

Antimikrobni učinak ekstrakta zelenog čaja na patogene uzročnike kvarenja hrane

Bumbak, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:964785>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIMIKROBNI UČINAK EKSTRAKTA ZELENOG ČAJA NA
PATOGENE UZROČNIKE KVARENJA HRANE

ZAVRŠNI RAD

JOSIPA BUMBAK

Matični broj: 39

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

**ANTIMIKROBNI UČINAK EKSTRAKTA ZELENOG ČAJA NA
PATOGENE UZROČNIKE KVARENJA HRANE**

ZAVRŠNI RAD

JOSIPA BUMBAK

Matični broj: 39

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF GREEN TEA EXTRACT
AGAINST FOOD BORNE PATHOGENS

BACHELOR THESIS

JOSIPA BUMBAK

Parent number: 39

Split, September 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza

Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat

ANTIMIKROBNI UČINAK EKSTRAKTA ZELENOG ČAJA NA PATOGENE UZROČNIKE KVARENJA HRANE

Josipa Bumbak, 39

Sažetak:

Povećan broj oboljenja uzrokovanih patogenim mikroorganizmima koji se nalaze u hrani dovodi do sve veće zabrinutosti potrošača oko sigurnosti hrane. Također, konzumacija hrane pripravljene korištenjem sintetskih aditiva postaje sve upitnija. Stoga, brojne studije nastoje pronaći nove i prirodne aditive, kao što su biljni ekstrakti, koji bi osigurali ispravnu i sigurnu hranu. Upravo je kemijski sastav biljke zaslužan za njen antimikrobni ili antioksidacijski učinak. Kemijski sastav bilja je kompleksan i ima široki spektar djelovanja. Jedni od glavnih kemijskih komponenti zaslužnih za antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje su fenolni spojevi. U ovom radu ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakta zelenog čaja na odabrane patogene mikroorganizme kvarenja hrane. Analiza je provedena na pet odabranih vrsta patogenih mikroorganizama: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenese*, *Salmonella enterica* i *Escherichia coli*, korištenjem metode određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metodom difuzije u jažicama. Rezultati ispitivanja pokazuju dobru antimikrobnu aktivnost ekstrakta zelenog čaja prema svim testiranim patogenim bakterijama.

Ključne riječi: zeleni čaj, antimikrobni učinak, patogeni mikroorganizmi

Rad sadrži: 19 stranica, 9 slika, 3 tablica, 36 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - predsjednik
2. Izv. prof. Dr. sc. Vida Šimat - član
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza - član-mentor

Datum obrane: 30. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

Mentor: Ph. D. Danijela Skroza, Assist. Prof

Technical assistance: Ph. D. Vida Šimat, Assoc. Prof.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF GREEN TEE EXTRACT AGAINST FOOD BORNE PATHOGENS

Josipa Bumbak, 39

Abstract:

The increased number of foodborne infections caused by pathogenic microorganisms found in food leads to increased consumer's concern about food safety. Also, consumption of food processed using synthetic additives becomes more questionable. Therefore, recent studies are focused on finding new and natural sources of additives, such as herbal extracts, which assures food quality and safety. The chemical composition of the plant is responsible for their antimicrobial or antioxidant potencial. Due to its complexity the chemical composition of plants has a wide range of effects. The main chemical components responsible for antimicrobial and antioxidant activity are phenolic compounds. This paper investigated the antimicrobial activity of green tea extracts on selected foodborne pathogenic microorganisms responsible for food deterioration. The analysis was conducted using five different types of microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecelis*, *Listeria Monocytogenese*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*, determined using the minimum inhibitory concentration (MIC) method and the well diffusion method. The results of the study show good antimicrobial activity of green tea extracts against all tested pathogenic bacteria.

Keywords: green tea, antimicrobial effect, pathogenic microorganisms

Thesis contains: 19 pages, 9 figures, 3 tables, 36 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assist. Prof. – chair person
2. Ph. D. Vida Šimat, Assoc. Prof. - member
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assist. Prof. - supervisor

Defence date: September 30th, 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33)

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroza, u razdoblju od svibnja do srpnja 2019. godine. Dio istraživanja proveden je u Laboratoriju medicinske mikrobiologije i parazitologije Medicinskog fakulteta u Splitu.

Ovaj je rad sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Danijeli Skroza na odvojenom vremenu za mene i moj rad, na danim savjetima i idejama koje je pružila tijekom izrade rada. Također, zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Vida Šimat na pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela rada, te veliko hvala komisiji za izdvojeno vrijeme.

HVALA!

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je

- Ispitati antimikrobnu aktivnost ekstrakta zelenog čaja na patogene Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenese*) i Gram (-) (*Salmonella enterica* i *Escherichia coli*) bakterije,
- Antimikrobnu aktivnost odrediti metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metodom difuzije u jažicama,
- Donijeti zaključke o antimikrobnoj aktivnosti ispitanog ekstrakta.

