Određivanje antimikrobnog učinka začinskog bilja na Enterococcus faecalis

Rašić, Tonka Mirjana

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:167:283931

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKU FAKULTET

ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA ZAČINSKOG BILJA NA *Enterococcus faecalis*

ZAVRŠNI RAD

TONKA MIRJANA RAŠIĆ

Matični broj: 30

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKU FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA ZAČINSKOG BILJA NA *Enterococcus faecalis*

ZAVRŠNI RAD

TONKA MIRJANA RAŠIĆ

Matični broj: 30

Split, rujan 2019.

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

ANTIMICROBICAL ACTIVITY OF SPICES AGAINST *Enterococcus feacalis*

BACHELOR THESIS

TONKA MIRJANA RAŠIĆ

Parent number: 30

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

ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA ZAČINSKOG BILJA NA *Enterococcus faecalis*

Tonka Mirjana Rašić, 30

Sažetak:
Zbog povećanja broja oboljenja uzrokovanih patogenim mikroorganizmima prisutnim u hrani dolazi do sve veće zabrinutosti potrošača oko njene sigurnosti. Zahtjevi za sigurnom i kvalitetnom hranom rastu kao i briga zbog uporabe kemikalija i sintetskih konzervansa koji se koriste kako bi inhibirali rast patogena. Navedeni problemi i zahtjevi potrošača povećali su potrebu za primjenom alternativnih metoda za očuvanje kvalitete hrane, pa tako hrana pripremljena i očuvana prirodnim aditivima postaje sve popularnija.
Kemijski sastav začina je kompleksan i svaki obično ima neki specifičan i dominantan sastojak koji pridonosi aromi proizvoda i/ili antimikrobnom i antioksidacijskom djelovanju samog začina. Upravo iz tog razloga je dokazano da pojedini začini imaju antimikrobni učinak prema nizu patogenih bakterija koje mogu uzrokovati kvarenje hrane. Smatra se da jedne od glavnih komponenta u začinima odgovorne za njihovo antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje su fenolni spojevi. U ovom radu ispitana je antimikrobna aktivnost odabranih vrsta začinskog bilja na patogenog uzročnika kvarenja hrane, *Enterococcus faecalis*. Analiza je provedena na šesnaest (16) različitih začinskih biljaka, dok su analize provedene korištenjem dviju različitih metoda: metodom difuzije u jažicama (engl. *Well diffusion method*) te metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimal inhibitory concentration*, MIC). Dobiveni rezultati ukazuju na dobra antiomikrobna svojstva nekoliko začinskih biljaka od kojih se posebno ističe češnjak s niskom MIC vrijednosti (35,89 mg GAE/L) i dobrom inhibicijskom aktivnosti (> 15 mm).

Ključne riječi: začinsko bilje, patogeni mikroorganizmi, fenolni spojevi, antimikrobna aktivnost

Rad sadrži: 27 stranica, 5 slika, 5 tablica , 32 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
2. Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza

Datum obrane: 26. rujna 2019. god.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

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, Assistant Professor
Technical assistance: Ph. D. Vida Šimat, Associate Professor

ANTIMICROBICAL ACTIVITY OF SPICES AGAINST *Enterococcus faecalis*

Tonka Mirjana Rašić, 30

Abstract:

The increasing number of diseases caused by foodborne pathogens has led to increasing consumer concerns about food safety. Demands for safe and quality food are growing, as are concerns about the use of chemicals and synthetic preservatives that inhibit the growth of pathogens. These problems and consumer preferences have increased need for using alternative methods of food preservation. Thus, food prepared and processed by the addition of natural additives is becoming more popular.
The chemical composition of spices is complex and each spice usually has some specific and dominant compound that contributes to the aroma of the product and/or its antimicrobial and antioxidant activity. Therefore it has been proven that some spices have an antimicrobial effect against a number of foodeborne pathogenic bacteria. One of the main components in spices responsible for their antioxidant and antimicrobial activity are phenolic compounds. This study aimed to investigate the antimicrobial activity of selected spices on a pathogenic food spoilage organism, *Enterococcus faecalis*. The analysis was carried out using sixteen (16) different spices, and the analyses were carried out using two different methods: the well diffusion method and minimum inhibitory concentration method (MIC). The obtained results indicate good antimicrobal properties of several spices especially garlic which showed low MIC value (35.89 mg GAE / L) and good inhibitory activity (> 15 mm).

Keywords: spices, foodborne pathogens, phenolic compunds, antimicrobal activity

Thesis contains: 27 pages, 5 figures, 5 tables, 32 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor
2. Ph. D. Vida Šimat, Associate Professor
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

Defence date: 26th September 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad izrađen je u Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu i u Laboratoriju medicinske mikrobiologije i parazitologije, Medicinskog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroza, u razdoblju od travnja do rujna 2019. godine.

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

ZAHVALA

Najveće hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na izuzetnoj susretljivosti, danim savjetima, idejama, i vremenu koje je pružila prilikom izrade ovog rada. Veliko hvala i komisiji koja je izdvojila vrijeme za pregled rada i ukazala na pogreške.

Od srca hvala mojoj obitelji, mami, tati, sestrama, Nadi i Tomislavu koji su me uvijek podržavali i upućivali na pravi put.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj mami Ani bez koje sve dosad postignuto ne bi bilo moguće.

Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama bez kojih cijeli ovaj period studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

I na kraju, hvala mom Anti na razumijevanju, strpljenju i pomoći u trenutcima kad se sve činilo nemogućim.

HVALA SVIMA !

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Spektrofotometrijski odrediti udio ukupnih fenola u 16 vodenih ekstrakata različitog začinskog bilja.
- Ispitati antimikrobnu aktivnost začinskog bilja na patogenog uzročnika kvarenja hrane, *Enterococcus faecalis* korištenjem metode difuzije u jažicama i metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije.
- Analizirati dobivene rezultate te donijeti zaključke o antimikrobnoj aktivnosti ispitivanih ekstrakata začinskog bilja.

SAŽETAK

Zbog povećanja broja oboljenja uzrokovanih patogenim mikroorganizmima prisutnim u hrani dolazi do sve veće zabrinutosti potrošača oko njene sigurnosti. Zahtjevi za sigurnom i kvalitetnom hranom rastu kao i briga zbog uporabe kemikalija i sintetskih konzervansa koji se koriste kako bi inhibirali rast patogena. Navedeni problemi i zahtjevi potrošača povećali su potrebu za primjenom alternativnih metoda za očuvanje kvalitete hrane, pa tako hrana pripremljena i očuvana prirodnim aditivima postaje sve popularnija.
Kemijski sastav začina je kompleksan i svaki obično ima neki specifičan i dominantan sastojak koji pridonosi aromi proizvoda i/ili antimikrobnom i antioksidacijskom djelovanju samog začina. Upravo iz tog razloga je dokazano da pojedini začini imaju antimikrobni učinak prema nizu patogenih bakterija koje mogu uzrokovati kvarenje hrane. Smatra se da jedne od glavnih komponenta u začinima odgovorne za njihovo antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje su fenolni spojevi. U ovom radu ispitana je antimikrobna aktivnost odabranih vrsta začinskog bilja na patogenog uzročnika kvarenja hrane, *Enterococcus faecalis*. Analiza je provedena na šesnaest (16) različitih začinskih biljaka, dok su analize provedene korištenjem dviju različitih metoda: metodom difuzije u jažicama (engl. *Well diffusion method*) te metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimal inhibitory concentration*, MIC). Dobiveni rezultati ukazuju na dobra antiomikrobna svojstva nekoliko začinskih biljaka od kojih se posebno ističe češnjak s niskom MIC vrijednosti (35,89 mg GAE/L) i dobrom inhibicijskom aktivnosti (> 15 mm).

