smo

inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo v vse luknjice dodali 10 µL bakterijskega rastnega indikatorja *p*-iodo-nitro-tetrazolium violet (INT, Sigma, Švica), ki sprejema elektrone iz encima dehidrogenaze in se reducira v rdeče obarvan formazan (INTF). Ploščice smo dali za eno minuto na mešalo in inkubirali v temi naslednjih 30 minut na 37 °C. Nato smo odsotnost rdeče barve odčitali kot rezultat inhibicije bakterijske rasti. MIK smo določili pri najnižji koncentraciji izvlečka, ki je povzročila inhibicijo bakterijske rasti. Vse meritve minimalne inhibitorne koncentracije smo ponovili v dveh paralelkah.

3.3.5 Krivulja odmiranja

Z makrodilucijsko metodo v bujonu smo preverili kinetiko protimikrobnega delovanja izvlečkov sort zelen, sauvignon in modri pinot pri bakterijah *S. aureus*, *L. monocytogenes* in *S. Enteritidis*. Pripravili smo si ustrezno koncentracijo izvlečka – minimalno inhibitorno koncentracijo, ki smo jo dobili z mikrodilucijsko metodo. V predhodno pripravljene epruvete s 5 ml gojišča MHB smo dodali izvleček in gojišče bakterij. Končna koncentracija bakterij je bila 10⁵–10⁶ CFU/mL. Epruvete smo inkubirali 24 h pri 37 °C med stresanjem pri 75 obratih/minuto. Bakterijsko rast smo spremljali z vzorčenjem ob času 0, 3, 6, 9 in 24 h. 10 µl ustrezne redčitve vzorca smo nacepili na agar MHA in petrijeve plošče inkubirali za 24 h pri 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrastle kolonije in izračunali povprečno koncentracijo preživelih bakterij (CFU/mL). Pozitivna kontrola je bila opravljena na podoben način, vendar brez dodatka izvlečka. Vse meritve smo opravili v dveh neodvisnih eksperimentih in izračunali log CFU/mL ter standardno deviacijo.

3.3.6 Opis metode inkapsulacije izvlečkov grozdnih tropin v β-ciklodekstrin

Inkluzijski kompleks fenolnih izvlečkov grozdnih tropin v β-ciklodekstrin (β-CD) smo pripravili z mešanjem etanolne raztopine izvlečka in vodne raztopine β-CD v množinskem razmerju 1 : 2 (skupna količina fenolov : β-CD). Mešanje je trajalo 24 ur pri sobni temperaturi na magnetnem mešalu. Stekleno čašo smo med mešanjem obložili s folijo, da smo preprečili vdor svetlobe. Po končani inkapsulaciji smo suspenzijo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 µm. S tem smo odstranili vse netopne in nekapsulirane fenole, ki so ostali na membranskem filtru. Inkapsulirali smo fenolni izvleček sorte zelen, količina inkapsuliranega izvlečka je bila 43 %. Količino inkapsuliranega izvlečka oz. učinkovitost inkapsulacije (UI %) smo izračunali z uporabo enačbe 2. Filtrat smo zamrznili pri –40 °C in v naslednjih 24 h liofilizirali. Suhi β-CD izvleček smo raztopili v destilirani vodi in filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,2 µm in s tem odstranili morebitne mikroorganizme (Mourtzinov in sod., 2008).

$$UI \% = \frac{\text{dejanska količina inkapsuliranega izvlečka}}{\text{teoretična količina inkapsuliranega izvlečka}} \times 100 \quad \dots(2)$$

Legenda: UI – učinkovitost inkapsulacije oz. količina inkapsuliranega izvlečka

Dejanska količina inkapsuliranega izvlečka je razlika med celotnim izvlečkom, uporabljenim za inkapsulacijo (= teoretično količino inkapsuliranega izvlečka) in izvlečkom, ki se je adsorbiral na površino (Mourtzinou in sod., 2008).

4 REZULTATI

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) smo kot merilo protimikrobne učinkovitosti določili vsem pripravljenim izvlečkom fenolnih spojin iz tropin šestih sort grozdja z uporabo sedmih ekstrakcijskih topil, skupno torej 42 izvlečkom fenolnih spojin. Uporabili smo pet testnih mikroorganizmov, ki so vključevali po Gramu pozitivne (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) in po Gramu negativne bakterijske vrste (*E. coli* O157:H7 in *S. Enteritidis*). Izmed šestih sort grozdja smo izbrali tiste, pri katerih smo določili najvišjo protimikrobno aktivnost. Nadalje smo izmed sedmih ekstrakcijskih topil izbrali tistega, pri katerih se je pokazala najvišja protimikrobna aktivnost. Z najboljšimi izvlečki smo naredili analizo kinetike protimikrobnega delovanja, kinetične parametre smo raziskali tudi z inkapsuliranimi izvlečki.

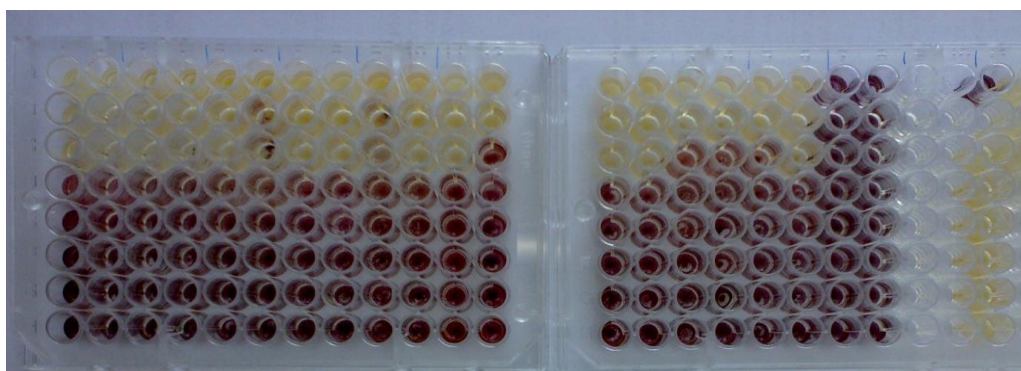
Rezultate v tem poglavju smo predstavili v treh različnih enotah. Protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na sorto smo v poglavju 4.1 predstavili kot MIK v mg GAE/mL gojišča. V poglavju 4.2 smo predstavili vpliv ekstrakcijskega topila na protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin in MIK preračunali na grame liofiliziranih tropin na L gojišča (g FDSS/L gojišča). V poglavju 4.3 smo predstavili protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na bakterije in MIK preračunali v g suhega izvlečka na L gojišča.

4.1 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN GROZDNIH TROPIN GLEDE NA SORTO

4.1.1 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte zelen

Pri vsaki sorti grozdja smo imeli vzorce pripravljene s sedmimi različnimi ekstrakcijskimi topili oz. njihovimi mešanicami v volumskem razmerju (voda : metanol = 75 : 25; voda : metanol = 50 : 50; voda : metanol = 25 : 75; metanol = 100; voda : etanol = 50 : 50; etanol = 100; metanol: aceton = 50 : 50 (v : v)). Liofilizirane vzorce v falkonkah smo najprej raztopili v 50 % etanolu (na začetku smo sicer uporabili absolutni alkohol, vendar se je večina vzorcev slabo oz. se sploh ni topila). Potem smo izvlečkom fenolnih spojin določili protimikrobno učinkovitost z metodo mikrodilucije z indikatorjem INT, ki smo jo izvedli v mikrotitrski ploščici.

Na sliki 6 in v preglednici 6 so prikazani rezultati protimikrobne učinkovitosti izvlečka sorte zelen na bakteriji *S. aureus*.



Slika 6: Prikaz rezultatov mikrodilucije v mikrotitrski ploščici v dveh paralelkah za bakterijo *S. aureus*
Figure 6: Results of microdilution method in 96-well microtitre plates in two paralels for bacterium *S. aureus*

Analizo smo opravili v dveh paralelkah in rezultate zabeležili v preglednici 6. Na sliki 6 in preglednici 6 vidimo rezultate mikrodilucije v razponu od 0,75 mg GAE/mL gojišča do 0,006 mg GAE/mL gojišča. Koncentracija fenolnih spojin v izvlečku tropin je bila 6 mg GAE/mL izvlečka. Protimikrobni učinek se je pokazal v tistih luknjicah, kjer je tekočina obarvana rumeno, izvleček je torej deloval inhibitorno. V preglednici 6 smo rezultat označili kot —. Kjer izvleček ni deloval inhibitorno, se je tekočina obarvala rdeče; v preglednici 6 smo to označili kot +. Minimalna inhibitorna koncentracija je najnižja vrednost, pri kateri ne opazimo rasti.

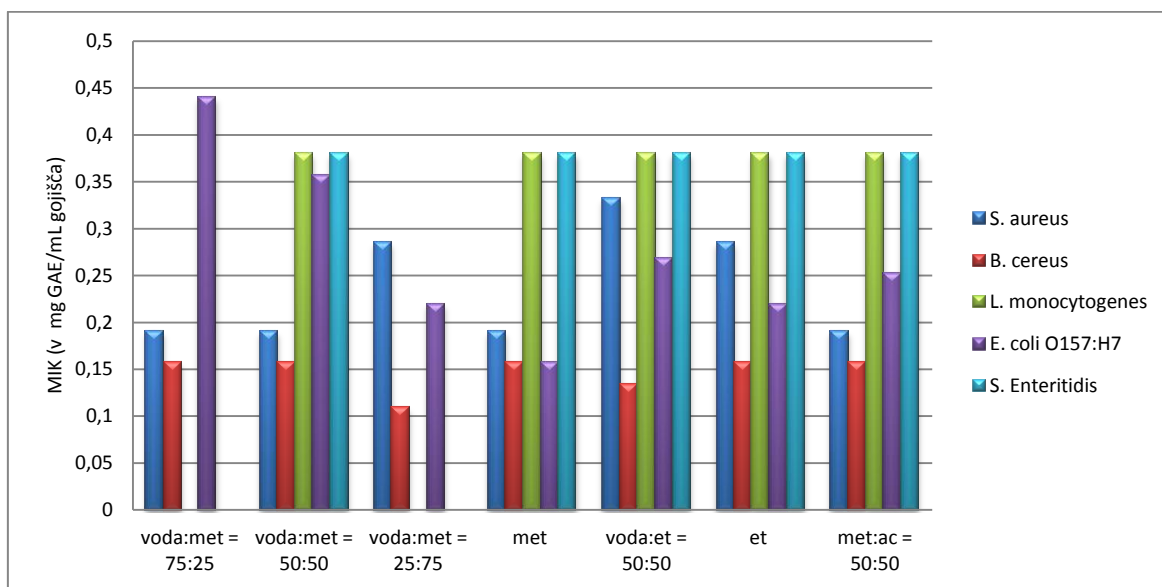
Preglednica 6: Odčitavanje MIK rezultatov za bakterijo *S. aureus* ŽMJ 343 (povprečna vrednost, n = 2)
Table 6: Minimum inhibitory concentration for bacterium *S. aureus* ŽMJ 343 (average value, n = 2)

Koncentracija (mg GAE/mL gojišča)	Z22	Z31	Z41	Z51	Z61	Z71	Z81	Z62	Z72
0,75	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
0,38	- -	- -	- -	- -	+ -	- -	- -	- -	- -
0,19	- -	- -	- +	- -	+ -	- +	- -	+ +	+ -
0,094	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
0,047	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
0,023	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
0,012	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
0,006	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +

Legenda: Z: sorta zelen; Z22: topilo voda : metanol = 75 : 25 (v : v); Z31: topilo voda : metanol = 50 : 50 (v : v); Z41: voda : metanol = 25 : 75 (v : v); Z51: metanol; Z61: voda : etanol = 50 : 50 (v : v); Z71: etanol; Z81: metanol : aceton = 50 : 50 (v : v); Z62: voda : etanol = 50 : 50 (v : v); Z72: etanol

Iz preglednice 6 je razvidno, da so imeli vsi izvlečki fenolov grozdnih tropin sorte zelen protimikrobni učinek. Vrednosti MIK se gibljejo med 0,19–0,38 mg GAE/mL gojišča, ena vrednost znaša tudi 0,75 mg GAE/mL gojišča.

Protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin tropin sorte zelen smo poleg bakterije *S. aureus* testirali tudi še pri preostalih, po Gramu pozitivnih bakterijah *B. cereus* in *L. monocytogenes* ter po Gramu negativnih bakterijah *E. coli* 0157:H7 in *S. Enteritidis*, pri vseh sedmih ekstrakcijskih topilih (slika 7). Rezultati so povprečne vrednosti dveh paralelk.



Slika 7: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte zelen v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton

Figure 7: MICs (mg GAE/mL of media) of 'Zelen' variety seeds and skins phenol extract of different extraction media and tested bacteria (average value, n = 2). Legend: met = methanol; et = ethanol; ac = acetone

Iz slike 7 je razvidno, da so imeli izvlečki fenolov grozdnih tropin sorte zelen na listerijo in salmonelo podoben protimikroben učinek. Vrednosti MIK so 0,38 mg GAE/mL gojišča pri vseh ekstrakcijski medijih. Tekom testiranja protimikrobnih aktivnosti nam je zmanjkalo raztopline izvlečka fenolov tropin sorte zelen, ki je bil pripravljen z ekstrakcijskimi topili voda : metanol = 75 : 25 (v : v) in voda : metanol = 25 : 75 (v : v) (Z22 in Z41), zato te MIK pri bakterijah *L. monocytogenes* in *S. Enteritidis* manjkajo.

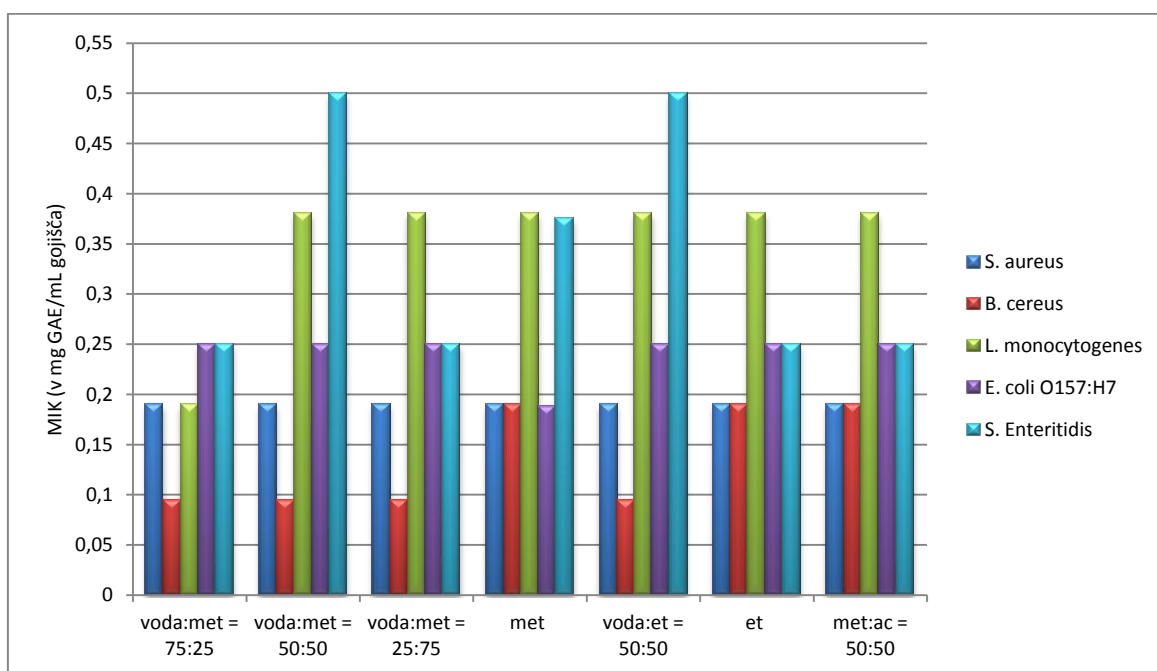
Pri ostalih G+ bakterijah ima izvleček fenolov tropin sorte zelen zelo dober protimikrobni učinek, vrednosti MIK se pri *S. aureus* gibljejo od 0,19–0,33 mg GAE/mL gojišča, pri *B. cereus* pa od 0,1095–0,1575 mg GAE/mL gojišča. Presenetljivo dober protimikroben učinek ima izvleček fenolov tropin te sorte tudi na *E. coli*, kajti izmed vseh preizkušenih tropin ravno fenoli tropin sorte zelen najbolj inhibirajo to, po Gramu negativno bakterijo (metanol, MIC 0,1575 mg GAE/mL gojišča).

4.1.2 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte sauvignon

Izvečki fenolov topin sorte sauvignon so imeli podoben protimikrobni učinek na bakterije kot tisti sorte zelen. Meritve so bile opravljene v dveh paralelnih ponovitvah, tako da podatki na sliki 8 predstavljajo povprečne vrednosti. Pri bakteriji *S. aureus* smo pri vseh ekstrakcijskih topilih določili MIK 0,19 mg GAE/mL gojišča. Podobno kot pri sorti zelen

tudi izvleček fenolov tropin sorte sauvignon dosega najboljšo protimikrobno učinkovitost proti G+ bakteriji *B. cereus*. Vrednosti MIK so še nižje in sicer 0,094 mg GAE/mL gojišča. Iz slike 8 je razvidno, da so najboljšo protimikrobno učinkovitost omogočala ekstrakcijska topila voda : metanol v volumskem razmerju 75 : 25, 50 : 50 in 25 : 75 ter voda : etanol = 50 : 50 (v : v).

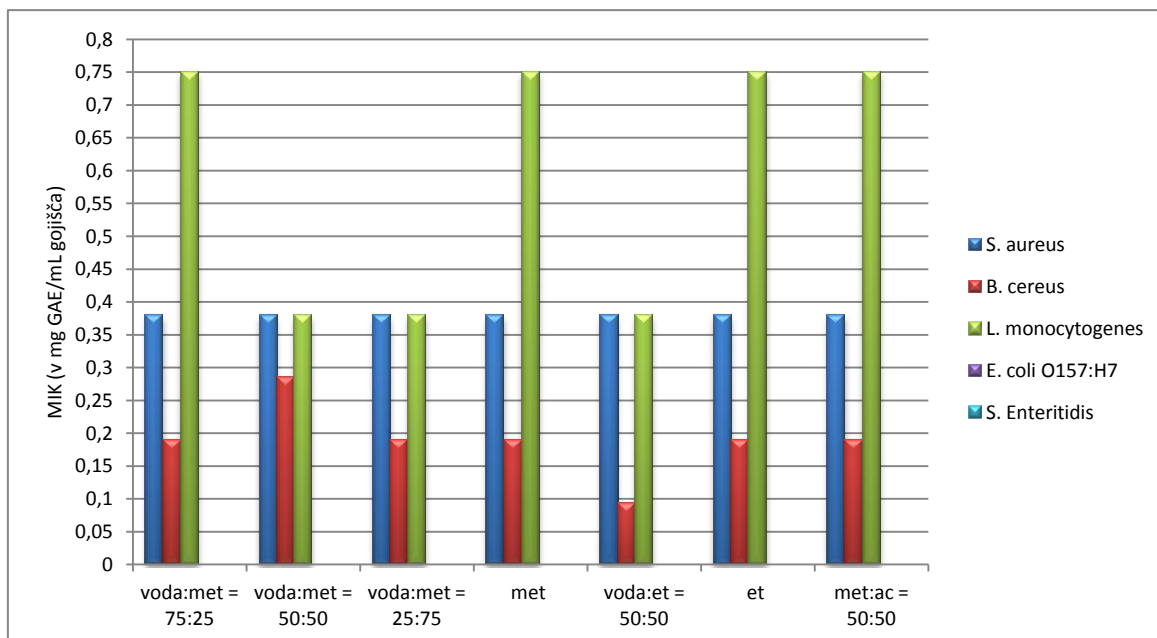
Izvleček fenolov tropin sorte sauvignon ima presenetljivo dober protimikrobni učinek tudi na G– bakterije *E. coli* in *S. Enteritidis*. Najboljše ekstrakcijsko topilo je bil metanol, saj je bila tukaj MIK najnižja in sicer 0,1875 mg GAE/mL gojišča, pri salmoneli pa so se kot najboljše topilo izkazali voda : metanol = 75 : 25 in 25 : 75, etanol in metanol : acetone = 50 : 50 (v : v). V primerjavi s sorto zelen delujejo izvlečki fenolov tropin sorte sauvignon bolj inhibitorno na salmonelo in listerijo.