SAŽETAK

Povećan broj oboljenja uzrokovanih patogenim mikroorganizmima koji se nalaze u hrani dovodi do sve veće zabrinutosti potrošača oko sigurnosti hrane. Također, konzumacija hrane pripravljene korištenjem sintetskih aditiva postaje sve upitnija. Stoga, brojne studije nastoje pronaći nove i prirodne aditive, kao što su biljni ekstrakti, koji bi osigurali ispravnu i sigurnu hranu. Upravo je kemijski sastav biljke zaslužan za njen antimikrobni ili antioksidacijski učinak. Kemijski sastav bilja je kompleksan i ima široki spektar djelovanja. Jedni od glavnih kemijskih komponenti zaslužnih za antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje su fenolni spojevi. U ovom radu ispitana je antimikrobna aktivnost ekstrakta zelenog čaja na odabrane patogene mikroorganizme kvarenja hrane. Analiza je provedena na pet odabranih vrsta patogenih mikroorganizama: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenese*, *Salmonella enterica* i *Escherichia coli*, korištenjem metode određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metodom difuzije u jažicama. Rezultati ispitivanja pokazuju dobru antimikrobnu aktivnost ekstrakta zelenog čaja prema svim testiranim patogenim bakterijama.

Ključne riječi: zeleni čaj, antimikrobni učinak, patogeni mikroorganizmi

SUMMARY

The increased number of foodborne infections caused by pathogenic microorganisms found in food leads to increased consumer's concern about food safety. Also, consumption of food processed using synthetic additives becomes more questionable. Therefore, recent studies are focused on finding new and natural sources of additives, such as herbal extracts, which assures food quality and safety. The chemical composition of the plant is responsible for their antimicrobial or antioxidant potential. Due to its complexity the chemical composition of plants has a wide range of effects. The main chemical components responsible for antimicrobial and antioxidant activity are phenolic compounds. This paper investigated the antimicrobial activity of green tea extracts on selected foodborne pathogenic microorganisms responsible for food deterioration. The analysis was conducted using five different types of microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria Monocytogenese*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*, determined using the minimum inhibitory concentration (MIC) method and the well diffusion method. The results of the study show good antimicrobial activity of green tea extracts against all tested pathogenic bacteria.

Keywords: green tea, antimicrobial effect, pathogenic microorganisms

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Antimikrobni učinak ljekovitog bilja.....	2
1.2. Zeleni čaj.....	3
1.2.1. Kemijski sastav zelenog čaja	4
1.2.2. Biološka aktivnost zelenog čaja	6
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
2.1. Biljni materijal	9
2.2. Reagensi i uređaji.....	9
2.3. Bakterijske kulture	10
2.4. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti	10
2.4.1. Priprema i kontrola inokuluma.....	10
2.4.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC metoda)	11
2.4.3. Metoda difuzije u jažicama (Well metoda)	12
3. REZULTATI.....	14
3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije	14
3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama	14
4. RASPRAVA	15
5. ZAKLJUČAK	16
6. LITERATURA.....	17

UVOD

Da bi preživjele, biljke se, baš poput ljudi, štite od uzročnika bolesti. U tu svrhu proizvode antimikrobne tvari poznate kao fitokemikalije. Fitokemikalije obuhvaćaju više od 900 različitih biološki aktivnih spojeva, a mnogi od njih imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje, stoga ne čudi činjenica da se ljekovito bilje koristi od davnina u liječenju različitih bolesti.[1]

U najstarijem pisanom dokumentu koji potječe iz Kine zapisano je korištenje više od stotinu ljekovitih biljaka među kojima se nalaze bosiljak i cimet dok su na području današnje Mezopotamije ljudi koristili mirtu, sladić, timijan, vrbu, smokvu, senu i metvicu, biljke koje se i danas koriste. Osim toga, poznata je upotreba biljka za liječenje bolova koje u svom sastavu imaju aktivne komponente iz skupine opijata. Neke od njih se koriste i danas, kao što su mak, indijska konoplja, bunike i velebilja.

U ljekovito bilje se ubraja i zeleni čaj koji potječe od biljke *Camellia sinensis* porijeklom iz Kine. U ljekovite svrhe koristi se već više od 4 000 godina i to najčešće za liječenje raznih tegoba, od glavobolje do liječenje depresije. Danas se zeleni čaj koristi zbog svojih antikancerogenih svojstva, za smanjenje stresa, potiče cirkulaciju, štiti zdravlje srce, potiče mršavljenje, a koristi se i u prevenciji Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti, humanog papiloma virusa i dr.

U ovom radu ispitan je antimikrobni potencijal ekstrakta zelenog čaja na odabrane Gram (+) i Gram (-) patogene bakterije.

1. OPĆI DIO

1.1. Antimikrobni učinak ljekovitog bilja

Antimikroban učinak ljekovitog bilja je važan čimbenik u očuvanju hrane. Mikroorganizmi su jedan od primarnih uzročnika kvarenja i odgovorni su za smanjenu sigurnost i gubitak kvalitete hrane, stoga je važno osigurati dobru i kvalitetnu zaštitu hrane od patogenih mikroorganizama.[2]

Kada govorimo o ljekovitom bilju i njegovom antimikrobnom djelovanju usredotočujemo se na bilje koje imaju primjenu u narodnoj medicini, eterična ulja ili na izolirane spojeve kao što su alkaloidi, flavonoidi, terpeni ili naftokinoni.[3] Kemijskom analizom niza začinskih biljaka otkriveno je da su glavni sastojci brojnih biljaka karvakrol, timol, eugenol i njihovi prekursori.[4] Antimikrobna svojstva velikog broja ljekovitog bilja su dokumentirana i eksperimentalno potvrđena pred kraj 19. stoljeća. Istraživanja su se provodila na patogenim mikroorganizmima i fokusirana su na aktivnost protiv *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, enterohemoragične *Escherichia coli*, spolno prenosivih bolesti uključujući *Neisseria gonorrhoeae*, bakterija rezistentnih na antibiotike kao što su *Staphylococcus aureus* te protiv multifunkcionalne rezistencije bakterija kao što je *Salmonella typhi*. [3]