Ključne riječi: začinsko bilje, patogeni mikroorganizmi, fenolni spojevi, antimikrobna aktivnost

SUMMMARY

The increasing number of diseases caused by foodborne pathogens has led to increasing consumer concerns about food safety. Demands for safe and quality food are growing, as are concerns about the use of chemicals and synthetic preservatives that inhibit the growth of pathogens. These problems and consumer preferences have increased need for using alternative methods of food preservation. Thus, food prepared and processed by the addition of natural additives is becoming more popular.

The chemical composition of spices is complex and each spice usually has some specific and dominant compound that contributes to the aroma of the product and/or its antimicrobial and antioxidant activity. Therefore it has been proven that some spices have an antimicrobial effect against a number of foodeborne pathogenic bacteria. One of the main components in spices responsible for their antioxidant and antimicrobial activity are phenolic compounds. This study aimed to investigate the antimicrobial activity of selected spices on a pathogenic food spoilage organism, *Enterococcus faecalis*. The analysis was carried out using sixteen (16) different spices, and the analyses were carried out using two different methods: the well diffusion method and minimum inhibitory concentration method (MIC). The obtained results indicate good antimicrobal properties of several spices especially garlic which showed low MIC value (35.89 mg GAE / L) and good inhibitory activity (> 15 mm).

Keywords: spices, foodborne pathogens, phenolic compunds, antimicrobal activity

SADRŽAJ

UVOD 1
1. OPĆI DIO 2
1.1. Povijest začinskog bilja 2
1.2. Potreba za konzerviranjem hrane 3
1.3. Biološka aktivnost začinskog bilja 4
1.3.1. Antioksidacijski učinak začinskog bilja 4
1.3.2. Antimikrobni učinak začinskog bilja 6
1.3.3. Fenolni spojevi u začinskim biljkama 7
1.4. Patogeni mikroorganizmi u prehrambenoj industriji 11
1.4.1. Rod Enterococcus 11
1.4.2. Enterococcus u hrani 11
2. EKSPERIMENTALNI DIO 13
2.1. Materijal 13
2.1.1. Biljni materijal 13
2.1.2. Reagensi korišteni za određivanje ukupnih fenola 14
2.1.3. Reagensi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti 14
2.1.4. Uređaji 14
2.2. Metode 14
2.2.1. Priprava ekstrakata 14
2.2.2.. Metoda određivanja ukupnih fenola 15
2.2.3.. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti 15
2.2.3.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije 17
2.2.3.2. Metoda difuzije u jažicama 18
3. REZULTATI 19
3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola u ekstraktima začinskog bilja 19
3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti začinskog bilja 20
4. RASPRAVA 22
5. ZAKLJUČAK 24
6. LITERATURA 25

UVOD

Poznato je da hrana zbog svog kemijskog sastava predstavlja pogodan medij za rast i razmnožavanje mikroorganizama, a kao posljedica toga dolazi do kvarenje hrane. Kvarenje i gubitak kvalitete hrane može biti uzrokovan kemijskim (oksidativna užeglost, gubitak boje, Maillardove reakcije), fizičkim (kretanje vlage, promjena u teksturi, isparavanje spojeva okusa niske molekularne mase,oštećenja uzrokovana smrzavanjem/odmrzavanjem), enzimskim (lipolitička užeglost, proteoliza, reakcije enzimskog posmeđivanja) i mikrobiološkim (kvarenje hrane i trovanje hranom) reakcijama. Kontrolom navedenih reakcija možemo djelotvorno očuvati hranu, a gubitak kvalitete može se spriječiti ili reducirati primjenom niza tehnika, uključujući upotrebu aditiva (antioksidansi, konzervansi), koji ometaju oksidativne kemijske reakcije i sprječavaju ili odgađaju rast mikroorganizama (bakteriostatski). Kao antioksidansi i antimikrobna sredstva često se primjenjuju sintetski aditivi. Međutim, budući da se uporaba aditiva gleda sa sumnjom zbog njihove potencijalne toksičnosti, potrošači sve više izbjegavaju hranu prerađenu korištenjem aditiva kemijskog (sintetskog) podrijetla. Upravo iz tog razloga proizvođači hrane nastoje smanjiti uporabu sintetskih aditiva iz prehrambenih proizvoda ili ih zamijeniti "prirodnim" i "zdravim" dodacima koji će održati ili čak produljiti rok trajanja proizvoda te dati funkcionalnu komponentu hrani. Interes za mogućom primjenom prirodnih dodataka u hrani, bilo da se spriječi rast patogena koji se prenose hranom ili da se odgodi njeno oksidativno kvarenje, sve je veći. Pri tome se posebna pažnja posvećuje ljekovitim i začinskim biljkama kao bogatim izvorima fenolnih spojeva, osobito polifenola, kojima je osim antioksidacijskog učinka dokazana i antimikrobna aktivnost što ih čini pogodnim izborom.

Stoga, cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost odabranih ekstrakata začinskog bilja na patogenog uzročnika kvarenja hrane, *Enterococcus faecalis* primjenom različitih antimikrobnih metoda.

1.OPĆI DIO

1.1. Povijest začinskog bilja

Ljekovito i začinsko bilje stoljećima je igralo bitnu ulogu u tradicionalnoj medicini i kulinarstvu, a njihovo korištenje može se pratiti još od drevnih Egipćana. Ovi prirodni sastojci posjeduju mnoge kvalitete zbog kojih su korišteni za zaštitu zdravlja i očuvanje namirnica. Prva dokumentirana upotreba začina datira još iz doba Starog Egipta, gdje su se luk i češnjak koristili za očuvanje zdravlja radnika, a cimet za balzamiranje. Mnogi od glasovitih istraživača kao što su Vasco da Gama, Cristofor Colombo i Marco Polo donijeli su egzotične začine sa svojih putovanja u nove zemlje. Prva kulinarska upotreba začina bila je u svrhu očuvanje mesa od antimikrobnog kvarenja **(1)**.

Potreba za očuvanjem hrane u davnim vremenima bila je u cijelosti potaknuta prirodnim čimbenicima, ali su kasnije uključeni i oni civilizacijski. Sve veći broj stanovništva počinje živjeti u gradovima gdje nema mogućnosti proizvodnje vlastite hrane, a također želi uživati u hrani i specijalitetima iz dalekih zemalja. Svi ovi čimbenici su imali utjecaj na očuvanje fizikalnih i nutritivnih svojstava namirnice **(2)**.

Začini danas igraju važnu ulogu u proizvodnji hrane jer su u stanju maskirati redukciju soli, smanjiti korištenje umjetnih aroma, osiguravaju prirodnu boju hrane te djeluju kao prirodni antioksidansi.