Slika 8: MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte sauvignon v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = acetone

Figure 8: MICs (mg GAE/mL of media) of 'Sauvignon' variety seeds and skins phenol extract of different extraction media and tested bacteria (average value, n = 2). Legend: met = methanol; et = ethanol; ac = acetone

4.1.3 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte rebula



Slika 9: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte rebula v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = acetone

Figure 9: MICs (mg GAE/mL of media) of 'Rebula' variety seeds and skins phenol extract of different extraction media and tested bacteria (average value, n = 2). Legend: met = methanol; et = ethanol; ac = acetone

MIK smo določili tudi pri beli sorti rebula (slika 9). Pri bakteriji *S. aureus* je MIK pri vseh ekstrakcijskih topilih 0,38 mg GAE/mL gojišča, kar je malenkost več kot pri ostalih belih sortah. Najboljše ekstrakcijsko topilo proti bakteriji *B. cereus* je bilo topilo voda : etanol = 50 : 50 (v : v), MIK je bil 0,094 mg GAE/mL gojišča. V primerjavi z ostalima G+ bakterijama listerija ni bila tako občutljiva na fenolne izvlečke sorte rebula, saj smo dokazali bistveno višje MIK, celo 0,75 mg GAE/mL gojišča. Najnižje MIK smo dobili pri ekstrakcijskih topilih voda : metanol = 50 : 50 in 25 : 75 ter pri topilu voda : etanol = 50 : 50 (v : v).

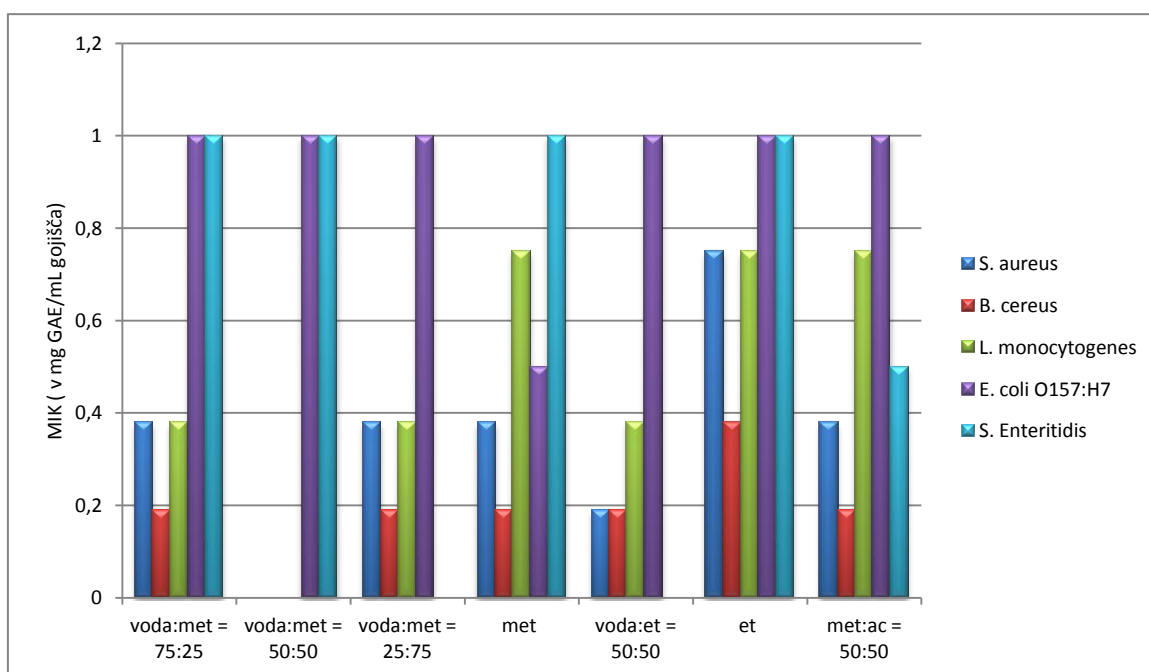
V nasprotju s sortama zelen in sauvignon pri izvlečkih fenolnih spojin tropin sorte rebula nismo dokazali protimikrobne učinkovitosti proti po Gramu negativnim bakterijam *E. coli* in *S. Enteritidis* oz. je MIK > 1,5 mg GAE/mL gojišča.

4.1.4 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte cabernet sauvignon

Izveček tropin sorte cabernet sauvignon je imel večji protimikrobni učinek na po Gramu pozitivne bakterije (slika 10). Najboljše ekstrakcijsko topilo pri bakteriji *S. aureus* je bilo voda : etanol v volumskem razmerju 50 : 50, MIK izvlečkov fenolov tropin je bil 0,19 mg GAE/mL gojišča. Ostale vrednosti so se gibale med 0,38–0,75 mg GAE/mL gojišča. Večji protimikrobni učinek so imeli izvlečki fenolov tropin te sorte na *B. cereus*, kot najboljša ekstrakcijska topila pa so se pokazala voda : metanol v volumskem razmerju 75 : 25 in 25 : 75 ter voda : etanol in metanol : aceton v volumskem razmerju 50 : 50. Vrednost MIK je znašala 0,19 mg GAE/mL gojišča.

Na sliki 10 lahko vidimo, da je tudi izvleček fenolov tropin te sorte imel izmed G+ bakterij najmanjši protimikrobni učinek na *L. monocytogenes*. MIK je bil 0,38 mg GAE/mL gojišča, pri ekstrakcijskih topilih voda : metanol = 75 : 25, voda : metanol = 25 : 75 ter voda : etanol = 50 : 50 (v : v).

Med analizo pri postopku določitve MIK z izvlečki, ki so bili pripravljene z ekstrakcijskim topilom voda : metanol = 50 : 50 (v : v) je prišlo do napake pri pripravi založne raztopine, zato nekaterih podatkov nimamo.



Slika 10: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte cabernet sauvignon v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton

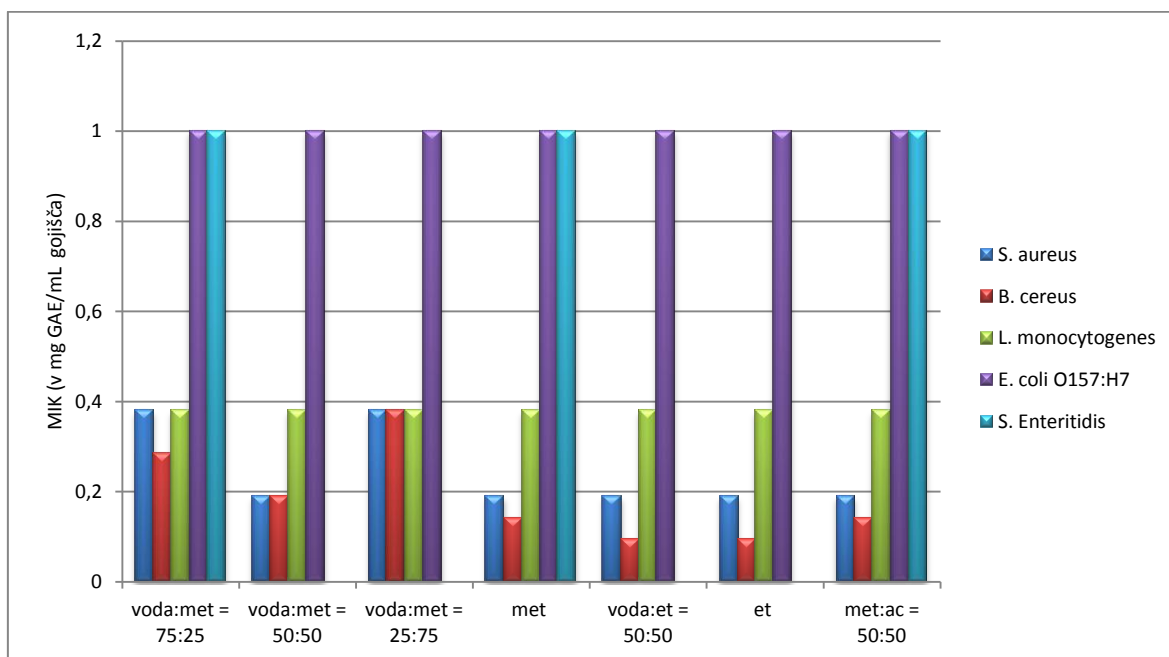
Figure 10: MICs (mg GAE/mL of media) of 'Cabernet sauvignon' variety seeds and skins phenol extract of different extraction media and tested bacteria (average value, n = 2). Legend: met = methanol; et = ethanol; ac = acetone

Pri po Gramu negativnih bakterijah smo uporabili večje začetne koncentracije založne raztopine in ujeli meritev MIK, ki je znašala 1 mg GAE/mL gojišča. Pri izvlečku fenolov tropin sorte modri pinot smo namreč uporabili nižje začetne koncentracije in bili izven območja MIK. Najboljše ekstrakcijsko topilo pri bakteriji *E. coli* je bil 100 % metanol (MIK 0,5 mg GAE/mL gojišča). Isti MIK je bil dokazan pri drugi G– bakteriji salmoneli, vendar z drugim ekstrakcijskim topilom metanol : aceton = 50 : 50 (v : v).

4.1.5 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte merlot

Pri teh tropinah smo dokazali protimikrobno učinkovitost tudi pri po Gramu negativnih bakterijah. Podobno kot pri sorti cabernet sauvignon smo uporabili večje začetne koncentracije. MIK pri vseh analiziranih fenolnih izvlečkih pri *E. coli* je znašala 1 mg GAE/mL gojišča. Bakterija *S. Enteritidis* je bila manj občutljiva, saj smo MIK (1 mg GAE/mL gojišča) uspeli dokazali pri treh ekstrakcijskih topilih in sicer pri voda : metanol = 50 : 50, metanol in mešanici metanol : aceton = 50 : 50 (v : v).

Na sliki 11 vidimo, da so bile G+ bakterije bolj občutljive na fenolne izvlečke tropin. Pri bakteriji *S. aureus* smo določili MIK pri 0,19 mg GAE/mL gojišča, kar je podobno kot pri tropinah sorte cabernet sauvignon, to vrednost pa smo dobili pri kar petih ekstrakcijskih topilih, kar lahko vidimo na sliki 10. Najbolj občutljiva bakterija je bila ponovno *B. cereus*, MIK smo določili pri 0,094 mg GAE/mL gojišča pri dveh fenolnih izvlečkih z ekstrakcijskima topiloma voda : etanol v volumske razmerju 50 : 50 in 100 % etanolu. Pri listeriji je bila ugotovljena enaka aktivnost izvlečkov, saj so bile vrednosti MIK pri vseh ekstrakcijskih topilih 0,38 mg GAE/mL gojišča.

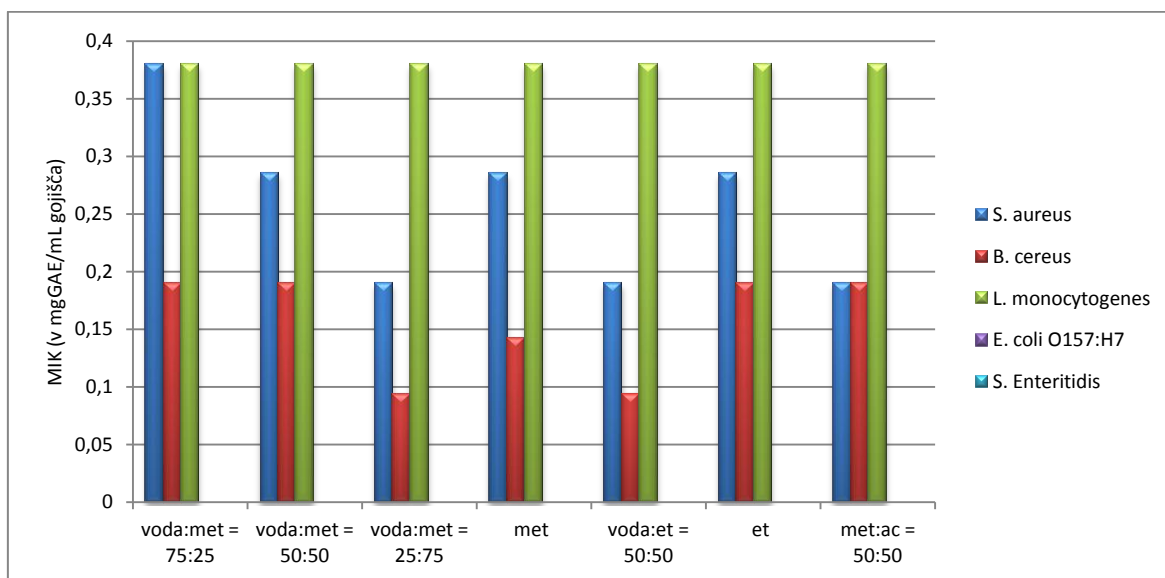


Slika 11: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte merlot v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton

Figure 11: MICs (mg GAE/mL of media) of 'Merlot' variety seeds and skins phenol extract of different extraction media and tested bacteria (average value, n = 2). Legend: met = methanol; et = ethanol; ac = acetone

4.1.6 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin sorte modri pinot

Vrednosti MIK za bakterijo *S. aureus* so 0,19 mg GAE/mL gojišča (ekstrakcijski mešanici voda : metanol = 25 : 75 in voda : etanol = 50: 50 (v : v)) (slika 12). Izvlečki so bili ponovno najbolj učinkoviti proti bakteriji *B. cereus*, MIK vrednosti so do 0,094 mg GAE/mL gojišča, pri istih ekstrakcijskih mešanicah kot pri bakteriji *S. aureus* (voda : metanol = 25 : 75 in voda : etanol = 50 : 50 (v : v)). Pri *L. monocytogenes* je bila ugotovljena zelo podobna aktivnost fenolnih izvlečkov, saj so bile vrednosti MIK pri vseh ekstrakcijskih topilih 0,38 mg GAE/mL gojišča, podobno kot pri sorti merlot.



Slika 12: Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) izvlečka fenolov tropin sorte zelen v odvisnosti od izbranega ekstrakcijskega topila in testne bakterije (povprečna vrednost, n = 2). Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton

Figure 12: MICs (mg GAE/mL of media) of 'Pinot noir' variety seeds and skins phenol extract of different extraction media and tested bacteria (average value, n = 2). Legend: met = methanol; et = ethanol; ac = acetone

Pri analizi protimikrobne učinkovitosti pri po Gramu negativnih bakterijah z obstoječimi koncentracijami založne raztopine nismo uspeli dokazati MIK. Manjkajoči rezultati so bili višji od 1 mg GAE/mL gojišča in izven območja meritve MIK.

Na podlagi rezultatov protimikrobne učinkovitosti pridobljenih fenolnih izvlečkov grozdnih tropin lahko trdimo, da so najvišjo protimikrobno aktivnost pokazali izvlečki tropin sorte sauvignon in zelen, pri rdečih sortah je zelo dobro protimikrobno aktivnost pokazal izvleček tropin sorte modri pinot. Te tri sorte smo vključili tudi v nadaljne analize kinetike protimikrobnega delovanja.

4.2 VPLIV EKSTRAKCIJSKEGA TOPILA NA PROTIMIKROBNO UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN GROZDNIH TROPIN

MIK fenolnih izvlečkov tropin izraženo kot mg GAE/mL gojišča smo preračunali (enačba 3) tudi na grame liofiliziranih tropin na L gojišča (g FDSS/L gojišča). Primer izračuna je predstavljen v preglednici 7. Podatki nam podajo boljšo predstavbo koliko liofiliziranih tropin na L gojišča deluje inhibitorno. Namen naše naloge je bil izbrati tudi najoptimalnejšo ekstrakcijsko topilo.

Za izračun MIK izraženega v g FDSS/L gojišča smo uporabili enačbo 3. Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) so predstavljene na slikah 7-12, vrednosti za skupne fenole (SF) pa v preglednici 5.

$$MIK (g FDSS L^{-1}) = \frac{MIK (mg GAE mL^{-1})}{SF (mg GAE g^{-1} FDSS)} \times 1000 \quad \dots(3)$$

Preglednica 7: Primer izračuna na osnovi enačbe 3 za MIK (g FDSS/L gojišča) za sorto zelen pri topilu voda : metanol = 75 : 25 (v : v) za bakterijo *S. aureus*

Table 7: Example of calculation on a basis of equation (3) of MIC (g FDSS/L medium) of 'Zelen' variety at extraction media water : methanol = 75 : 25 (v : v) against bacteria *S. aureus*

Izračun MIK (g FDSS/L gojišča)		
MIK (mg GAE/mL gojišča)	SF (mg GAE/g FDSS)	MIK (g FDSS/L gojišča)
0,19	17,89	10,6

4.2.1 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji *S. aureus*

V preglednici 8 so prikazane MIK za bakterijo *S. aureus* v odvisnosti od izbrane sorte in izbranega ekstrakcijskega topila. Podane so povprečne vrednosti dveh eksperimentov.

Preglednica 8: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji *S. aureus* (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v)

Table 8: Antimicrobial activity of pf phenol extracts from six *Vitis vinifera* L. cultivars skins and seeds prepared with seven extraction media against *S. aureus* (MICs in g FDSS/L medium) (average value, n = 2). Concentration of the extraction media are given in the volume ratio (v : v)

	MIK (g FDSS/L gojišča)						
	voda : metanol = 75 : 25	voda : metanol = 50 : 50	voda : metanol = 25 : 50	metanol	voda : etanol = 50 : 50	etanol	metanol : aceton = 50 : 50
zelen	10,6	7,9	9,8	7,5	11,4	11,3	6,3
sauvignon	7,1	5,3	5,9	6,2	4,2	8,2	5,7
rebula	25,7	13,3	15,3	18,2	11,2	17,5	18,3
cabernet sauvignon	25,1	13,1	13,7	17,9	5,7	41,6	18,6
merlot	18,9	5,4	10,8	6,0	4,4	6,4	5,8
modri pinot	11,2	5,3	3,6	5,6	3,2	4,0	3,9

Iz preglednice 8 je razvidno, da ekstrakcijsko topilo voda : etanol = 50 : 50 (v : v) daje v povprečju najnižje rezultate, kar pomeni, da so ti izvlečki učinkoviti pri najnižjih koncentracijah. Najbolje se je odrezal izvleček tropin sorte modri pinot, samo 3,2 g FDSS tropin te sorte na L gojišča preprečuje rast bakterije *S. aureus*. Zelo dobri rezultati so se pokazali tudi pri tropinah sorte sauvignon (4,2 g FDSS/L gojišča) in sorti merlot (4,4 g FDSS/L gojišča). V povprečju imajo izvlečki fenolnih spojin tropin rdečih sort nižji MIK kot bele sorte.

4.2.2 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji *L. monocytogenes*

Nadalje smo iskali optimalno ekstrakcijsko topilo v povezavi s protimikrobno učinkovitostjo proti bakteriji *L. monocytogenes* (preglednica 9). Podoben trend se nadaljuje tudi pri tej, po Gramu pozitivni bakteriji. Najbolj optimalno ekstrakcijsko topilo je bilo v večini primerov voda : etanol = 50 : 50 (v : v). Vidimo tudi, da imajo v povprečju izvlečki fenolnih spojin tropin rdečih sorte nižji MIK (6,4–11,4 g FDSS/L gojišča) kot bele sorte (8,6–13,1 g FDSS/L gojišča).

Preglednica 9: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji *L. monocytogenes* (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v)

Table 9: Antimicrobial activity of FDSS extracts from six *Vitis vinifera* L. cultivars prepared with seven extraction media against *L. monocytogenes* (MICs in g FDSS/L media) (average value, n = 2). Concentration of the extraction media are given in the volume ratio (v : v)

	MIK (g FDSS/L gojišča)						
	voda : metanol = 75 : 25	voda : metanol = 50 : 50	voda : metanol = 25 : 50	metanol	voda : etanol = 50 : 50	etanol	metanol : aceton = 50 : 50
zelen	ND	15,8	ND	15,0	13,1	15,1	12,7
sauvignon	7,1	10,6	11,9	12,3	8,6	16,4	11,3
rebula	50,8	13,3	15,3	36,0	11,2	34,6	36,0
cabernet sauvignon	25,1	ND	13,7	35,4	11,4	41,6	36,7
merlot	18,9	10,7	10,8	11,9	8,9	12,8	11,6
modri pinot	11,2	7,0	7,2	7,6	6,4	8,1	7,8

Legenda: ND: ni določeno

4.2.3 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji *B. cereus*

Izvlečki so pokazali zelo veliko protimikrobno učinkovitost proti tej sporogeni G+ bakteriji (preglednica 10). Izvlečki fenolnih spojin so bili bolj učinkoviti proti *B. cereus* v primerjavi z bakterijama *S. aureus* in *L. monocytogenes*. Najboljše topilo je ponovno voda : etanol = 50 : 50 (v : v). MIK se gibljejo od 1,6–5,7 g FDSS/L gojišča. Najnižje vrednosti MIK so bile v vseh treh primerih ugotovljene pri tropinah sorte modri pinot (1,6–5,6 g FDSS/L gojišča).