Istraživanja su pokazala da češnjak, crveni luk, kadulja, majčina dušica, timijan, cimet i drugi začini mogu djelovati antimikrobno na patogene bakterije. Općenito, antimikrobni učinak kemijskih komponenti ljekovitog bilja ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi te koncentraciji u koji su prisutni u biljci. Stoga, začini koji sadrže visoke koncentracije antimikrobnih komponenti mogu inhibirati rast patogenih mikroorganizama u hrani.[5]

1.2. Zeleni čaj

Čaj, lat. *Camellia Sinensis*, se dijeli u tri kategorije, ovisno o stupnju fermentacije: **zeleni** (nefermentirani), **oolong** (polufermentirani) i **crni čaj** (fermentirani).[5]



Slika 1. Vrste čajeva: a) zeleni čaj, b) crni čaj, c) oolong čaj [6]

Camellia sinensis je grmolika, zimzelena biljka koja se uzgaja na plantažama Kine, Indije i drugih zemalja. Biljka ima manje izdužene listove elipsasta oblika koji su lagano nazubljeni na krajevima. Cvjetovi su pravilni, bijele do svijetlo ružičaste boje, a plodovi su u tvrdim ljuskama. Biljka zahtijeva puno sunca i vlage pa se uzgaja u tropskim i suptropskim područjima. Uzgaja se na velikim plantažama, a naraste do visine od 3-4 m. Berba listova vrši se više puta godišnje, a beru se pupoljci.[7]



Slika 2. Izgled biljke *Camellia sinensis* [8]



Slika 3. Drvo biljke *Camellia sinensis* [9]

Zeleni čaj je nefermentirani čaj, koji se tradicionalno dobiva na Tajvanu, u Japanu i Kini. Kod proizvodnje zelenog čaja glavni cilj je sprječavanje fermentacije zbog čega se listići zelenog čaja odmah nakon branja lagano preokreću, a zatim tretiraju parom ili prže kako bi se inaktivirali enzimi odgovorni za fermentaciju. Glavni pigment odgovoran za boju zelenog čaja je klorofil, a prilikom obrade čaja njegov sadržaj se smanjuje pa su u konačnici listići čaja maslinasto-zelene boje.[6]

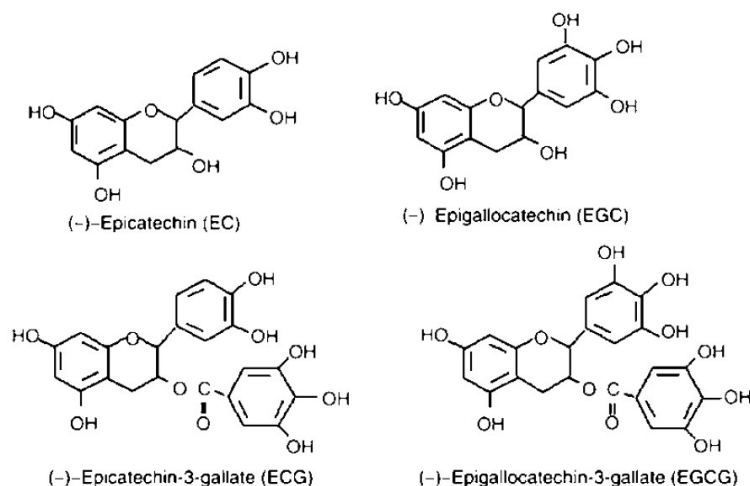
1.2.1. Kemijski sastav zelenog čaja

Kemijski sastav zelenog čaja varira o klimi, sezoni, hortikularnoj praksi i položaju lista na ubranom izdanku. Nekoliko znanstvenika provelo je analizu kemijskog sastava čaja i jedan od takvih analiza dala je najopsežniji i najtočniji sastav čaja koji je prikazan u tablici 1.[10]

Tablica 1. Kemijski sastav svježih listića čaja [10]

Sastojak	Udio (%)
Voda	75-78
Suha tvar	22-25
Organske komponente	
Proteini	20-30
Slobodne aminokiseline	1-4
Alkaloidi	3-5
Polifenoli	20-35
Ugljikohidrati	20-25
Organske kiseline	≤ 3
Masti	≤ 8
Pigmenti	≤1
Aromatični spojevi	0,005 - 0,1
Vitamini	0,6 - 1,0
Mineralne komponente	
Topljive u vodi	2-4
Netopljive u vodi	1.5-3