Slika 1. Povijest i trgovina začina **(3)**

1.2. Potreba za konzerviranjem hrane

Iako je konzerviranje hrane doseglo visoki standard, količine pokvarene hrane još uvijek su zapanjujuće. Unatoč modernim poboljšanjima u tehnologiji proizvodnje hrane, distribucije, higijenskih standarda i obrazovanja potrošača tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, sigurnost hrane je još uvijek važan problem javnog zdravstva zbog velikog broja infekcija porijeklom iz hrane. Procjenjuje se da svake godine oko 600 milijuna ljudi, odnosno svaki deseti stanovnik Zemlje, oboli od neke bolesti koja se prenosi hranom **(2)**. Reakcije koje uzrokuju kvarenje i gubitak kvalitete namirnica mogu biti fizičke, enzimske, kemijske ili mikrobiološke. Od svih tih reakcija, mikrobiološke su najvažnije zbog nekoliko razloga. Prvenstveno s ekonomskog stajališta, mikroorganizmi su glavni uzroci ogromnih gubitaka u primarnoj poljoprivrednoj proizvodnji diljem svijeta. Procjenjuje se da se oko jedne četvrtine ukupne svjetske proizvedene hrane izgubi zbog aktivnosti mikroorganizama. Sa stajališta sigurnosti potrošača, neki od mikroorganizama koji su kontaminanti hrane uzrokuju niz bolesti trovanja hranom, uključujući i one opasne po život **(4)**. Drugim riječima, kvarenje i trovanje hranom od strane mikroorganizama je problem koji još nije pod odgovarajućom kontrolom te stoga još uvijek postoji potreba da se rizik kvarenja hrane svede na najmanju moguću mjeru.

Dostupne metode za smanjenje ili uklanjanje mikroorganizama prisutnih u hrani mogu se primijeniti u tri glavne faze tijekom procesa proizvodnje hrane:

- spriječiti pristup mikroorganizama hrani;
- inaktivirati mikroorganizme prisutne u hrani i
- usporiti ili spriječiti rast mikroorganizama u slučaju da imaju pristup hrani i da se ne mogu inaktivirati.

Upravo konzervansi koji se dodaju u hranu djeluju na treći navedeni način, uglavnom inhibicijom, iako neki i inaktiviraju i inhibiraju mikroorganizme **(2)**.

1.3. Biološka aktivnost začinskog bilja

Začini su uobičajeni dodaci hrani koji se koriste kao arome, bojila, a sve češće i kao konzervansi. Posebna važnost začinima pridaje se jer su bogati izvori bioaktivnih spojeva. Pojam bioaktivan, odnosno biološki aktivan, znači da spoj ima pozitivan učinak na život organizama, tkiva ili stanica.

Bioaktivne molekule su prehrambene komponente koje igraju važnu ulogu u razvoju, biokemijskim reakcijama i posjeduju dokazane zdravstvene učinke. Nacionalni institut za zdravlje (engl. *The National Institutes of Health*) definira bioaktivne sastojke hrane kao konstituente hrane ili dodataka prehrani koji potječu iz biljnih i životinjskih izvora, a uključuju nenutritivne i nutritivne sastojke koji imaju dokazanu ulogu u prevenciji bolesti i očuvanju zdravlja **(4)**.

Dokazano je da pojedini začini posjeduju antioksidacijski i antimikrobni učinak. Prisutnost fenolnih spojeva u začinskom bilju usko je povezana s njihovom antioksidacijskom i antimikrobnom aktivnošću **(1)**. Antimikrobno i antioksidativno djelovanje začina je različito, te ovisi o koncentraciji i vrsti prisutnih aktivnih komponenti **(5)**. Aktivne komponente začina koje pokazuju antioksidativno djelovanje su fenolne kiseline, flavonoidi, prirodni pigmenti i terpeni, dok su većina antimikrobnih sastojaka terpeni (karvakrol, α-pinen, *p*-cimen, timol, kamfor, eugenol, linalol i dr.), spojevi male molekularne mase i snažnih lipofilnih svojstava, koji lako prolaze kroz stanične membrane **(6)**.

1.3.1. Antioksidacijski učinak začinskog bilja

Antioksidansi, u širem smislu, su sve tvari koje mogu zaštititi materijale (ne samo hranu) od autooksidacije, bez obzira na mehanizam djelovanja. Točnije, ovi spojevi bi se mogli nazivati i inhibitorima oksidacije **(2)**.

Antioksidansi u hrani definirani su kao spojevi koji mogu odgoditi, usporiti ili spriječiti autooksidacijske procese. Oni sprečavaju pojavu užeglosti ili drugih oštećenja hrane uslijed oksidacije te na taj način produljuju vijek trajanja namirnica **(7)**.

1.3.1.1. Mehanizmi antioksidacijske aktivnosti

Antioksidansi se razlikuju po kemijskoj strukturi i različitim mehanizmima djelovanja. Prema načinu djelovanja, antioksidansi se dijele na primarne ili preventivne, sekundarne i tercijarne. Primarni ili preventivni antioksidansi sprječavaju nastanak novih slobodnih radikala, sekundarni antioksidansi "hvataju" slobodne radikale i na taj način inhibiraju inicijaciju i prekidaju propagaciju, dok tercijarni antioksidansi obnavljaju i uklanjaju oštećene biomolekule koje nastaju u uvjetima oksidativnog stresa. Antioksidativni kapacitet začina se uglavnom pripisuje fenolnim spojevima **(7)**.

1.3.1.2. Prirodni antioksidansi

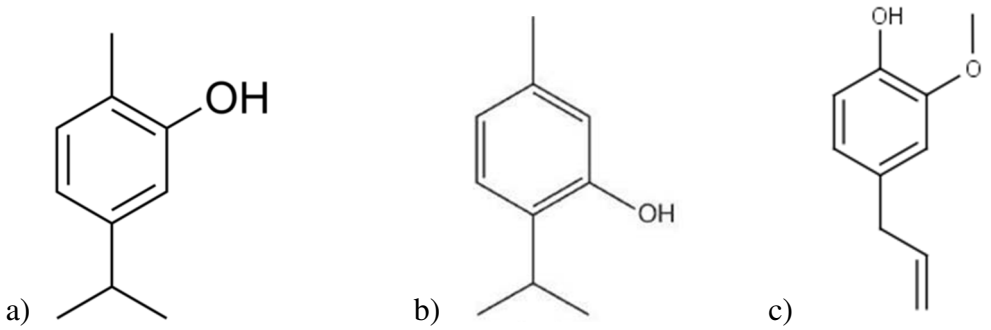
Prema podrijetlu, antioksidansi se dijele na sintetske i prirodne antioksidanse. Prirodni antioksidansi u hrani mogu biti iz (a) endogenih spojeva u jednoj ili više komponenti hrane; (b) tvari nastale u reakcijama tijekom obrade hrane; i (c) prehrambeni aditivi izolirani iz prirodnih izvora. Gotovo sve biljke, mikroorganizmi, pa čak i životinjska tkiva sadrže neku vrstu antioksidansa **(7,8)**.

Antioksidacijsko djelovanje začina ne ovisi samo o koncentraciji nego i vrsti prisutnih fenolnih spojeva. Tako npr. antioksidativni kapacitet fenolnih kiselina ovisi o broju i položaju -OH skupina pa su hidroksicimetne kiseline učinkovitiji antioksidansi u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline. Isto tako, antioksidativni kapacitet flavonoida ovisi o stupnju hidroksilacije i položaju hidroksilnih skupina u B prstenu, supstituciji hidroksilnih skupina u B prstenu s metoksi skupinama, prisustvu dvostruke veze u C prstenu te o stupnju polimerizacije **(6)**.Općenito, ako se analizira koncentracija ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet začina po porodicama, biljne vrste iz porodice Lamiaceae predstavljaju značajan izvor prirodnih antioksidanata. Ovoj porodici pripadaju ružmarin te brojne druge začinske biljne vrste, kao origano, bosiljak, metvica, kadulja, mažuran, timijan i majčina dušica. Sve one su bogate fenolnim spojevima i eteričnim uljima te su poznate po svojim antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima **(2,6)**.