Preglednica 10: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji *B. cereus* (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v)

Table 10: Antimicrobial activity of FDSS extracts from six *Vitis vinifera* L. cultivars prepared with seven extraction media against *B. cereus* (MICs in g FDSS/L media) (average value, n = 2). Concentration of the extraction media are given in the volume ratio (v : v)

	MIK (g FDSS/L gojišča)						
	voda : metanol = 75 : 25	voda : metanol = 50 : 50	voda : metanol = 25 : 50	metanol	voda : etanol = 50 : 50	etanol	metanol : aceton = 50 : 50
zelen	8,8	6,5	3,7	6,2	4,5	6,2	5,2
sauvignon	3,5	2,6	2,9	6,2	2,1	8,2	5,7
rebula	12,9	9,7	7,7	9,1	2,8	8,8	9,1
cabernet sauvignon	12,5	26,4	6,8	9,0	5,7	21,1	9,3
merlot	14,1	5,4	10,8	4,4	2,2	3,2	4,3
modri pinot	5,6	3,5	1,8	2,9	1,6	4,0	3,9

4.2.4 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji *S. Enteritidis*

Rezultati so glede na vrsto bakterije pričakovani, čeprav so pri fenolnih izvlečkih tropin belih sort (zelen in sauvignon) presenetljivi. Izvlečki tropin belih sort so pokazali učinkovitost proti tej G– bakteriji pri vseh ekstrakcijskih topilih (pri obeh manjkajočih podatkih je pri pripravi izvlečka pri sorti zelen prišlo do napake) (preglednica 11). Salmonela je bila na fenolne izvlečke tropin sorte rebula slabše občutljiva (podobno vidimo v preglednici 12 pri *E. coli*). V primerjavi z ostalima belima sortama se je izvleček tropin te sorte slabše odrezal tudi pri G+ bakterijah, kar lahko vidimo na slikah 6, 7 in 8. Na podlagi danih eksperimentalnih podatkov je težko izbrati najbolj učinkovito ekstrakcijsko topilo, saj imamo npr. za topilo voda : etanol samo dva podatka.

Preglednica 11: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolov tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji *S. Enteritidis* (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v)

Table 11: Antimicrobial activity of FDSS extracts from six *Vitis vinifera* L. cultivars prepared with seven extraction media against *S. Enteritidis* (MICs in g FDSS/L media) (average value, n = 2). Concentration of the extraction media are given in the volume ratio (v : v)

	MIK (g FDSS/L gojišča)						
	voda : metanol = 75 : 25	voda : metanol = 50 : 50	voda : metanol = 25 : 50	metanol	voda : etanol = 50 : 50	etanol	metanol : acetone = 50 : 50
zelen	ND	15,8	ND	15,0	12,8	15,1	12,7
sauvignon	9,3	14,0	7,8	12,2	11,4	10,8	7,5
rebula	> 101,5	> 52,5	> 60,4	> 71,9	> 44,3	> 69,2	> 72,1
cabernet sauvignon	65,9	35,2	ND	47,2	ND	55,5	24,5
merlot	49,6	>56,4	> 56,9	31,3	> 47,1	> 67,4	30,5
modri pinot	> 44,3	> 27,7	> 28,2	> 29,8	> 25,3	> 31,8	> 30,6

Legenda: ND: ni določeno

4.2.5 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na topilo pri bakteriji *Escherichia coli* O157:H7

Podobno kot pri bakteriji *S. Enteritidis* tudi na to G– bakterijo najbolj učinkovito delujeta izvlečka fenolov tropin sort zelen in sauvignon. MIK se pri sorti zelen gibljejo od 6,7–24,5 g FDSS/L gojišča (povprečen MIK je skoraj 10 g FDSS/L gojišča), najboljše ekstrakcijsko topilo je voda : etanol v volumskem razmerju 50 : 50. Pri tropinah sorte sauvignon se MIK gibljejo od 6–10,8 g FDSS/L gojišča. Najnižji MIK je dosegel vzorec pri topilu voda : etanol = 50 : 50 (v : v). Dokazali smo tudi protimikrobno učinkovitost tropin sort cabernet sauvignon in merlot. Najboljše rezultate smo dobili z metanolom, pri izvlečku fenolov tropin sorte merlot pa s topilom voda : etanol = 50 : 50 (v : v). Povprečni MIK vrednosti so v primerjavi s tropinami belih sort višje. Povprečen MIK pri tropinah sorte cabernet sauvignon je 44,1 g FDSS/L gojišča, pri sorti merlot pa celo 32,2 g FDSS/L gojišča.

Preglednica 12: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolov tropin šestih sort grozdja, pripravljenih s sedmimi ekstrakcijskimi topili proti bakteriji *E. coli* (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2). Koncentracije ekstrakcijskih topil so podane v volumskem razmerju (v : v)

Table 12: Antimicrobial activity of FDSS extracts from six *Vitis vinifera* L. cultivars prepared with seven extraction media against *E. coli* (MICs in g FDSS/L media) (average value, n = 2). Concentration of the extraction media are given in the volume ratio (v: v)

	MIK (g FDSS/L gojišča)						
	voda : metanol = 75 : 25	voda : metanol = 50 : 50	voda : metanol = 25 : 50	metanol	voda : etanol = 50 : 50	etanol	metanol : acetone = 50 : 50
zelen	24,5	14,8	7,5	6,7	9,1	8,7	8,4
sauvignon	9,3	7,0	7,8	6,1	5,7	10,8	7,5
rebula	> 101,5	> 52,5	> 60,4	> 71,9	> 44,3	> 69,2	> 72,1
cabernet sauvignon	65,9	35,2	35,9	23,6	ND	55,5	48,9
merlot	49,6	28,2	28,5	31,3	23,5	33,7	30,5
modri pinot	> 44,3	> 27,7	> 28,2	> 29,8	> 25,3	> 31,8	> 30,6

Legenda: ND: ni določeno

Na podlagi vseh rezultatov, predstavljenih v poglavju 4.2, smo kot najbolj optimalno ekstrakcijsko topilo določili topilo voda : etanol v volumskem razmerju 50 : 50 in vse rezultate zbrali v preglednici 13. Vsi rezultati so povprečje dveh eksperimentov.

Preglednica 13: Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolov tropin šestih sort grozdja, pripravljenih z ekstrakcijskim topilom voda : etanol = 50 : 50 (v : v) proti petim bakterijam (MIK v g FDSS/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2)

Table 13: Antimicrobial activity of FDSS extracts of six *Vitis vinifera* L. cultivars prepared with water : ethanol = 50 : 50 (v : v) extraction against five foodborne pathogens (MICs in g FDSS/L media) (average value, n = 2).

	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
zelen	11,4	4,5	13,1	12,8	9,1
sauvignon	4,2	2,1	8,6	11,4	5,7
rebula	11,2	2,8	11,2	> 44,3	> 44,3
cabernet sauvignon	5,7	5,7	11,4	ND	> 29,9
merlot	4,4	2,2	8,9	> 47,1	> 23,5
modri pinot	3,2	1,6	6,4	> 25,3	> 12,8

Legenda: ND: ni določeno

4.3 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN GROZDNIH TROPIN GLEDE NA BAKTERIJE

V naši raziskavi smo ugotovili, da je najbolj optimalno ekstrakcijsko topilo voda : etanol = 50 : 50 (v : v). Na sliki 13 smo predstavili rezultate protimikrobne učinkovitosti izvlečkov

fenolov pripravljenih s tem ekstrakcijskim topilom izražene v g suhega izvlečka na L gojišča.

MIK izvlečkov fenolnih spojin izraženo kot mg GAE/mL gojišča smo preračunali (enačba 4) tudi na g suhega izvlečka na L gojišča. Ti podatki nam podajo predstavo koliko izvlečka na L gojišča deluje inhibitorno. Primer izračuna je predstavljen v preglednici 14.

Za izračun MIK izraženega v g suhega izvlečka na L gojišča smo uporabili enačbo 4. Vrednosti MIK (mg GAE/mL gojišča) so predstavljene na slikah 7-12, vrednosti za skupne fenole (SF) pa v preglednici 4.

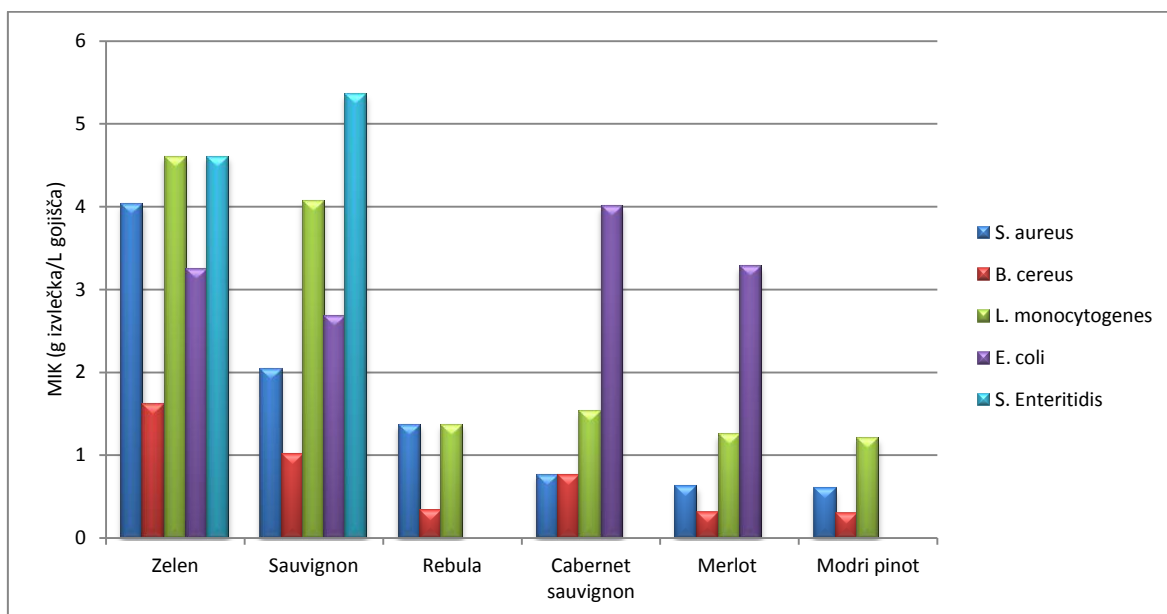
$$MIK \text{ (g izvlečka L}^{-1}\text{)} = \frac{MIK \text{ (mg GAE mL}^{-1}\text{)}}{SF \text{ (mg GAE g}^{-1}\text{ suhe snovi izvlečka)}} \times 1000 \quad \dots(4)$$

Preglednica 14: Primer izračuna na osnovi enačbe 4 za MIK (g suhega izvlečka/L gojišča) za sorto zelen pri topilu voda : metanol = 75 : 25 (v : v) za bakterijo *S. aureus*

Table 14: Example of calculation on a basis of equation of MIC (g extract/L medium) of 'Zelen' variety at extraction media water : methanol = 75 : 25 (v : v) against bacteria *S. aureus*

Izračun MIK (g suhega izvlečka/L gojišča)		
MIK (mg GAE/mL gojišča)	SF (mg GAE/g suhe snovi izvlečka)	MIK (g suhega izvlečka/L gojišča)
0,19	46,9	4,05

Na sliki 13 se zelo nazorno vidi, da so se fenolni izvlečki tropin rdečih sort bolje izkazali v primerjavi z belimi, saj na primer že 0,6 g suhega izvlečka fenolov tropin sorte modri pinot na L gojišča inhibira rast stafilokoka. Pri bacilusu so podatki še bolj impresivni, saj le 0,3 g suhega fenolnega izvlečka na L gojišča iste sorte inhibira rast te bakterije. Pri listeriji so vrednosti višje, vendar še vedno le 1,2 g suhega izvlečka fenolov tropin sorte modri pinot ali merlot na L gojišča inhibira to patogeno bakterijo. Inhibicije rasti po Gramu negativnih bakterijah nam s fenoli tropin uporabljenih rdečih sort ni uspelo dokazati, izjema so le fenoli tropin sort cabernet sauvignon in merlot, ki z dobrimi 3 g izvlečka na L gojišča inhibirata rast *E. coli*.



Slika 13: Vrednosti MIK izvlečkov fenolov tropin pri topilu voda : etanol = 50 : 50 (v : v) v odvisnosti od sorte grozdja in testne bakterije (v g suhega fenolnega izvlečka/L gojišča) (povprečna vrednost, n = 2)

Figure 13: MICs of of 6 *Vitis vinifera* L. varieties water: ethanol = 50 : 50 (v : v) phenol extracts (from skins and seeds) against five bacteria (in g of dry phenol extract /L media) (average value, n = 2)

Najbolj inhibitorno delujeta na G– bakterije izvlečka fenolov tropin sort zelen in sauvignon. Izvlečki fenolov tropin sorte sauvignon delujejo bolj inhibitorno na *E. coli*, saj 2,6 g suhega fenolnega izvlečka tropin sorte sauvignon na L gojišča inhibira rast te bakterije. Fenoli tropin sorte zelen delujejo bolj inhibitorno na *S. Enteritidis*, 3,6 g suhega fenolnega izvlečka na L gojišča preprečuje rast salmonelle. Na G+ bakterije delujejo izvlečki tropin sort zelen in sauvignon bistveno manj inhibitorno v primerjavi z izvlečki rdečih sort, kot tudi v primerjavi s sorto rebula. Za inhibicijo stafilokoka potrebujemo trikrat več suhega fenolnega izvlečka sorte sauvignon (2 g izvlečka na L gojišča) v primerjavi s sorto modri pinot in več kot šestkrat več izvlečka sorte zelen (6 g suhega izvlečka na L gojišča). Za inhibicijo rasti listerije potrebujemo kar 4,6 g suhega fenolnega izvlečka tropin sorte zelen na L gojišča in le 1,3 g izvlečka tropin sorte rebula na L gojišča.

Torej vse bakterije najbolj inhibirata izvlečka tropin sort sauvignon in zelen, saj delujeta najbolj široko, po količini izvlečka pa prednjačijo tropine rdečih sort modri pinot in merlot, saj zelo mala količina suhega izvlečka fenolov inhibira G+ bakterije.

4.4 KINETIKA PROTIMIKROBNEGA DELOVANJA

V nadaljevanju našega dela smo naredili analizo kinetike protimikrobnega delovanja. V skladu z najnižjo minimalno inhibitorno koncentracijo, ki smo jo določili z metodo mikrodilucije z indikatorjem INT, izvedene v mikrotitrski ploščici, smo vzorce tropin sort zelen, sauvignon in modri pinot (rezultati so prikazani na slikah 7, 8 in 12) določili za

nadaljnje analize kinetike protimikrobnega delovanja z makrodilucijsko metodo v bujonu. Izmed sedmih ekstrakcijskih topil smo kot najbolj optimalno določili topilo voda : etanol = 50 : 50 (v : v). Torej smo izmed 42 vzorcev kot optimalne izbrali tri izvlečke, pripravljene iz grozdnih tropin sorte zelen, sauvignon in modri pinot, vse z uporabo ekstrakcijskega topila voda : etanol = 50 : 50 (v : v).

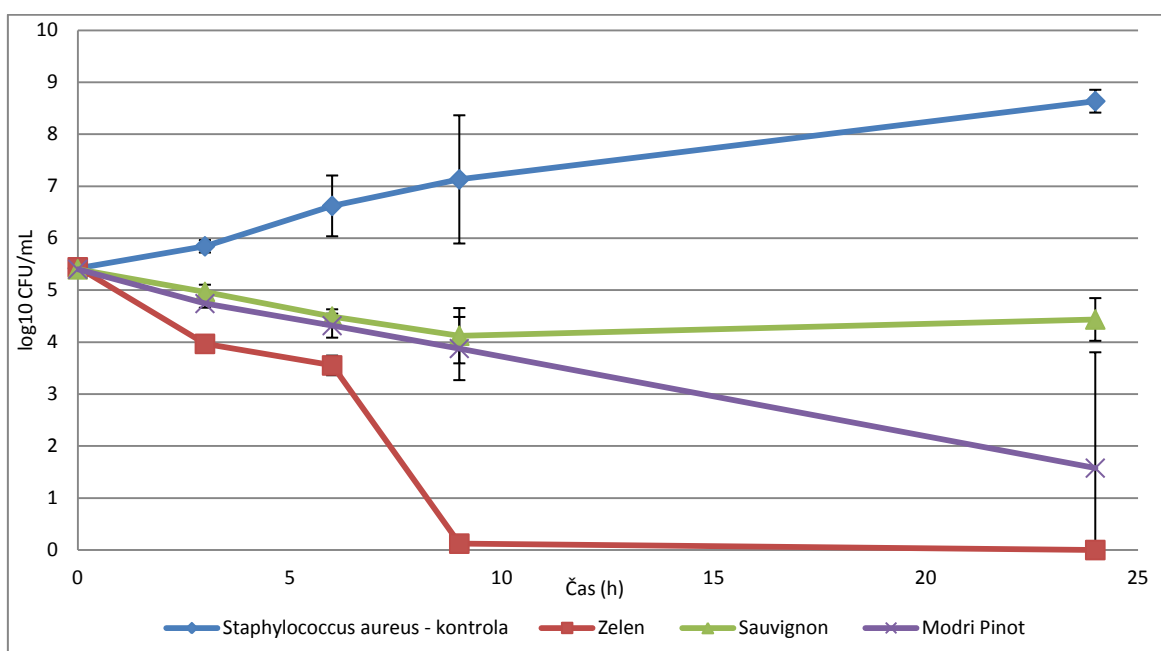
4.4.1 Krivulje odmiranja/rasti bakterije *Staphylococcus aureus*

Krivulje rasti, preživetja in odmiranja za bakterijo *S. aureus* po izpostavitvi trem fenolnim izvlečkom pri koncentracijah MIK, ki smo jih določili z mikrodilucijsko metodo, so prikazane na sliki 14.

Z določitvijo števila bakterij v gojišču z dodanim izvlečkom grozdnih tropin smo po 24 urni inkubaciji odčitali inhibicijo, ki smo jo dosegli s posameznim izvlečkom.

Kot je bilo tudi pričakovano, je bila poleg inhibicije rasti v dveh primerih dosežena tudi redukcija. Izvleček tropin sorte zelen v koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča (to je MIK izvlečka tropin sorte zelen za *S. aureus*) je znižal koncentracijo celic za približno 5 log stopenj, torej je zmanjšal tarčni organizem pod nivo detekcije že po 9 h inkubacije (slika 14).

Izvlečka fenolov tropin sort sauvignon in modri pinot nista tako učinkovito inhibirala rasti kot izvleček fenolnih spojin tropin sorte zelen. Tekom poskusa sta obe sorti preprečili razmnoževanje bakterij in znižali koncentracijo celic. Mikrobiološka inhibicija se je pri fenolnem izvlečku tropin sorte sauvignon ustavila po 9 h do končne koncentracije bakterije 10^4 CFU/mL. Pri tropinah sorte modri pinot se je tudi po 9 h nadaljevala redukcija in fenolni izvleček tropin sorte zelen v koncentraciji 0,19 mg GAE/mL je po 24h znižal koncentracijo celic za približno 4 log stopnje, na končno koncentracijo med $10-10^2$ CFU/mL.