Najznačajnije bioaktivne komponente prisutne u zelenom čaju su polifenoli s udjelom od 20-35% koji utječu na boju, aromu i okus čaja. Fenolni spojevi u svom sastavu imaju jedan ili više benzenskih prstenova koji posjeduju barem jednu hidroksilnu skupinu (-OH). Dokazano je da zeleni čaj, čiji je kemijski sastav identičan onome u svježe ubranim listićima čaja, sadrži polifenole flavonoide koji obuhvaćaju flavanole, flavanone, antocijane i druge. Flavan-3-oli se uobičajeno nazivaju i katehinima, od kojih su najpoznatiji epigalokatehin 3-galat (EGCG), epigalokatehina (EGC), epikatehin galat (ECG) i epikatehin (EC) (Slika 4). Od navedenih katehina najzastupljeniji je EGCG. Navedene spojevi čine oko 70% ukupnih polifenola u čaju.[10]



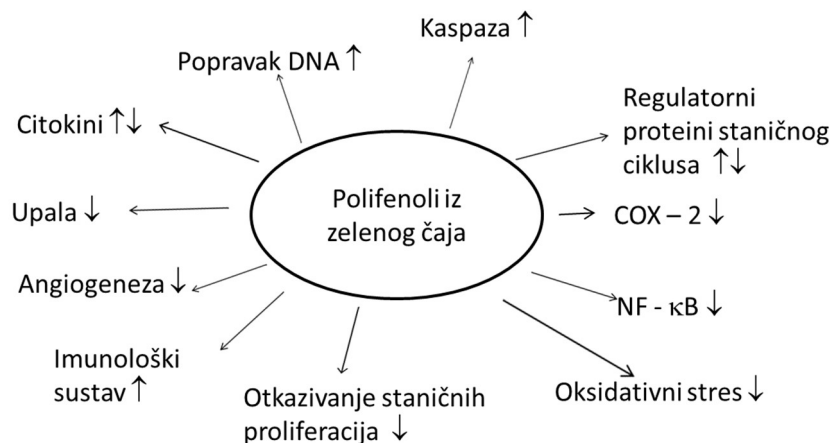
Slika 4. Struktura glavnih polifenola u zelenom čaju [11]

Druge fenolne komponente koje imaju značaj u sušenom zelenom čaju su fenolne kiseline od kojih je najzastupljeniji teogalin, kava kiselina, te galna kiselina. Uz fenolne kiseline značajne su i slobodne aminokiseline među kojima je najznačajniji teanin koji čini čak 50% ukupno prisutnih aminokiselina u čaju, alkaloidi od kojih su najzastupljeniji kofein (1,3,7-trimetilksantin), teobromin (3,7-dimetilksantin) i teofilin (1,3-dimetilksantin) te enzimi polifenol oksidaza (PPO), peroksidaza (PO)-enzim, tirozinaza koji su nepoželjni u proizvodnji zelenog čaja jer smanjuju kvalitetu.[10]

1.2.2. Biološka aktivnost zelenog čaja

Broj radova objavljenih u posljednjih deset godina o potencijalnim učincima zelenog čaja na zdravlje teško je izbrojati. Fenolni spojevi, posebno flavonoidi, odgovorni su za većinu zdravstvenih učinaka u zelenom čaju o kojima se raspravlja od davnina te su novije studije potvrdile zdravstvene učinke zelenog čaja, odnosno teanina iz zelenog čaja. Utvrđeno je snažno antioksidacijsko djelovanje: inhibira rast tumorskih stanica, ubija stance raka, a da pri tom ne oštećuje zdravo tkivo.[12, 13]

Također, zeleni čaj je učinkovit u snižavanju razine LDL kolesterola, inhibira nenormalno stvaranje krvnih ugrušaka, smanjuje akumulaciju trombocita, rizik od razvoja Parkinsonove bolesti, koristi se u prevenciji Alzheimerove bolesti, HPV-a, itd.[12, 13]



Slika 5. Molekularne mete polifenola iz zelenog čaja [14]

Antikancerogena svojstva

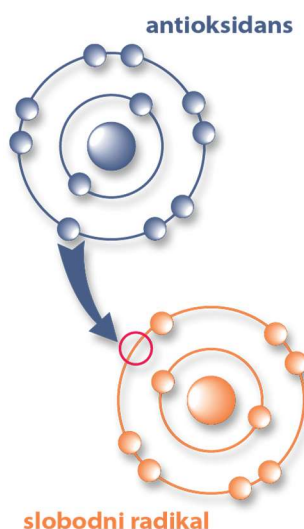
In vitro ispitivanja pokazuju kako zeleni čaj ima zaštitni učinak na ljudsko zdravlje i da smanjuje rizik od razvoja karcinoma, što potvrđuju podaci o niskoj stopi karcinoma u zemljama poput Japana, gdje se zeleni čaj redovito konzumira.[15] U provedenim studijama analiziran je molekularni mehanizam i djelovanje zelenog čaja na razne tipove karcinoma uključujući rak kože, pluća, želudca, jetre i gušterače, no sam mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen.[16] Važnu ulogu u antikancerogenom djelovanju ima EGCG koji djeluje kao inhibitor dihidrofolat reduktaze (ključni enzim u metabolizmu folata) te bi to mogao biti mehanizam za aktivnost zelenog čaja protiv nekih vrsta karcinoma.[17, 18]

Antimikrobna svojstva

Antibakterijsko, antitoksično, antivirusno i antifungalno djelovanje flavonoida iz zelenog čaja su detaljno opisana u studiji Friedman iz 2007. godine.[19]. Antimikrobno djelovanje zelenog čaja je dokazano *in vivo* kod ljudi, međutim još nije određen sinergijski efekt te treba provjeriti djelovanje zelenog čaja na mikroorganizme rezistentne na antibiotike.[20]

