

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2012-05/27

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	V4-1079	
<b>Naslov projekta</b>	Fitofenoli za izboljšanje varnosti in obstojnosti živil	
<b>Vodja projekta</b>	7030 Sonja Smole - Možina	
<b>Naziv težišča v okviru CRP</b>	5.09.07 Naravne bioaktivne snovi za varnost in kakovost hrane	
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	1117	
<b>Cenovni razred</b>	C	
<b>Trajanje projekta</b>	10.2010 - 09.2012	
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta	
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	377 Zavod za zdravstveno varstvo Maribor 1510 Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper 1540 Univerza v Novi Gorici	
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	4 BIOTEHNIKA 4.03 Rastlinska produkcija in predelava	
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	08. Kmetijstvo	

#### 2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS<sup>1</sup>

<b>Šifra</b>	4.01	
<b>- Veda</b>	4 Kmetijske vede	
<b>- Področje</b>	4.01 Kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo	

#### 3. Sofinancerji<sup>2</sup>

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje RS
	Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana

## B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### 4. Povzetek projekta<sup>3</sup>

SLO

Zagotavljanje kakovostne, obstojne in varne hrane je eno od prioritarnih področij slovenskega kmetijstva in živilstva in zato tudi prednostno raziskovalno področje. Enako velja za področje ravnanja z odpadki in stranskimi proizvodi (sekundarnimi surovinami), kjer agroživilstvo prav tako predstavlja izpostavljeno panogo. Projekt Fitofenoli za izboljšanje varnosti in obstojnosti živil je povezal aktivnosti na obeh omenjenih področjih. Ker sodobni potrošniki dajejo prednost varnim in obstojnim živilom brez kemijskih dodatkov, smo pripravili, karakterizirali in raziskovali uporabnost naravnih bioaktivnih dodatkov živilom. Pridobili smo jih iz odpadnih in stranskih proizvodov v predelavi slovenskih oljk in grozdja. Multifunktionalnost rastlinskih fenolnih snovi, ki so glavna učinkovina teh pripravkov, je znana in predmet številnih raziskav. Antioksidativna aktivnost je že potrjena tudi z aplikacijami. Slabše je poznavanje protimikrobnega delovanja in mehanizmov le-tega, ter možnih načinov uporabe in delovanja v živilih, kar zavira prenos v prakso. Zato smo preučili različne dejavnike, ki vplivajo na učinkovitost: 1) kemijsko sestavo (glavne učinkovine, kot so oleuropein, hidroksitirozol, flavonoidi in ne-flavonoidne sestavine fenolnih izvlečkov iz listja in tropin oljk ter grozdja 2) vpliv na potencialne tarčne biološke strukture (bakterijske in glivne celice) in/ali inhibicijo njihove rasti, odpornosti in/ali sinteze toksinov 3) vpliv matriksa ter predhodne inkapsulacije v liposomske ali ciklodektrinske nosilce na bioaktivnost in obstojnost učinkovine 4) protimikrobno in antioksidativno zaščitno delovanje v izbranih živilskih modelih. Pričakovali smo, da so le nekatere kombinacije, opisane v točkah 1-4, primerne za aplikacijo v živilski industriji, saj določene ovire predstavlja topnost in senzorične spremembe matriksa živila po dodatku bioaktivne učinkovine. Zato je bil cilj projekta, da te omejitve raziščemo in s tem olajšamo nadaljnjo uporabo v slovenski živilsko-predelovalni industriji. S projektom smo povezali več slovenskih raziskovalnih institucij z izkušnjami iz obdelave stranskih ali odpadnih surovin oljkarstva in vinarstva ter njihove kemijske analitike s strokovnjaki mikrobiološkega in živilsko tehnološkega področja. Slednji so preučili uporabnost pridobljenih učinkovin – s presejalnimi »in vitro« testi in tudi v izbranih realnih živilskih modelih. Vzpostavljeno je bilo tudi intenzivno mednarodno sodelovanje na tej tematiki, kar je botrovalo tudi skupni pripravi mednarodnega projekta, ki naj bi nadaljeval zastavljene raziskave. Pričakujemo, da bodo rezultati omogočili nove načine uporabe rastlinskih funkcionalnih snovi v živilih in realizacijo tega v Sloveniji. To pomeni prispevek k boljši varnosti in kakovosti živil, ki predstavljajo tveganje. Ker pa bodo učinkovine pridobljene iz slovenskih stranskih proizvodov agroživilstva (oljkarstva in vinarstva), bo to tudi prispevek k novemu znanju o njihovi možni uporabi oz. njihovi dodani vrednosti.

ANG

Production of safe and stable food products of highest quality is one of the priority aims of slovene agricultural production and food industry and thus also one of the priority research fields. The same is true for waste and by-products management (secondary materials) where agro-food industry is again one of the most important sectors. The project "Phytophenols for food safety and stability" has joined the activities of both mentioned sectors. Nowadays the consumers prefer safe and stable products, but without chemical additives. That is why we prepared, chemically characterized and studied the efficiency of plant bioactive compounds from plants, grape skins and seeds and vine and olive leaves. Multifunctional activity was studied already in many "in vitro" tests, especially antioxidant activity was confirmed also in applications. Less is known about antimicrobial activity and its mechanisms, what is the reason for slow transfer into application. So we studied 1) chemical composition (main compounds, such as oleuropein, tyrosol, hydroxytyrosol, flavonoids and non-flavonoid compounds from grape skins and seeds and vine and olive leaves; 2) impact on potential biological targets (bacterial or fungal cells) and/or their growth inhibition, resistance and/or toxin synthesis; 3) impact of matrix and encapsulation into liposome or cyclodextrin carriers on bioactivity and stability of the compounds 4) antimicrobial and antioxidant activity in selected food models. We hypothesized that only some of the combinations, described in 1-4 could be successfully applied in food industry, due to some physico-chemical and sensory limitations after addition into the food matrix. The aim of the project was research of these

limitations and thus ease application of these compounds by slovene food producers. We joined several slovene research institutions with the expertise in processing and chemical analytics of by-products from slovene olive oil and wine production on one side and also food microbiologists and technologists on the other side. They have evaluated the prepared formulations with »in vitro« screening tests and also in selected food models. Beside this, intensive international cooperations has been established, which resulted in application of new joined research programme, which can continue research in this field. We expect that the results will contribute to the added value of the studied by-products of Slovene agro-food industry, as well as to better safety and quality of some food products where the extracts could be used.

## 5. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>4</sup>

### Program projektnega dela je bil razdeljen v štiri delovne sklope (DS):

**DS1:** Zagotavljanje surovine, pridobivanje in kemijska karakterizacija bioaktivnih fenolnih izvlečkov (fitofenolov) iz odpadnih surovin in stranskih proizvodov agroživilstva: A) stranskih proizvodov pridelave oljk Slovenske Istre - UP ZRS Koper; B) stranskih proizvodov predelave grozdja (UNG).

Aktivnosti UP ZRS Koper:

Delo je potekalo z vzorci listja oljk, zbranih v letih 2009, 2010 in 2011 na legi LABS, Izola, dveh kultivarjev - 'Leccino' (L9, L10, L11) in 'Istrska belica' (IB9, IB 10, IB11). Opravljeno je bilo sledeče:

- Optimizacija in modifikacija HPLC protokola za kvantifikacijo biofenolov v ekstraktu oljčnega listja: Optimizirali smo veljavno metodo mednarodnega sveta za oljke za določevanje vsebnosti biofenolov v oljčnih oljih in asignirali naslednje biofenole: hidrokstitirozol (TyrOH), tirosol (Tyr), verbaskozid (Verbaskozid), luteolin-7-O-Glukozid (Lu-7-O-Glu), oleuropein (Ole) in apigenin-7-O-Glukozid (Api-7-O-glu). Rezultate smo podajali na osnovi eksterne standarda tirosola in sicer kot asignirane, neasignirane in skupne biofenole. Večina biofenolov v vseh ekstraktih je bila flavonoidno glukozidnega tipa, kar za naše oljke še ni bilo ugotovljeno (Bešter s sod., 2012).

- Finalizacija ekstrakcijskega postopka za vzorce L9, L 10, IB9 in IB10:

Zračno oziroma sušenje v liofilizatorju, fino mletje vzorca, 3-kratna zaporedna ekstrakcija z različnimi topili, odstranjevanje lipofilnih snovi z ekstrakcijo s heksanom (nujna faza za oblikovanje trdnega ekstrakta, primernejšega za aplikacijo), odstranjevanje topila iz ekstrakta z gradientno uporabo vakuuma. Na osnovi takega ekstrakcijskega protokola smo izdelali ekstrakte za nadaljnjih analize, rezultate pa ovrednotili na osnovi eksterne standarda tirosola kot asignirane, neasignirane in skupne biofenole (42,99 – 76,38 mg/g). Večina biofenolov je bila flavonoidno glukozidnega tipa, kar za naše oljčne kultivarje še ni bilo objavljeno oz. poznano. Podatki se ujemajo s podatki komercialnih ekstraktov, ki so jih uporabljali v podobnih raziskavah v mesnem matriksu.

- Določitev alfa-tokoferola v vzorcih: V vseh vzorcih smo poskusili kvantificirati vsebnost alfa-tokoferola. Vzorci so vsebovali alfa-tokoferolu sorodne učinkovine, ki bodo predmet nadaljnjih raziskav (Butinar s sod, 2012).

Aktivnosti UNG:

Zagotavljanje surovine, pridobivanje in kemijska karakterizacija bioaktivnih spojin iz tropin, stranskega produkta po stiskanju grozdja iz Vipavske Doline; Biofenolna karakterizacija tropin najpogostejših sort belega (Sauvignon, Rebula, Zelen) in rdečega grozdja (Modri Pinot, Cabernet Sauvignon in Merlot):

Optimizirali smo ekstrakcijsko metodo za fenole iz tropin glede na polarnost ekstrakcijskega topila. Topila smo sestavili iz mešanic metanola, etanola, acetona in vode. Ekstraktom smo izmerili koncentracijo skupnih fenolov in jim določili antioksidativno učinkovitost. Skupni fenoli so predstavljali od 50 do 350 mg/g suhega ekstrakta, najvišje vrednosti pri topilu voda:metanol v razmerju 25:75%. Najvišjo antioksidativno zaščito so pokazali ekstrakti tropin grozdja sorte Merlot in Sauvignon, ki so dosegali vrednosti do 10 mmol Troloxa/g skupnih fenolov (SF). Kot najbolj optimalna ekstrakcijska medija sta se izkazala voda:metanol v volumskem razmerju 25:75% in voda:etanol v razmerju 50:50% (Trošt s sod., 2011).

Poleg slovenskih institucij, ki so bile s tega projekta tudi financirane, so se preko bilateralnega mednarodnega sodelovanja z Biotehniško fakulteto, nosilko tega projekta, v pridobivanje ustreznih surovin za pripravo bioaktivnih izvlečkov vključevale tudi tuje RO (Fakulteta za kemijsko tehnologijo, Univerze v Splitu (bilateralni projekt 2009-2010 s Hrvaško (Katalinić et al., 2010 in 2012; Generalić et al., 2012a,b, Abramovič s sod., 2012); Oddelek za farmacijo, Medicinske fakultete v Novem sadu (bilateralni projekt 2010-2011 s Srbijo, Božin et al., 2012a,b) in Institut za farmakognozijo, Univerze v Grazu (bilateralni projekt 2011-2012 z Avstrijo; Klančnik s sod., 2012, Bucar, 2012).

**DS2: Primerjalna analiza aktualnega stanja na področju varnosti živil v EU in**

**Sloveniji z namenom izpostavitve kritičnih živil za izbor modelnih sistemov testiranja učinkovitosti pridobljenih fenolnih izvlečkov:**

Ta delovni sklop je bil v času prvih 4 mesecev projekta izveden s sodelavci Biotehniške fakultete in sodelujoče RO, ZZV Maribor, ki so bili vključeni v različne monitoringe varnosti živil. Ti omogočajo zagotavljanje ažurnih podatkov za analizo stanja oz. tveganj na področju varnosti živil v Sloveniji in EU glede kritičnih bioloških agensov oz. najpogostejših tveganj (npr. okužbe z večkratno odpornimi zoonotskimi bakterijami, prisotnost mikotoksigenih gliv in njihovih toksinov). Na osnovi teh analiz smo definirali testne modele mikroorganizmov in živil za nadaljnje delo na projektu (DS3 in DS4) – npr. izbrali smo proti antibiotikom odporne bakterije *Campylobacter*, živila na osnovi mesnih emulzij, mikotoksigene plesni itd.