1.3. 2. Antimikrobni učinak začinskog bilja

Antimikrobno djelovanje je drugi važan aspekt očuvanja hrane. Mikrobna aktivnost, primarni uzrok kvarenja mnogih namirnica, često je odgovorna za gubitak kvalitete i sigurnosti te skraćenje roka trajanja **(9)**.

Antimikrobna svojstva biljaka dokumentirana su i eksperimentalno potvrđena već krajem 19. stoljeća. Istraživanja su pokazala da rast Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija te kvasaca može biti inhibiran češnjakom, crvenim lukom, kaduljom, majčinom dušicom, timijanom, cimetom i drugim začinima. Glavne komponente s antimikrobnim učinkom pronađene u začinima su fenolni spojevi, terpeni, alifatski alkoholi, aldehidi, ketoni, kiseline i izoflavonoidi, a kemijskom analizom niza začinskih biljaka otkriveno je da glavni sastojci mnogih uključuju karvakrol, timol, eugenol i njihove prekursore **(10)**.



Slika 2. Kemijske strukture: a) karvakrola; b) timola i c) eugenola **(11,12,13)**

Općenito, antimikrobna učinkovitost pojedinih komponenata začinskog bilja ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi kao i koncentraciji u kojoj su prisutni. Prema tome, začini koji manifestiraju relativno visoke razine antimikrobnog učinka mogu biti izvori komponenti koje inhibiraju rast patogenih mikroorganizama prisutnih u hrani **(10)**.

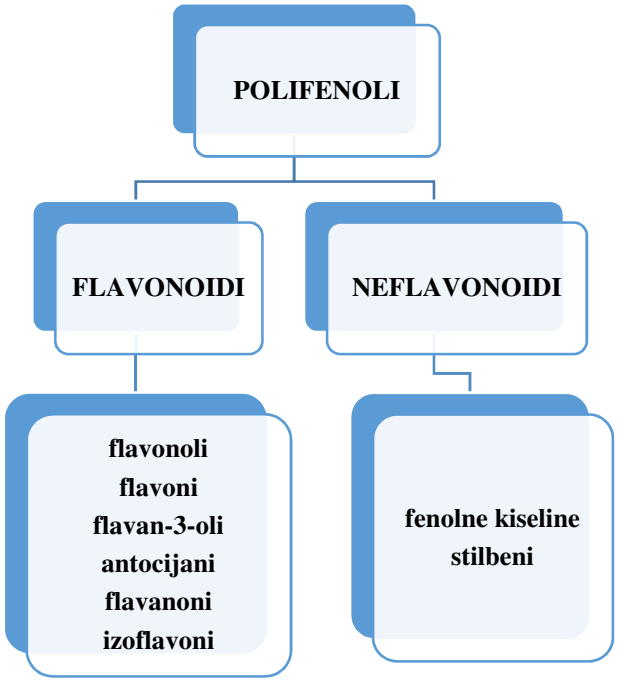
1.3.2.1. Mehanizam antimikrobne aktivnosti

Točan mehanizam antimikrobnog djelovanja nije sasvim jasan, a antimikrobno djelovanje bilja pripisuje se uglavnom eteričnim uljima te nekim fenolnim spojevima. Najznačajniji sastojci eteričnih ulja pripadaju grupi cikličkih i ravnolančanih terpenskih ugljikovodika, monoterpenskih alkohola te monoterpenskih aldehida. Njihov mehanizam djelovanja je različit. U biljnim ekstraktima i eteričnim uljima prisutan je veliki broj različitih reaktivnih spojeva pa se antimikrobna aktivnost ne pripisuje samo jednom, specifičnom mehanizmu, već je u antioksidacijski učinak uključeno njih nekoliko. Općenito, antimikrobne tvari u vegetativnim bakterijskim stanicama mogu djelovati na staničnu stjenku, citoplazmu ili citoplazmatsku membranu **(14)**. Učinak fenolnih spojeva može također ovisiti i o koncentraciji prisutnog spoja. Pri niskoj koncentraciji, fenoli utječu na aktivnost enzima, posebice onih povezanih s proizvodnjom energije, dok pri visokim koncentracijama, uzrokuju denaturaciju bjelančevina. Antimikrobni učinak fenolnih spojeva može biti posljedica njihove sposobnosti mijenjanja propusnosti mikrobnih stanica, čime se omogućuje gubitak makromolekula iz unutrašnjosti (Na-glutamat, riboza). Fenoli također mogu ometati membranske funkcije (prijenos elektrona, unos hranjivih tvari, proteina, sintezu nukleinskih kiselina i aktivnost enzima) i stupati u interakciju s membranskim proteinima, uzrokujući deformacije u njenoj strukturi i probleme u funkcionalnosti **(15)**.

1.3.3. Fenolni spojevi u začinskim biljkama

1.3.3.1. Klasifikacija fenola

Fenoli su jedna od najvećih skupina sekundarnih metabolita. Osnovna kemijska struktura fenola podrazumijeva jedan benzenski prsten koji posjeduje barem jednu hidroksilnu skupinu (-OH). Obuhvaćaju jednostavne spojeve kao što su fenolne kiseline pa sve do velikih polimeriziranih spojeva poput kondenziranih tanina. Heterogenu skupinu fenola možemo najjednostavnije klasificirati na polifenole i jednostavne fenole *(slika 3)*.



Slika 3. Klasifikacija fenolnih spojeva

Polifenoli su složeniji fenolni spojevi koji posjeduju najmanje dvije fenolne podjedinice, dok oni jednostavni imaju samo jednu i nazivaju se monofenolima **(16)**. Fenolni spojevi prisutni u začinima su većinom polifenoli **(2)**.

U *tablici 1* dan je pregled najznačajnijih fenolnih spojeva prisutan u različitim vrstama začinskog bilja. Koncentracije spojeva nisu navedene budući da se znatno razlikuju ovisno o primijenjenoj metodi izolacije, o metodi identifikacije, te ovisno o dijelu biljke koji je analiziran, genetičkoj podvrsti, klimatskim uvjetima i sl.