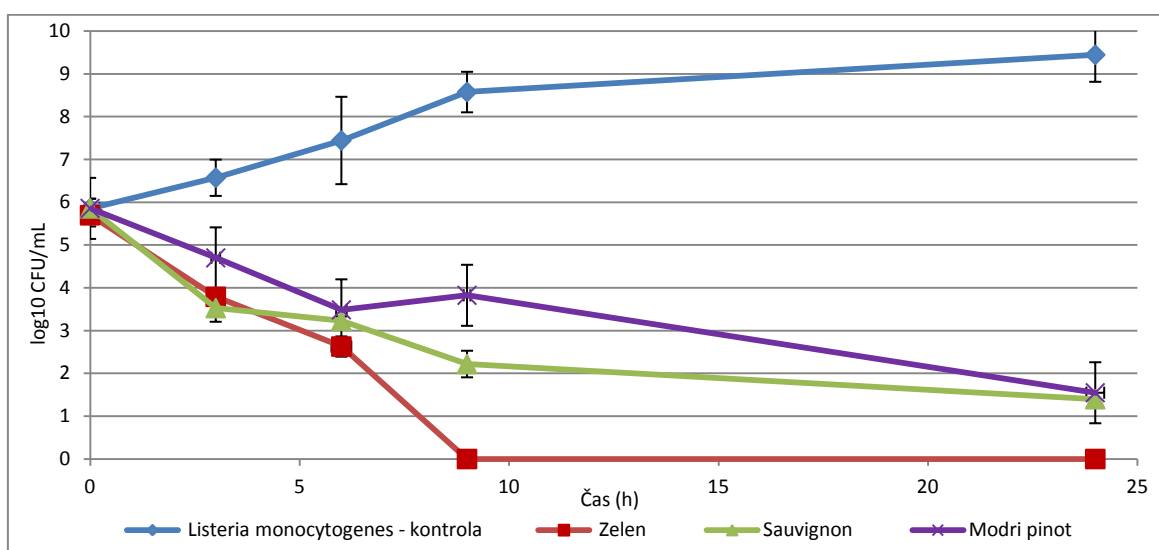
Slika 14: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *S. aureus* po izpostavitvi izvlečkom fenolnih spojin grozdnih tropin treh sort pri koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)

Figure 14: *S. aureus* growth and survival/death curves after exposure to phenolic extracts of three grape varieties (skins and seeds) at concentrations 0,19 mg GAE/mL media (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

4.4.2 Krivulje odmiranja/rasti bakterije *Listeria monocytogenes*

Krivulje rasti, preživetja in odmiranja za bakterijo *L. monocytogenes* po izpostavitvi trem izvlečkom fenolnim spojin tropin pri koncentracijah MIK, ki smo jih določili z mikrodilucijsko metodo, so prikazane na sliki 15.

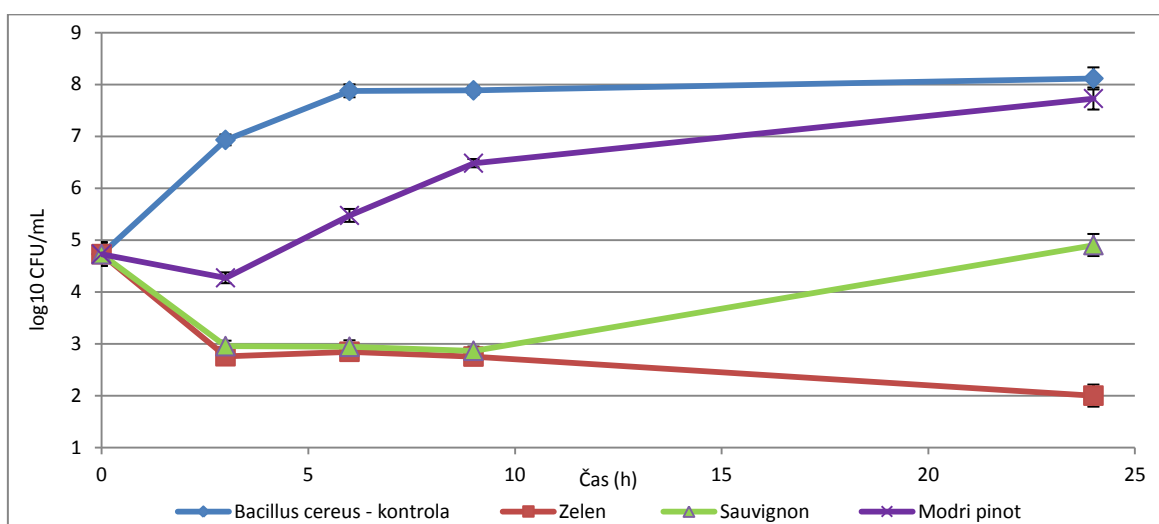
Podoben učinek so imeli izvlečki tudi na rast bakterije *L. monocytogenes*. Izvleček fenolnih spojin tropin sorte zelen v koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča je znižal koncentracijo celic za približno 5 log stopenj, torej je zmanjšal celice bakterije pod nivo detekcije že po 9 h inkubacije. V primerjavi z bakterijo *S. aureus* je izvleček fenolnih spojin tropin sorte sauvignon tudi po 9 h zniževal koncentracijo bakterij in znižal koncentracijo celic za približno 4 log stopnje, na končno koncentracijo med $10-10^2$ CFU/mL. Izvleček fenolnih spojin tropin sorte modri pinot je dosegel podobno mikrobiološko redukcijo za približno 4 log stopnje.



Slika 15: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *L. monocytogenes* po izpostavitvi izvlečkom fenolnih spojin treh sort pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)
Figure 15: *L. monocytogenes* growth and survival/death curves after exposure to phenolic extracts of three grape varieties (skins and seeds) at concentrations 0,38 mg GAE/mL media media (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

4.4.3 Krivulje odmiranja/rasti bakterije *Bacillus cereus*

Kinetiko protimikrobnega delovanja smo preverili tudi pri vrsti *B. cereus* (slika 16).

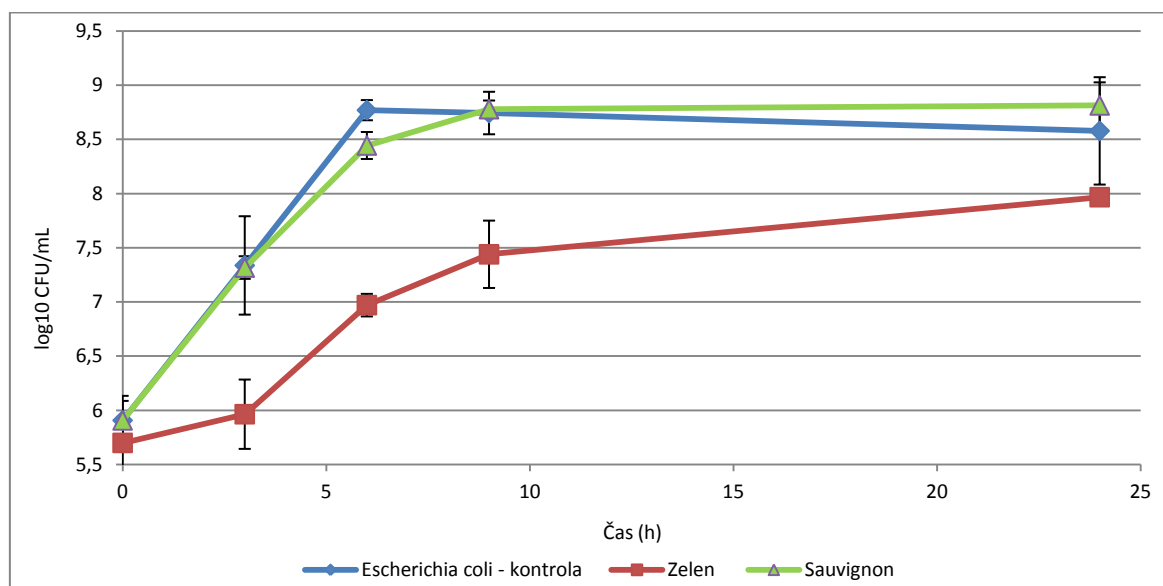


Slika 16: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *B. cereus* po izpostavitvi izvlečkom fenolnih spojin tropin sorte zelen v koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča, tropin sorte sauvignon v koncentraciji 0,094 mg GAE/mL gojišča in tropin sorte modri pinot pri koncentraciji 0,094 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)
Figure 16: *B. cereus* growth and survival/death curves after exposure to phenolic extracts (skins and seeds) grape variety `Zelen` at concentrations 0,19 mg GAE/mL media, variety `Sauvignon` at concentrations 0,094 mg GAE/mL media and variety `Pinot Noir` at concentrations 0,094 mg GAE/mL media media (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

Krivulje rasti, preživetja in odmiranja za to bakterijo po izpostavitvi trem fenolnim izvlečkom tropin pri koncentracijah MIK, ki smo jih določili z mikrodilucijsko metodo, so prikazane na sliki 16. Izvleček fenolnih spojin tropin sorte zelen v koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča je dosegel mikrobiološko redukcijo po 3 h za 2 log stopnji. Inhibicija se je nadaljevala do 24 h, vendar je koncentracija po 24 h ostala v območju 10^2 CFU/mL. Takšen rezultat je v skladu s pričakovanji, saj je bakterija *B. cereus* sporogena. Spore bakterije preživijo v okolju z izvlečkom. Izvleček fenolnih spojin tropin sorte sauvignon v koncentraciji 0,094 mg GAE/mL gojišča je inhibiral rast bakterije prvih 9 h in znižal koncentracijo celic za 2 log stopnji, kasneje pa je koncentracija bakterij začela naraščati do 10^5 CFU/mL. Izvlečki fenolnih spojin tropin sorte modri pinot v koncentraciji 0,094 mg GAE/mL gojišča so na začetku inhibirali rast bakterije, vendar je že po 4 h začela bakterija zopet rasti in se je po 24 h skoraj približala koncentraciji celic kontrole (10^8 CFU/mL).

4.4.4 Krivulje odmiranja/rasti bakterije *Escherichia coli* O157:H7

Tekom eksperimenta smo se odločili, da kinetiko protimikrobnega delovanja poskusimo tudi pri po Gramu negativnih bakterijah. Najprej smo analizirali izvlečke tropin sorte zelen pri koncentracijah MIK (0,38 mg GAE/mL gojišča) na bakteriji *E. coli* (slika 17). Izvlečki fenolnih spojin tropin sorte zelen niso inhibirali rasti *E. coli*, so pa znižali razmnoževanje bakterij v primerjavi s kontrolo do končne koncentracije do 10^8 CFU/mL. Izvleček fenolnih spojin tropin sorte sauvignon v koncentraciji 0,25 mg GAE/mL gojišča ni omejil razmnoževanja celic *E. coli* (slika 17).



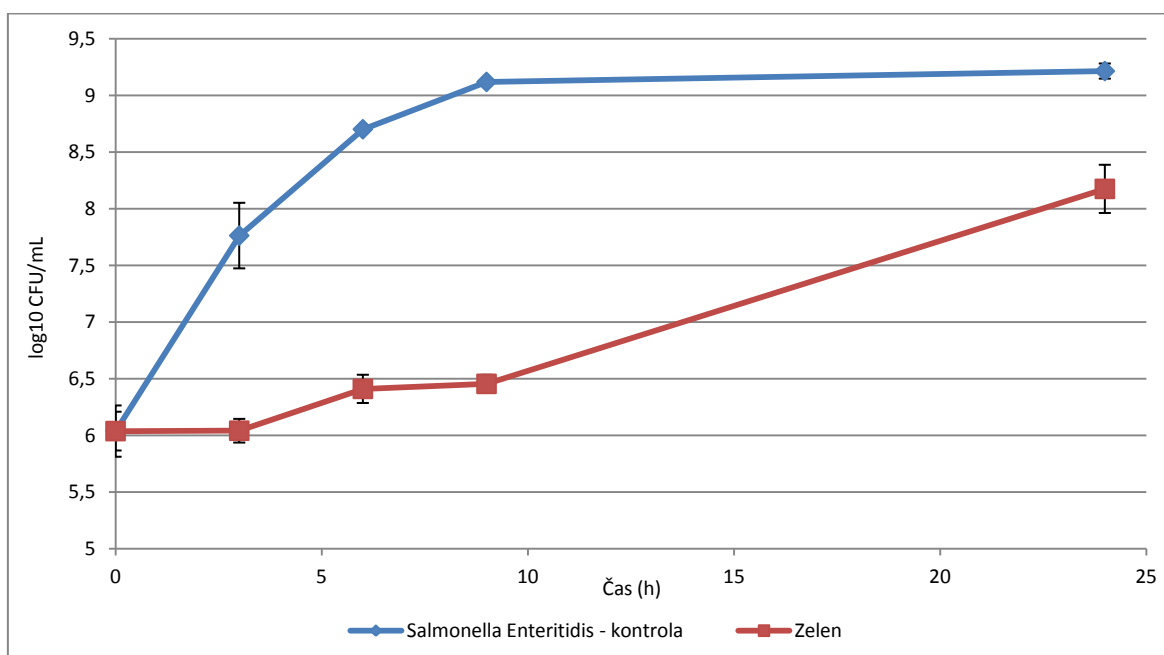
Slika 17: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *E. coli* po izpostavitvi izvlečkom fenolnih spojin sorte zelen v koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča ter sorte sauvignon v koncentraciji 0,25 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)

Figure 17: *E. coli* growth and survival/death curves after exposure to phenolic extracts grape variety `Zelen` at concentrations 0,38 mg GAE/mL media and variety `Sauvignon` at concentrations 0,25 mg GAE/mL media (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

Pri tej analizi smo za sorto zelen uporabili MIK, ki smo ga določili za novo serijo izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen. Povprečen MIK za izvleček fenolnih spojin tropin sorte zelen za bakterijo *E. coli* je sicer znašal 0,26 mg GAE/mL gojišča (slika 7).

4.4.5 Krivulje odmiranja/rasti bakterije *Salmonella Enteritidis*

Kot naslednjo po Gramu negativno bakterijo smo analizirali *S. Enteritidis*. Izvleček fenolnih spojin tropin sorte zelen v koncentraciji 0,38 mg GAE/mL je podobno kot pri bakteriji *E. coli* na začetku rahlo zaviral rast bakterije (slika 18) in malenkost upočasnil razmnoževanje bakterij.



Slika 18: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *S. Enteritidis* po izpostavitvi izvlečku fenolnih spojin sorte zelen v koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)
Figure 18: *S. Enteritidis* growth and survival/death curves after exposure to FDSS phenolic extract grape variety `Zelen` at concentrations 0,38 mg GAE/mL (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

4.5 VPLIV INKAPSULACIJE NA PROTIMIKROBNO UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN TROPIN

Pred izvedbo kinetike smo inkapsuliranemu izvlečku sorte zelen, ekstrahiranemu v 50 % etanolu, določili MIK. Pred izvedbo kinetike smo ponovno preverili MIK neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin tropin sorte zelen, saj smo dobili nov vzorec izvlečka. Ponekod smo dobili različne vrednosti, kot so predstavljene na sliki 7. Protimikrobno učinkovitost inkapsuliranega izvlečka sorte zelen smo testirali pri vseh petih bakterijah. Rezultati so prikazani v preglednici 15.

Preglednica 15: Protimikrobna učinkovitost inkapsuliranega in neinkapsuliranega izvlečka sorte zelen proti petim patogenim bakterijam (MIK v mg GAE/mL gojišča) (povprečna vrednost, n = 2)

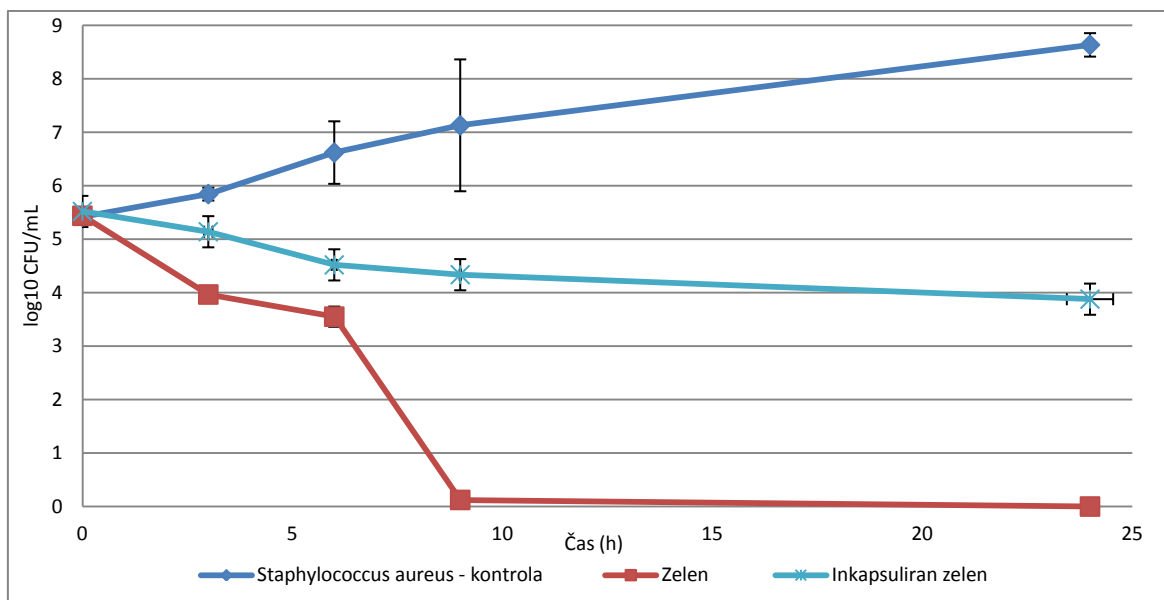
Table 15: Antimicrobial activity of encapsulated extract of variety `Zelen` against five foodborne pathogens (expressed as MICs in mg GAE/mL media) (average value, n = 2)

Bakterije	MIK (mg GAE/mL gojišča) neinkapsuliranega izvlečka*	MIK (mg GAE/mL gojišča) inkapsuliranega izvlečka
<i>S. aureus</i>	0,19	0,19
<i>B. cereus</i>	0,19	0,19
<i>L. monocytogenes</i>	0,38	0,38
<i>E. coli</i> O157:H7	0,38	0,38
<i>S. Enteritidis</i>	0,38	0,38

* MIK je ponovno izmerjen na drugemu vzorcu izvlečka

4.5.1 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije *S. aureus*

Inkapsuliranemu izvlečku tropin sorte zelen smo določili MIK, ki je znašal 0,19 mg GAE/mL gojišča (preglednica 11). MIK neinkapsuliranega izvlečka sorte zelen na novejšem vzorcu je prav tako znašal 0,19 mg GAE/mL gojišča. Povprečen MIK izvlečka sorte zelen na sliki 7 je 0,33 mg GAE/mL gojišča. Inkapsuliran izvleček tropin sorte zelen je bil v primerjavi z neinkapsuliranim manj učinkovit (slika 19).

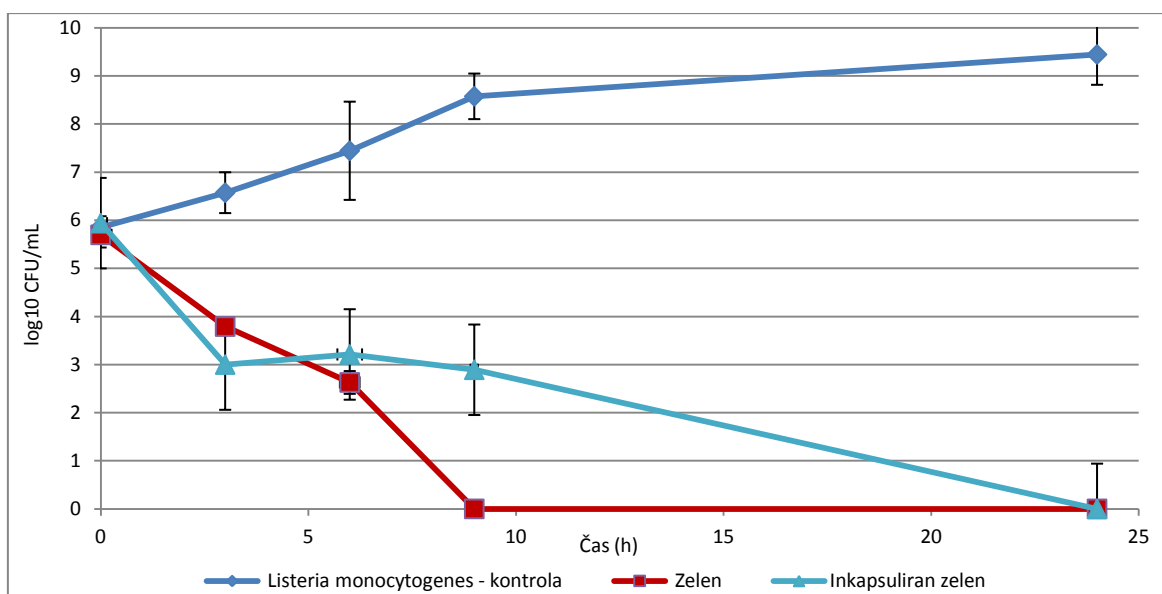


Slika 19: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *S. aureus* po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)

Figure 19: *S. aureus* growth and survival/death curves after exposure to FDSS phenolic extracts and encapsulated phenolic extracts of grape variety `Zelen` at concentrations 0,19 mg GAE/mL media (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

4.5.2 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije *L. monocytogenes*

Protimikrobno učinkovitost inkapsuliranega izvlečka tropin sorte zelen smo testirali tudi na bakteriji *L. monocytogenes*, minimalna inhibitorna koncentracija je znašala 0,38 mg GAE/mL gojišča. MIK neinkapsuliranega izvlečka sorte zelen je prav tako znašala 0,38 mg GAE/mL gojišča. Iz slike 20 lahko odčitamo, da je imela koncentracija 0,38 mg GAE/mL gojišča izvlečka fenolnih spojin sorte zelen bakteriociden učinek že po 9 urah, inkapsuliranemu fenolnemu izvlečku pa je v isti koncentraciji bakteriociden učinek uspelo doseči šele po 24 urah.