Antioksidativna svojstva

Fenolni spojevi prisutni u lišću zelenog čaja djeluju antioksidativno što znači da pomoću različitih mehanizama osiguravaju zaštitu od oksidansa i oksidativnih reakcija. Za antioksidativnu aktivnost čaja zaslužni su katehini koji djeluju kao *hvatači* slobodnih radikala (Slika 6). Kineski zeleni čaj je pokazao značajan učinak u prevenciji oksidacije LDL kolesterola u stanicama endotela te kod smanjenja aktivnosti lipooksigenaze. Oksidacija LDL-a i lipooksigenaza mogu uzrokovati različite bolesti, dok konzumacija zelenog čaja može smanjiti rizik od koronarnih bolesti srca.[21]



Slika 6. Djelovanje antioksidansa na slobodne radikale [22]

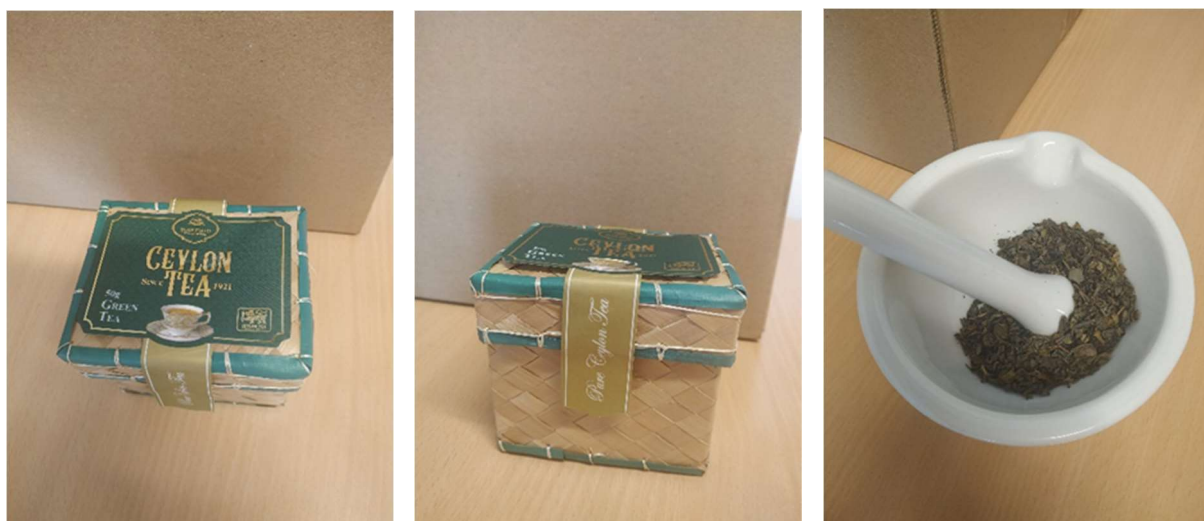
Druge dobrobiti

Istraživanja su pokazala da zeleni čaj posjeduje i brojna druga biološka svojstva kao što su: protuupalno i antivirusno djelovanje, smanjuje kolesterol, sprječava nastanak i razvoj koronarnih bolesti, itd.[23, 24] Uglavnom se za sva navedena pozitivna svojstva smatraju zaslužnima polifenoli spojevi. Otkriveno je da su EGCG i ECG snažni inhibitori replikacije virusa gripe u staničnim kulturama. Konzumiranje zelenog čaja statistički je značajno povezano s nižim razinama ukupnog kolesterola u serumu i kod muškaraca i kod žena.[25] Studije su otkrile da redovita konzumacija zelenog čaja štiti od srčanih bolesti, a jedno je istraživanje dokumentiralo da je taj rizik za osobe koji su pili čaj bio 36% manji.[26]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog završnog rada korišteno je lišće zelenog čaja (Slika 7). Biljni materijal je prije postupka ekstrakcije homogeniziran korištenjem ručnog mlinca do finog praha. 15 g biljnog materijala ekstrahirano je s 100 mL destilirane vode. Ekstrakcija se vršila u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od dva sata pri 60 °C. Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani preko naboranog filter papira i do trenutka analize, ekstrakti su skladišteni u zamrzivaču.



Slika 7. Biljni materijal korišten u radu

2.2. Reagensi i uređaji

- Fosfatni pufer (Phosphate Buffered Saline, PBS), Biolife, Italija
- Mueller-Hinton bujon (MHB), Biolife, Italija
- Mueller-Hinton agar (MHA), Biolife, Italija
- Jodonitrotetrazolium klorid (INT), Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka
- Ultrazvučna kupelj, Elma, Njemačka
- Mlinac za kavu, 980 Moulinex, Francuska
- Analitička vaga, Mettler P1210, SAD

2.3. Bakterijske kulture

Za određivanje antimikrobne aktivnosti zelenog čaja u ovom radu korišteni su bakterijski sojevi ATCC (engl. *American Type Culture Collection*): *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29219, *Salmonella enterica* i *Escherichia coli* 25922 i jedan klinički izolat *Listeria monocytogenes* DG 3269L preuzet iz Kliničkog bolničkog centra, Split. Bakterijske kulture su prenesene s dubokog hranjivog agara na krvni agar koji sadrži 5% ovčje krvi i inkubirane u aerobnim uvjetima pri 37 °C. Ovako uzgojeni sojevi čuvani su u hladnjaku pri +4 °C.