Tablica 1. Pregled najznačajnijih fenolnih spojeva prisutnih u različitim vrstama začinskog bilja **(2,17,18)**

ZAČINI	GLAVNI FENOLNI SPOJEVI
Kadulja	Fenolne kiseline: ružmarinska, kava, ferulinska, klorogenska, kumarinska, karnozolna kiselina; Flavonoidi: kvercetin, luteolin, apigenin, katehin
Ružmarin	Fenolne kiseline: ružmarinska, kava, ferulinska; Fenolni diterpeni: karnozolna kiselina, karnozol, karvakrol; Flavonoidi: luteolin, apigenin, naringinin; urosolna kiselina
Limun	Fenolne kiseline: kava, ferulinska, hidroksibenzojeva, kumarinska
Kapula	Fenolne kiseline: galna, ferulinska Flavonoidi: kvercetin, rutin, miricetin, kammpferol
Koromač	Flavonoidi: kvercetin, kempferol, rutin
Peršin	Fenolne kiseline: kava; Flavonoidi
Kurkuma	Fenolne kiseline: vanilinska, kalebin A, Vanilin, Kurkumin
Celer	Fenolne kiseline: kava, cinamična, kumarinska, ferulinska Flavonoidi: apigenin, luteolin, kvercetin, kempferol
Lovor	Fenolni terpeni: Linalol, karvakrol, eugenol
Češnjak	Fenolne kiseline: kava, ferulinska, *p*-kumarinska, vanilinska, *p*-hidroksibenzojeva
Papar	Piperin, piperidin; Flavonoidi: izokvercetin
Maslina	Fenolne kiseline: kava, kumarinska, ferulinska, siringinska, vanilinska
Klinčić	Fenolne kiseline: kava, ferulinska, elaginska; Salicilna

1.3.3.2. Učinak fenolnih komponenti na kvalitetu hrane

Fenolni spojevi usko su povezani s prehrambenom i senzorskom kvalitetom hrane dobivene iz biljnih izvora. U niskim koncentracijama, fenoli mogu zaštititi hranu od oksidativnog propadanja. Kada su prisutni u velikim količinama, kao npr. antocijani onda su odgovorni za narančastu, crvenu, plavu i/ili ljubičastu boju. Nadalje, u visokim koncentracijama, oni ili njihovi oksidacijski produkti, mogu sudjelovati u uklanjanju boje hrane, interakciji s proteinima, ugljikohidratima i mineralima **(19)**.

1.3.3.3. Zdravstveni učinci fenolnih spojeva

Brojnim fiziološkim i biokemijskim procesima u ljudskom tijelu mogu nastati slobodni radikali i druge reaktivne vrste kisika (ROS) kao nusprodukti. Slobodni radikali mogu biti uključeni u brojne bolesti i ozljede tkiva. Prisutnost fenolnih spojeva u biljkama, koji su povezani sa suzbijanjem rizika od kardiovaskularnih bolesti, utječe na primarne uzroke koronarne srčane bolesti, ateroskleroze, ciroze jetre, dijabetesa i dr. To je djelomično objašnjeno činjenicom da fenolni spojevi pomažu tijelu da se zaštiti od oštećenja uzrokovanih ROS-om. Zaštita se postiže sprječavanjem oksidacije lipida, umrežavanjem proteina i mutacijom DNA te u kasnijim fazama oštećenja tkiva **(2)**.

1.4. Patogeni mikroorganizmi u prehrambenoj industriji

1.4.1. Rod Enterococcus

Rod Enterococcus je novoimenovan rod za fekalne Streptococcus vrste: *Streptococcus faecalis* i *S. faecium* koje su sad poznate kao *Enterococcus faecalis* i *E. faecium*. Bakterije roda Enterococcus su Gram-pozitivni, nepokretni, fakultativno anaerobni mikroorganizmi, saprofiti koji pod određenim uvjetima mogu postati patogeni. Stanice su veličine 0,6–2,0 × 0,6–2,5 µm, okruglog ili elipsoidnog oblika i dolaze u parovima ili kratkim lancima. Optimalna temperatura rasta im je 37°C, ali mogu rasti u rasponu od 10-45°C. Stanište im je probavni trakt životinja, ptica i kukaca **(20)**. Veliki broj enterokoka nalazi se na živežnim namirnicama, pogotovo u sirevima, a njihova prisutnost u namirnicama ukazuje na neposrednu ili posrednu kontaminaciju fekalnim tvarima. Enterokoki, kao skupina, su indikatori kontaminacije vode patogenim mikroorganizmima, obično u zajednici s fekalnim koliformima **(21)**. Danas enterokoke smatramo s jedne strane korisnim bakterijama budući da su fermentacijske bakterije koje pridonose senzorskim specifičnostima pojedinih proizvoda, dok su s druge strane potencijalno virulentne bakterije, tvorci biogenih amina ili nositelji gena rezistencije **(22)**. Enterokoki su prepoznati kao glavni patogeni koji uzrokuju bakteriemiju, endokarditis, infekcije mokraćnog sustava i druge infekcije. Enterokoki su oportunistički patogeni i obično uzrokuju infekcije u bolesnika koji imaju ozbiljne podloge bolesti ili koji su imunokompromitirani. Među enterokokima izoliranim od infekcije kod ljudi prevladava *E. faecalis* (s više od 80%), dok je *E. faecium* povezan s većinom preostalih infekcija **(23)**.

1.4.2. Enterococcus u hrani

Prijenos bakterijskih patogena životinjskog podrijetla može se dogoditi konzumiranjem kontaminiranih životinjskih ili biljnih prehrambenih proizvoda. Mesne prerađevine mogu se kontaminirati fekalnim materijalom u klaonicama, dok povrće može biti kontaminirano u poljima tijekom gnojenja ili uslijed upotrebe kanalizacijske vode koja se koristi za

gnojidbu i navodnjavanje **(24)**. Iako je uloga enterokoka kao oportunističkog patogena dobro utvrđena, njihova sposobnost izazivanja bolesti izazvanih hranom ostaje uglavnom nepoznata.

Dugo je prisutnost enterokoka u mliječnim proizvodima smatrana pokazateljem neadekvatnih sanitarnih uvjeta tijekom proizvodnje i prerade mlijeka. No naprotiv, mnogi autori sugeriraju da prisutnost određenih sojeva enterokoka u nekim sirevima može biti vrlo poželjna na osnovi njihovog pozitivnog doprinosa razvoju okusa tijekom zrenja sira. Ova korisna uloga dovela je do uključivanja enterokoknih sojeva u određene starter kulture. Razina enterokoka u različitim sirevima pred kraj zrenja može se kretati od 10^5-10^7 jedinica koje formiraju kolonije (engl. *Colony Forming Units*, CFU)/g.

Enterokoki su nađeni kao kontaminanti sirovog mesa u koncentraciji od 10^2-10^4 CFU/g; u fermentiranim prehrambenim proizvodima, poput salame (10^2–10^5 CFU/g) i sira mozzarelle **(21)**. Iako se navodi da enterokoki uzrokuju dijareju i druge infekcije kod životinja, to nije dokazano kod ljudi. U nekim se slučajevima smatra da su povraćanje i glavobolje, koje ukazuju na intoksikaciju hranom, uzrokovani konzumiranjem hrane koja sadrži fermentirane enterokoke koji su proizveli biogene amine **(23)**. Ono što je važno, enterokoki predstavljaju značajnu opasnost u hrani zbog njihove sposobnosti stjecanja i prenošenja svojstava otpornosti na antibiotike. Enterokoki se mogu otkriti ne samo u sirovoj hrani, već i u gotovoj hrani biljnog i životinjskog podrijetla.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

2.1.1. Biljni materijal

U eksperimentalnom dijelu završnog rada korišteno je 16 različitih vrsta začinskog bilja (*tablica 2*) skupljenog na području Čiova ili kupljenog u trgovinama zdrave prehrane Bio&Bio. Svježi biljni materijal je nakon prikupljanja liofiliziran te neposredno prije postupka ekstrakcije homogeniziran korištenjem ručnog mlinca do finog praha.