**DS3: 1.) Primerjalna analiza protimikrobne aktivnosti fenolnih izvlečkov na osnovi vrednosti MIK (min. inhibitorne konc) in njihov izbor za študij mehanizma delovanja; 2.) Študij vpletenosti efluksa pri odpornih bakterijskih sevih; 3.) Priprava inkapsulirane učinkovine ter študij vpliva inkapsulacije na protimikrobno delovanje.**

**AD 1/** Protimikrobno aktivnost fenolnih izvlečkov različnih surovin (listje oljk, tropine šestih sort grozdja, eterična olja in fenolni izvlečki preostalega rastlinskega materiala po destilaciji eteričnih olj timijana in origana) in različnih ekstrakcijskih postopkov (npr. sedmih različnih mešanic topil za ekst.rakcijo fenolov iz liofilizatov grozdnih tropin) smo najprej ovrednotili na osnovi vrednosti MIK čistih fenolnih spojin in njihovih mešanic v izvlečkih za različne testne mikroorganizme: a) Gram-pozitivne in gram-negativne bakterije (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.). Vrednosti MIK so bile zbrane za vse vrste omenjenih izvlečkov (preko 50), za vse testne organizme, za nadaljnje analize kinetike protimikrobnega delovanja pa so bili izbrani le izvlečki z najboljšim delovanjem, na osnovi nizkih vrednosti MIK; b) različne seve kvasovk, povzročiteljice kvarjenja živil (izolati iz pokvarjenega oljčnega olja in mošta/vina): *Pichia* spp., *Candida* spp., *Ogataeaea* spp., *Dekkera* spp. - testirani so bili fenolni izvlečki oljčnega listja in grozdnih tropin. c) izbrane seve mikotoksigenih gliv: *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum* - testirali smo učinkovitost eteričnih olj timijana in origana ter najučinkovitejših sestavin teh olj, t.j. timola in karvakrola, na inhibicijo rasti gliv v trdnem in tekočem gojišču (z mikrodilucijsko metodo v agarju in na mikrotitrski ploščici za izbor najučinkovitejših kombinacij, ki so bile nato preizkušene tudi v tekočem gojišču z makrodilucijskim testom in spremljanjem kinetike inhibicije rasti in tvorbe toksinov med 21-dnevno inkubacijo glivnih kultur. Potrdili smo različne aktivnosti, ki so bile odvisne od surovine, načina ekstrakcije in testne metode (npr. MIK med 0.094–0.38 mg SF v izvlečkih liofilizatov grozdnih tropin (izraženih kot ekvivalent galne kisline, GAE) na ml testnega gojišča za patogene bakterije in v območju 0.004–0.50 mg GAE/ml za testirane kvasovke (Smole Možina in sod., 2011). Zelo dobro protiglivo aktivnost sta pokazali eterični olji origana in timijana ter karvakrol, rezultati pa so bili odvisni od vrste testne plesni. S tenkoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC) smo določali tudi tvorbo ohratoksina A (OTA) in aflatoksina B1 (AFB1). Rezultati so pokazali, da izolati plesni vrst *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. niger* in *P. nordicum* ne tvorijo nobenega od navedenih mikotoksinov, izolati plesni vrst *A. flavus*, *A. westerdijkiae* in *P. verrucosum* pa tvorijo OTA oziroma AFB1 (Jeršek s sod., 2012). V zaključnem delu projekta smo ovrednotili tudi učinek posameznega eteričnega olja na tvorbo mikotoksinov z ekstrakcijo posameznega mikotoksina in HPLC-analizami. Ekstrakcija OTA iz gojišč CYA je bila izvedena z etanolom in naknadno z metanolom, medtem ko je bila ekstrakcija AFB1 narejena z acetonitrilom. Testirane koncentracije eteričnih olj in njihovih sestavin so bile 1/2 in 1/4 MIC, izbrani časi vzorčenja pa 14 oziroma 21 dni. Rezultati kažejo na kompleksnost problema zaviranja rasti pleni in hkratnega zaviranja tvorbe mikotoksinov, saj kljub velikemu številu testnih vzorcev in preizkušenih parametrov (vrsta plesni/vrsta eteričnega olja/koncentracija eteričnega olja/različen čas/) ne moremo določiti sočasnega protiglivnega učinka eteričnih olj na rast plesni in tvorbo mikotoksinov (Hostnik, 2012).

**AD2/** Vpletenost efluksa oz. morebitno inhibitorno vlogo rastlinskih izvlečkov na membranske proteine, ki pri mikroorganizmih sodelujejo pri iznosu protimikrobnih snovi iz celic, smo proučevali pri izbranih sevih bakterij *Campylobacter*, ki so bili selekcionirani v prvem obdobju projekta (Kurincič, 2011). Aktivno vlogo pri zaviranju delovanja izlivnih črpalk in s tem možnost zmanjševanja odpornosti teh patogenih bakterij proti drugim protimikrobnim snovem, npr. antibiotikom in/ali biocidom, smo potrdili za nekatere sestavine rastlinskih izvlečkov (npr. epigalokatehin-galat, ne pa tudi za analizirane izvlečke grozdnih tropin) (Gornik, 2011; Kurincič s sod., 2012).

**AD3/** V sodelovanju dveh raziskovalnih skupin na Biotehniški fakulteti smo opravili tudi inkapsulacijo izbranih fenolnih izvlečkov, ki so se v predhodnih testih protimikrobnega delovanja izkazali kot učinkoviti - in sicer izvlečkov oljčnih listov ter izbranega izvlečka tropin sorte Zelen. Ta je pokazal dobro protimikrobno delovanje z najširšim spektrom-učinkovit je bil tako proti gram-pozitivnim in gram-negativnim bakterijam, kakor tudi kvasovkam. Pripravili smo dve vrsti inkapsuliranih izvlečkov, vgrajenih v liposomske in ciklodekstrinske nosilce. Obe vrsti inkapsulacije sta imeli pozitiven učinek na protimikrobno delovanje obeh vrst rastlinskih

izvlečkov, kar se je izrazilo tako v nižjih vrednostih MIC, kakor tudi v hitrejši inhibiciji rasti med podaljšano inkubacijo mikrobnih kultur v tekočem gojišču. Oboje pripisujemo izboljšani topnosti hidrofobnih sestavin izvlečkov v vodnem mediju in večji stabilnosti učinkovin med podaljšano inkubacijo (Tadić s sod., 2012).

#### **DS4: «In vivo» testiranje protimikrobne in antioksidativne učinkovitosti rastlinskih fenolnih izvlečkov oz. njihovih komponent**

Ovrednotili smo antioksidativno in protimikrobno učinkovitost v izbranem živilskem modelu (mesni emulziji kot polizdelku živilske predelovalne industrije) in njegovo senzorično sprejemljivost v primerih, ko smo dodali izbrane rastlinske izvlečke (iz tropin sort zelen in sauvignon) v treh različnih koncentracijah. Kot indikatorski analizi stopnje oksidacije smo uporabili določanje števila TBK in vsebnost oksidov holesterola (LC-MS/MS). Za senzorično analizo smo uporabili test točkovanja lastnosti iz skupine deskriptivnih testov z nestrukturirano točkovno lestvico. Kot mikrobiološke indikatorje smo izbrali skupno število mezofilnih bakterij ter število sporogenih bakterij ter specifični indikator, bakterijsko vrsto *Bacillus cereus*. Mesna emulzija v tipu hrenovke je bila narejena iz slanine in svinjine, ledu in nitritne soli, toplotno obdelana do središčne temperature 68 °C. Analize določanja števila TBK in oksidov holesterola (LC-MS/MS) smo opravili v surovini, mesni emulziji pred in po toplotni obdelavi ter po 1 mesecu skladiščenja. Primerjalna analiza je pokazala, da je problematična predvsem sprememba barve izdelka, ki omejuje uporabo višjih koncentracij aktivnega izvlečka, zato bomo študije nadaljevali v smislu optimizacije priprave (kapsulacijskega postopka) dodane učinkovine.

### **6. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>5</sup>**

Večjih odstopanj od predvidenega plana dela ni bilo. Določen problem je predstavljala le sezonska narave surovine, predvsem v zadnjem delu projekta, kjer se je izkazalo, da bi v zaključni fazi testiranja izbranih učinkovin na živilskih modelih potrebovali večje količine pripravljenega materiala. Ta pa v obdobju pomlad-poletje 2012 ni bil več dosegljiv. Projekt se namreč zaključuje septembra, zato ni bilo možno pripraviti in na živilih stestirati novih pripravkov, ki bi jih pridobili tekom letošnje sezone (trgatev).

### **7. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>6</sup>**

Sprememb programa ni bilo.

### **8. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>7</sup>**

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	4119160	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Epigalokatehin galat kot modulator odpornosti proti makrolidnim antibiotikom pri bakterijah <i>Campylobacter</i>
		ANG	Epigallocatechin gallate as a modulator of <i>Campylobacter</i> resistance to macrolide antibiotics
	Opis	SLO	Predstavljena je bila visoka stopnja navzkrižne odpornosti pri kampilobaktirih med eritromicinom, azitromicinom, klaritromicinom, diritromicinom in tilozinom, kot rezultat dveh mehanizmov odpornosti mutacij na 23S rRNA genu in/ali izlivnih črpalk. Predstavljena je bila tudi naravna fenolna spojina epigalokatehin galat kot dober modulator odpornosti pri izbranih kampilobaktirih proti testiranim makrolidnim antibiotikom.
		ANG	High co-resistance of <i>Campylobacter</i> to erythromycin, azithromycin, clarithromycin, dirithromycin and tylosin, with contributions from the 23S rRNA gene and/or drug efflux systems was presented in the study. The natural phenolic compound epigallocatechin gallate has been shown as a good modulator of <i>Campylobacter</i> resistance to tested macrolide antibiotics.

	Objavljeno v	Elsevier Science Publishers; International journal of antimicrobial agents; 2012; 40 (2012), pp. 467-471; Impact Factor: 4.128; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.72; A': 1; Avtorji / Authors: Kurinčič Marija, Klančnik Anja, Smole Možina Sonja	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	3836280	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Znižanje števila bakterij Campylobacter jejuni z naravnimi protimikrobnimi dodatki v živilih (piščančje) meso
		ANG	Reduction of Campylobacter jejuni by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions
	Opis	SLO	Ob testiranju protimikrobnega učinka naravnih rastlinskih izvlečkov pri nizkih temperaturah smo ugotovili 4-krat boljši učinek v laboratorijskem mediju kot v mesnem soku. Kratko pred-zamrzovanje v kombinaciji z rastlinskim dodatkom je omogočilo 3 redukcijske stopnje v 48 urah. protimikrobno testiranje v modelu piščančjega mesa je omogočilo 2 redukcijski stopnji, kar je obetajoče za zmanjšanje tovrstne bakterijske kontaminacije mesa v prodaji.
		ANG	When we tested different antimicrobials against Campylobacter jejuni at a low storage temperatures, the antimicrobial effect of them was four times greater in laboratory media than in chicken meat juice. Pre-freezing with plant extract addition proved to be effective treatment by more than 3.0 log reduction in 48 h. The results in chicken meat food model again showed the synergistic effect of freezing and plant extract antimicrobial activity and reduced the cell number by more than 2.0 log reduction which is promising treatment for Campylobacter reduction in the poultry meat supply.
	Objavljeno v	Butterworth Scientific; Food control; 2011; Vol. 22, Issue 5; str. 718-724; Impact Factor: 2.656; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.379; A': 1; Avtorji / Authors: Piskernik Saša, Klančnik Anja, Tandrup Riedel Charlotte, Brondsted Lone, Smole Možina Sonja	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	3939448	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Liposomska stabilizacija askorbinske kisline v modelnih sistemih in hrani
		ANG	Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices
	Opis	SLO	Asorbinsko kislino (AA) smo kapsulirali v liposome pripravljene iz dipalmitoil (DPPC) in dipalmitoil / holesterola (DPPC / Chol. Skupna prisotnost citronske kisline in askorbinske v liposomi omogoča dodatno stabilizacijo AA v modelnih sistemih z veliko koncentracijo bakrovih ionov. Enkapsulirana AA je bila stabilnejša tudi v realnih sistemih kot je hrane. Stopnja oksidacije enkapsulirane AA v jabolčnem soku, glede na prosto AA, se je zmanjšala za dva velikostna razreda. Liposomska stabilizacija AA v fermentiranih mlečnih izdelkih je bila manj izrazita.
		ANG	Ascorbic acid (AA) was encapsulated into dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol (DPPC/chol) liposomes. Co-encapsulation of citric and ascorbic acids into liposomes results in considerable stabilization of the latter in model systems containing catalytic concentrations of copper ions. Encapsulated AA was also stabilized in real food matrices. The rate of AA oxidation in apple juice, relative to that of free AA, was decreased by two orders of magnitude. Liposomal stabilization of AA in a fermented milk product was less pronounced.
		Academic Press; Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie; 2012; Vol. 45, issue 1; str. 43-49; Impact Factor: 2.545; Srednja vrednost revije / Medium	