2.4. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost ekstrakta zelenog čaja ispitana je metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) [27] i metodom difuzije u jažicama.[28]

Otopine, pribor i posuđe korišten za određivanje antimikrobnih svojstava prethodno je sterilizirano. Svi postupci provedeni u ovom radu urađeni su pri sterilnim uvjetima.

2.4.1. Priprema i kontrola inokuluma

Prije početka pokusa svaka od navedenih bakterijskih kultura je revitalizirana na hranjivom MHA agaru. Ovako pripravljena kultura koristi se za pripremu inokuluma na način da se ezom prenese jedna bakterijska kolonija u MHB agar (4 mL) i ostavi na inkubaciji tijekom 20 h uz stalno miješanje (100 okr/min). Od ove suspenzije se potom otpipetira 150 µL bakterijske kulture u novu sterilnu posudicu s 10 mL MHB-a i ovako pripremljen inokulum ima koncentraciju bakterijskih stanica 10^5 - 10^6 (engl. *Colony Forming Units*, CFU) po 1 mL i koristi se u daljnjim postupcima testiranja antimikrobnog djelovanja.

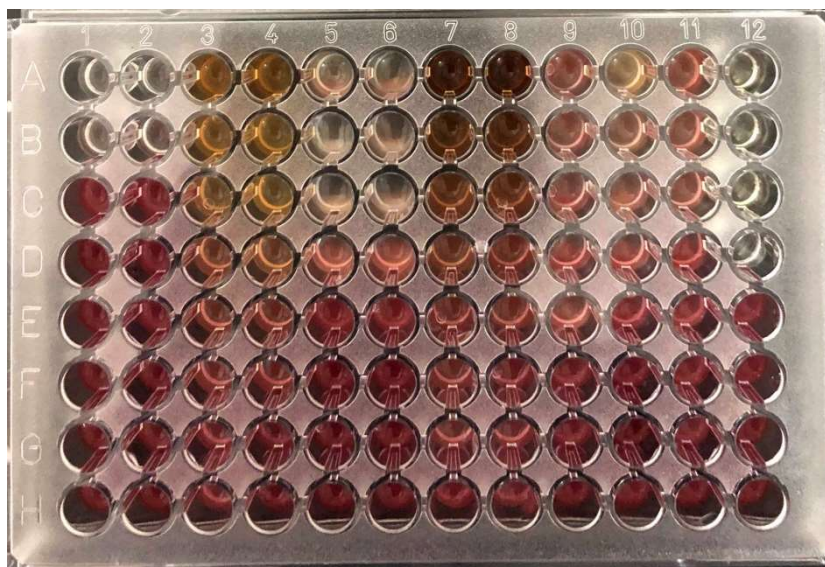
Kao potvrda koncentracije bakterijskih stanica u inokulumu koristi se metoda po Kochu. Kod ove metode se od inokuluma pripravi serija decimalnih razrjeđenja (50 μ L inokuluma + 450 μ L PBS-a; do 10^6 razrjeđenja) koji se nakapaju (engl. *Drop plate method*) na hranjivi agar te se nakon inkubacije broje porasle bakterijske kolonije. Od svih se pripremljenih razrjeđenja, po tri kapi volumena 10 μ L nakapaju na hranjivu MHA podlogu, te se potom stave na inkubaciju pri 37 °C tijekom 24 h.[29, 30]

Nakon inkubacije, kolonije porasle na podlozi u Petrijevim posudama se prebroje, a dobiveni rezultat potvrđuje broj jedinica koje formiraju kolonije (CFU) po 1 mL uzorka.[30, 31]

2.4.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC metoda)

MIC vrijednost predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa koja potpuno inhibira rast mikroorganizama. Testirani uzorak ekstrakta zelenog čaja (prethodno odgovarajuće razrijeđeni u MHB) serijski se razrjeđuje u MHB duž mikrotitarske pločice i to na način da se 50 μ L uzorka prenese u sljedeći otvor na pločici koji sadrži 50 μ L MHB te izmiješa. Volumen od 50 μ L novog razrjeđenja prenese se istim postupkom u sljedeći otvor, te se tako postupak ponavlja sve do kraja mikrotitarske pločice. Ovakvim načinom razrjeđivanja, početna koncentracija testiranog uzorka se razrijedi duž pločice tako da je svaka sljedeća koncentracija upola niža od prethodne. Konačni volumen u svakom otvoru nakon razrjeđivanja iznosi 50 μ L. U svrhu kontrole rezultata na svakoj se pločici pripremi slijepa proba (100 μ L MHB), pozitivna kontrola (50 μ L MHB + 50 μ L bakterijske kulture) i negativne kontrole za uzorak (50 μ L MHB + 50 μ L ekstrakta zelenog čaja). Nakon toga, u sve otvore mikrotitarske pločice, osim u slijepu probu i negativne kontrole, doda se po 50 μ L ispitivanih kultura bakterija.[45] Po dodatku bakterijskih kultura, suspenzije u pločicama se izmiješaju (laganim okretanjem i treskanjem pločice rukom po radnoj površini), i nakon 24-satne inkubacije (pri 35 °C) vizualno se očitavaju rezultati dodatkom INT reagens, promjena boje u jažicama.. Usporedbom promjene boje pozitivne kontrole, slijepa probe i negativne kontrole s obojenjem u otvorima mikrotitarske pločice s ekstraktom zelenog čaja očitava se MIC vrijednost.