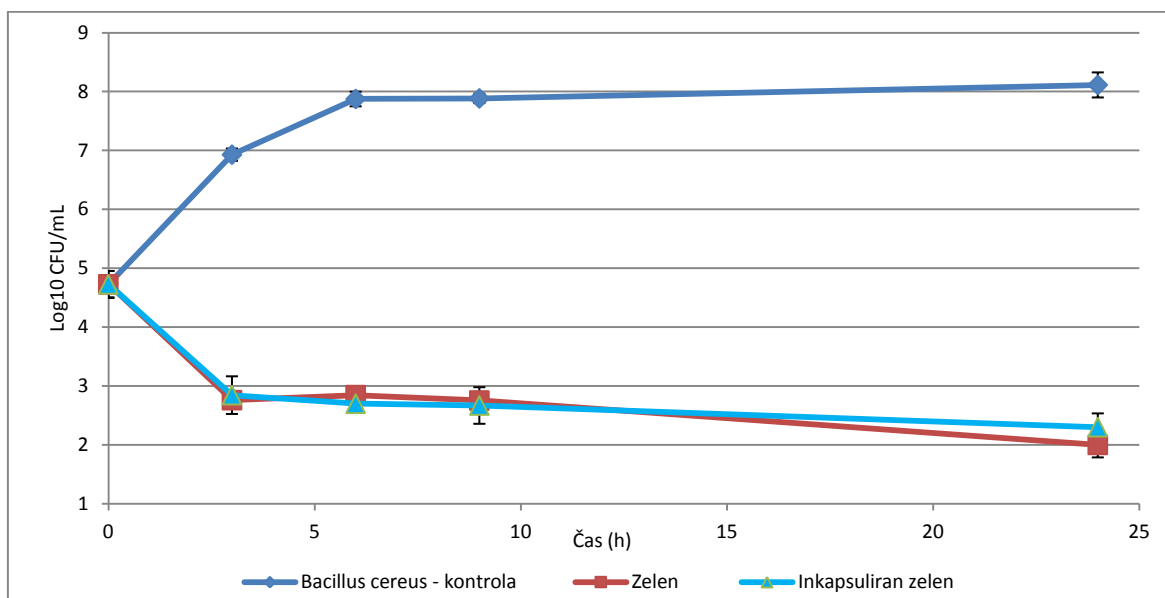


Slika 20: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *L. monocytogenes* po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)

Figure 20: *L. monocytogenes* growth and survival/death curves after exposure to FDSS phenolic extracts and encapsulated phenolic extracts of grape variety `Zelen` at concentrations 0,38 mg GAE/mL media (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

4.5.3 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije *B. cereus*

Učinkovitost inkapsulacije smo preverili tudi pri sporogeni, po Gramu pozitivni bakteriji *B. cereus*. MIK inkapsuliranega in neinkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen je znašal 0,19 mg GAE/mL gojišča. Povprečna vrednost MIK na sliki 7 je 0,13 mg GAE/mL gojišča. Na sliki 21 vidimo, da sta oba pripravka enako reducirala število bakterij. Že po treh urah inkubacije sta dosegla mikrobiološko inhibicijo za 2 log stopnji. Inhibicija se je nadaljevala do 24 h, vendar je koncentracija po 24 h ostala v območju 10^2 CFU/mL.

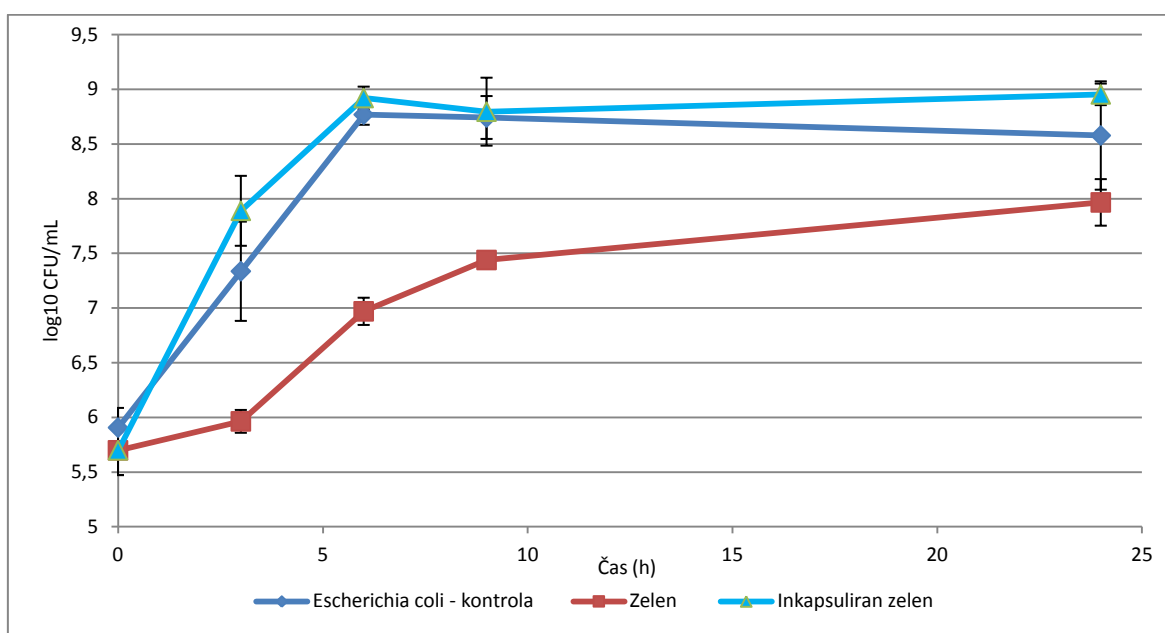


Slika 21: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *B. cereus* po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,19 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)

Figure 21: *B. cereus* growth and survival/death curves after exposure to FDSS phenolic extracts and encapsulated phenolic extracts of grape variety `Zelen` at concentrations 0,19 mg GAE/mL media (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

4.5.4 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije *E. coli*

Protimikrobna učinkovitost inkapsuliranega izvlečka tropin sorte zelen je bila podobna neinkapsuliranemu, MIK je znašal 0,38 mg GAE/mL gojišča. Na sliki 22 vidimo, da noben pripravek ni popolnoma inhibiral rasti bakterij, je bil pa neinkapsuliran pripravek nekoliko boljši.

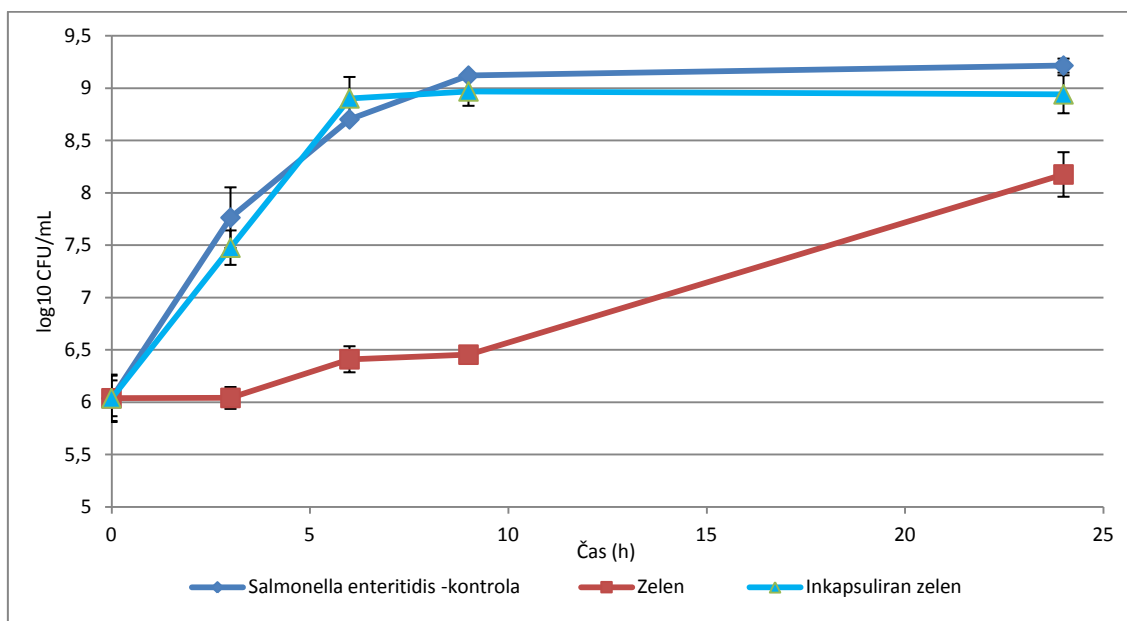


Slika 22: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *E. coli* po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)

Figure 22: *E. coli* growth and survival/death curves after exposure to FDSS phenolic extracts and encapsulated phenolic extracts of grape variety `Zelen` at concentrations 0,38 mg GAE/mL (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

4.5.5 Vpliv inkapsuliranega izvlečka fenolnih spojin tropin sorte zelen na krivuljo odmiranja/rasti bakterije *S. Enteritidis*

Protimikrobno učinkovitost inkapsuliranega izvlečka tropin sorte zelen smo testirali tudi na bakteriji *S. Enteritidis* (slika 23), MIK je znašal 0,38 mg GAE/mL gojišča, kakor tudi MIK neinkapsuliranega izvlečka tropin sorte zelen. Pri vseh petih bakterijah je bil MIK inkapsuliranega izvlečka tropin sorte zelen podoben kot pri neinkapsuliranem izvlečku. Inkapsuliran izvleček fenolnih spojin tropin sorte zelen ni imel nobenega vpliva na odmiranje salmonele, krivulja rasti je bila zelo podobna rasti kontrole.



Slika 23: Krivulja rasti, preživetja/odmiranja bakterije *S. Enteritidis* po izpostavitvi inkapsuliranemu in neinkapsuliranemu izvlečku fenolnih spojin sorte zelen pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča (povprečna vrednost in standardni odklon, n = 2)

Figure 23: *S. Enteritidis* growth and survival/death curves after exposure to FDSS phenolic extracts and encapsulated phenolic extracts of grape variety `Zelen` at concentrations 0,38 mg GAE/mL (average value, error bars indicate standard deviations of assays, n = 2)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Vinarska industrija proizvede vsako leto ogromne količine stranskih proizvodov v obliki grozdnih tropin, ki predstavljajo ekološki in ekonomski problem. Ponovna uporaba industrijskih stranskih produktov ne le zmanjša njihov vpliv na okolje, ampak lahko prinaša tudi ekonomske prednosti (Zhu in sod., 2015a). Grozdne tropine vsebujejo veliko polifenolov, poročajo namreč, da okoli 70 % fenolnih spojin ostane v tropinah (Mazza, 1995). Dokazano je antioksidativno, antikancerogeno in antidiabetično delovanje grozdnih tropin (Ruberto in sod., 2007; Parry in sod., 2011). Zelo veliko študij pa je dokazalo tudi protibakterijsko delovanje (Özkan in sod., 2004; Kao in sod., 2010; Adamez in sod. 2012; Xu in sod., 2016). Zato smo se v naši študiji osredotočili na izvlečke fenolnih spojin iz grozdnih tropin belih in rdečih sort, ki prevladujejo v Vipavski dolini in nastanejo kot stranski proizvod tekom proizvodnje vina. Izmed belih sort smo izbrali sorte: zelen, sauvignon in rebula. Med rdečimi sortami smo izbrali sorte: cabernet sauvignon, merlot in modri pinot.

Leta 2010 objavljena študija, ki so jo izvedli Katalinić in sod., na fenolnih izvlečkih grozdnih kožic sedmih Dalmatinskih rdečih in belih sort grozdja, je pokazala, da je vsebnost polifenolov odvisna od sorte grozdja. Na vsebnost fenolov v grozdnih tropinah pa pomembno vpliva tudi nepopolna ekstrakcija tekom maceracije, saj so relativno visoke vrednosti polifenolov še vedno prisotne v tropinah (Fontana in sod., 2013). V našem primeru je bilo grozdje obrano ob tehnološki zrelosti za posamezno sorto in predelano po tipičnih vinifikacijskih postopkih, ki so se glede na sorto razlikovali predvsem po dolžini maceracije.

Zato smo skladno z delovnimi hipotezami najprej preverili, ali je protimikroben učinek izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin odvisen od sorte grozdja in vinifikacijskega postopka, nadalje smo preverili, ali je protimikrobna učinkovitost odvisna od vrste ekstrakcijskega topila.

5.1.1 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz grozdnih tropin glede na sorto

Minimalno inhibitorno koncentracijo smo kot merilo protimikrobne učinkovitosti določili 42 izvlečkom fenolnih spojin iz tropin grozdja 6 sort ekstrahiranih s 7 različnimi topili. Uporabili smo pet testnih mikroorganizmov, ki so vključevali po Gramu pozitivne (*B. cereus*, *S. aureus* in *L. monocytogenes*) in po Gramu negativne bakterije (*E. coli* O157:H7 in *S. Enteritidis*), ki so najpogostejše bakterijske povzročiteljice črevesnih okužb, prenosljivih s hrano.

Izbrali smo metodo mikrodilucije v tekočem gojišču, za katero so Klančnik in sod. leta 2010 potrdili, da je primerljiva z ostalimi dilucijskimi metodami in občutljivejša v

primerjavi s presejalnimi testi. Na slikah od 7 do 12 so predstavljene vrednosti MIK, ki smo jih določili za izvlečke iz tropin posameznih sort grozdja. Te vrednosti dosegajo koncentracije do 0,094 mg GAE/mL gojišča. Največja učinkovitost izvlečkov tropin je bila opazna pri belih sortah zelen in sauvignon ter pri rdeči sorti modri pinot. Izvlečki so bili najbolj učinkoviti proti po Gramu pozitivnim bakterijam vrst *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in *Listeria monocytogenes*. Proti po Gramu negativnim bakterijam je bila ugotovljena nekoliko slabša aktivnost, oz. smo opazili večje razlike v učinkovitosti posameznih izvlečkov. Presenetljivo je, da so bili izvlečki fenolnih spojin tropin sort zelen in sauvignon zelo učinkoviti proti obema po Gramu negativnima bakterijama. Naši rezultati se delno skladajo s predhodnimi študijami s celim grozdom oz. grozdnimi tropinami, ki so dokazali protibakterijsko učinkovitost proti po Gramu pozitivnim kot po Gramu negativnim bakterijam in tudi, da so bili izvlečki bolj učinkoviti proti po Gramu pozitivnim bakterijam (Darra in sod., 2012; Oliveira in sod., 2013; Xu in sod., 2015). Podobni rezultati so na splošno znani za izvlečke fenolnih spojin iz različnih rastlinskih materialov, ker je glavna ovira za boljše delovanje slabša prehodnost skozi večplastno celično steno po Gramu negativnih bakterij (Katalinić in sod., 2010; Klančnik in sod., 2010). Naši rezultati se skladajo tudi s študijo pri dalmatinskih belih sortah (Katalinić in sod., 2010), kjer so ravno tako dokazali protimikrobno učinkovitost belih sort grozdja proti po Gramu negativnim bakterijam. Izvlečki sort zelen in sauvignon so v primerjavi z ostalimi sortami dosegali boljše protimikrobno aktivnost za obe po Gramu negativni bakteriji. Najnižja vrednost MIK je bila izmerjena pod 0,2 mg GAE/mL gojišča in sicer za izvlečke fenolnih spojin tropin sorte zelen napram *E. coli*. Mulero in sod. (2010) razlagajo, da je vzrok lahko v flavonolih v grozdju, ki so lokalizirani v trdnih delih grozdja.

Grozdje sort zelen in sauvignon je bilo predelano s postopkom kratke maceracije. Grozdje sorte zelen je bilo pred stiskanjem v stiku s kožico 2 uri, grozdje sorte sauvignon pa 4 ure, zato je tudi večja količina fenolnih spojin ostala v tropinah. Pri tretji beli sorti, pri sorti rebula, je bilo grozdje obdelano po stari primorski tehnologiji s podaljšano maceracijo ob fermentaciji, ki je trajala 14 dni. Protimikrobne učinkovitosti nismo dokazali proti po Gramu negativnim bakterijam, oz. je bil $MIK > 1,5$ mg GAE/mL gojišča. Pri rdečih sortah je bilo grozdje sorte modri pinot ob predhodni hladni maceraciji macerirano 10 dni, sorta merlot 12 dni in cabernet sauvignon 14 dni.

V rdečem grozdju so flavonoli prisotni v manjši meri kot antocianini, vendar so bili v našem primeru (priloga C in D) izmerjeni v relativno visokih koncentracijah, primerljivih s sortama zelen in sauvignon in tudi v fenolnem izvlečku tropin sorte modri pinot. V prilogi C in D vidimo tudi, da so bile vsebnosti flavonolov nižje v izvlečkih sorte merlot in cabernet sauvignon, prav tako so bili nižji v sorti rebula. To dobro korelira z nižjo protimikrobno učinkovitostjo teh izvlečkov.

5.1.2 Vpliv ekstrakcijskega topila na protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin

V naši raziskavi smo želeli tudi preveriti, ali je protimikrobna učinkovitost odvisna od vrste ekstrakcijskega topila. Ekstrakcija je prvi korak pri pridobivanju fenolnih spojin iz rastlinskega materiala. Veliko raziskovalcev uporablja zmes organskega topila oz. alkohola in vode, ker prisotnost vode poveča prepustnost celičnega tkiva in tako z molekularno difuzijo omogoči boljši masni transport, kot tudi ohrani v vodi topne bioaktivne spojine (Cheng in sod., 2012). V literaturi navajajo, da so aceton, etanol (Libran in sod., 2013) in metanol (Sulaiman in sod., 2011) najpogosteje uporabljena topila, ki dajejo pri ekstrakciji polifenolov iz stranskih produktov grozdja najboljše rezultate (Yilmaz in sod., 2006). Zato smo tudi mi v naši raziskavi uporabili navedena topila. V tem poglavju smo minimalno inhibitorno koncentracijo, izraženo v ekvivalentih galne kisline kot mg GAE/mL gojišča, preračunali na grame liofiliziranih tropin na L (g FDSS/L). Podatki nam dajejo boljšo predstavbo o uporabnosti izvlečkov glede na suho snov tropin.

V preglednici 8 vidimo, da je bilo najoptimalnejše ekstrakcijsko topilo pri določanju MIK pri bakteriji *S. aureus* topilo voda : etanol v volumskem razmerju 50 : 50. Najbolje se je odrezala sorta modri pinot, samo 3,2 g FDSS na L gojišča preprečuje rast bakterije *S. aureus*. Tudi pri ostalih dveh po Gramu pozitivnih bakterijah je bilo najoptimalnejše topilo voda : etanol v volumskem razmerju 50 : 50. V primerjavi z belimi sortami (2,1 do 50,9 g FDSS/L gojišča) se vrednosti MIK pri rdečih sortah gibljejo med 23,4 do 65,9 g FDSS/L gojišča. Naši rezultati se skladajo z rezultati študije, kjer so dokazali, da so vsi izvlečki fenolov tropin (uporabili so topila etanol, metanol in aceton) imeli bolj inhibitoren učinek na *S. aureus* v primerjavi z *E. coli* (Cheng in sod., 2012). Kjub temu, da je pri bilo pri po Gramu negativnih bakterijah težko izbrati najboljše ekstrakcijsko topilo, saj smo imeli premalo podatkov in še ti so bili razpršeni, smo kot najoptimalnejše topilo izbrali voda : etanol v volumskem razmerju 50 : 50. Naši rezultati potrjujejo predhodne raziskave, kjer se je 50 % oz. 30 % etanol izkazal kot optimalno ekstrakcijsko topilo pri rastlinskih polifenolih (Bucić-Kojić in sod., 2009; Dent in sod., 2013).