	Objavljeno v	Category Impact Factor: 1.379; A': 1; Avtorji / Authors: Wechtersbach Luka, Poklar Ulrih Nataša, Cigić Blaž	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
4.	COBISS ID	3652216	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Polifenolni profil, antioksidativne in protimikrobne lastnosti izvlečkov grozdnih kožic 14 sort vinske trte ( <i>Vitis vinifera</i> ) iz Dalmacije (Cro)
		ANG	Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 <i>Vitis vinifera</i> varieties grown in Dalmatia (Croatia)
	Opis	SLO	Opređeljena je polifenolna sestava (vsebnost skupnih polifenolov, flavonoidov, katehinov, flavanolov in posameznih učinkovin, kot so monomeri katehinov, procianidinov in resveratrola) 14 sort grozdja, iz katerih so bili pripravljene polifenolni izvlečki. Kot izjemen vir bioaktivnih snovi so bili potrjeni predvsem izvlečki belih, a tudi rdečih sort z antioksidativno in protimikrobno učinkovitostjo za potencialno uporabo kot dodatek hrani, krmi, kozmetičnim ali farmacevtskim izdelkom.
		ANG	Publication defines the polyphenolic composition (content of total phenols, flavonoids, catechines, flavanols and individual polyphenols, i.e. different monomers of catechines, procyanidins and resveratrol) from 14 grape varieties, which were used for grape skin extracts preparation. The extracts of white and red grape varieties were confirmed as highly antioxidatively and antimicrobially active with potential for use in food, feed, drug or cosmetic products.
	Objavljeno v	Applied Science Publishers; Food chemistry; 2010; Vol. 119; str. 715-723; Impact Factor: 3.458; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.269; A': 1; Avtorji / Authors: Katalinić Višnja, Smole Možina Sonja, Skroza Danijela, Generalić Ivana, Abramovič Helena, Miloš Mladen, Ljubenkov Ivica, Piskernik Saša, Pezo Ivan, Terpinc Petra, Boban Mladen	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
5.	COBISS ID	2039803	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Ultrasonična ekstrakcija fenolov iz odpadne vode predelave oljk: primerjava z običajnimi metodami
		ANG	Ultrasonic extraction of phenols from olive mill wastewater
	Opis	SLO	Primerjali smo pet metod za ekstrakcijo fenolov iz odpadne vode predelave oljk v oljčno olje. Primerjali smo filtracijo, ekstrakcijo fenolov odpadne na trdno fazo (SPE), ekstrakcijo tekoče-tekoče (LLE) in ultrasonično podprto ekstrakcijo fenolov iz tekoče in trdne (liofilizirane) odpadne vode. Soniciranje liofilizirane odpadne vode da največji izplen posameznih in skupnih fenolov brez kemijskih modifikacij. Kvantitativna analiza realnih vzorcev je razkrila, da je slovenska odpadna voda predelave oljk pomemben vir fenolov, zlasti hidroksitirozola in tirozola.
		ANG	Phenols recovery from olive mill wastewater (OMWW) was studied comparing five sample preparation methods: filtration, solid-phase (SPE), liquid-liquid (LLE) and ultrasonic (US)-assisted extraction of liquid and solid (freeze-dried) OMWW. US-assisted extraction of freeze-dried OMWW offered the highest qualitative-quantitative phenol yields without any US-induced alterations. This is also the first report that Slovenian OMWW may be utilised as a valuable source of phenols, especially hydroxytyrosol and tyrosol.
	Objavljeno v	American Chemical Society, Books and Journals Division; Journal of agricultural and food chemistry; 2011; Vol. 59, no. 24; str. 12725-12731; Impact Factor: 2.823; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.782; A': 1; Avtorji / Authors: Jerman Tina, Mozetič Vodopivec Branka	
	Tipologija	1.01	

Tipologija	Izvirni znanstveni članek
------------	---------------------------

### 9. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine<sup>8</sup>

Družbenoekonomsko relevantni dosežki			
1.	COBISS ID	1992443	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Antioksidativna in antimikrobna aktivnost fenolnih izvlečkov grozdnih tropin
		ANG	Antioxidant and antimicrobial activity of phenolic extracts of grape seeds and skins
	Opis	SLO	V trgatvi 2010 smo na večih lokacijah Vipavske doline odvzeli vzorce tropin sort 'Zelen', 'Rebula', 'Sauvignon', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot' in 'Modri Pinot', jih liofilizirali, zmleli in ultrasonično ekstrahirali z različnimi topili. Najvišjo antioksidativno zaščito so imeli ekstrakti sort 'Merlot' in 'Sauvignon', z ekvivalenti Trolox-a 10 mmol Troloxa/g skupnih fenolov. Vrednosti MIK fenolnih izvlečkov tropin so znašale med 0,094-0,38 mg SF/ml gojišča, kar jih uvršča med uporabne antioksidativne in protimikrobne dodatke v živilstvu, farmaciji in nutraceutiki.
		ANG	During the harvest in 2010 on different location of Vipava valley the samples of Zelen', 'Sauvignon', 'Rebula', 'Merlot', 'Cabernet Sauvignon' and 'Pinot Noir' grape seeds and skins were collected, freeze dried and ultrasonically extracted with different solvents. Chemical composition with total phenolic content was determined. 'Merlot' and 'Sauvignon' extracts exhibited highest antioxidant activities with up to 10 mmol of Trolox equivalents/g of TP. Gram (+) bacteria were more sensitive to inhibition by extracts introduced with MICs ranging from 0,094 up to 0,38 mg TP/ml. This confirms the grape extracts as potential natural antioxidative and antimicrobial additives in food technology, pharmacy and nutraceutics.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	FKKT; Slovenski kemijski dnevi 2011, Portorož, 14-16 september 2011; 2011; 8 str.; Avtorji / Authors: Trošt Kajetan, Mozetič Vodopivec Branka, Sternad Lemut Melita, Jug Katja, Raspor Peter, Smole Možina Sonja	
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
2.	COBISS ID	4134776	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Nanoinkapsuliranje v živilski industriji
		ANG	Nanoencapsulation in food industry : materials and cases.
	Opis	SLO	V živilski industriji se kot ogrodni materiali za kapsulacijo bioloških substanc uporabljajo različne naravne snovi – polisaharidi, proteini in lipidi, rastlinskega, morskega, živalskega ali mikrobnega izvora. V prispevku so predstavljeni materiali, ki imajo status GRAS (generally recognized as safe) in najpomembnejše skupine kapsuliranih snovi za uporabo v živilski in nutraceutski industriji (arome, vitamini, barvila, encimi, mikroorganizmi, bioaktivni peptidi, polifenoli, eterična olja, izvlečki različnih rastlinskih materialov z antioksidativno in protimikrobno aktivnostjo itd.).
		ANG	In the food industry as matrix materials for encapsulation of biological substances a variety of natural substances - polysaccharides, proteins and lipids, which may be of plant, marine, animal or microbial origin, are used. This paper presents different materials with GRAS status (Generally Recognized As Safe) and the major groups of encapsulated substances in food and nutraceutical industry such as flavours, vitamins, pigments, enzymes, microorganisms, bioactive peptides, polyphenols, essential oils, phenolic extracts from different plant materials with antioxidant and antimicrobial activity.



	Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
	Objavljeno v	Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo; Nanotehnologije in nanoživila; 2012; Str. 49-65; Avtorji / Authors: Smole Možina Sonja, Istenič Katja, Poklar Ulrich Nataša	
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljen predavanje)	
3.	COBISS ID	2176723	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Oleuropein in biofenoli v oljčnih listih
		ANG	Oleuropein and biophenols in olive leaves
	Opis	SLO	Oljčni listi so idealen vir sekoiridoidnih biofenolov, predvsem oleuropeina, ki ima antioksidativne, antimikrobne, antiviralne in protivnetne učinke. V listih v Sloveniji gojenih oljčnih sort Istrska belica in Leccino so tudi biofenoli flavonoidnega tipa, e.g. luteolin-7-O-glukozid in apigenin-7-O-glukozid. Vsebnost biofenolov v listih je odvisna od sorte, klime, načina sušenja in časa hranjenja.
		ANG	Olive leaves are ideal source for secoiridoid type of biophenols, especially oleuropein. Oleuropein has antioxidative, antimicrobial, antiviral and anti-inflammatory effects. In leaves of Slovenian olive cultivars Istrska belica and Leccino there are other types of biophenols of flavonoid type as well, e.g. luteolin-7-O-glucoside and apigenin-7-O-glucoside. The biophenols content varies according to cultivar, climate, drying and shelf time.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Univerzitetna založba Annales; Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu; 2012; Str. 151-167; Avtorji / Authors: Butinar Bojan, Bučar-Miklavčič Milena, Bešter Erika, Valenčič Vasilij	
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
4.	COBISS ID	2176979	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Razvoj metode za določevanje sladkorjev v plodovih in listih oljke
		ANG	The setting of the methodology for determination of sugars in olive drupes and leaves
	Opis	SLO	Sladkorji so prekurzorji različnih biomolekul oljke, predvsem lipidov in biofenolov. Opisali smo način ekstrakcije sladkorjev in vodotopnih biofenolov obenem pa tudi uporabljene analize metode (HPLC, ionsko izmenjevalna kolona, detekcija RID). Z opisano metodologijo bo mogoče zbrati podatke, ki bodo omogočili podrobnejše razlikovanje med oljčnimi sortami.
		ANG	Sugars are precursors of various biological molecules in olive, especially lipids and biophenols. The way of extracting sugars and water soluble biophenols is described among with the HPLC determination based on ion exclusion chromatography and RID detection. The data gathered with described methodology could serve as a tool to discriminate among olive cultivars.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Univerzitetna založba Annales; Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu; 2012; Str. 169-175; Avtorji / Authors: Bešter Erika, Butinar Bojan, Bučar-Miklavčič Milena, Valenčič Vasilij	
	Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci	
5.	COBISS ID	4088184	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Protiglivna učinkovitost eteričnih olj proti plesnim <i>Aspergillus westerdijkiae</i> ,

		A. ochraceus, A. flavus in Penicillium nordicum
	ANG	Antifungal effect of essential oils on Aspergillus westerdijkiae, A. ochraceus, A. flavus and Penicillium nordicum
Opis	SLO	Minimalno inhibitorno koncentracijo smo določili eteričnim oljem origana, timijana, mete, janeža, borovih iglic ter karvakrolu in timolu z metodo razredčevanja v mikrotiterski ploščici v gojišču RPMI-1640 proti mikotoksigenim plesnim vrst Aspergillus westerdijkiae, A. flavus, A. ochraceus in Penicillium nordicum. Ugotovili smo, da so timol, karvakrol, in eterična olja origana, timijana in mentola imeli največji protiglivi učinek v smislu zaviranja rasti že pri 1/2 ali 1/4 vrednosti MIC v trdem gojišču..
	ANG	MICs of essential oils of oregano, thyme, mint, fennel, pine needles and pinecones, and carvacrol, thymol, menthol and anisaldehyde were determined with broth microdilution method in RPMI-1640 medium for Aspergillus westerdijkiae, A. ochraceus, A. flavus and Penicillium nordicum. We found out that thymol, carvacrol and oregano, thyme and menthol essential oils were most efficient antifungals with growth inhibition of all strains already at 1/2 or 1/4 of MICs in solid medium.
Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci
Objavljeno v		University of Novi Sad, Institute of Food Technology; Proceedings of 6th Central European Congress on Food; 2012; Str. 479-484; Avtorji / Authors: Jeršek Barbara, Anđić Marijana, Markov Ksenija, Lakić Neda, Božin Biljana, Smole Možina Sonja
Tipologija	1.08	Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