MIC vrijednost je ona koncentracija antimikrobnog agensa prisutna u prvom ne obojanom otvoru pločice.[28,30] Ispitivanja su urađena u tri ponavljanja.



Slika 8. Izgled miktotitarske pločice nakon dodatka INT-a.

2.4.3. Metoda difuzije u jažicama (Well metoda)

Ovom metodom određuje se inhibicija rasta bakterija oko jažice u kojoj se nalazi određena koncentracija ekstrakta. Metoda se izvodi u Petrijevim zdjelicama na čvrstoj hranjivoj podlozi određenog sastava. Na hranjivu podlogu se nacjepljuje bakterijska kultura (inokulum) koja ima koncentraciju bakterijskih stanica 10^5 - 10^6 CFU/mL. Nakon inokulacije i sušenja (2-3 min), u agaru se buše jažice (rupe) promjera 7-8 mm. Potom se u svaku jažicu dodaje po 50 μ L ispitivanog ekstrakta zelenog čaja, nakon čega se Petrijeve zdjelice stave u hladnjak na 1 h da se omogući difundiranje aktivnih komponenti ekstrakta zelenog čaja u hranjivu podlogu. Nakon toga slijedi inkubacija tijekom 20-24 h pri 37 °C, a potom mjerenje zona inhibicije.[33] U slučaju da je zona inhibicije ≥ 15 mm govorimo o dobrom inhibitornom učinku ekstrakta zelenog čaja.[33] Ispitivanje je provedeno u tri ponavljanja.



Slika 9. Izgled zone inhibicije određene metodom difuzije u jažicama

3. REZULTATI

3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije

Tablica 2. MIC vrijednosti ekstrakta zelenog čaja izražene u mg GAE/L

	MIC (mg GAE/L)
Gram (+)	
<i>S. aureus</i>	3567,80
<i>L. monocytogenes</i>	3567,80
<i>E. faecalis</i>	891,94
Gram (-)	
<i>S. enterica</i>	891,94
<i>E. coli</i>	891,94

3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama

Tablica 3. Zona inhibicije (mm) dobivene metodom difuzije u jažicama

	Zona inhibicije (mm)
Gram (+)	
<i>S. aureus</i>	27,0 ± 0,0
<i>L. monocytogenes</i>	20,3 ± 0,58
<i>E. faecalis</i>	0,0 ± 0,0
Gram (-)	
<i>S. enterica</i>	12,7 ± 1,15
<i>E. coli</i>	0,0 ± 0,0

4. RASPRAVA

Rezultati prikazani u ovom završnom radu ukazuju na dobru antimikrobnu aktivnost ekstrakata zelenog čaja te se slažu s drugim provedenim istraživanjima.[34]

U tablici 2. prikazani su rezultati MIC vrijednosti ekstrakta zelenog čaja iz kojih se može uočiti bolji učinak ekstrakta na Gram (-) bakterije i *E. faecalis*, u odnosu na *S. aureus* i *L. monocytogenes* kod kojih je MIC vrijednost bila 4 puta viša (3567,80 mg GAE/L). MIC vrijednosti kod *E. faecalis*, *S. enterica* i *E. coli* je bila 891,94 mg GAE/L te ukazuju na bolji antimikrobni učinak ekstrakta i činjenicu da nam treba manja koncentracija zelenog čaja za inhibiranje rasta i razmnožavanja ispitivanih bakterija.

Usprkos niskim MIC vrijednostima, rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti metodom difuzije u jažicama (tablica 3) ne potvrđuje dobar antimikrobni učinak zelenog čaja na *E. faecalis* i *E. coli*, što je Bancirova [35] dokazala u svom radu. Naime ekstrakt zelenog čaja nije pokazao inhibicijski učinak (zona inhibicije = 0,0 mm) na dvije patogene bakterije. Najbolji inhibitorni učinak ekstrakt zelenog čaja pokazuje prema *S. aureus* s zonom inhibicije od 27,0 mm. Radji i sur. [36] u svom istraživanju su došli do istog zaključka. Za razliku od prethodne metode gdje je ekstrakt zelenog čaja pokazao najbolji učinak prema Gram (-) bakterijama i *E. faecalis*., u ovom slučaju zeleni čaj nije pokazao nikakvu ili je pokazao malu zonu inhibicije rasta (*S. enterica* = zona inhibicije = 12,7 mm). U interpretaciji ovih rezultata može se uzeti u obzir utjecaj sadržaj fenola ili drugih aktivnih komponenti iz zelenog čaja, razlike u građi bakterijskih stanica kao i različiti mehanizmi djelovanja ekstrakata na bakterijsku stanicu. Bolju aktivnost zelenog čaja prema Gram (+) bakterijskim vrstama u odnosu na Gram (-) možemo pripisati jednostavnijoj građi stanične stjenke Gram (+) vrsta, pa samim time i lakšem prolasku aktivnih komponenti u stanicu. No ovo pravilo možemo primijeniti samo kod metode difuzije u jažicama, obzirom da je ekstrakt u ovom radu bolju aktivnost MIC metodom pokazao samo prema jednoj testiranoj G (+) bakteriji.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenog istraživanja i dobivenih rezultata utvrđeno je:

- ekstrakt zelenog čaja MIC metodom pokazao je dobar antimikrobni učinak na *E. faecalis*, *S. enterica* i *E. coli*,
- metodom difuzije u jažicama ekstrakt zelenog čaja pokazao je najbolji inhibitorni učinak prema Gram (+) bakterijama *S. aureus* i *L. monocitogenes*.