Tablica 2. Pregled korištenog začinskog bilja

NAZIV	**LATINSKI NAZIV**	**PORODICA**
Kadulja	*Salvia officinalis*	*Lamiaceae*
Kurkuma	*Curcuma longa*	*Zingiberaceae*
Ružmarin	*Rosmarinus officinalis L.*	*Lamiaceae*
Limun	*Citrus × limon*	*Rutaceae*
Kapula	*Allium cepa*	*Amaryllidaceae*
Kapula ljubičasta	*Allium cepa*	*Amaryllidaceae*
Koromač	*Foeniculum vulgare*	*Apiaceae*
Peršin	*Petroselinum crispum*	*Apiaceae*
Kurkuma BP	*Curcuma longa*	*Zingiberaceae*
Celer	*Apium graveolens*	*Apiaceae*
Lovor	*Laurus*	*Lauraceae*
Češnjak	*Allium sativum*	*Amaryllidaceae*
Papar zeleni	*Piper nigrum*	*Piperaceae*
Papar crni	*Piper nigrum*	*Piperaceae*
Maslina	*Olea europaea*	*Oleaceae*
Klinčić	*Syzygium aromaticum*	*Myrtaceae*

2.1.2. Reagensi korišteni za određivanje ukupnih fenola

- Folin- Ciocalteu reagnes, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Natrijev karbonat p.a., bezvodni, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Galna kiselina, Gallussare, Fluka, India

2.1.3. Reagensi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti

- Mueller-Hinton bujon (MHB), Biolife, Italija
- Mueller-Hinton agar (MHA), Biolife, Italija
- Fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), Biolife, Italija
- Jodonitrotetrazolium klorid (INT), Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka

2.1.4. Uređaji

- Ultrazvučna kupelj, Transsonic 310/H, Elma, Njemačka
- Spektrofotometar, SPECORD 200, Analytik Jena, Njemačka
- Mlinac za kavu, 980 Moulinex, Francuska
- Analitička vaga, Mettler P1210, SAD
- Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka
- Liofilizator

2.2. Metode

2.2.1. Priprava ekstrakata

Za pripravu ekstrakata korišteni su liofilizirani i pulverzirani začini pri čemu je 10 g biljnog materijala ekstrahirano s 100 mL destilirane vode. Ekstrakcija se vršila u ultrazvučnoj kupelji u trajanju od dva sata pri 60°C (*slika 9*). Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani preko Buchner lijevka korištenjem filter papira Whatman br. 1, a dobiveni filtrati su prebačeni u Falcon epruvete. Do trenutka analize pripremljeni ekstrakti su skladišteni u zamrzivaču.

Slika 4. Ultrazvučna ekstrakcija

2.2.2 Metoda određivanja ukupnih fenola

Udio ukupnih fenola u ekstraktima odabranog začinskog bilja određen je metodom po Folin-Ciocalteu. Metoda je spektrofotometrijska i temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, pri čemu nastaje obojeni produkti, a intenzitet obojene otopine se mjeri pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima se izračuna preko jednadžbe kalibracijskog pravca dobivene za otopine galne kiseline. Dobiveni rezultati su izraženi u mg ekvivalenata galne kiseline po 1 L ekstrakta (mg GAE/L) **(25)**. Ispitivanja su urađena u tri ponavljanja a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD).

2.2.3. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost začinskog bilja ispitivana je MIC metodom odnosno metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije **(26)** i metodom difuzije u jažicama **(9)**. Pribor, posuđe i otopine korištene za određivanje antimikrobnih svojstava je prije upotrebe sterilizirano. Svi postupci provedeni u eksperimentalnom dijelu rada odvijali su se pri sterilnim uvjetima.

Bakterijska kultura

Za određivanje antimikrobne aktivnosti odabranog začinskog bilja u ovom radu korišten je ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) bakterijski soj *Enterococcus faecalis* 29219. Bakterijska kultura preuzeta je s dubokog hranjivog agara i uzgojena na krvnom agaru koji sadrži 5% ovčje krvi u aerobnim uvjetima pri 37°C. Ovako uzgojen soj čuvan je u hladnjaku pri +4°C.

Priprema mikrobne kulture i inokuluma

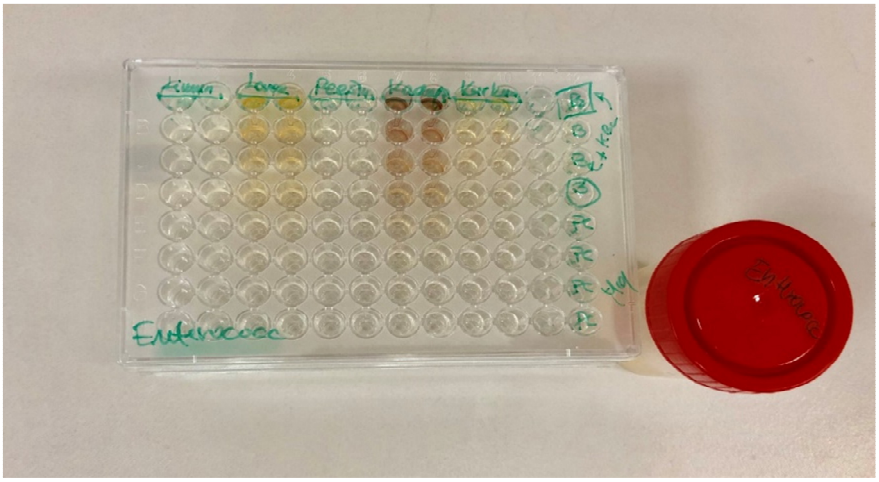
Prije početka eksperimenta bakterijska kultura je revitalizirana na način da je ezom prenesena s krvnog agara na hranjivi MHA agar i inkubirana 20-24 h pri 37°C. Ovako pripravljena kultura koristi se za pripremu inokuluma tako da se ezom prenese bakterijska kolonija u 4 mL hranjivog bujona (MHB bujon) i inkubira tijekom 20 h, uz konstantno miješanje 100 okr./min. Nakon inkubacije se 150 µL inokuluma prenese u epruvetu u kojoj se nalazi 10 mL MHB-a. Ovako pripravljen inokulum ima koncentraciju bakterijskih stanica 10^5-10^6 CFU/mL i koristio se u daljnjim postupcima testiranja antimikrobnog djelovanja ekstrakata.

Kontrola inokuluma

Kao potvrda koncentracije bakterijskih stanica u inokulumu koristi se metoda po Kochu. Kod ove metode se od inokuluma pripravi serija decimalnih razrjeđenja (do 10^6) koji se nakapaju (engl. *Drop plate method*) na hranjivi agar te se nakon inkubacije broje porasle bakterijske kolonije. Za pripravu prvog razrjeđenja, u mikro-epruvete (2,0 mL; Eppendorf) se pipetira 50 µL inokuluma i 450 µL PBS-a, i dobro promiješa. Drugo razrjeđenje pripremi se tako da se pipetira 50 µL prvog razrjeđenja inokuluma i 450 µL PBS, i tako redom sve do šestog razrjeđenja. Od svih se pripravljenih razrjeđenja, po tri kapi (10 µL) nakapaju se na hranjivu MHA podlogu, te se inkubiraju 24 h pri optimalnoj temperaturi rasta testiranog mikroorganizma **(27,28)**. Nakon inkubacije, kolonije porasle na hranjivoj podlozi u Petrijevim posudama se prebroje, a dobiveni rezultat potvrđuje broj jedinica koje formiraju kolonije (CFU) po 1 mL uzorka **(27)**.