## 10. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>9</sup>

1. Izvirni znanstveni članki iz medn. sodelovanja o uporabi rastlinskih izvlečkov v živilstvu:
- GENERALIĆ, I., SKROZA, D., ŠURJAK, J., SMOLE MOŽINA, S., LJUBENKOV, I., KATALINIĆ, A., ŠIMAT, V., KATALINIĆ, V. Seasonal variations of phenolics and biological properties of sage. Chem. biodivers. 2012; 9, 2: 441-457. [COBISS.SI-ID 3965304]
  - KATALINIĆ, V., SMOLE MOŽINA, S., GENERALIĆ, I., SKROZA, D., LJUBENKOV, I., KLANČNIK, A. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from six Vitis vinifera L. varieties. Int. j. food prop., 2012, doi: 10.1080/10942912.2010.526274. [COBISS.SI-ID 3814264]
  - KLANČNIK, Anja, GRÖBLACHER, Barbara, KOVAČ, Jasna, SMOLE MOŽINA, Sonja. Anti-Campylobacter and resistance-modifying activity of Alpinia katsumadai seed extracts. J Appl Microbiol, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05424.x. [COBISS.SI-ID 4120696]
  - ABRAMOVIČ, Helena, TERPINC, Petra, GENERALIĆ, Ivana, SKROZA, Danijela, KLANČNIK, Anja, KATALINIĆ, Višnja, SMOLE MOŽINA, Sonja. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (Rosmarinus officinalis) and vine (Vitis vinifera) leaves. Croatian j food sci. technol., 2012, 4, 1:1-8. [COBISS.SI-ID 4114040]
  - KLANČNIK, A., PISKERNIK, S., SMOLE MOŽINA, S., DEMŠAR, L., JERŠEK, B. Int. j. food sci. technol. 2011,46;413-420. [COBISS.SI-ID 3836536]
2. Diseminacija rezultatov na konferencah doma in v tujini:  
[COBISS.SI-ID 4140920]; [COBISS.SI-ID 4089208]; [COBISS.SI-ID 4088696]; [COBISS.SI-ID 4088440]; [COBISS.SI-ID 4094328]; [COBISS.SI-ID 4090232]; [COBISS.SI-ID 4093560]; [COBISS.SI-ID 4094072]; [COBISS.SI-ID 3954808]; [COBISS.SI-ID 3964792]; [COBISS.SI-ID 3943544]; [COBISS.SI-ID 3989624]; [COBISS.SI-ID 3967608]; [COBISS.SI-ID 4141688]
3. Diplome, doktorati:  
[COBISS.SI-ID 3880056]; [COBISS.SI-ID 4089464]; [COBISS.SI-ID 4111480]; [COBISS.SI-ID 3916664]

4.

Diseminacija rezultatov projekta na domačih in tujih strokovnih konferencah:

## 11. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>10</sup>

### 11.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>11</sup>

SLO

Raziskovalni rezultati projektne skupine so za razvoj znanosti večplastni. V okviru projekta smo razdelali način priprave biofenolnih ekstraktov iz posušenih in/ali liofiliziranih oljčnih listov in s pomočjo tekočinske kromatografije z detektorjem DAD določili kemijsko sestavo. Pomen za razvoj znanosti je predvsem okarakteriziran prispevek dveh slovenskih oljčnih sort s specifičnima biofenolnima sestavama v nabor v svetu opisanih kultivarjev, kar daje možnost primerjave in razširitve znanja. Podobno velja za okarakterizirane kultivarje vinskih sort, ki so bile vključene v pripravo izvlečkov grozdnih tropin in so vključevale na eni vesplošno razširjene sorte, na drugi strani pa slovenske avtohtone sorte. Slednje so se v smislu bioaktivne učinkovitosti izkazale kot zelo zanimive za nadaljnje raziskave. Originalen prispevek k znanosti so tudi podatki o učinkovanju rastlinskih izvlečkov, ne samo v smislu antioksidativne in protimikrobne aktivnosti, pač pa predvsem v smislu načina protimikrobnega delovanja in vpliva na odpornost patogenih bakterij proti drugim pomembnim protimikrobnim snovem, npr. protimikrobnim zdravilom, žolčnim solem ali drugim biocidnim snovem. Vse to lahko vpliva na njihovo preživeljivost v okolju proizvodnje hrane ali v gostiteljskem organizmu, s tem pa določa tveganje, ki jih ti patogeni mikroorganizmi predstavljajo za zdravje ljudi. Podatki, pridobljeni tekom tega projekta, so bili javno predstavljeni na konferencah in delavnicah ter tudi objavljeni v izvirnih znanstvenih prispevkih, tako na državni, kot tudi mednarodni ravni, v znanstvenih in strokovnih publikacijah.

ANG

Research results of the project group are important in different ways. In lieu of the project the flowchart of the biophenolic extracts preparation from the air dried or/and freeze dried olive leaves was set. At the same time the biophenolic species characterization was performed with the aid of DAD equipped reverse phase HPLC. The scientific impact of our research lies in the field of biophenols composition of two main Slovenian olive cultivars and their contribution to the world's olive cultivars biophenols composition data. Similar is true for characterization of different vine varieties which were included in preparation of wine seeds and skins extracts. On

one side world well-known varieties are included, but also some Slovene autochthonic varieties which were in fact found as very interesting for further research of their bioactivity (e.g. "Zelen"). Original contribution to scientific knowledge are also data not just about antimicrobial but also modulatory activity of different plant extracts and their active compounds. They could reduce bacterial resistance against other compounds, e.g. antimicrobial drugs, bile salts or other biocides, with an important impact on their survival in food-producing environment or in human body, influencing the hazards which they present food safety and health of the consumers.

The results collected in this project were presented on national and international scientific conferences and workshops as well as published in original scientific articles in high-ranked scientific journals.

## 11.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>12</sup>

SLO

Gre za zbrana nova znanja o bioaktivnih rastlinskih izvlečkih, ki so lahko uporabna v hrani, torej živilskih izdelkih, pa tudi nutraceutiki, farmaciji, kozmetiki in ostalih področjih, ko so zelo pomembna v slovenskem gospodarstvu.

Vsem sodelujočim partnerjem projekta pa nova znanja in metode dela, kakor tudi novo ustvarjeno sodelovanje tekom navezujočih se bilateralnih projektov pomeni pomemben napredek za konkurenčno delovanje pri pridobivanju novih nacionalnih, evropskih in ostalih raziskovalnih projektov.

Širjenje in prenašanje znanja med znanstvenimi institucijami je izjemno pomemben element organizacije in vodenja tega projekta. Razvili smo spretnosti, ki bodo omogočile dostop do novih znanj, izobrazbe in tudi mednarodnih izmenjav raziskovalcev ter ugleda našega dela in države tudi v tujini. Poleg tega vključeni učitelji z različnih sodelujočih organizacij širimo pridobljeno znanje neposredno na svoje študente na vseh sodelujočih fakultetah. Diplomski in predvsem podiplomski študenti se tudi neposredno vključujejo v omenjene raziskave, kar dokazujejo njihova zaključna dela (omenjeno v točki 10 tega poročila).

ANG

The project has contributed to new knowledge for development of plant extracts and their mixtures to be applied in different disciplines - food, nutraceutical, pharmaceutical, cosmetic and others, which are all important for slovene economy.

All participating research partners have aimed to increase the volume of their applied research and newly established research cooperation also with some other partners in linked bilateral projects, whis is also very important to ensure long-term financing of further activities and competitive performance in getting new national, European and other international projects.

Dissemination and transfer of knowledge between scientific institutions is an extremely important parameter of organization and management of this project. With interinstitutional cooperation we have developed new skills that will enable access to new knowledge, education and international exchange of personnel, which will significantly contribute to the promotion of our country. Beside this, the university teachers who are involved from all institutions are expanding the new knowledge directly to their students at all faculties involved in the project. Master and doctoral students are involved in research work on this field, what is evident from their diploma works.

## 12. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine.

### 12.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

**Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?**<sup>13</sup>

- Slovenska živilska industrija, kjer se raziskave nadaljujejo na novih živilskih proizvodih

- Druge raziskovalne organizacije, kjer se raziskave nadaljujejo tudi v smeri učinkovanja rastlinskih izvlečkov in aktivnih učinkovin v gostitelju
- Druge raziskovalne organizacije, kjer se raziskave nadaljujejo v smeri učinkovanja rastlinskih izvlečkov in aktivnih učinkovin v obliki prehranskih dodatkov.
- Oljčni pridelovalcev in farmacevtska podjetja z interesom trženja oljčnih listov.

## 12.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih
- pri mednarodnih uporabnikih

**Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:**<sup>14</sup>

BI-SLO-A-11/12-20: Plant natural products as new agents to combat Campylobacter infections – evaluation of antimicrobial activity, resistance modulation and inhibition of biofilm formation;  
BI-SLO-ZDA-11/12-43: Contribution of efflux mechanisms to antimicrobial resistance of Campylobacter spp.  
BI-SLO-SR-10/11-34: Exploitation of waste plant material after distillation of essential oil; BI-HR-09/10-44: Natural, biologicaly active additives for healthy and stable food

**Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:**<sup>15</sup>

- Skupna prijava mednarodnega projekta, ki je trenutno v 2. fazi evalvacije
- Skupne znanstvene publikacije (pet izvirnih znanstvenih člankov v zadnjih dveh letih na temo uporabe rastlinskih izvlečkov na področju živilstva;
- pet v celoti objavljenih konferenčnih predstavitev v zadnjih dveh letih na temo uporabe rastlinskih izvlečkov na področju živilstva;
- večje število drugih mednarodnih predstavitev na konferencah ali delavnicah

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino letnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi študijo ali elaborat, skladno z zahtevami sofinancerjev

**Podpisi:**

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

Univerza v Ljubljani, Biotehniška  
fakulteta

Sonja Smole - Možina

**ŽIG**

Kraj in datum:

**Oznaka prijave: ARRS-CRP-ZP-2012-05/27**

## Zaključno poročilo o rezultatih ciljnega raziskovalnega projekta - 2012

<sup>1</sup> Zaradi spremembe klasifikacije je potrebno v poročilu opredeliti raziskovalno področje po novi klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevaljalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Podpisano izjavo sofinancerja/sofinancerjev, s katero potrjuje/jo, da delo na projektu potekalo skladno s programom, skupaj z vsebinsko obrazložitvijo o potencialnih učinkih rezultatov projekta obvezno priložite obrazcu kot priložitev (v skeniranem PDF formatu) in jo v primeru, da poročilo ni polno digitalno podpisano, pošljite po pošti na Javno agencijo za raziskovalno dejavnost RS. [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

<sup>4</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>6</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbenoekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen, kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno ekonomsko relevantnega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. v preteklem letu vodja meni, da je izjemen dosežek to, da sta se dva mlajša sodelavca zaposlila v gospodarstvu na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovila svoje podjetje, ki je rezultat prejšnjega dela ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Največ 500 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Največ 500 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>15</sup> Največ 1.000 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2012-05 v1.00c  
E9-E6-E4-44-2E-39-19-E5-57-C0-0C-A8-D9-58-92-B5-DA-11-66-E3

## **PRILOGA 1:**

### **Razširjeno vsebinsko poročilo o doseženih rezultatih projekta CRP V4-1079**

#### **Program projektnega dela je bil razdeljen v štiri delovne sklope (DS):**

**Delovni sklop 1:** Zagotavljanje surovine, pridobivanje in kemijska karakterizacija bioaktivnih fenolnih izvlečkov (fitofenolov) iz odpadnih surovin in stranskih proizvodov agroživilstva: A) stranskih proizvodov pridelave oljk Slovenske Istre - UP ZRS Koper; B) stranskih proizvodov predelave grozdja (UNG).