5.1.3 Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin glede na bakterije

Na sliki 13 lahko vidimo, da je bila v naši raziskavi izmed petih bakterij najbolj občutljiva bakterija *B. cereus*, sledi *S. aureus* in *L. monocytogenes*, najmanj pa *E. coli* in *S. Enteritidis*. Večja občutljivost po Gramu pozitivnih bakterij je verjetno zaradi različne zgradbe celične stene in zunanje membrane (Shan in sod., 2007). Naši rezultati se delno ujemajo z raziskavami, ki so jih opravili s celim grozdom oz. grozdnimi tropinami in so ugotovile protimikrobno učinkovitost proti obema skupinama bakterij ter da so bili izvlečki bolj učinkoviti proti po Gramu pozitivnim bakterijam (Darra in sod., 2012; Olivera in sod., 2013; Xu in sod., 2015). Verjetni vzrok za te razlike leži v pomembnih razlikah v zgradbi zunanje membrane bakterij. Po Gramu negativne bakterije imajo dvojno membrano in

periplazmatski prostor. Njihova zunanja membrana je hidrofilna in bogata z lipopolisaharidnimi molekulami, ki predstavljajo oviro pri penetraciji mnogih molekul, njihova rezistenca pa je povezana tudi s prisotnostjo encimov v periplazmatskem prostoru, ki so sposobni razgradnje molekul, ki pridejo od zunaj (Shan in sod., 2007). Po Gramu pozitivne bakterije nimajo takšne zunanje membrane in celične strukture, zato lahko protimikrobne snovi lažje preдреjo bakterijsko celično steno in citoplazmatsko membrano ter povzročijo izločanje citoplazme in njeno koagulacijo (Kalemba in Kunicka, 2003).

V poglavju 4.3 smo rezultate izrazili kot g suhega izvlečka/L gojišča. Do razlik prihaja zaradi različnih vsebnosti fenolnih spojin in posledično do različnih vrednosti kot v poglavju 4.2. Med po Gramu pozitivnimi bakterijami je bila najbolj občutljiva *B. cereus*, vendar je bila občutljivost odvisna od sorte in topila. Samo 0,29 g suhega izvlečka (oziroma 1,6 g liofiliziranih tropin/L gojišča) fenolnih spojin tropin sorte modri pinot na L inhibira to bakterijo. Razlike znotraj sort so majhne, saj že tudi izvleček tropin sorte merlot pri koncentraciji 0,31 g suhega izvlečka/L gojišča ali 0,33 g suhega izvlečka/L gojišča tropin sorte rebula inhibira to patogeno bakterijo. Zanimivo je, da ostali dve beli sorti inhibirata *B. cereus* pri šele 1 oz. 1,6 g suhega izvlečka/L gojišča. *B. cereus* se je izkazala tudi za najbolj občutljivo bakterijo na izvlečke grozdnih listov dalmatinskih sort grozdja (Katalinić in sod., 2013). Podoben trend se nakazuje tudi pri dveh ostalih po Gramu pozitivnih bakterijah, čeprav je vrednost MIK bistveno večja. Bakterijo *S. aureus* bolj inhibirajo fenolni izvlečki tropin rdečih sort (0,6–0,76 g suhega izvlečka/L gojišča). Tudi *L. monocytogenes* bolj inhibirajo fenolni izvlečki tropin rdečih sort. Vrednost MIK je od 1,2 do 1,5 g suhega izvlečka/L gojišča, pri belih sortah pa od 1,3 g suhega izvlečka/L gojišča (rebula) do 4,6 g suhega izvlečka/L gojišča (zelen).

Po Gramu negativne bakterije najbolj inhibirajo izvlečki fenolnih spojin tropin belih sort zelen in sauvignon. Slednja deluje bolj inhibitorno na *E. coli*, saj 2,6 g fenolnega izvlečka tropin na L gojišča inhibira rast te bakterije. Zelen deluje bolj inhibitorno na *S. Enteritidis*, 3,6 g suhega izvlečka na L gojišča preprečuje rast salmonele.

Veliko študij je že poročalo o protimikrobni učinkovitosti, vsebnosti fenolov in antioksidativni aktivnosti grozdnih tropin. Dokazali so tudi korelacijo med vsebnostjo fenolov in antioksidativno aktivnostjo (Adamez in sod., 2012). Direktna primerjava rezultatov različnih študij je zaradi različnih uporabljenih metod in vrst bakterij težje izvedljiva. Fenolne spojine, ki jih najdemo v grozdju, so nosilke antioksidativne in protimikrobne učinkovitosti. Vsebnost fenolnih spojin je zato prvi pokazatelj potencialne učinkovitosti pripravljenih izvlečkov. Vsebnost fenolnih spojin je odvisna predvsem od sorte grozdja in ekstrakcijskega topila (preglednica 4 in 5). V preglednici 4 so vidne manjše vsebnosti v vzorcih izvlečkov tropin sort zelen in sauvignon, ki znašajo med 50-100 mg GAE/g suhe snovi izvlečkov, medtem ko so izvlečki rdečih sort vsebovali tudi do 350 mg skupnih fenolnih spojin v gramu suhega izvlečka. Nesorazmerje oz. velike rezlike v koncentracijah skupnih fenolov so potencialno pogojene z uporabljenim tehnološkim

postopkom in časom maceracije. Zaradi kratkega časa slednje je bila npr. onemogočena popolna raztopitev sladkorjev iz grozdnih jagod, zato so jih izvlečki fenolnih spojin tropin sorte zelen in sauvignon vsebujejo manjšo kolčino glede na suhi izvleček (Trošt in sod., 2011).

V preglednici 5 je vsebnost fenolnih spojin izražena v mg GAE/g FDSS. Najboljši izvleček glede na vsebnost skupnih fenolov je bil pridobljen z ekstrakcijskim topilom voda : etanol = 50 : 50 (v : v) za izvlečke fenolnih spojin tropin sort modri pinot, sauvignon, merlot, rebula in cabernet sauvignon (59, 44, 42 in 33 mg GAE/g FDSS) (Trošt in sod., 2015). V preglednici 13 in v prilogi B vidimo, da je bila določena najnižja protimikrobna učinkovitost izvlečkov proti Gram pozitivnim bakterijam sorte modri pinot (med 1,6 – 6,4 g FDSS/L gojišča), potem sorte sauvignon in merlot. S tem smo dokazali povezavo med protimikrobno aktivnostjo in vsebnostjo skupnih fenolov (priloga C in D) (Trošt in sod., 2015).

V prilogi A so podane vrednosti za antioksidativno aktivnost izvlečkov grozdnih tropin, ki jo je določil Kajetan Trošt. V prilogi vidimo, da so najvišjo antioksidativno vrednost določili za sorto modri pinot (0,46 – 0,55 mmol Trolox). Sledijo sorte sauvignon in merlot (vrednosti od 0,1 – 0,4 mmol Trolox). Dokazali smo, da obstaja povezava med protimikrobno učinkovitostjo in antioksidativno aktivnostjo izvlečkov (Priloga A in B) (Trošt in sod., 2015). V prilogi B vidimo podoben trend pri sortah modri pinot, sauvignon in merlot, rezultati so podani v gramih liofiliziranih tropin na L gojišča. Izvlečki teh sort dosegajo najnižje minimalne inhibitorne koncentracije.

Če primerjamo prilogo B s sliko 13, vidimo različne trende. Na sliki 13 so namreč rezultati podani v gramih izvlečka na L gojišča in slika kaže, da so se najbolj odrezale rdeče sorte. Iz priloge B lahko razberemo, da so se najbolj odrezale sorte sauvignon, merlot in modri pinot. S tem primerom smo dokazali, da je izbira, v kakšnih enotah bomo podajali rezultate, zelo pomembna in zaradi tega so rezultati različnih raziskav med seboj težje primerljivi.

5.1.4 Kinetika protimikrobnega delovanja

V tem delu eksperimenta smo s krivuljo rasti/odmiranja preverjali kinetiko protimikrobnega delovanja izvlečkov na bakterije vrst *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7 in *Salmonella* Enteritidis. Na osnovi najnižjih minimalnih inhibitornih koncentracij so bili izvlečki sorte zelen, sauvignon in modri pinot, vsi pripravljene z ekstrakcijskim topilom voda : etanol = 50 : 50 (v : v), izbrani za nadaljnje analize kinetike protimikrobnega delovanja z metodo makrodilucije. Podatke smo podali v obliki krivulj in rezultati so prikazani na slikah od 14 do 18.

Najprej smo spremljali kinetiko protimikrobnega delovanja na po Gramu pozitivnih bakterijah. Kot je bilo pričakovano, je bila poleg inhibicije rasti dosežena tudi redukcija števila bakterij. Izvleček sorte zelen s koncentracijo 0,19 mg GAE/mL gojišča v primeru bakterije *Staphylococcus aureus* in 0,38 mg GAE/mL gojišča v primeru bakterije *Listeria monocytogenes* je dosegel redukcijo za več kot 5 log stopenj, torej je zmanjšal število celic bakterije pod nivo detekcije že po 9 h inkubacije. Rezultati MIK so podani v mg GAE/mL gojišča, kar nam omogoča direktno primerjavo učinkovitosti fenolnih spojin v izvlečkih z že omenjeno raziskavo, opravljeno na dalmatinskih belih in rdečih sortah grozdja, kjer so dokazali MIK za bakterijo *Staphylococcus aureus* od 0,15–0,26 do 0,22–0,44 mg GAE/mL gojišča (Katalinić in sod., 2010). *Listeria monocytogenes* je bila v primerjavi s *S. aureus* manj občutljiva vrsta. Podobno kot v raziskavi Klančnik in sod. (2010), smo v naši raziskavi dokazali višjo vrednost MIK. Pri testiranju izvlečkov sort sauvignon in modri pinot z metodo makrodilucije s koncentracijami MIK, kot smo jih dobili pri mikrodiluciji, sta izvlečka zmanjšala število, ne pa tudi eliminirala bakterijskih celic.

Bakterije rodu *Bacillus* so sporogene, spor pa izvlečki ne uničijo. Zato tudi nismo dokazali baktericidnega učinka. Izvleček fenolnih spojin tropin sorte zelen je dosegel mikrobiološko inhibicijo za 2 log stopnji, medtem ko je pri izvlečkih fenolnih spojin tropin sort sauvignon in modri pinot kljub začetni inhibiciji začela koncentracija bakterijskih celic kasneje naraščati.

Pri po Gramu negativnih bakterijah smo kinetiko protimikrobnega delovanja preizkusili samo na belih sortah, saj pri sorti modri pinot nismo določili ustrezne vrednosti MIK. Izvleček sorte zelen je pri koncentraciji 0,38 mg GAE/mL gojišča dosegel blago inhibicijo na bakterijo *E. coli* in *S. Enteritidis* za približno 1 log stopnjo, medtem ko izvečki sorte sauvignon na bakterijo *E. coli* niso imeli nobenega učinka. V svoji raziskavi so Serra in sod. (2008) dokazali, da izvleček ostankov oliv ni imel inhibitornega učinka na *E. coli*, rastna krivulja je bila podobna kontroli. V isti raziskavi so preučevali tudi izvlečke grozdnih pečk in ugotovili, da je bila protimikrobna učinkovitost odvisna od koncentracije.

Podobno so ugotovili v raziskavi, ki so jo leta 2015 objavili Zhu in sod. (2015b) Ugotovili so, da je inhibitorni učinek grozdnih pečk odvisen od koncentracije izvlečka in začetne koncentracije bakterije *Escherichia coli* O157:H7. Pri visoki začetni koncentraciji (1×10^7 CFU/mL) izvleček grozdnih pečk ni imel nobenega učinka. Pri koncentraciji bakterij 5×10^5 CFU/mL je 2–4 mg/mL izvlečka inhibiralo rast bakterije, medtem ko je bila koncentracija 4 mg/mL celo baktericidna. Nižje koncentracije izvlečka (0,125–1 mg/mL) so celo pospešile rast bakterij. Možna razlaga je, da v nižjih koncentracijah izvleček deluje kot hranilo, vir ogljika, v višjih koncentracijah pa prevlada protimikrobni učinek.

Zaključimo lahko, da so bili izvlečki avtohtone sorte zelen pri minimalni inhibitorni koncentraciji, določeni z mikrodilucijo pri analizi kinetike protimikrobne učinkovitosti najbolj učinkoviti. Kljub temu je bila ekstrakcija skupnih fenolov iz sorte zelen manj učinkovita v primerjavi z ostalimi sortami. Vendar ko, poleg vsebnosti skupnih fenolov v

izvlečkih šestih različnih gramih liofiliziranih tropin na L, upoštevamo še njihovo antioksidativno in protimikrobno učinkovitost, je jasno, da se sorta modri pinot po ekstrakciji s 50 % etanolom izkaže kot najbolj optimalna.

5.1.5 Vpliv inkapsulacije na protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin

Skladno z delovnimi hipotezami smo preverili, ali je protimikrobna učinkovitost odvisna od načina aplikacije, zato smo poleg neinkapsuliranega izvlečka testirali tudi učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin, kapsuliranih v β -ciklodekstrinsko ovojnico.

Po opravljeni inkapsulaciji smo določili vrednosti MIK inkapsuliranemu izvlečku sorte zelen proti vsem patogenim bakterijam (preglednica 15). Zanimivo je, da so bili določene vrednosti MIK inkapsuliranega izvlečka sorte zelen pri vseh petih bakterijah enake kot za neinkapsulirane izvlečke. Rezultati se delno ujemajo s študijo, kjer so ugotovili, da inkapsulacija eteričnega olja origana v β -ciklodekstrin ohrani protimikrobno učinkovitost proti bakterijam *E. coli*, *S. aureus* in *Pseudomonas aeruginosa* (Arana-Sanchez in sod., 2010). Opravili smo tudi kinetiko protimikrobnega delovanja. Mikrobiološko redukcijo je dosegel samo inkapsuliran izvleček sorte zelen proti bakteriji *L. monocytogenes*. Število celic je po 24 urah znižal pod mejo detekcije, to je nekoliko kasneje kot neinkapsuliran izvleček sorte zelen. V primeru bakterije *S. aureus* in *B. cereus* je bila dosežena inhibicija rasti za 1 oz. 2 log stopnji. Na po Gramu negativne bakterije inkapsuliran izvleček sorte zelen ni imel vpliva.

V primerjavi z rezultati, ki so jih objavili de Souza in sod. (2014), so naši rezultati bolj obetavni. Brazilci so določili MIK inkapsuliranemu vzorcu grozdnih tropin sorte bordo (*Vitis labrusca*). V primerjavi z inkapsuliranim izvlečkom je bila protimikrobna učinkovitost neinkapsuliranega izvlečka iz liofiliziranih tropin večja. Dokazali so protimikrobno učinkovitost proti bakterijam *S. aureus* in *L. monocytogenes*, ki je bila odvisna od koncentracije izvlečka, medtem ko protimikrobne učinkovitosti proti po Gramu negativnim bakterijam *E. coli* in *Salmonella* z inkapsuliranimi izvlečki niso dokazali. Njihove rezultate potrjuje študija protimikrobne učinkovitosti inkapsuliranega eteričnega olja timijana (Bilenler in sod., 2015). Protimikrobna učinkovitost inkapsuliranega eteričnega olja je bila nižja v primerjavi s protimikrobno učinkovitostjo neinkapsuliranega olja po 24 urah.

Kljub temu, da inkapsulacija ni izboljšala protimikrobne učinkovitosti, se inkapsulacija izvlečkov fenolnih spojin priporoča, saj po podatkih v raziskavah lahko izboljša stabilnost polifenolov in poveča antioksidativnost (Pinho in sod., 2014).

5.2 SKLEPI

Z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču smo proučili protimikrobno delovanje 42 izvlečkov fenolnih spojin iz tropin treh belih sort grozdja (zelen, sauvignon, rebula) in treh rdečih sort grozdja (cabernet sauvignon, merlot, modri pinot) na treh po Gramu pozitivnih bakterijah (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*) in na dveh po Gramu negativnih bakterijah (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis). Izbrali smo tri najbolj učinkovite izvlečke za spremljanje kinetike protimikrobnega delovanja. Izvleček sorte zelen smo tudi inkapsulirali in preverili kinetiko njegovega protimikrobnega delovanja. Glede na rezultate eksperimentalnega dela in zastavljene hipoteze naloge lahko povzamemo sledeče sklepe:

- Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz grozdnih tropin je odvisna od sorte grozdja. Najbolj učinkoviti so bili izvlečki belih sort zelen in sauvignon ter izvleček rdeče sorte modri pinot. Zaradi razlik v vsebnosti fenolov v grozdu in posledično izvlečkih belih in rdečih sort je zelo pomemben način izražanja učinkovitosti. Če primerjamo vrednosti MIK, izražene na celotne tropine, torej v mg suhe snovi tropin, dobimo drugačno razvrstitev, kot če rezultate izražamo v mg ekvivalentov fenolnih snovi v izvlečku. Protimikrobna učinkovitost je odvisna tudi od vinifikacijskega postopka. Sorti zelen in sauvignon sta bili predelani s postopki kratkih maceracij, sorta modri pinot pa je bila med rdečimi sortami podvržena najkrajši maceraciji.
- Protimikrobna učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin iz grozdnih tropin je odvisna tudi od vrste ekstrakcijskega topila. Kot najoptimalnejše topilo se je izkazal voda : etanol = 50 : 50 (v : v).
- Izvlečki so bili najbolj učinkoviti proti po Gramu pozitivnim bakterijam vrst *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* in *Listeria monocytogenes*. Ugotovili smo pomembno dejstvo, da so bili zelo učinkoviti izvlečki belih sort zelen in sauvignon proti po Gramu negativnim bakterijam *Escherichia coli* O157:H7 in *Salmonella* Enteritidis.
- Način aplikacije vpliva na protimikrobno učinkovitost, kar smo potrdili pri večini testiranj inkapsuliranega izvlečka grozdnih tropin sorte zelen, vendar se protimikrobna aktivnost ni izboljšala, zato bi morali te pogoje optimizirati v nadaljnjih raziskavah.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Vinarska industrija proizvede vsako leto velike količine stranskih proizvodov v obliki grozdnih tropin, ki predstavljajo ekološki in ekonomski problem. Ponovna uporaba industrijskih stranskih produktov ne le zmanjša njihov vpliv na okolje, ampak lahko prinaša tudi ekonomske prednosti. Zaradi nepopolne ekstrakcije tekom maceracije grozdja vsebujejo ti stranski proizvodi vinarstva (grozdne tropine) pomembne količine fenolnih spojin. Fenolne spojine so naravno prisotne protimikrobne snovi, ki delujejo protimikrobno proti širokemu spektru mikroorganizmov (Calo in sod., 2015). Živilska industrija išče produkte z dodano vrednostjo, ki se lahko proizvedejo iz stranskih proizvodov v kmetijstvu. Zato je bil namen magistrske naloge proučiti protimikrobno delovanje izvlečkov fenolnih spojin grozdnih tropin šestih sort in potrditi, da je učinkovitost odvisna od sorte in vinifikacijskega postopka. Cilj naloge je bil tudi, da na osnovi protimikrobne učinkovitosti izberemo optimalno sorto in ekstrakcijsko topilo ter primerjamo protimikrobno učinkovitost inkapsuliranega in neinkapsuliranega izvlečka. Raziskave so bile usmerjene v sorte, ki so najbolj zastopane na Vipavskem, to so tri bele sorte (zelen, sauvignon, rebula) in tri rdeče sorte (cabernet sauvignon, merlot, modri pinot).

Najpogosteje uporabljeno merilo v raziskavah za določanje protimikrobne učinkovitosti je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). MIK smo določili izvlečkom fenolnim spojin iz tropin šestih sort grozdja in sedmih ekstrakcijskih topil, skupno torej 42 izvlečkom. Uporabili smo pet testnih mikroorganizmov, ki so vključevali po Gramu pozitivne (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) in po Gramu negativne bakterijske vrste (*E. coli* O157:H7 in *S. Enteritidis*). Izmed šestih sort grozdja smo izbrali tiste, pri katerih smo določili najvišjo protimikrobno aktivnost. Nadalje smo izmed sedmih ekstrakcijskih topil izbrali najoptimalnejšega. Z najboljšimi izvlečki smo analizirali kinetiko protimikrobnega delovanja, kinetične parametre smo raziskali tudi z izbranimi inkapsuliranimi izvlečki.

Rezultati so pokazali, da so najvišjo protimikrobno aktivnost pokazali izvlečki tropin sort sauvignon in zelen, pri rdečih sortah je zelo dobro protimikrobno aktivnost pokazal modri pinot. Izvlečki so bili najbolj učinkoviti proti po Gramu pozitivnim bakterijam. Presenetljivo je, da sta bili sorti zelen in sauvignon zelo učinkoviti tudi proti obema po Gramu negativnima bakterijama. Vrednosti MIK za izvlečke sorte zelen za G– bakterije so dosegali 0,15–0,38 mg GAE/mL gojišča. Rezultati protimikrobne učinkovitosti se ujemajo z različnim vinifikacijskim postopkom, saj sta bili sorti zelen in sauvignon predelani s postopkom kratkih maceracij, modri pinot pa je bil izmed rdečih sort maceriran najkrajši čas. V tropinah je zato ostala večja količina fenolnih spojin.