Na osnovu navedenog, iako ekstrakt zelenog čaja nije svim metodama pokazao antimikrobni učinak prema testiranim mikroorganizmima, možemo zaključiti da općenito ima dobru antimikrobnu aktivnost.

6. LITERATURA

1. Hamilton AC. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodivers Conserv.* 2004;13(8):1477-517.
2. Balour M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. *J Pharm.* 2015;6(2):71-79.
3. JRíos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 2005;100(1-2):80–84.
4. Bor T, Aljaloud SO, Gyawali R, Ibrahim SA. Antimicrobials from herbs, spices, and plants, 2016;551-565.
5. Mađarić J. Bioaktivne komponente čaja. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek. 2014.
6. Li X, Zhu X. Tea: Types, Production, and Trade. *Encyclopedia of Food and Health.* 2016;279-282.
7. Rakovac Ž. »Poziv na čaj,«. Hrvatska: Algoritam; 2010.
8. https://hr.wikipedia.org/wiki/%C4%8Cajevke#/media/Datoteka:Camellia_sinensis_-_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-025.jpg - preuzeto 13.09.2019.
9. <http://www.plantsrescue.com/camellia-sinensis/> - preuzeto 13.09.2019.
10. Luo SH. IV. Processing of tea. *Food Rev Inter.* 2009;11(3):409-434.
11. https://www.researchgate.net/figure/Major-polyphenols-in-green-tea_fig2_228355417 - preuzeto 13.09.2019.
12. Wiseman SA, Balentine DA, Frei B. Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997;37(8):705–718.
13. Hollman PCH, Tijburg LBM; Yang CS. Bioavailability of flavonoids from tea. *Crit Rev Food Sc. Nutr.* 1997;37(8):719–738.
14. https://www.researchgate.net/figure/Molecular-targets-of-GTPs_fig1_228355417 - preuzeto 13.09.2019.

15. Sun CL, Yuan JM, Koh WP, Yu MC. Green tea, black tea and colorectal cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Carcinogenesis* 2006;27(7):1301–1309.
16. Yang CS, Lambert DJ, Ju J, Lu G, Sang S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;224(3):265–273.
17. Navarro-Pera´E, Cabezas-Herrera J, Campo LS, Rodríguez-Lo´JN. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(12):2215–2225.
18. Navarro-Pera´E, Cabezas-Herrera J, García-Ca´ novas F, Durrant MC, Thorneley RN, Rodríguez-Lo´JN. *Cancer Res.* 2005;65(6):2059–2064.
19. Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51(1):116–134.
20. Kyle JA, Morrice PC, McNeill G, Duthie GG. Effects of infusion time and addition of milk on content and absorption of polyphenols from black tea. *Agric J Food Chem.* 2007;55(12):4889–4894.
21. Cheng TO. All teas are not created equal. The chinese green tea and cardiovascular health. *Int J Cardiol.* 2006;108:301–308.
22. <https://matuzalem.hr/o-antioksidansima/> - pristupljeno 14.09.2019.
23. Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.* 2005;68:66–74.
24. http://www.northernhiorailfan.com/Green_Tea_Diet_Review.html. - pristupljeno 10.11.2007.
25. Sinija VR, Mishra HN. Green tea: Health benefits. *J Nutr Environ Med.* 2008;17(4):232–242
26. Hirano-Ohmori R, Takahashi R, Momiyama Y. Green tea consumption and serum malondialdehydmodified LDL concentrations in healthy subjects. *J Am Coll Nutr.* 2005;24:342–346.
27. Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Smole Možina S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods.* 2010;81:121–126.

28. Balour M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity. A review. J Pharm Anal Journal of Pharmaceutical. 2016;6(2):71-79
29. Katalinić V, Smole Možina S, Skroza D, Generalić I, Abramović H, Miloš M, Ljubenković I, Piskernik S, Pezo I, Terpinč P, Boban M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia. Food Chem. 2010;119:715-723.
30. Skroza D. Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveratrola u binarnim fenolnim smjesama. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2015.
31. Maksimović Z, Rifatbegović M. Osnovni principi kliničke bakteriologije. Sarajevo, BiH; 2015.
32. <http://www.secretsofgreentea.com/green-tea-diet-review>. - preuzeto 13.09.2019.
33. Koohsari H, Ghaemi EA, Shesh Poli MS, Sadegh A. Evaluation of antibacterial activity of Lemon verbena (Lippiacitriodora) leaves. Ascholars Research Library. 2013. Dostupno na: www.scholarsresearchlibrary.com
34. Reygaert WC. Potential for Prevention of Infection by Green Tea. Nova Science Pub Inc. 2015.
35. Bancirova M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. Food Res Int. 2010;43(5):1379–1382.
36. Radji M, Agustama RA, Elya, B, Tjampakasari C R. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3(8):663–667.