#### **Aktivnosti, ki jih je v okviru projekta izvajal UP ZRS Koper:**

Delo je potekalo z vzorci listja oljk, zbranih v letih 2009, 2010 in 2011 na legi LABS, Izola in sicer na dveh kultivarjih – ‘Leccino’ (L9, L10, L11) in ‘Istrska belica (IB9, IB 10, IB11). Opravljeno je bilo sledeče:

- Biofenolna karakterizacija listja najpogosteje zastopanih sort Slovenske Istre  
Preliminarno ekstrakcijo in karakterizacijo smo izvedli na vzorcu listov sorte Leccino, ki so bili nabrani in posušeni julija 2009 ter na vzorcu listov sorte Istrska belica, ki so bili nabrani in posušeni julija 2008. Uporabljena ekstrakcija je rezultat naših dolgoletnih izkušenj, njeno glavno vodilo je bila relativna enostavnost priprave, tako da je izvleček za nadaljnjo uporabo praktično takoj pripravljen. Zaradi specifičnosti nadaljnega raziskovalnega dela smo se odločili za ekstrakcijsko pot z uporabo etanola in NE metanola.
- Princip ekstrakcije in kvantifikacije: približno 750 mg zmletih in predhodno zamrznjenih ter liofiliziranih oziroma na zraku posušeni oljčnih listov ekstrahiramo s 70-% vol. etanolom s pomočjo stresalnika vortex. Ekstrahiramo 3-krat s po 15 mL etanola. Izvleček ločimo s centrifugiranjem pri 4000-1. Združenim centrifugatom z ekstrakcijo s heksanom odstranimo možne prisotne lipofilne substance in jih po potrebi koncentriramo. Ponavadi je delovna koncentracija približno 1 g biofenolnega izvlečka na 10 mL 70-% EtOH. V tako koncentriranem izvlečku okarakteriziramo bistvene biofenolne species oleuropeinskega in flavonoidnega tipa in določimo vsebnost skupnih HPLC biofenolov. Kromatografska določitev in kvantifikacija potekata v skladu s kromatografskim protokolom (COI, 2009). Preliminarni rezultati se gibljejo v polju med 30 in 70 g HPLC biofenolov/kg liofiliziranih (posušeni) listov. Na osnovi tega protokola bodo pripravljene novi in sveži izvlečki letošnjih vzorcev, ki bodo tudi kvalitativno in kvantitativno ovrednoteni glede oljčne sorte (Leccino, Istrska belica).
- Optimizacija in modifikacija HPLC protokola za kvantifikacijo biofenolov v ekstraktu oljčnega listja: Modificirali in optimizirali smo veljavno metodo mednarodnega sveta za oljke za določevanje vsebnosti biofenolov v oljčnih oljih in v skladu z dobljenimi rezultati (detekcija DAD 200-400 nm) in razpoložljivimi standardi asignirali naslednje biofenole: hidrositirozol (TyrOH), tirozol (Tyr), verbaskozid (Verbaskozid), luteolin-7-O-Glukozid (Lu-7-O-Glu), oleuropein (Ole) in apigenin-7-O-Glukozid (Api-7-O-glu). Rezultate smo podajali na osnovi eksterne standarda tirozola in sicer kot asignirane, neasignirane in skupne biofenole. Večina biofenolov v vseh ekstraktih je bila flavonoidno glukozidnega tipa, kar za naše oljke še ni bilo ugotovljeno (Bešter s sod., 2012).

- Finalizacija ekstrakcijskega postopka z rezultati za vzorce L9, L 10, IB9 in IB10  
Zračno oziroma sušenje v liofilizatorju, fino mletje vzorca, 3-kratna zaporedna ekstrakcija z različnimi topili, odstranjevanje lipofilnih snovi z ekstrakcijo s heksanom (nujna faza za oblikovanje trdnega ekstrakta, primernejšega za aplikacijo), odstranjevanje topila iz ekstrakta z gradientno uporabo vakuumu. Na osnovi takega ekstrakcijskega protokola smo izdelali ekstrakte za potrebe nadaljnjih analiz na Biotehniški fakulteti, rezultate pa ovrednotili na osnovi zunanjega standarda tirozola in sicer kot asignirane, neasignirane in skupne biofenole (42,99 – 76,38 mg/g). Večina biofenolov je bila flavonoidno glukoziidnega tipa, kar za naše oljčne kultivarje še ni bilo objavljeno oz. poznano. Podatki pa se ujemajo s podatki komercialnih ekstraktov, ki so jih uporabljali v podobnih raziskavah v mesnem matriksu.
- Poskus določitve alfa-tokoferola v vzorcih: V vseh vzorcih smo poskusili kvantificirati vsebnost alfa-tokoferola. Izkazalo se je, da so v vzorcih alfa-tokoferolu sorodne učinkovine, ki bodo predmet nadaljnjih raziskav (Butinar s sod, 2012).

#### **Aktivnosti, ki jih je v okviru projekta izvajala Univerza v Novi gorici:**

Zagotavljanje surovine, pridobivanje in kemijska karakterizacija bioaktivnih spojin iz tropin, stranskega produkta po stiskanju grozdja iz Vipavske Doline;

Biofenolna karakterizacija tropin najpogosteje zastopanih sort belega (Sauvignon, Rebula, Zelen) in rdečega grozdja (Modri Pinot, Cabernet Sauvignon in Merlot):

V času trgatve 2010 smo vzorčili tropine 3 belih in 3 rdečih sort. Tropine so bile v času trgatve shranjene na - 25°C in nato liofilizirane. Pridobljene liofilizate smo zmelili in tako pripravljene homogene vzorce izpostavili različnim ekstrakcijam, pri čemer smo postopek ekstrakcije (čas, vrsta topila) optimizirali. Fenolne spojine ekstrahiramo s pomočjo ultrazvočne kopeli (0.5 g/10 mL ekstrakcijskega topila, 4 X 30 min), ki pospeši prehod iz rastlinskega materiala v topilo. Optimizacija ekstrakcije je bila izvedena na tropinah sorte Zelen in Merlot in različni ekstrakti so bili poslani tudi v mikrobiološko obravnavo na BF. Masni izkoristki posameznih sort nihajo okvirno med 10 in 50 % izkoristkom glede na liofilizirane tropine glede na vrsto tehnološke obdelave grozdja. Vsebnosti skupnih fenolov izdatno nihajo glede na posamezno sorto in ekstrakcijsko topilo in se gibajo med 15 - 350 mg/g ekstrakta. Na podlagi preliminarnih kemijskih in MB analiz bomo določili optimalni postopek ekstrakcije, kateremu bomo izpostavili večje količine izhodnega materiala najboljšega predstavnike bele in rdeče sorte.

V nadaljevanju smo optimizirali ekstrakcijsko metodo za fenole iz tropin različnih sort grozdja glede na polarnost ekstrakcijskega topila. Topila smo sestavili iz različnih mešanic metanola, etanola, acetona in vode. Ekstraktom smo nato izmerili koncentracijo skupnih fenolov ter določili njihovo antioksidativno učinkovitost. Koncentracije skupnih fenolov so se gibale v območju med 50 in 350 mg/g suhega ekstrakta, najvišje vrednosti so bile dosežene z ekstrakcijskim medijem voda:metanol v volumskem razmerju 25:75%. Najvišjo antioksidativno zaščito so pokazali ekstrakti tropin grozdja sorte Merlot in Sauvignon, ki so dosegali vrednosti do 10 mmol Troloxa/g skupnih fenolov (SF). Kot najbolj optimalna ekstrakcijska medija sta se izkazala voda:metanol v volumskem razmerju 25:75% in voda:etanol v razmerju 50:50% (Trošt s sod., 2011).



Poleg slovenskih institucij, ki so bile s tega projekta tudi financirane, so se preko bilateralnega mednarodnega sodelovanja z Biotehniško fakulteto, nosilko tega projekta, v pridobivanje ustreznih surovin za pripravo bioaktivnih izvlečkov vključevale tudi tuje institucije oz. raziskovalne organizacije. (Fakulteta za kemijsko tehnologijo, Univerze v Splitu (bilateralni projekt 2009-2010 s Hrvaško (Katalinić et al., 2010 in 2012; Generalić et al., 2012, Abramovič s sod., 2012); Oddelek za farmacijo, Medicinske fakultete v Novem sadu (bilateralni projekt 2010-2011 s Srbijo, Božin et al., 2012) in Institut za farmakognozijo, Univerze v Grazu (bilateralni projekt 2011-2012 z Avstrijo; Klančnik s sod., 2012).

V okviru teh mednarodnih izmenjav sta je v času trajanja tega projekta (oktober in november 2010 ter februar in marec 2011 na Biotehniški fakulteti gostovali tudi raziskovalki Danijela Skroza iz Fakulteta za kemijsko tehnologijo, Univerze v Splitu na Hrvaškem in Neda Lakič iz Oddelka za farmacijo, Medicinske fakultete v Novem Sadu v Srbiji. Obe sta v okviru tekočih bilateralnih projektov, ki so prav tako obravnavali pripravo biološko aktivnih fenolnih izvlečkov iz grozdja in emditerasnkih zelišč ter odpadnega rastlinskega materiala po destilaciji eteričnih olj. Materialni stroški njunega dela so se povezovali s projektom CRP-V4-1079, rezultate oz. pripravljene rastlinske materiale (olja in izvečki, pridobljeni z različnimi načini ekstrakcije) pa smo uporabili tudi za nadaljnjo izvedbo tega projekta in so opisani v nadaljevanju tega poročila in v dodanih poročilih o delu obeh raziskovalk med gostovanjem na Biotehniški fakulteti.

**Delovni sklop 2: Primerjalna analiza aktualnega stanja na področju varnosti živil v EU in Sloveniji z namenom izpostavitve kritičnih živil za izbor modelnih sistemov testiranja učinkovitosti pridobljenih fenolnih izvlečkov:**

Ta delovni sklop je bil v času prvih 4 mesecev projekta izveden s sodelavci Biotehniške fakultete in sodelujoče RO, ZZV Maribor, ki so bili vključeni v različne monitoringe varnosti živil. Ti omogočajo zagotavljanje ažurnih podatkov za analizo stanja oz. tveganj na področju varnosti živil v Sloveniji in EU glede kritičnih bioloških agensov oz. najpogostejših tveganj (npr. okužbe z večkratno odpornimi zoonotskimi bakterijami, prisotnost mikotoksigenih gliv in njihovih toksinov). Na osnovi teh analiz smo definirali testne modele mikroorganizmov in živil za nadaljnje delo na projektu (DS3 in DS4). Izbrali smo proti antibiotikom odporne bakterije *Campylobacter*, ker so te bakterije najpogostejše povzročiteljice gastroenteritisov pri ljudeh, vse večji problem pa postaja njihova vse pogostejša odpornost proti različnim protimikrobnim snovem, vključno s protimikrobnimi zdravili in razkužili. Najpogostje se prenašajo s piščančjim mesom, zato smo tudi ta tip živila vključili v raziskave, iz česar je nastala znanstvena publikacija, objavljena v mednarodni znanstveni reviji (Piskernik s sod., 2011).

Na osnovi analize teh podatkov pa smo izbrali tudi druge tarčne organizme, npr. mikotoksigene plesni, ker tvedanja zaradi njih prav tako naraščajo, drugi živilski model pa so bile mesne emulzije. Teoretično obravnavo mikrobioloških podatkov v modelnih živilskih sistemih smo prav tako objavili v mednarodni znanstveni reviji (Jeršek in sod., 2011).