Določili smo odvisnost protimikrobne učinkovitosti od vrste ekstrakcijskega topila. Izmed sedmih ekstrakcijskih topil se je kot najbolj optimalno izkazalo topilo voda : etanol = 50 : 50 (v : v). Ugotovili smo tudi pomen različnega izražanja učinkovitosti. Če primerjamo

vrednosti MIK na celotne tropine, torej na suho snov tropin, je drugačna razvrstitev, kot če rezultate izražamo v g izvlečka na L ali v ekvivalentih fenolnih spojin v izvlečku. Do razhajanj prihaja zaradi razlik v vsebnosti in učinkovitosti posameznih izvlečkov oz. fenolnih spojin v njih. Dokazali smo tudi, da način aplikacije vpliva na protimikrobno učinkovitost.

Povzamemo lahko, da imajo izvlečki fenolnih spojin iz grozdnih tropin protimikrobno učinkovitost tako proti po Gramu pozitivnim kot po Gramu negativnim bakterijam. Protimikrobna učinkovitost je odvisna od sorte grozdja, na protimikrobno učinkovitost pa vpliva tudi ekstrakcijsko sredstvo.

6.2 SUMMARY

The wine-making industries produce large quantities of residues (grape pomace) after fermentation, which represents a waste management problem both ecologically and economically. The productive use of such by-products would not only reduce its ecological footprint but also offer substantial economic benefits. Grape pomace, a remnant of the winemaking process, contains significant quantities of phenol compounds. This is due to the imperfect extraction during the vinification process when phenolic compounds move from solid parts of the grape cluster into wine. Phenolic compounds are naturally occurring antimicrobials shown to be effective at decreasing growth and survival of a wide variety of microorganisms (Calo et al. 2015). The food industry is searching for ways to productively utilize agricultural by-products. The focus of our work was to study antimicrobial activity of phenol compounds extracted from grape pomace of six different varieties of grape. The aim of this master thesis is to confirm that antimicrobial activity depends on the grape variety as well as the vinification process. The goal of this project is to determine the optimal grape variety on the basis of its antimicrobial activity, to optimize the extraction method of phenol compounds from grape pomace, and to compare antimicrobial activity of phenolic extracts to encapsulated phenolic extracts. Predominant grape varieties in the Vipava Valley wine-producing region (Slovenia) were selected: `Rebula`, `Sauvignon` and `Zelen` as white and `Cabernet Sauvignon`, `Merlot` and `Pinot Noir` as red varieties (all *Vitis vinifera* L.).

Broth microdilution method was used to determine minimal inhibitory concentration (MIC) for six cultivars and seven extraction solvents, total 42 extracts. We used five target microorganisms, which included Gram-positive (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) and Gram-negative bacteria (*Echerichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis).

Out of six grape varieties tested we determined those with the highest antimicrobial properties. Additionally, we determined the most optimal of seven extraction solvents based on MIC results. We chose the most effective extracts, as well as the corresponding encapsulated extracts, to analyse antimicrobial kinetics.

Our results show that extracts from white grape varieties `Sauvignon` and `Zelen` had the highest antimicrobial activity. `Pinot Noir`, showed the highest antimicrobial activity among the red grape varieties tested. Extracts were most effective against Gram-positive bacteria. Surprisingly, white grape varieties `Zelen` and `Sauvignon` were highly effective against both Gram-negative bacteria. MIC values of `Zelen` extracts reached as low as 0.15–0.38 mg GAE/mL. MIC results are consistent with different duration of the vinification processes used, the shorter the vinification process the more phenol compounds are left in grape pomace. Extracts of grape varieties showing highest antimicrobial activities (`Zelen` and `Sauvignon`) were processed using a short vinification, similarly `Pinot Noir` undergoes the shortest vinification process among the red grape varieties.

We determined the correlation between antibacterial properties of the extract and the type of solvent used in the extraction process. Out of 7 different solvents tested, we determined that 50 % ethanol is the most efficient. We also determined the importance of the units used to describe antimicrobial efficacy. If we compare MIC values of total grape pomace (dry value) we get a different hierarchy of extract activity then when comparing MIC values in g of extract/L. The differences arise due to the different concentrations of phenol compounds. We also showed that the method of application affects antimicrobial efficiency.

In summary, our work shows that phenol extracts of grape pomace have antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Antimicrobial activity depends on grape variety as well as the solvent used to extract the phenol compounds.

7 VIRI

- Adámez J. D., Samino E. G., Sánchez E. V., González-Gómez D. 2012. *In vitro* estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 24: 136–141
- Adams M. R., Moss M. O. 2008. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge, The Royal Society of Chemistry Publishing: 463 str.
- Adegoke G. O. 2004. *Understanding food microbiology*. 2nd ed. Akobo, Alleluia Ventures ltd.: 217 str.
- Agron P. G., Walker R. L., Kinde H., Sawyer S. J., Hayes D. C., Wollard J., Andersen G. L. 2001. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 11: 4984–4991
- Akowuah G. A., Ismail Z., Norhayati I., Sadikun A. 2005. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chemistry*, 93, 2: 311–317
- Ali K., Maltese F., Choi Y. H., Verpoorte R. 2010. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews*, 9, 3: 357–378
- Amico V., Napoli E. M., Renda A., Ruberto G., Spatafora C., Tringali C. 2004. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar “*Nerello Mascalese*”. *Food Chemistry*, 88: 599–607
- Anastasiadi M., Chorianopoulos N. G., Nychas G. J., Haroutounian S. A. 2009. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2: 457–463
- Arakawa H., Maeda M., Okubo S., Shimamura T. 2004. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 3: 277–281
- Arana-Sánchez A., Estarrón-Espinosa M., Obledo-Vázquez E. N., Padilla-Camberos E., Silva-Vázquez R., Lugo-Cervantes E. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in beta-cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 6: 585–590
- Arvanitoyannis I. S., Ladas D., Mavromatis A. 2006. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 475–487

- Bentivegna S. S., Whitney K. M. 2002. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 12: 1731–1743
- Bernard F. X., Sable S., Cameron B., Provost J., Desnottes J. F., Crouzet J. 1997. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 992–998
- Berce I., Bujko M., Dovečar D., Grilc E., Kraigher A., Trkov M. 2008. Odkrivanje nekaterih genov, povezanih z virulenco, pri sevih *E. coli*, ki povzročajo črevesne okužbe. *Zdravstveno varstvo*, 47, 2: 81–88
- Bilenler T., Gokbulut I., Sislioglu K., Karabulut I. 2015. Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles. *Flavour and Fragrance Journal*, 30: 392–398
- Blatnik J., Lešničar G., Šibanc B., Cvitan S. 2002. Okužba z *Escherichia coli* O157:H7 – Prikaz primera. *Zdravniški Vestnik*, 71: 439–441
- Bordiga M., Travaglia F., Locatelli M., Arlorio M., Coisson J. D. 2015. Spent grape pomace as a still potential by-product. *International Journal of Food Science & Technology*, 50: 2022–2031
- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Jakobek L., Šeruga M. 2009. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 44: 2394–2401
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 3: 223–253
- Calo J. R., Crandall P. G., O'Bryan C. A., Ricke S. C. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, 54: 111–119
- Canett Romero R., Ledesma Osuna A. I., Robles Sanchez R. M., Morales Castro R., Leon-Martinez L., Leon Galvez R. 2004. Characterization of cookies made with deseeded grape pomace. *Archivos Latinoamericanos Nutricion*, 54: 93–99
- Chavan U. D., Shahidi F., Naczki M. 2001. Extracted of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 7: 509–512
- Cheng V. J., Bekhit A. E.-D. A., McConnell M., Mros S., Zhao J. 2012. Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry*, 134, 1: 474–482

- Cherdshewasart W., Sutjit W., Pulcharoen K., Chulasiri M. 2009. The mutagenic and antimutagenic effects of the traditional phytoestrogen-rich herbs, *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42: 816–823
- Chinnam N., Dadi P. K., Sabri S. A., Ahmad M., Kabir M. A., Ahmad Z. 2010. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46: 478–486
- Corrales M., Han J. H., Tauscher B. 2009. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 425–433
- Corrales M., Fernandez A., Vizoso Pinto M. G., Butz P., Franz C. M., Schuele E., Tauscher B. 2010. Characterization of phenolic content, in vitro biological activity, and pesticide loads of extracts from white grape skins from organic and conventional cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 3471–3476
- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12: 564–582
- Cushnie T. P., Lamb A. J. 2005a. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 5: 343–356
- Cushnie T. P. T., Lamb A. J. 2005b. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 1-3: 243–248
- Cushnie T. T., Lamb A. J. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 2: 99-107
- Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 2: 174–181
- Darra N. E., Tannous J., Mouncef P. B., Palge J., Yaghi J., Vorobiev E. 2012. A comparative study on antiradical and antimicrobial properties of red grapes extracts obtained from different *Vitis vinifera* varieties. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 3:1420–1432
- Demir B. S., Serindađ O. 2006. Determination of boron in grape (*Vitis vinifera*) by azomethine H spectrophotometric method. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 1: 11–18
- Deng Q., Zhao Y. 2011. Physicochemical, nutritional, and antimicrobial properties of wine grape (cv. Merlot) pomace extract-based films. *Journal of Food Science*, 76, 3: 309–317

- Dent M., Dragovic-Uzelac V., Penic M., Brncic M., Bosiljkov T., Levaj B. 2013. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 5, 11: 84–96
- Desai K. G. H., Jin Park H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 7: 1361–1394
- de Souza V. B., Fujita A., Thomazini M., da Silva E. R., Lucon J. F., Genovese M. I., Favaro-Trindade, C. S. 2014. Functional properties and stability of spray-dried pigments from Bordo grape (*Vitis labrusca*) winemaking pomace. *Food Chemistry*, 164: 380–386
- Díaz A. B., Caro I., de Ory I., Blandino A. 2007. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 3: 302–306
- Direktiva 2008/98/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 19. novembra 2008 o odpadkih in razveljavitvi nekaterih direktiv. 2008. Uradni list Evropske Unije, 51, L312: 3-30
- Dortet L., Veiga-Chacon E., Cossart P. 2009. *Listeria monocytogenes*. V: *Encyclopedia of microbiology*. 3rd ed. Vol. 2. Schaechter M. (ed.). Oxford, Academic Press: 182–198
- Drobniewski F. A. 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6, 4: 324–338
- FAO. 2014. FAOSTAT: World grape production. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: baza podatkov
<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E> (22. 05. 2014)
- Fang Z., Bhandari B. 2010. Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 10: 510–523
- Farber J. M., Peterkin P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 3: 476–511
- Fernández-Mar M. I., Mateos R., García-Parrilla M. C., Puertas B., Cantos-Villar E. 2012. Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: a review. *Food Chemistry*, 130, 4: 797–813
- Fontana A. R., Antonioli A., Bottini R. 2013. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 38: 8987–9003

- Furiga A., Lonvaud-Funel A., Badet C. 2009. *In vitro* study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chemistry*, 113, 4: 1037–1040
- Galanakis C. M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*: 26, 2: 68–87
- Godič Torkar K. 2009. Prisotnost bakterije *Bacillus cereus* v bolniškem oddelku in kužninah, tvorba enterotoksinov ter njena občutljivost za antibiotike. *Obzornik Zdravstvene Nege*, 43, 1: 21–29
- Gortzi S., Lala S., Chinou I., Tsaknis J. 2007. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*, 12, 5: 932–945
- Goula A. N., Lazarides H. N. 2015. Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *Journal of Food Engineering*, 167: 45–50
- Gradišar H., Pristovšek P., Plaper A., Jerala R. 2007. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 2: 264–271
- Granum P. E., Lund T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157, 2: 223–228
- Granum P. E. 2005. *Bacillus cereus*. V: Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology. Fratamico P. M., Bhunia A. K., Smith J. L. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 409–419
- Gutiérrez-Larraínzar M., Rúa J., Caro I., de Castro C., de Arriaga D., García-Armesto M. R., del Valle P. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*, 26, 2: 555–563
- Gyawali R., Ibrahim S. A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46: 412–429
- Hang Y. D., Woodams E. E. 1986. Utilization of grape pomace for citric-acid production by solid-state fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 2: 141–142

- Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48: 125–129
- Hayta M., Özugur G., Eتgü H., Tugkan Seker I. 2014. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) pomace on the quality, total phenolic content and anti-radical activity of bread. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 3: 980-986
- 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
- Ignat I. Volf I., Popa V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 4: 1821–1835
- Ikigai H., Nakae T., Hara Y., Shimamura T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1147, 1: 132–136
- Ivanova V., Stefova M., Vojnoski B., Dörnyei Á., Márk L., Dimovska V., Stafilov T., Kilár F. 2011. Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International*, 44: 2851–2860
- Jackson R. S. 2008. *Wine science: Principles and applications*. 3rd ed. San Diego, Academic Press: 776 str.
- Jackson R., Knisley D., McIntosh C., Pfeiffer P. 2011. Predicting flavonoid UGT regioselectivity. *Advances in Bioinformatics*, 2011: ID 506583, doi:10.1155/2011/506583: 15 str.
- Jayaprakasha G. K., Selvi T., Sakariah K. K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, 2: 117-122
- Jay J. M., Loessner M. J., Golden D. A. 2005. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York, Springer: 790 str.
- Kähkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J. P., Pihlaja K., Kujala T. S., Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 10: 3954–3962
- Kalemba D., Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10,10: 813–829
- Kammerer D., Claus A., Carle R., Schieber A. 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4360–4367

- Kammerer D. R., Kammerer J., Valet R., Carle R. 2014. Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients. *Food Research International*, 65: 2–12
- Kao T. T., Tu H. C., Chang W. N Chen B. H., Shi Y. Y., Chang T. C., Fu T. F. 2010. Grape seed extract inhibits the growth and pathogenicity of *Staphylococcus aureus* by interfering with dihydrofolate reductase activity and folate-mediated one-carbon metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 1-2: 17–27
- Kapoor N., Narain U., Misra K. 2007. Bioactive conjugates of curcumin having ester, peptide, thiol and disulphide links. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66: 647–650
- Katalinić V., Smole Možina S., Skroza D., Generalić I., Abramovič H., Miloš M., Ljubenkovič I., Piskernik S., Pezo I., Terpinč P., Boban M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119: 715–723
- Katalinić V., Možina S. S., Generalić I., Skroza D., Ljubenkovič I., Klančnik A. 2013. Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*, 16, 1: 45–60
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 2: 121–126
- Koyama K., Ikeda H., Poudel P. R., Goto-Yamamoto N. 2012. Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry*, 78: 54–64
- Kotzekidou P., Giannakidis P., Boulamatsis A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1: 119–127
- Kramer P. A., Jones D. 1969. Media selective for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 32: 381–394
- Krishnaswamy K., Orsat V., Thangavel K. 2012. Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. *Journal of Food Engineering*, 111, 2: 255–264
- Lapornik B., Prošek M., Wondra A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71: 214–222

- Le Loir Y., Baron F., Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research, 2, 1: 63–76
- Librán C. M., Mayor L., Garcia-Castello E. M., Vidal-Brotons D. 2013. Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect. Agricultural Sciences, 4, 9B: doi:10.4236/as.2013.49B010: 56–62
- Lin R. D., Chin Y. P., Hou W. C., Lee M. H. 2008. The effects of antibiotics combined with natural polyphenols against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Planta Medica, 74, 8: 840–846
- Liu D., Zhang T. 2011. *Listeria*. V: Molecular detection of human bacterial pathogens. Liu D. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 279–295
- Lu Y., Foo L. Y. 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. Food Chemistry, 65: 1–8
- Mazza G. 1995. Anthocyanins in grape and grape products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35: 341–371
- Melo P. S., Massarioli A. P., Denny C., dos Santos L. F., Franchin M., Pereira G. E., de Alencar S. M. 2015. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species. Food Chemistry, 181: 160–169
- Meyer A. S., Jepsen S. M., Sørensen N. S. 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 7: 2439–2446
- Mirzoeva O. K., Grishanin R. N., Calder P. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiological Research, 152, 3: 239–246
- Monagas M., Bartolome B. 2009. Anthocyanins and Anthocyanin-derived compounds. V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. (eds.). Madrid, Springer: 439–462
- MOP. 2015. Odpadki: Odpadek je vir surovin. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor: 1 str.
http://www.mop.gov.si/si/delovna_podrocja/odpadki/ (14. 10. 2015)
- Mourtzinis I., Kalogeropoulos N., Papadakis S. E., Konstantinou K., Karathanos V. T. 2008. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in β -cyclodextrin and modified starch. Journal of Food Science, 73, 1: 89–94

- Mozetič B., Tomažič I., Škvarč A., Trebše P. 2006. Determination of polyphenols in white grape berries cv. Rebula. *Acta Chimica Slovenica*, 53: 58–64
- Mulero J., Pardo F., Zafrilla P. 2010. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 6: 569–574
- Munin A., Edwards-Lévy F. 2011. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics*, 3, 4: 793–829
- Murthy K. N. M., Singh R. P., Jayaprakasha G. K. 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis Vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 21: 5909–5914
- Nakayama M., Shigemune N., Tsugukuni T., Jun H., Matsushita T., Mekada M., Kurahachi M., Miyamoto T. 2012. Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*, 25: 225–232
- Navarro Martinez M. D., Navarro Peran E., Cabezas Herrera J., Ruiz Gomez J., Garcia Canovas F., Rodriguez Lopez J. N. 2005. Antifolate activity of epigallocatechin gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 7: 2914–2920
- Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Levic S., Bugarski B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1: 1806–1815
- 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, 1: 7–17
- Nerantzis E. T., Tataridis P. 2006. Integrated enology - utilization of winery by-products into high added value products. *Journal of Food Science and Technology*, 3: 1–12
- Njegova Visokost: Olje grozdnih pečk. 2014. Radgonske Gorice, Mojkrjaj.info: 1 str. <http://mojkraj.info/index.php/vinarstv-o/7318-njegova-visokost-olje-grozdnih-pesk> (7. 11. 2015)
- Nohynek L. J., Alakomi H. L., Kähkönen M. P., Heinonen M., Helander I. M., Oksman-Caldentey K. M., Puupponen-Pimiä R. H. 2006. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, 54, 1: 18–32

- Oliveira D. A., Salvador A. A., Smânia A., Smânia E. F. A., Maraschin M., Ferreira S. R. S. 2013. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology*, 164, 3: 423–432
- Özkan G., Sagdiç O., Göktürk Baydar N., Kurumahmutoglu Z. 2004. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1807–1811
- Parry J. W., Li H., Liu J.-R., Zhou K., Zhang L., Ren S. 2011. Antioxidant activity, antiproliferation of colon cancer cells, and chemical composition of grape pomace. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2: 530–540
- Parvathy K. S., Negi P. S., Srinivas P. 2009. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin- β -diglucoside. *Food Chemistry*, 115: 265–271
- Peng X., Ma J., Cheng K. W., Jiang Y., Chen F., Wang M. 2009. The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chemistry*, 119: 49–53
- Perumalla A. V. S., Hettiarachchy N. S. 2011. Green tea and grape seed extracts—Potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44, 4: 827–839
- Piercey M. J., Mazzanti G., Budge S. M., Delaquis P. J., Paulson A. T., Hansen Truelstrup L. 2012. Antimicrobial activity of cyclodextrin entrapped allyl isothiocyanate in a model system and packaged fresh-cut onions. *Food Microbiology*, 30, 1: 213–218
- Pinho E., Grootveld M., Soares G., Henriques M. 2014. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*: 101, 121–135
- Poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2010. 2011. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 79 str.
http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA_PODROCJA/Zivila/zoonoze/POROCILO_ZOONOZE_2011.pdf (12.3.2013)
- Putarek K. 2011. Otvoritev bioplinske naprave v Ormožu. Ormož, Bioplin Šijanec: 1 str.
<http://www.maxi.pnv.si/index.php?option=news&roption=online&id=2121> (7. 11. 2015)
- Ramos-Nino M. E., Clifford M. N., Adams M. R. 1996. Quantitative structure activity relationship for the effect of benzoic acids, cinnamic acids and benzaldehydes on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*: 80, 3: 303–310
- Ratnasooriya C. C., Rupasinghe H. P. 2012. Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 134, 2: 625–631