2.2.3.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

MIC vrijednost predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa koja potpuno inhibira rast mikroorganizama. Kod ove metode koriste se sterilne mikrotitarske pločice s 96 otvora. Testirani ekstrakti začina serijski se razrjeđuju u MHB duž mikrotitarske pločice i to tako da se 50 µL uzorka prenese u sljedeći otvor na pločici koji sadrži 50 µL MHB te izmiješa. Volumen od 50 µL novog razrjeđenja prenese se istim postupkom u sljedeći otvor i tako se 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 µL. U svrhu kontrole rezultata na svakoj se pločici pripremi slijepa proba (100 µL MHB), pozitivna kontrola (50 µL MHB + 50 µL bakterijske kulture) i negativne kontrole za svaki uzorak (50 µL MHB + 50 µL ekstrakta). Nakon toga, u sve otvore mikrotitarske pločice, osim u slijepu probu i negativne kontrole, doda se po 50 µL bakterijske kulture **(28)**. Po dodatku bakterijskih kultura, suspenzije u pločicama se izmiješaju (1 min, 800 okr./min; Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) nakon 24-satne inkubacije (37°C) u svaki se otvor mikrotitarske pločice doda po 10 µL indikatora INT te se pločice stave još 30 minuta na inkubaciju (37°C). Nakon inkubacije vizualno se očitavaju rezultati tako da se promatra pojava crvenog obojenja u otvorima na mikrotitarskoj pločici. MIC vrijednost je ona koncentracija ekstrakta prisutna u prvom neobojenom otvoru pločice pazeći da pri istim uvjetima pozitivna i negativna kontrola prikazuju odgovarajući rezultat **(9,28)**. Ispitivanja su provedena u dva ponavljanja.



Slika 5. Izgled mikrotitarske pločice pri određivanju MIC vrijednosti

2.3.3.2. Metoda difuzije u jažicama

Cilj ove metode je odrediti inhibiciju rasta bakterija oko jažice s određenom koncentracijom ekstrakta začina. Međutim, bakterijska inhibicija rasta ne znači bakterijsku smrt, stoga ova metoda ne razlikuje baktericidne i bakteriostatske efekte.
Metoda difuzije u jažicama se izvodi u Petrijevim zdjelicama na čvrstoj hranjivoj MHA podlozi. Na hranjivu podlogu se nacjepljuje bakterijska kultura koja ima koncentraciju bakterijskih stanica 10^5-10^6 CFU/mL. Nakon inokulacije i sušenja u trajanju od 2-3 minute, u agaru se buše jažice (rupe) promjera 7-8 mm. Potom se u svaku jažicu dodaje po 50 µL ispitivanog ekstrakta, nakon čega se Petrijeve zdjelice stave u hladnjak na 1 h kako bi se omogućilo difundiranje aktivnih komponenti ekstrakta u hranjivu podlogu. Nakon toga slijedi inkubacija u trajanju od 20-24 h pri temperaturi od 37°C i mjerenje zone inhibicije bakterijskog rasta oko jažice **(9)**. U ovom slučaju zona inhibicije ≥ 12 mm predstavlja dobar inhibitorni učinak začina **(29)**. Ispitivanja su provedena u tri ponavljanja a rezultati prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

3. REZULTATI

3.1. Rezultati određivanja ukupnih fenola u ekstraktima začinskog bilja

Tablica 3. Udio ukupnih fenola (UF) u ekstraktima začinskog bilja

Uzorak	UF (mg GAE/L)
Kadulja	1916,67 ± 33,33
Kurkuma	214,44 ± 14,20
Ružmarin	2583,33 ± 28,87
Limun	425,00 ± 4,17
Kapula	424,44 ± 19,88
Kapula ljubičasta	448,06 ± 17,29
Koromač	189,72 ± 7,18
Peršin	398,33 ± 11,02
Kurkuma - nusprodukt	341,11 ± 39,52
Celer	231,11 ± 13,88
Lovor	1925,00 ± 62,92
Češnjak	179,44 ± 6,31
Papar zelen	561,39 ± 15,03
Papar crni	1463,89 ± 19,25
Maslina	1986,11 ± 37,58
Klinčić	6230,56 ± 33,68

3.2. Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti začinskog bilja

Tablica 4. Prikaz zona inhibicije (mm) dobivenih metodom difuzije u jažicama za *Enterococcus faecalis*

Uzorak	Zona inhibicije (mm)
Kadulja	0
Kurkuma	0
Ružmarin	0
Limun	0
Kapula	0
Kapula ljubičasta	0
Koromač	0
Peršin	0
Kurkuma- nusprodukt	0
Celer	0
Lovor	0
Češnjak	15,67 ± 0,58
Papar zelen	0
Papar crni	0
Maslina	0
Klinčić	0

Tablica 5. MIC vrijednosti začina izražene u mg GAE/L za *Enterococcus faecalis*

Uzorak	MIC (mg GAE/L)
Kadulja	0
Kurkuma	0
Ružmarin	1033,33
Limun	85,00
Kapula	0
Kapula ljubičasta	0
Koromač	0
Peršin	0
Kurkum-nusprodukt	136,44
Celer	0
Lovor	0
Češnjak	35,89
Papar zelen	0
Papar crni	0
Maslina	794,44
Klinčić	623,06

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobni potencijal ekstrakata začinskog bilja prema Gram pozitivnom soju, *Enterococcus faecalis*, korištenjem različitih metoda testiranja.

Za interpretaciju i usporedbu rezultata dobivenih metodom difuzije u jažicama i MIC metodom iznimno je važan podatak o udjelu fenola u ispitivanim ekstraktima. Udio ukupnih fenola u ekstraktima ispitivanog začinskog bilja određen je metodom po Folin-Ciocalteu, a dobivene vrijednosti su prikazane u *tablici 3.* Najveći sadržaj ukupnih fenola od 6230,56 mg GAE/L imao je ekstrakt klinčića. Iz rezultata prikazanih u *tablici 3.* također se može zaključiti da ispitani ekstrakti ljekovitog začinskog bilja: ružmarin, kadulja, lovor i maslina, sadrže visok udio ukupnih fenola (1916,67-2583,33 mg GAE/L). Relativno mali udio ukupnih fenola imali su ekstrakti kurkume, limuna, kapule, koromača, peršina i celera dok je najmanji udio ukupnih fenola određen u ekstraktu češnjaka (179,44 mg GAE/L).

Rezultati antimikrobne aktivnosti ekstrakata začinskog bilja određeni dvjema različitim metodama prikazani su u *tablicama 4.* i *5*. Metodom difuzije u jažicama ekstrakt češnjaka pokazao najbolji inhibitorni učinak (zona inhibicije 15,67 ± 0,58 mm). Osim češnjaka, koji je ujedno imao najmanji udio ukupnih fenola, niti jedan drugi začin nije uspio inhibirati rast *Enterococcus faecalis* (*tablica 4*).