**Delovni sklop 3:** Glavni cilji tega delovnega sklopa so bili naslednji:

1.) Primerjalna analiza protimikrobne aktivnosti fenolnih izvlečkov na osnovi vrednosti MIK testiranih mikroorganizmov in njihov izbor za preučevanje mehanizma delovanja in inkapsulacije; 2.) Ugotovitev vpletenosti efluksa pri odpornih bakterijskih sevih; 3.) Priprava inkapsulirane učinkovine v liposomih jajčnega fosfatidilholina ter raziskava vpliva inkapsulacije na protimikrobno delovanje v modelnem sistemu. **Primerjalna analiza protimikrobne aktivnosti fenolnih izvlečkov na osnovi vrednosti MIK testiranih mikroorganizmov in njihov izbor za preučevanje mehanizma delovanja in inkapsulacije;** Protimikrobno aktivnost pripravljenih fenolnih izvlečkov različnih surovin (listje različnih sort oljk, tropine šestih sort grozdja, eterična olja in fenolni izvlečki preostalega rastlinskega materiala po destilaciji eteričnih olj timijana in origana) in različnih ekstrakcijskih postopkov (npr. sedmih različnih mešanic topil za ekstrahiranje fenolov iz liofilizatov grozdnih tropin) smo najprej ovrednotili na osnovi vrednosti MIC čistih fenolnih spojin in njihovih mešanic v izvlečkih za različne testne mikroorganizme: a) Gram-pozitivne in gram-negativne bakterije (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.). Vrednosti MIC so bile zbrane za vse vrste omenjenih izvlečkov, v skupnem številu preko 50, za vse testne organizme, za nadaljnje analize kinetike protimikrobnega delovanja pa so bili izbrani le izvlečki z najboljšim delovanjem, potrjenim na osnovi nizkih vrednosti MIC; b) različne seve kvasovk, povzročiteljice kvarjenja živil (izolati iz pokvarjenega oljčnega olja in mošta/vina): *Pichia* spp., *Candida* spp., *Ogataea* spp., *Dekkera* spp. - testirani so bili fenolni izvlečki oljčnega listja in grozdnih tropin. c) izbrane seve mikotoksigenih gliv: *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum* - testirali smo učinkovitost eteričnih olj timijana in origana ter najučinkovitejših sestavin teh olj, t.j. timola in karvakrola, na inhibicijo rasti gliv v trdnem in tekočem gojišču (z mikrodilucijsko metodo v agarju in na mikrotitrski ploščici za izbor najučinkovitejših kombinacij, ki so bile nato preizkušene tudi v tekočem gojišču z makrodilucijskim testom in spremljanjem kinetike inhibicije rasti in tvorbe toksinov med 21-dnevno inkubacijo glivnih kultur. Potrdili smo zelo različne protimikrobne aktivnosti, ki so bile odvisne od surovine, načina ekstrakcije in testne metode (npr. vrednosti MIC v območju 0.094–0.38 mg skupnih fenolov v izvlečkih liofilizatov grozdnih tropin (izraženih kot ekvivalent galne kisline, GAE) na ml testnega gojišča za patogene bakterije in v območju 0.004–0.50 mg GAE/ml za testirane kvasovke (Smole Možina in sod., 2011). Zelo dobro protiglivno aktivnost sta pokazali eterični olji origana in timijana ter karvakrol, pri čemer so bili inhibitorni rezultati zelo odvisni tudi od vrste testne plesni. Vzporedno smo s tenkoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC) določali tvorbo ohratoksina A (OTA) in aflatoksina B1 (AFB1). Rezultati TLC za AFB1 in OTA so pokazali, da izolati plesni vrst *A. ochraceus* (ŽMJ 28), *A. flavus* (ŽMJ 30), *A. niger* (ŽMJ 27), *P. nordicum* (ŽMJ 29), in *P. nordicum* (ŽMJ 31) ne tvorijo nobenega od navedenih mikotoksinov. Izolati plesni vrst *A. flavus* (ŽMJ 25), *A. westerdijkiae* (ŽMJ 26) in *P. verrucosum* (ŽMJ 23) pa tvorijo OTA oziroma AFB1 (Jeršek s sod., 2012). V zaključnem delu projekta smo ovrednotili tudi učinek posameznega eteričnega olja na tvorbo mikotoksinov z ekstrakcijo posameznega mikotoksina in HPLC-analizami. Ekstrakcija OTA iz gojišč CYA je bila izvedena z etanolom in naknadno z metanolom, medtem ko je bila ekstrakcija AFB1 narejena z acetonitrilom. Testirane koncentracije eteričnih olj in njihovih sestavin so bile  $\frac{1}{2}$  in  $\frac{1}{4}$  MIC; izbrani časi vzorčenja pa 14 oziroma 21 dni. Inhibicija tvorbe AFB1 pri plesnih vrste *Aspergillus flavus* ŽMJ 25 je bila dosežena z dodatkom karvakrola ( $\frac{1}{2}$  in  $\frac{1}{4}$  MIC), mentola ( $\frac{1}{2}$  MIC) po 14 in po 21 dneh ter origana in timijana ( $\frac{1}{4}$ ) po 21 dneh, medtem ko je timol v koncentraciji  $\frac{1}{2}$  in  $\frac{1}{4}$  MIC povzročil večjo tvorbo AFB1 v primerjavi s

kontrolnimi vzorci, kjer eterično olje ni bilo dodano. Inhibicija tvorbe OTA pri plesnih vrste *Penicillium verrucosum* ŽMJ 23 je bila dosežena z dodatkom timola (1/4 MIC) po 21 dneh, karvakrola (1/4 MIC) po 21 dneh in mentola (1/2 in 1/4 MIC) po 21 dneh, medtem ko so origano (1/2 in 1/4 MIC, 14 in 21 dni), karvakrol (1/2 MIC, 21 dni) in mentol (1/2 MIC, 14 dni) povzročili večjo tvorbo OTA v primerjavi s kontrolnimi vzorci kjer eterično olje ni bilo dodano. Rezultati študij opravljenih na protiglivnem delovanju eteričnih olj in njihovih sestavin kažejo na kompleksnost problema zaviranja rasti pleni in hkratnega zaviranja tvorbe mikotoksinov, saj kljub velikemu številu testnih vzorcev in preizkušenih parametrov (vrsta plesni/vrsta eteričnega olja/koncentracija eteričnega olja/različen čas/) ne moremo določiti sočasnega protiglivnega učinka eteričnih olj na rast plesni in tvorbo mikotoksinov.

## **2.) Ugotovitev vpletenosti efluksa pri odpornih bakterijskih sevih;**

Vpletenost efluksa oz. morebitno inhibitorno vlogo rastlinskih izvlečkov na membranske proteine, ki pri mikroorganizmih sodelujejo pri iznosu protimikrobnih snovi iz celic, smo proučevali pri izbranih sevih bakterij *Campylobacter*, ki so bili selekcionirani v prvem obdobju projekta (Kurinčič, 2011). Aktivno vlogo pri zaviranju delovanja izlivnih črpalk in s tem možnost zmanjševanja odpornosti teh patogenih bakterij proti drugim protimikrobnim snovem, npr. antibiotikom in/ali biocidom, smo potrdili za nekatere sestavine rastlinskih izvlečkov, npr. epigalokatehin-galat in etanolne izvlečke semen rastline *Alpinia katsumadai*, ne pa tudi za analizirane izvlečke grozdnih tropin) (Gornik, 2011; Kurinčič s sod., 2012; Klančnik s sod., 2012). Na osnovi teh raziskav smo objavili dve znanstveni publikaciji v revijah z visokim dejavnikom vpliva (npr. International Journal of Antimicrobial Agents, IF=4.128)

## **3.) Priprava inkapsulirane učinkovine v liposomih jajčnega fosfatidilholina ter raziskava vpliva inkapsulacije na protimikrobno delovanje v modelnem sistemu.**

V sodelovanju dveh raziskovalnih skupin na Biotehniški fakulteti smo opravili tudi inkapsulacijo izbranih fenolnih izvlečkov, ki so se v predhodnih testih protimikrobnega delovanja izkazali kot učinkoviti - in sicer izvlečkov oljčnih listov ter izbranega izvlečka tropin sorte Zelen. Ta je pokazal dobro protimikrobno delovanje z najširšim spektrom- učinkovit je bil tako proti gram-pozitivnim in gram-negativnim bakterijam, kakor tudi kvasovkam. Pripravili smo dve vrsti inkapsuliranih izvlečkov, vgrajenih v liposomske in ciklodekstrinske nosilce. Obe vrsti inkapsulacije sta imeli pozitiven učinek na protimikrobno delovanje obeh vrst rastlinskih izvlečkov, kar se je izrazilo tako v nižjih vrednostih MIC, kakor tudi v hitrejši inhibiciji rasti med podaljšano inkubacijo mikrobnih kultur v tekočem gojišču. Oboje pripisujemo izboljšani topnosti hidrofobnih sestavin izvlečkov v vodnem mediju in večji stabilnosti učinkovin med podaljšano inkubacijo (Tadić s sod., 2012). Delo je bilo predstavljeno in v celoti publicirano v Zborniku kongresa CEFOOD2012.

## **DS4:«In vivo» testiranje protimikrobne in antioksidativne učinkovitosti rastlinskih fenolnih izvlečkov oz. njihovih komponent**

Ovrednotili smo antioksidativno in protimikrobno učinkovitost v izbranem živilskem modelu (mesni emulziji kot polizdelku živilske predelovalne industrije) in njegovo senzorično sprejemljivost v primerih, ko smo dodali izbrane rastlinske izvlečke (iz tropin sort zelen in sauvignon) v treh različnih koncentracijah. Kot indikatorski analizi stopnje oksidacije smo uporabili določanje števila TBK in vsebnost oksidov holesterola (LC-

MS/MS). Za senzorično analizo smo uporabili test točkovanja lastnosti iz skupine deskriptivnih testov z nestrukturirano točkovno lestvico. Mesna emulzija v tipu hrenovke je bila narejena iz slanine in svinjine, ledu in nitritne soli, toplotno obdelana do središčne temperature 68 °C. Analize določanja števila TBK in oksidov holesterola (LC-MS/MS) smo opravili v surovini, mesni emulziji pred in po toplotni obdelavi ter po 1 mesecu skladiščenja. V tem delovnem sklopu smo vrednotili antioksidativno in protimikrobno učinkovitost v izbranem živilskem modelu (mesni emulziji kot polizdelku živilske predelovalne industrije) in njegovo senzorično sprejemljivost v primerih, ko smo dodali rastlinske ekstrakte sorte zelen in sauvignon. Kot indikatorski analizi stopnje oksidacije smo uporabili določanje števila TBK in vsebnost oksidov holesterola (LC-MS/MS). Za senzorično analizo smo uporabili test točkovanja lastnosti iz skupine deskriptivnih testov z nestrukturirano točkovno lestvico. Za vrednotenje tujih vonjev in arom smo izbrali točkovanje od 1 do 7 točk, pri čemer 7 točk pomeni ekstremno izraženo lastnost, 1 točka pomeni ekstremno neizraženo lastnost. Za barvo pa smo izbrali točkovanje 1-4-7 točk, pri čemer 1 točka pomeni rožnato marelično barvo kot pri kontroli, 4 točke pomeni sivo-rožnato barvo in 7 točk sivo barvo. Kot mikrobiološke indikatorje smo izbrali skupno število mezofilnih bakterij ter število sporogenih bakterij ter specifični indikator, bakterijsko vrsto *Bacillus cereus*.

V preglednici 1 so podani rezultati senzorične analize, ki se je izkazala kot najbolj omejujoča za uporabo pripravljenih fenolnih izvlečkov v mesnih emulzijah, predvsem zaradi vpliva na spremembo barve.

Preglednica 1: Rezultati senzorične analize mesnih emulzij, izdelanih z različnimi koncentracijami in ekstrakti sorte zelen in sauvignon, po toplotni obdelavi in 1 mesecu skladiščenja

Točke (1-4-7)	toplotno obdelano				po 1 mesecu			
	15.6.2012	barva	tuji vonji	tuje arome	16.7.2012	barva	tuji vonji	tuje arome
kontrola	CRP11	1	1	1	CRP21	1	1	1
zelen 1 ml	CRP12	3	1	1	CRP22	4	1	1
zelen 2 ml	CRP13	3,5	1	1	CRP23	4,5	1	2,0
zelen 10 ml	CRP14	4,5	1	1	CRP24	4,5	1,5	2,5
sauvignon 1 ml	CRP15	1,5	1	1	CRP25	1	1	1
sauvignon 2 ml	CRP16	1,5	1	1	CRP26	1	1	1,5
sauvignon 10 ml	CRP17	2,5	1	1	CRP27	4,5	1,5	2

Iz preglednice 2 lahko povzamemo, da po toplotni obdelavi ocenjevalci na emulzijah vseh skupin niso zaznali tujih vonjev in arom, pač pa so zaznali razlike v barvi emulzij. V primerjavi s kontrolo so imele emulzije z dodatkom ekstrakta sorte zelen močno izražen siv odtenek, v katerem je še vedno prevladovala rožnata barva, emulzije z dodatkom ekstrakta sorte sauvignon pa le rahlo izražen siv odtenek. Po enomesečnem skladiščenju so ocenjevalci v emulzijah za večjo koncentracijo dodanih ekstraktov obeh vinskih sort zaznali tuje vonje, predvsem pa tuje arome, ki pa še niso bili moteči do te mere, da bi bila aroma ali vonj nesprejemljiva (ta meja je 4 točke). Najprimernejša sta dodatka 1 ml in 2ml ekstrakta sorte sauvignon, ki ne spremeni barve emulzije, pa tudi tuji vonji in okusi niso oz. so zelo rahlo zaznavni.