- Ravichandran M., Hettiarachchy N. S., Ganesh V., Ricke S. C., Singh S. 2011. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety*, 31, 4: 462–471
- Rentzsch M., Wilkens A., Winterhalter P. 2009. Non-flavonoid phenolic compounds. V: *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. (eds.). Madrid, Springer: 509–527
- Rodin J. B., Lamikanra O., Leong S., Inyang I., Owusu Y. 1997. Effect of chemical treatment on livestock feed value of muscadine pomace. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 110: 231–234
- Rodríguez L. A., Toro M. E., Vazquez F., Correa-Daneri M. L., Gouiric S. C., Vallejo M. D. 2010. Bioethanol production from grape and sugar beet pomaces by solid-state fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, 11: 5914–5917
- Rodríguez Vaquero M. J., Alberto M. R., Manca de Nadra M. C. 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 5: 587–593
- Rosales Soto M. U., Brown K., Ross C. F. 2012. Antioxidant activity and consumer acceptance of grape seed flour-containing food products. *International Journal of Food Science & Technology*, 47: 592–602
- Ruberto G., Renda A., Daquino C., Amico V., Spatafora C., Tringali C., De Tommasi N. 2007. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100, 1: 203–211
- Quiroga E. N., Sampietro A. R., Vattuone M. A. 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 1: 89–96
- Sagdic O., Ozturk I., Ozkan G., Yetim H., Ekici L., Tahsin Yilmaz M. 2011b. RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chemistry*, 126, 4: 1749–1758
- Sagdic O., Ozturk I., Yilmaz M. T., Yetim H. 2011a. Effect of grape pomace extracts obtained from different grape varieties on microbial quality of beef patty. *Journal of Food Science*, 76, 7: 515–521
- Sagdic O., Ozturk I., Kisi O. 2012. Modeling antimicrobial effect of different grape pomace and extracts on *S. aureus* and *E. coli* in vegetable soup using artificial neural network and fuzzy logic system. *Expert Systems with Applications*, 39, 8: 6792–6798

- Sayago-Ayerdi S. G., Brenes A., Viveros A., Gona I. 2009. Antioxidative effect of dietary grape pomace concentrate on lipid oxidation of chilled and long-term frozen stored chicken patties. *Meat Science*, 83: 528–533
- Schaechter M. 2009. *Escherichia coli*. V: Encyclopedia of microbiology. 3rd ed. Vol. 2. Schaechter M. (ed.). Oxford, Academic Press: 125–133
- Schieber A., Stintzing F. C., Carle, R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 11: 401–413
- Serra A. T., Matias A. A., Nunes A. V., Leitão M. C., Brito D., Bronze R., Duarte C. M. 2008. *In vitro* evaluation of olive-and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 3: 311–319
- Seo K. S., Bohach G. A. 2010. *Staphylococcal* food poisoning. V: Pathogens and toxins in food: challenges and interventions. Juneja V. K., Sofos J. N. (eds.). Washington, ASM Press: 119–131
- Shan B., Cai Y. Z., Brooks J. D., Corke H. 2007. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1: 112–119
- Shi J., Yu J., Pohorly J. E., Kakuda Y. 2003. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6, 4: 291–299
- Sirk T. W., Brown E. F., Sum A. K., Friedman M. 2008. Molecular dynamics study on the biophysical interactions of seven green tea catechins with lipid bilayers of cell membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 17: 7750–7758
- Smith J. L., Fratamico P. M. 2005. Diarrhea-inducing *Escherichia coli*. V: Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology. Fratamico P. M., Bhunia A. K., Smith J. L. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 357–383
- Smith I. N., Yu J. 2015. Nutritional and sensory quality of bread containing different quantities of grape pomace from different grape cultivars. *EC Nutrition*, 2, 1: 291–301
- Stapleton P. D., Shah S., Hamilton Miller J. M., Hara Y., Nagaoka Y., Kumagai A., Uesato S., Taylor P. W. 2004. Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 4: 374–380

- Sternad Lemut M., Trošt K., Siviloti P., Vrhovšek U. 2011. Pinot Noir grape colour related phenolics as affected by leaf removal treatments in the Vipava Valley. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 777–784
- Sulaiman S. F., Sajak A. A. B., Ooi K. L., Seow E. M. 2011. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24,4: 506–515
- Šikovec S. 1993. *Vinarstvo – od grozdja do vina*. Ljubljana, Kmečki glas: 283 str.
- Škvarč A. 2005. Vinorodni okoliš Vipavska dolina. V: *Pinela in zelen žlahtna dediščina Vipavske doline, Ajdovščina*. Furlan T. (ur.). Ajdovščina, Razvojna agencija Rod: 12–31
- Terrier N., Poncet-Legrand C., Cheynier V. 2009. Flavanols, flavonols and dihydroflavonols. V: *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. (eds.). Madrid, Springer: 463–507
- Thimothe J., Bonsi I. A., Padilla Zakour O. I., Koo H. 2007. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific* hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 10200–10207
- Tiwari B. K., Valdramidi V. P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen, P. J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 14: 5987–6000
- Torres J. L., Bobet R. 2001. New flavanol derivatives from grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant aminoethylthio–flavan-3-ol conjugates from a polymeric waste fraction used as a source of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4627–4634
- Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Soumaya B., Hajlaoui H., Abdelly C. 2010. Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 4: 632–639
- Trošt K., Mozetič Vodopivec B., Sternad Lemut M., Jug K., Raspor P., Smole Možina S. 2011. Antioksidativna in protimikrobna aktivnost fenolnih izvlečkov grozdnih tropin. V: *Slovenski kemijski dnevi 2011*. Kravanja Z., Brodnjak Vončina D., Bogataj M. (ur.). Maribor, FKKT: 8 str. [CD-ROM]
- Trošt K., Mozetič Vodopivec B., Sternad Lemut M., Jug K., Raspor P., Smole Možina S. 2012. Phenolic profile, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts from grape

- skins and seeds - winery by-products in the Vipava Valley (Slovenia). *Journal of the Science of Food and Agriculture* (neobjavljeno)
- Trošt K., Klančnik A., Mozetič Vodopivec B., Sternad Lemut M., Jug Novšak K., Raspor P., Smole Možina S. 2015. Bio-refinery concept in searching for novel compounds and their functional characteristics in grape/wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture* (poslano v objavo)
- Tseng A., Zhao Y. 2013. Wine grape pomace as antioxidant dietary fiber for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138: 356–365
- Tsuchiya H., Inuma M. 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, 7: 161–165
- Turkmen N., Sari F., Velioglu Y. S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99, 4: 835–841
- Vrhovšek U. 1996. Fenoli kot antioksidanti v vinu. V: Zbornik referatov 1. Slovenskega vinogradniško-vinarskega kongresa, Portorož od 4. do 6. decembra 1996. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 124–134
- Waterhouse A. L. 2002. Determination of total phenolics. V: *Current protocols in food analytical chemistry*. Wrolstad R. E. (ed.). New York, Wiley & Sons: 11–18
- Xi Y., Sullivan G. A., Jackson A. L., Zhou G. H., Sebranek J. G. 2011. Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system. *Meat Science*, 88, 3: 503–511
- Xia E. Q., Deng G. F., Guo Y. J., Li H. B. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 2: 622–646
- Xu Y., Burton S., Kim C., Sismour E. 2016. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food Science & Nutrition*, 4, 1: 125–133
- Yadav M., Jain S., Bhardwaj A. 2009. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: An update. *Journal of Medicinal Food*, 12: 473–484
- Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S., Kikuchi M. 2002. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 599–607

- Yigit D., Yigit N., Mavi A., Yildirim A., Güleriyüz M. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of methanol and water extracts of fruits, leaves and seeds of *Vitis vinifera* L. cv. Karaerik. *Asian Journal of Chemistry*, 21, 1: 183–194
- Yilmaz Y., Toledo R. T. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 41–48
- Yu J., Ahmedna M. 2013. Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48: 221–237
- Zhu F., Du B., Zheng L., Li J. 2015a. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, 186: 207–212
- Zhu M. J., Olsen S. A., Sheng L., Xue Y., Yue W. 2015b. Antimicrobial efficacy of grape seed extract against *Escherichia coli* O157: H7 growth, motility and Shiga toxin production. *Food Control*, 51: 177–182
- Zhu L., Zhang Y., Lu J. 2012. Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 3: 3492–3510

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila vam, prof. dr. Sonja Smole Možina, da ste mi omogočili priključitev k projektu, na osnovi katerega je nastala ta naloga. Hvala za vse koristne nasvete in popravke.

Sebastjan, David in Matej. Kar veliko ur sem preživela v laboratoriju in za računalnikom. Hvala za vašo podporo in Sebastjan hvala, da si skrbel za fanta ☺

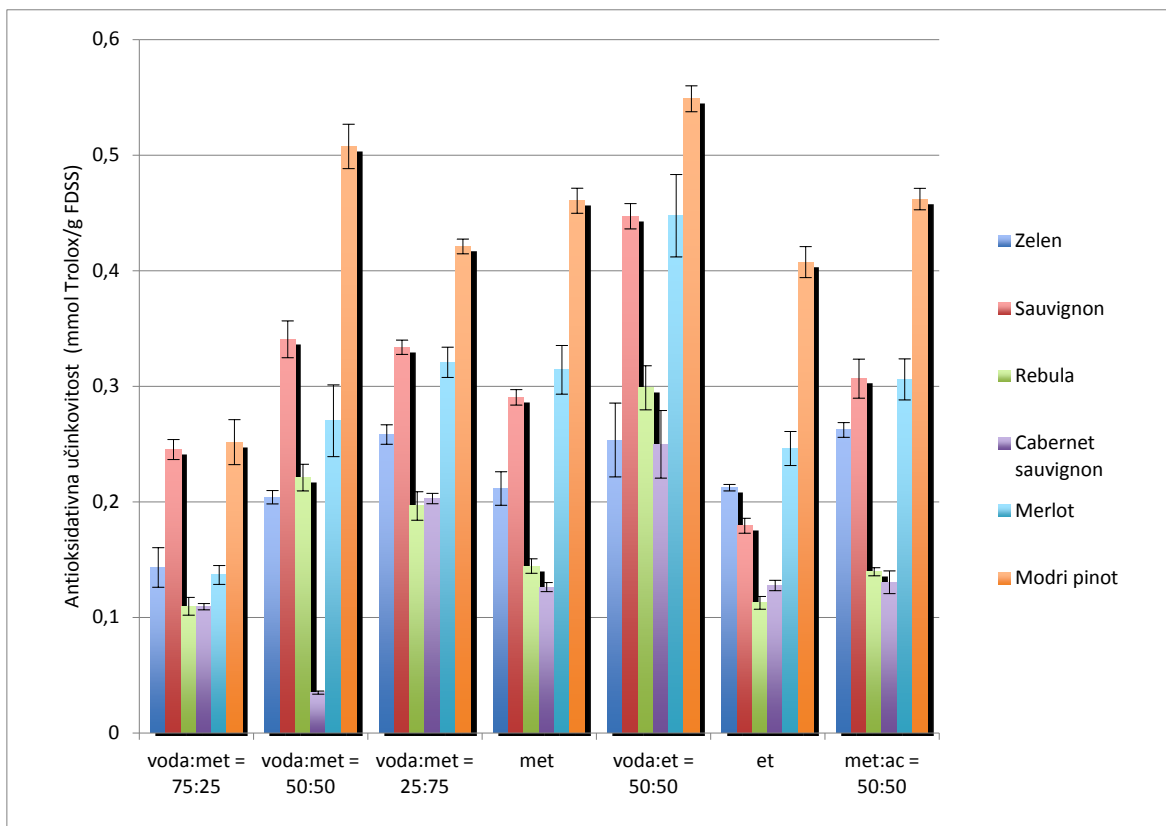
Prof. dr. Helena Abramovič in doc. dr. Branka Mozetič Vodopivec, hvala za vajin izčrpni pregled naloge.

Kajetan, hvala za vse analize!

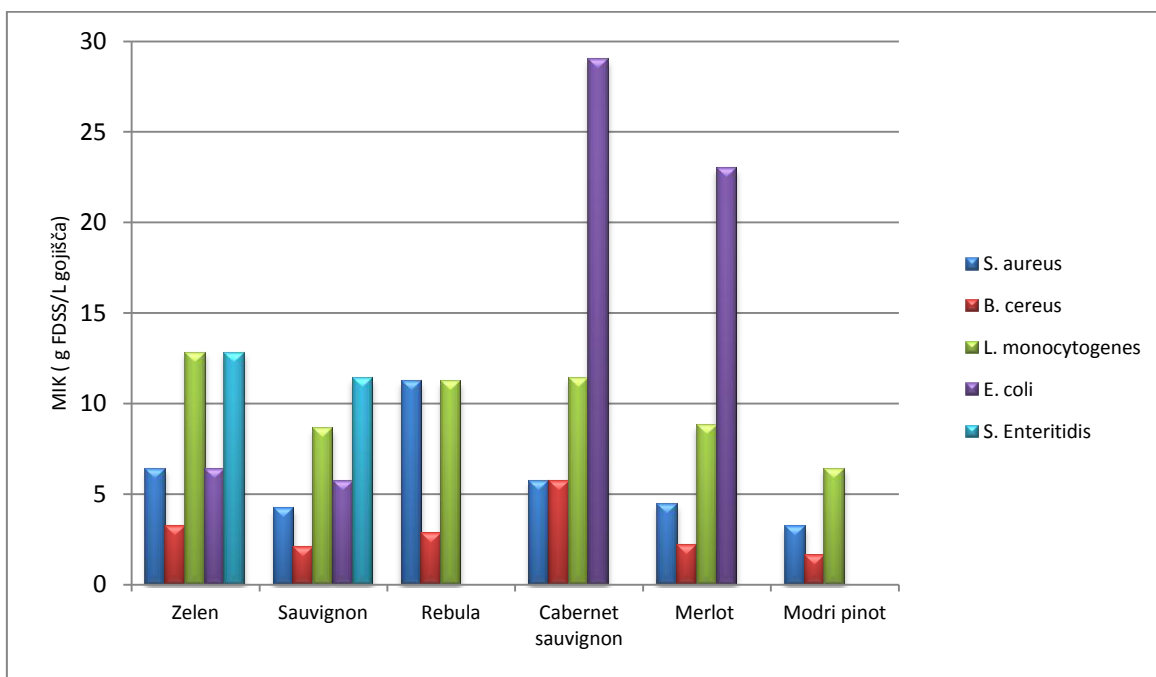
Hvala tudi vsem ostalim kolegom na oddelku.

Ksenija, ti si dala pa piko na i tej nalogi, hvala ti!

PRILOGE



Priloga A: Antioksidativna aktivnost izvlečkov grozdnih tropin, merjena po metodi DPPH, v odvisnosti od sorte grozdja in ekstrakcijskega topila (Trošt in sod., 2011) Legenda: met = metanol; et = etanol; ac = aceton
Appendix A: Antioxidant activity of FDSS extracts of three white and three red *Vitis vinifera* L. varieties, extracted with seven extraction media (Trošt et al., 2011) Legend: met = methanol; et = ethanol; ac = acetone



Priloga B: Minimalne inhibitorne koncentracije izvlečkov, ki so pripravljene z ekstrakcijskim topilom voda : etanol = 50 : 50 (v : v) v odvisnosti od sorte in testne bakterije, rezultati so podani v gramih liofiliziranih tropin na L gojišča

Appendix B: Minimal inhibitory concentration of FDSS extracts prepared with water : ethanol = 50 : 50 (v : v) extraction

Priloga C: Vsebnost fenolnih spojin v mg fenolnih spojin na kg liofiliziranih izvlečkov v treh belih sortah z ekstrakcijo z različnimi topili (Trošt in sod., 2015)
Appendix C: Contents of phenolic compounds in FDSS extracts from the three white grape varieties upon extraction with the different mixtures (Trošt et al., 2015)

Ekstrakcijsko topilo	Konc. (%)	Vsebnost fenolnih spojin (mg/kg FDSS)								
		Zelen			Sauvignon			Rebula		
		TFLA	TCAT	HCA	TFLA	TCAT	HCA	TFLA	TCAT	HCA
Voda : metanol	25	151,3 ±1,2	1969,0 ±569,8	24,6 ±0,9	179,0 ±12,1	4085,9 ±360,6	23,4 ±2,3	19,1 ±0,3	847,6 ±58,5	2,8 ±0,2
	50	274,6 ±5,1	3310,0 ±292,9	68,4 ±1,8	431,6 ±2,0	4735,4 ±323,4	34,9 ±1,1	56,8 ±0,3	1592,6 ±139,8	6,0 ±0,2
	75	394,4 ±0,9	3912,2 ±257,8	92,3 ±2,9	581,4 ±4,9	5777,0 ±80,4	76,4 ±0,4	60,7 ±6,0	1738,5 ±107,4	5,5 ±0,1
Metanol	100	341,9 ±2,4	3829,3 ±66,8	64,2 ±1,4	439,6 ±9,3	4218,3 ±242,7	67,0 ±3,4	52,5 ±1,8	800,6 ±7,4	< nd
Voda : etanol	50	343,8 ±0,3	3432,3 ±70,1	33,4 ±0,4	548,4 ±4,2	5749,1 ±28	42,8 ±0,3	77,2 ±0,8	2439,5 ±58,9	8,0 ±0,2
Etanol	100	311,7 ±0,0	2902,6 ±300,6	40,6 ±0,6	246,6 ±5,5	1837,2 ±5,1	19,8 ±0,8	15,7 ±13,5	454,6 ±113,8	< nd
Metanol : aceton	50	407,2 ±0,7	4279,6 ±170,3	68,9 ±1,0	431,1 ±1,1	4007,7 ±17,7	52,4 ±0,6	44,1 ±0,3	908,8 ±17,0	< nd

Povprečna vrednost ± standardna deviacija. *, $P \leq 0,001$

TFLA, skupni flavonoli (izraženo kot mg/kg FDSS); TCAT, skupni katehini (izraženo kot mg/kg FDSS); HCA, skupne hidroksicimetne kisline; nd, premalo podatkov

Priloga D: Vsebnost fenolnih spojin v mg fenolnih spojin na kg liofiliziranih izvlečkov v treh rdečih sortah z ekstrakcijo z različnimi topili (Trošt in sod., 2015)
Appendix D: Contents of phenolic compounds in FDSS extracts from the three red grape varieties upon extraction with the different mixtures (Trošt et al., 2015)

Ekstrakcijsko topilo	Konc. (%)	Fenolna spojina (mg/kg FDSS)										
		Cabernet sauvignon			Merlot				Modri pinot			
		TFLA	TCAT	HCA	TFLA	TCAT	TANT	HCA	TFLA	TCAT	TANT	HCA
Voda : metanol	25	86,7 ±2,0	858,1 ±57,2	447,2 ±1,5	56,8 ±6,0	4044,9 ±27,3	94,3 ±1,4	42,6 ±0,8	100,7 ±8,5	6940 ±32,7	597,2 ±1,1	24,6 ±0,3
	50	37,4 ±2,4	251,3 ±2,2	214,8 ±9,8	146,3 ±1,3	6980,7 ±198,8	221,4 ±6,5	39,0 ±1,0	211,6 ±4,1	9590,3 ±1076,9	984,9 ±5,8	30,1 ±1,1
	75	275,4 ±10,2	1915,1 ±136,1	1580,4 ±6,9	138,0 ±3,3	6063,3 ±322,7	158,0 ±2,1	31,3 ±0,6	318,2 ±3,0	12495,0 ±465,9	972,8 ±6,7	33,9 ±0,8
Metanol	100	220,5 ±19,5	1052,6 ±1,3	< nd	140,9 ±1,3	5303,9 ±112,8	82,5 ±2,4	22,9 ±1,4	312,5 ±0,7	11338,2 ±564,7	570,9 ±13,5	21,8 ±1,9
Voda : etanol	50	273,4 ±64,6	2472,5 ±128,2	2141,0 ±28,5	118,5 ±13,3	6578,6 ±601,9	217,7 ±5,0	36,4 ±2,1	356,2 ±6,0	12437,3 ±106,9	1272,7 ±6,2	38,0 ±2,5
Etanol	100	83,7 ±60,8	1346,1 ±54,6	292,6 ±3,0	101,4 ±0,5	4419,6 ±101,8	26,2 ±0,3	20,3 ±0,5	138,5 ±4,5	4775,8 ±114,5	62,0 ±2,0	11,2 ±0,5
Metanol : aceton	50	212,7 ±5,3	1215,9 ±70,9	< nd	144,6 ±2,0	5790,5 ±1,9	75,4 ±2,4	24,0 ±2,4	241,8 ±1,2	8077,3 ±392,0	251,0 ±2,5	22,8 ±0,2

Povprečna vrednost ± standardna deviacija. *, P ≤ 0.001

TFLA, skupni flavonoli; TCAT, skupni katehini; TANT, skupni antocianini; HCA, skupne hidroksicimetne kisline; nd, premalo podatkov