Za razliku od metode difuzije u jažicama, MIC metodom se određuje minimalna koncentracija uzorka koja može inhibirati rast i razmnožavanje bakterije *Enterococcus faecalis*. Rezultati MIC vrijednosti prikazani u *tablici 5*. ukazuju na činjenicu da pojedini ekstrakti, usprkos visokom udjelu fenola, ne pokazuju antimikrobni učinak. Od ispitivanih začina aktivnost su pokazali ekstrakti ružmarina, limuna, kurkume, češnjaka, klinčića i lista masline. Od svih navedenih ekstrakata najniže MIC vrijednosti, što ujedno znači i najbolji antimikrobni učinak, pokazali su ekstrakti češnjaka i limuna (MIC vrijednosti 35,89 i 85,00 mg GAE/L). Posebno se ističe ekstrakt kore kurkume koji je imao MIC vrijednost 136,44 mg GAE/L u odnosu na kurkumu koja nije pokazala antimikrobnu aktivnost nijednom testiranom metodom. Najveće MIC vrijednosti pokazali su ekstrakti ružmarina i klinčića (1033,33 i 623,06 mg GAE/L) unatoč jako visokom sadržaju ukupnih fenola.

Dosadašnja istraživanja su pokazala proturječne podatke o povezanosti ukupne antimikrobne aktivnosti i koncentracije fenolnih spojeva. Stratil i sur. (2006) dokazali su

da je veza između fenolnih spojeva te antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti u biljkama vrlo značajna i pozitivna, dok su drugi autori utvrdili nizak stupanj povezanosti između fenola i antimikrobne aktivnosti, odnosno uopće nisu utvrdili značajnu vezu **(31)**. Na temelju rezultata dobivenih u eksperimentalnom dijelu rada možemo uočiti kako koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u češnjaku nije povezana s ukupnom antimikrobnom aktivnosti. To ukazuje na važnu ulogu ne-fenolnih spojeva kao što su organo-sumporne komponente, od kojih najviše S-alkil-L-cistein sulfoksidi i ostalih nefenolnih spojeva koji sudjeluju u ukupnoj antioksidacijskoj i antimikrobnoj aktivnosti češnjaka **(32)**.

Nakon provedenog istraživanja možemo zaključiti da se prirodni antimikrobni ekstrakti iz začinskog bilja mogu koristit u prehrambenoj industriji s ciljem sprječavanja rasta patogenih mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane u svrhu produljenja roka trajanja namirnice i poboljšanja stabilnosti. Osim posjedovanja antimikrobnog i antioksidacijskog učinka na patogene mikroorganizme začinsko bilje također utječe na okus, aromu i teksturu prehrambenih proizvoda. Na taj način upotreba antimikrobnih sredstava dobivenih iz začinskog bilja ima veći potencijal za poboljšanje sigurnosti i kvalitete prehrambenih proizvoda. Prirodni sastojci mogu se koristiti u kombinaciji s drugim tradicionalnim metodama konzerviranja za poboljšanje sigurnosti prehrambenih proizvoda.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenog istraživanja i dobivenih rezultata utvrđeno je:

- Od 16 odabranih i ispitanih vrsta začinskog bilja inhibiciju rasta *Enterococcus faecalis* pokazali su: ružmarin, limun, kurkuma, češnjak, maslina i klinčić.
- Od začina testiranih MIC metodom najbolju antimikrobnu aktivnost pokazuju ekstrakti češnjaka i limuna.
- Antimikrobni učinak prema *Enterococcus faecalis* primjenom metode difuzije u jažicama pokazao je samo češnjak sa zonom inhibicije ≥ 15 mm.

6. LITERATURA

1. Embuscado ME. Bioactives From Spices and Herbs, Encyclopedia of Food Chemistry.2019:479-514.
2. Shan B. Antioxidant and Antibacterial Capacities of Spice and Medicinal Herb Extracts and their Potential Application as Natural Food Preservatives, University of Science and Technology.2008:3-78.
3. Povijest i trgovina začina, https://www.harissa.hr/blog/kratka-povijest-zacina (PRISTUPLJENO 21.07.2019.)
4. De AK, De M. Functional and Therapeutic Applications of Some Important Spices, The Role of Functional Food Security in Global Health.2019:499-510.
5. Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial Herb and Spice Compounds in Food, Food Control. 2010;21(9):1199-1218
6. Josipović R. i sur. Upotreba začina u proizvodnji tradicionalnih sireva, Mljekarstvo.2016;66(1):13-19.
7. Pokorny, J. Antioxidants in food preservation, Handbook of Food Preservation. 1999;309-338.
8. Amarowicz, R., Pegg, R. B. Natural antioxidants of plant Origin, Advances in Food and Nutrition.2019;90:2-7.
9. Balouir M, Sadiki M, Ibnsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity, Journal of Pharmaceutical Analysis.2015;6(2):71-79.
10. Bor T., Aljaloud Sulaiman O., Gyawali R. and Ibrahim Salam A. Antimicrobials from herbs, spices, and plants, Fruits, Vegetables and Herbs.2016:551-578.
11. Struktura karvakola, https://sh.wikipedia.org/wiki/Karvakrol (PRISTUPLJENO 09.08.2019.)
12. Struktura timola, https://sh.wikipedia.org/wiki/Timol (PRISTUPLJENO 09.08.2019.)
13. Struktura eugenola, https://www.extrasynthese.com/eugenol.html (PRISTUPLJENO 09.08.2019.)
14. Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.J.E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7, Italian Journal of Food Science.2006;13:65-75.

15. Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., ODonnel, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., and Cullen, J.P. Application of Natural Antimicrobals for Food Preservation, J. Agric. Food Chem. 2009;57 (14):13-78.

16. Jolić, N. Antioksidacijska aktivnost fenola: Interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline. Završni rad. Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu. 2017 (na hrvatskom jeziku)

17. Rodrigues A.S., Domingos P.F. Almeida, Simal Gandara J., Pérez-Gregorio M.R. Onions: A Source of Flavonoids, 2017

18. Wojdylo, A., Oszmianski, J. ,Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, 105(3), 2007;940–949.

19. Lu,M., Yuan, B., Zeng, M., Chen, J. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China, Food Research International. 2011;44(2):530-536.

20. Fisher, K. and Phillips, C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus, School of Health. 2009

21. Franz, C., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety, International Journal of Food Microbiology. 2003;88(2-3):106-111.

22. Vukušić, N., Zdolec, N. Utjecaj bakteriocina enterokoka na odabrane uzročnike bolesti prenosivih hranom, 2018

23. Giraffa, G. Enterococci from foods, Encyclopedia of Food Microbiology. 2002;2:163-168

24. Wierzchowska, W.C., Zadernowska, A., Trokenheim, L.L. Virulence factors of Enterococcus spp. presented in food, LWT. 2017;75:670-676.

25. Singleton V.L., ROSSI J.A.; Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagents; Am J Enol Vitic. 1965;16:144-158.

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

27. Katalinić V, Smole Možina S, Skroza D, Generalić I, Abramovič H, Miloš M, Ljubenkov I, Piskernik S, Pezo I, Terpinc P, Boban M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia., Food Chemistry. 2010;119:715-723.

28. Skroza D. Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveatrola u binarnim fenolnim smjesama. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2015

29. Koohsari H, Ghaemi E.A, Shesh Poli M.S, Sadegh A. Evaluation of antibacterial activity of *Lemon verbena (Lippiacitriodora)* leaves. Ascholars Research Library. USA; 2013

30. Stratil P, Klejdus B, Kuban V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods, J Agric Food Chem . 2006;607–616.

31. Turkmen N, Velioglu YS, Sari F, Polat G. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea, Molecules. 2007;484-496.

32. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive compounds, J Nutr. 2001;131:955-962.