Zaradi možnosti nadaljnje optimizacije bomo študije v tej smeri nadaljevali tudi po zaključku projekta, predvsem v smislu optimizacije priprave (kapsulacijskega postopka) dodane učinkovine. V okviru tega projekta to ni bilo mogoče zaradi zaključka v

septembru 2012, za ponovno izvedbo the raziskav pa potrebujemo nov material, pridobljen v letošnji trgatvi. Zato tudi nadaljujemo zastavljeno sodelovanje s sodelavci Univerze v Novi Gorici oz. njihovim centrom za raziskave vina v Ajdovščini.

Poleg opravljenega dela v zastavljenih delovnih sklopih smo v času trajanja projekta skrbeli za diseminacijo rezultatov, tako v Sloveniji kot tujini, v obliki raziskovanih publikacij kot tudi s številnimi predstavitvami rezultatov na strokovnih in znanstvenih srečanjih, konferencah, delavnih in kongresih. Udeleževali smo se jih tako v Sloveniji kot tujini, prav tako pa smo za organizacijo strokovnih srečanj poskrbeli tudi sami na domačih institucijah. Tovrstne aktivnosti so razvidne iz pregleda objav v naslednji točki.

**Viri oz. glavne objave, ki so izšle v povezavi s projektnim delom v času trajanja projekta CRP V4-1079:**

### **1.01 Izvirni znanstveni članek**

KURINČIČ, Marija, KLANČNIK, Anja, SMOLE MOŽINA, Sonja. Epigallocatechin gallate as a modulator of *Campylobacter* resistance to macrolide antibiotics. *Int. j. antimicrob. agents*. [Print ed.], 2012, str. [1-5, sprejeto v objavo], doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.07.015>. [COBISS.SI-ID [4119160](#)]

GENERALIĆ, Ivana, SKROZA, Danijela, ŠURJAK, Jana, SMOLE MOŽINA, Sonja, LJUBENKOV, Ivica, KATALINIĆ, Ana, ŠIMAT, Vida, KATALINIĆ, Višnja. Seasonal variations of phenolics and biological properties of sage. *Chem. biodivers. (Print)*, 2012, vol. 9, issue 2, str. 441-457, doi: [10.1002/cbdv.201100219](http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201100219). [COBISS.SI-ID [3965304](#)]

ABRAMOVIČ, Helena, TERPINC, Petra, GENERALIĆ, Ivana, SKROZA, Danijela, KLANČNIK, Anja, KATALINIĆ, Višnja, SMOLE MOŽINA, Sonja. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and vine (*Vitis vinifera*) leaves. *Croatian journal of food science and technology*, 2012, vol. 4, no. 1, str. 1-8. [COBISS.SI-ID [4114040](#)]

KATALINIĆ, Višnja, SMOLE MOŽINA, Sonja, GENERALIĆ, Ivana, SKROZA, Danijela, LJUBENKOV, Ivica, KLANČNIK, Anja. Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *Int. j. food prop.*, 2012, str. [1-10, sprejeto v tisk]. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942912.2010.526274>, doi: [10.1080/10942912.2010.526274](http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2010.526274). [COBISS.SI-ID [3814264](#)]

KLANČNIK, Anja, GRÖBLACHER, Barbara, KOVAČ, Jasna, SMOLE MOŽINA, Sonja. Anti-*Campylobacter* and resistance-modifying activity of *Alpinia katsumadai* seed extracts. *J Appl Microbiol*, 2012, str. [1-14, sprejeto v objavo], doi: [10.1111/j.1365-2672.2012.05424.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05424.x). [COBISS.SI-ID [4120696](#)]

PISKERNIK, Saša, KLANČNIK, Anja, TANDRUP RIEDEL, Charlotte, BRØNDSTED, Lone, SMOLE MOŽINA, Sonja. Reduction of *Campylobacter jejuni* by natural antimicrobials in chicken meat-related conditions. *Food control*. [Print ed.], 2011, vol. 22, issue 5, str. 718-724, doi: [10.1016/j.foodcont.2010.11.002](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.002). [COBISS.SI-ID [3836280](#)]

KLANČNIK, Anja, PISKERNIK, Saša, SMOLE MOŽINA, Sonja, DEMŠAR, Lea, JERŠEK, Barbara. Investigation of some factors affecting the antibacterial activity of rosemary extracts in food models by a food microdilution method. *Int. j. food sci. technol.* [Print ed.], 2011, vol. 46, str. 413-420. [COBISS.SI-ID [3836536](#)]

KATALINIĆ, Višnja, SMOLE MOŽINA, Sonja, SKROZA, Danijela, GENERALIĆ, Ivana, ABRAMOVIĆ, Helena, MILOŠ, Mladen, LJUBENKOV, Ivica, PISKERNIK, Saša, PEZO, Ivan, TERPINC, Petra, BOBAN, Mladen. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food chem.* [Print ed.], 2010, vol. 119, str. 715-723, doi: [10.1016/j.foodchem.2009.07.019](#). [COBISS.SI-ID [3652216](#)]

KLANČNIK, Anja, PISKERNIK, Saša, JERŠEK, Barbara, SMOLE MOŽINA, Sonja. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J. microbiol. methods*. [Print ed.], 2010, issue 2, vol. 81, str. 121-126, doi: [10.1016/j.mimet.2010.02.004](#). [COBISS.SI-ID [3752312](#)]

JERMAN, Tina, MOZETIČ VODOPIVEC, Branka. Ultrasonic extraction of phenols from olive mill wastewater : comparison with conventional methods. *J. agric. food chem.*, 2011, vol. 59, no. 24, str. 12725-12731

WECHTERSACH, Luka, POKLAR ULRIH, Nataša, CIGIĆ, Blaž. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *Lebensm.-Wiss. + Technol.*, 2012, vol. 45, issue 1, str. 43-49, doi: [10.1016/j.lwt.2011.07.025](#). [COBISS.SI-ID [3939448](#)]

### **1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljeni predavanja)**

GENERALIĆ, Ivana, KATALINIĆ, Višnja, SMOLE MOŽINA, Sonja. Current cooperation and results : illustration of biological activity of plant extracts = Rezultati sodelovanja na področju biološke aktivnosti rastlinskih ekstraktov. V: RASPOR, Peter (ur.), SMOLE MOŽINA, Sonja (ur.). Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 27th and 28th September 2012. *Biotechnology and microbiology for knowledge and benefit*, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 09). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, 2012, str. 193-202. [COBISS.SI-ID [4141944](#)]

SMOLE MOŽINA, Sonja, ISTENIČ, Katja, POKLAR ULRIH, Nataša. Nanoinkapsuliranje v živilski industriji : materiali in primeri = Nanoencapsulation [i.e. nanoencapsulation] in food industry : materials and cases. V: DEMŠAR, Lea (ur.), ŽLENDER, Božidar (ur.). 27. Bitenčevi živilski dnevi 2012 = 27th Food Technology Days 2012 dedicated to prof. F. Bitenc, 26. september 2012, Ljubljana. *Nanotehnologije in nanoživila*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2012, str. 49-65. [COBISS.SI-ID [4134776](#)]

BUTINAR, Bojan, BUČAR-MIKLAVČIČ, Milena. Current cooperation and results : illustration of pumpkin seed oil genuineness studies and olive leaf extracts bioactivity = Tekoče sodelovanje in rezultati : prikaz ugotavljanja pristnosti bučnega olja in priprave ekstraktov oljnih listov za študij bioaktivnosti. V: RASPOR, Peter (ur.), SMOLE

MOŽINA, Sonja (ur.). Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 27th and 28th September 2012. *Biotechnology and microbiology for knowledge and benefit*, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 09). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, 2012, str. 251-260. [COBISS.SI-ID [4141432](#)]

### 1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci

BOŽIN, Biljana, LAKIĆ, Neda, SMOLE MOŽINA, Sonja. Current cooperation and results : illustration of bioactivity of waste plant materials after distillation of essential oils = Oris sodelovanja na področju ugotavljanja bioaktivnosti odpadnih rastlinskih materialov po destilaciji eteričnih olj. V: RASPOR, Peter (ur.), SMOLE MOŽINA, Sonja (ur.). Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 27th and 28th September 2012. *Biotechnology and microbiology for knowledge and benefit*, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 09). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, 2012, str. 231-240. [COBISS.SI-ID [4141688](#)]

MOZETIČ VODOPIVEC, Branka, TROŠT, Kajetan, SMOLE MOŽINA, Sonja. Current cooperation and results : illustration of phytophenols for food shelf-life improvement = Oris sodelovanja na področju uporabe rastlinskih fenolnih izvlečkov za podaljšanje obstojnosti živil. V: RASPOR, Peter (ur.), SMOLE MOŽINA, Sonja (ur.). Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 27th and 28th September 2012. *Biotechnology and microbiology for knowledge and benefit*, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 09). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, 2012, str. 297-304. [COBISS.SI-ID [4140920](#)]

BUTINAR, Bojan, BUČAR-MIKLAVČIČ, Milena, BEŠTER, Erika, VALENČIČ, Vasilij. Oleuropein in biofenoli v oljčnih listih. V: BANDELJ MAVSAR, Dunja (ur.), PODGORNIK, Maja (ur.), ARBEITER, Alenka (ur.). *Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu : zbornik znanstvenih prispevkov z mednarodnega posveta : zbornik znanstvenih radova sa međunarodnog susreta*. Koper: Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Univerzitetna založba Annales, 2012, str. 151-167, graf. prikazi. [COBISS.SI-ID [2176723](#)]

BEŠTER, Erika, BUTINAR, Bojan, BUČAR-MIKLAVČIČ, Milena, VALENČIČ, Vasilij. Razvoj metode za določevanje sladkorjev v plodovih in listih oljke. V: BANDELJ MAVSAR, Dunja (ur.), PODGORNIK, Maja (ur.), ARBEITER, Alenka (ur.). *Novi raziskovalni pristopi v oljkarstvu : zbornik znanstvenih prispevkov z mednarodnega posveta : zbornik znanstvenih radova sa međunarodnog susreta*. Koper: Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Univerzitetna založba Annales, 2012, str. 169-175. [COBISS.SI-ID [2176979](#)]

BOŽIN, Biljana, LAKIĆ, Neda, MIŠAN, Aleksandra Č., SMOLE MOŽINA, Sonja. Phenolic profile, antioxidant and antimicrobial activity of oregano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae) postdistillation waste extracts. V: LEVIĆ, Jovanka (ur.). 6th Central European Congress on Food, 23-26 May, Novi Sad, Serbia. *Proceedings of 6th Central*

*European Congress on Food : CEFood congress*. Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012, str. 250-255. [COBISS.SI-ID [4089208](#)]

JERŠEK, Barbara, ANDIĆ, Marijana, MARKOV, Ksenija, LAKIĆ, Neda, BOŽIN, Biljana, SMOLE MOŽINA, Sonja. Antifungal effect of essential oils on *Aspergillus westerdijkiae*, *A. ochraceus*, *A. flavus* and *Penicillium nordicum*. V: LEVIĆ, Jovanka (ur.). 6th Central European Congress on Food, 23-26 May, Novi Sad, Serbia.

*Proceedings of 6th Central European Congress on Food : CEFood congress*. Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012, str. 479-484. [COBISS.SI-ID [4088184](#)]

KOVAČ, Jasna, KLAUS, Anita, KOZARSKI, Maja, NIKŠIĆ, Miomir, RASPOR, Peter, SMOLE MOŽINA, Sonja. Antimicrobial activity of polysaccharides extracted from medicinal mushrooms on *Campylobacter jejuni* and *Staphylococcus aureus*. V: LEVIĆ, Jovanka (ur.). 6th Central European Congress on Food, 23-26 May, Novi Sad, Serbia.

*Proceedings of 6th Central European Congress on Food : CEFood congress*. Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012, str. 596-601. [COBISS.SI-ID [4088696](#)]

TADIĆ, Đorđe, ČADEŽ, Neža, OTA, Ajda, BUTINAR, Bojan, TROŠT, Kajetan, PAJIN, Biljana, RASPOR, Peter, POKLAR ULRIH, Nataša, SMOLE MOŽINA, Sonja.

Antimicrobial activity of phenolic extracts from olive leaves and grape skins and seeds - impact of encapsulation. V: LEVIĆ, Jovanka (ur.). 6th Central European Congress on Food, 23-26 May, Novi Sad, Serbia. *Proceedings of 6th Central European Congress on Food : CEFood congress*. Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012, str. 1000-1005. [COBISS.SI-ID [4088440](#)]

TROŠT, Kajetan, MOZETIČ VODOPIVEC, Branka, STERNAD LEMUT, Melita, JUG, Katja, RASPOR, Peter, SMOLE MOŽINA, Sonja. Antioksidativna in antimikrobna aktivnost fenolnih izvlečkov grozdnih tropin = Antioxidative and antimicrobial activity of phenolic extracts from grape skins and seeds. V: KRAVANJA, Zdravko (ur.), BRODNJAK-VONČINA, Darinka (ur.), BOGATAJ, Miloš (ur.). *Slovenski kemijski dnevi 2011, Portorož, 14-16 september 2011*. Maribor: FKKT, 2011, 8 str. [COBISS.SI-ID [1992443](#)]

SMOLE MOŽINA, Sonja, KUTIN, Tina, GENERALIĆ, Ivana, KLANČNIK, Anja, SKROZA, Danijela, PISKERNIK, Saša, ABRAMOVIČ, Helena, KATALINIĆ, Višnja. Antimicrobial activity of pure phenolic acids and phenolic extracts of Lamiaceae plants against bacterial food-borne pathogens. V: 5th Central European Congress on Food, 19th - 22nd may 2010, Bratislava, Slovak Republic. *Book of abstracts and full papers*. Bratislava: Food Research Institute (FRI): = Výskumný ústav potravinársky, 2010, 5 str. [COBISS.SI-ID [3777400](#)]

KLANČNIK, Anja, PISKERNIK, Saša, LIPOGLAVŠEK, Luka, SMOLE MOŽINA, Sonja. Anti-*Campylobacter* effect of alternative antimicrobial compounds. V: 5th Central European Congress on Food, 19th - 22nd may 2010, Bratislava, Slovak Republic. *Book of abstracts and full papers*. Bratislava: Food Research Institute (FRI): = Výskumný ústav potravinársky, 2010, 6 str. [COBISS.SI-ID [3777144](#)]



SMOLE MOŽINA, Sonja, KLANČNIK, Anja, RASPOR, Peter. Izzivi raziskav mikroorganizmov v živilih in odmevnejši dosežki v slovenskih raziskavah = The research challenges and achievements of Slovenian researchers in food chain microorganisms. V: RASPOR, Peter (ur.), MATOS, Tadeja (ur.). *Mikrobiologija od včeraj za jutri : 50 let SMD, Ljubljana, 24. november 2010*, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 08). Ljubljana: Slovensko mikrobiološko društvo: Biotehniška fakulteta, 2010, str. 57-70. [COBISS.SI-ID [3845240](#)]

### **1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci**

SMOLE MOŽINA, Sonja, JERŠEK, Barbara, DEMŠAR, Lea, VIDRIH, Rajko, RASPOR, Peter. Dosežki sodelavcev živilstva na področju varnosti živil = Research achievements in the field of food safety. V: RASPOR, Peter (ur.), HOČEVAR, Ivica (ur.). *Živilstvo in prehrana včeraj, danes za jutri : 50 let študija živilske tehnologije : Ljubljana, 29. in 30. september 2011*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2011, str. 41-58. [COBISS.SI-ID [3961464](#)]

### **1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci**

LAKIĆ, Neda, BOŽIN, Biljana, SMOLE MOŽINA, Sonja. Potential use of oregano postdistillation plant waste material as a source of novel food additives and functional foods. V: NEDOVIĆ, Viktor (ur.). *Abstract book of 6th Central European Congress on Food : CEFood congress, Novi Sad, Serbia, 23-26 May, 2012*. Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012, str. 46. [COBISS.SI-ID [4094328](#)]

KOVAČ, Jasna, KLAUS, Anita, KOZARSKI, Maja, NIKŠIĆ, Miomir, RASPOR, Peter, SMOLE MOŽINA, Sonja. Antimicrobial activity of polysaccharides extracted from medicinal mushrooms on *Campylobacter jejuni* and *Staphylococcus aureus*. V: NEDOVIĆ, Viktor (ur.). *Abstract book of 6th Central European Congress on Food : CEFood congress, Novi Sad, Serbia, 23-26 May, 2012*. Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012, str. 184. [COBISS.SI-ID [4090232](#)]

JERŠEK, Barbara, ANDIĆ, Marijana, MARKOV, Ksenija, LAKIĆ, Neda, BOŽIN, Biljana, SMOLE MOŽINA, Sonja. Antifungal effect of essential oils on *Aspergillus westerdijkiae*, *A. ochraceus*, *A. flavus* and *Penicillium nordicum*. V: NEDOVIĆ, Viktor (ur.). *Abstract book of 6th Central European Congress on Food : CEFood congress, Novi Sad, Serbia, 23-26 May, 2012*. Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012, str. 262. [COBISS.SI-ID [4093560](#)]

TADIĆ, Đorđe, ČADEŽ, Neža, OTA, Ajda, BUTINAR, Bojan, TROŠT, Kajetan, PAJIN, Biljana, RASPOR, Peter, POKLAR ULRIH, Nataša, SMOLE MOŽINA, Sonja. Antimicrobial activity of phenolic extracts from olive leaves and grape skins and seeds - impact of encapsulation. V: NEDOVIĆ, Viktor (ur.). *Abstract book of 6th Central European Congress on Food : CEFood congress, Novi Sad, Serbia, 23-26 May, 2012*. Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012, str. 444. [COBISS.SI-ID [4094072](#)]

SMOLE MOŽINA, Sonja, TROŠT, Kajetan, JUG, Katja, PISKERNIK, Saša, TADIĆ, Đorđe, ČADEŽ, Neža, RASPOR, Peter, STERNAD LEMUT, Melita, MOZETIČ

VODOPIVEC, Branka. Antimicrobial phenolics from grape skins and seeds-by-products of Slovene wine industry. V: JANEŽIČ, Sandra (ur.), BENČINA, Mojca (ur.), RUPNIK, Maja (ur.), GRADIŠAR, Helena (ur.). 9th Congress of the Slovenian Biochemical Society [also] 5th Congress of the Slovenian Microbiological Society with International Participation [also] 3rd CEFORM (Central European Forum for Microbiology), Maribor, 12th - 15th October 2011. *Abstract book*. Maribor: Zavod za zdravstveno varstvo, 2011, str. 129, P3. [COBISS.SI-ID [3954808](#)]

TROŠT, Kajetan, MOZETIČ VODOPIVEC, Branka, STERNAD LEMUT, Melita, JUG, Katja, RASPOR, Peter, SMOLE MOŽINA, Sonja. Bioactive compounds of phenolic extracts from grape skins and seeds. V: SILVA, Cristina L. M. (ur.). 2nd International ISEKI\_Food Conference, August 31th - September 2nd, 2011, Milan, Italy. *Bridging training and research for industry and the wider community : ISEKI\_Food 2011 : [book of abstracts]*. Porto: Universidade Católica Portuguesa, Escola Superior de Biotecnologia, 2011, str. 181, P133. [COBISS.SI-ID [3943544](#)]

LAKIĆ, Neda, BOŽIN, Biljana, SMOLE MOŽINA, Sonja. Chemical composition, antioxidant, antibacterial activity of thyme essential oil and possible synergy of main compounds. V: OBRADOVIĆ, Dragojlo (ur.), RANIN, Lazar (ur.), RADULOVIĆ, Špiro (ur.). *Microbiologia Balkanica 2011 : proceedings*. Beograd = Belgrade: Udruženje mikrobiologa Srbije: = Serbian Society for Microbiology, 2011, str. [1]. [COBISS.SI-ID [3989624](#)]

ABRAMOVIČ, Helena, KUTIN, Tina, POKLAR ULRIH, Nataša, POLAK, Tomaž, SMOLE MOŽINA, Sonja, TERPINC, Petra. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from *Camelina sativa* seeds. V: 9th Euro Fed Lipid Congress, 18-21 September 2011, Rotterdam, The Netherlands. *Oils, fats and lipids for a healthy and sustainable world*. Frankfurt/Main: European Federation for the Science and Technology of Lipids, 2011, str. 322, OSP-009. [COBISS.SI-ID [3967608](#)]

RASPOR, Peter, SMOLE MOŽINA, Sonja. New technologies raise new microbiology problems and the search for new food safety solutions. V: Food Safety Day - 29 September 2010, Leatherhead, England. *Advances in food safety management*. Leatherhead: Leatherhead Food Research, 2010, str. [1]. <http://www.leatherheadfood.com/food-safety-day-2010>. [COBISS.SI-ID [3871864](#)]

KLANČNIK, Anja, PISKERNIK, Saša, KINČIČ, Anja, GORENC, Teja, KOROŠEC, Živa, GORNIK, Aleksandra, GRÖBLACHER, Barbara, KNAUDER, Elvira, SMOLE MOŽINA, Sonja, RASPOR, Peter, BUCAR, Franz, JERŠEK, Barbara. Antimicrobial activity of *Alpinia katsumadai* extract in food models. V: FRECE, Jadranka (ur.), KOS, Blaženka (ur.), MRŠA, Vladimir (ur.). Central European Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology, Malinska, Croatia, 22nd-25th September, 2010. *Power of microbes in industry and environment 2010 : programme and abstracts*. Zagreb: Croatian Microbiological Society, [2010], str. 36, OP 5. [COBISS.SI-ID [3812728](#)]

**Urednik**

Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Ljubljana, 27th and 28th September 2012, RASPOR, Peter (ur.), SMOLE MOŽINA, Sonja (ur.). *Biotechnology and microbiology for knowledge and benefit*, (Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, 09). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, 2012. XII, 420 str., ilustr. ISBN 978-961-6908-01-6. [COBISS.SI-ID [263124736](#)]

## **Mentor**

PETAN, Andreja. *Protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na antibiotsko odporne in občutljive seve bakterij rodov Campylobacter in Staphylococcus : diplomsko delo, univerzitetni študij = Antimicrobial activity of plant phenolic extracts against antibiotic resistant and sensitive Campylobacter and Staphylococcus spp. : graduation thesis, university studies*, (Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Diplomske naloge, 1468). Ljubljana: [A. Petan], 2012. XII, 57 f., [2] f. pril., graf. prikazi, tabele. [http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn\\_petan\\_andreja.pdf](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_petan_andreja.pdf) [COBISS.SI-ID [4089464](#)]

GORNIK, Aleksandra. *Protimikrobno in modulatorno delovanje izbranih rastlinskih ekstraktov in čistih fenolnih spojin pri bakterijah Campylobacter jejuni : diplomsko delo, univerzitetni študij = Antimicrobial and modulatory activity of selected plant extracts and pure phenolic compounds against Campylobacter jejuni : graduation thesis, university studies*, (Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, Ljubljana, Diplomske naloge, 473). Ljubljana: [A. Gornik], 2011. XIV, 73 f., [1] f. pril., graf. prikazi, tabele. [COBISS.SI-ID [3916664](#)]

KESER, Bojana. *Protimikrobno delovanje izvlečkov listja in grozdnih kožic vinske trte (Vitis vinifera L.) na patogene bakterije živil : diplomsko delo, univerzitetni študij = Antimicrobial activity of extracts from leaves and grape skins of grapevine varieties (Vitis vinifera L.) against food-borne pathogens : graduation thesis, university studies*, (Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, Diplomske naloge, 1403). Ljubljana: [B. Keser], 2010. XII, 63 f., graf. prikazi, tabele. [http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn\\_keser\\_bojana.pdf](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_keser_bojana.pdf) [COBISS.SI-ID [3859064](#)]

**Dodatni prilogi: Kopiji poročil o rezultatih bilateralnih izmenjav, povezanih s projektom CRP V4-1079, raziskovalk Daniele Skroza in Nede Lakič**

*Ljubljana, 18.11.2010.g.*

**IZVJEŠTAJ O RADU**

U sklopu programa ERASMUS kao stipendist boravim na Biotehničkom fakultetu Univerze u Ljubljani (Oddelek za živilstvo) na stručnom usavršavanju u Laboratoriju za živilsko mikrobiologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Sonja Smole-Možina i Laboratoriju za proteomiku kod doc. dr. sc. Polona Jamnik.

U Laboratoriju za mikrobiologiju hrane mikrobiološkom metodom mikrodilucije odredila sam antimikrobnu aktivnost (MIC vrijednost – minimalnu inhibitornu koncentraciju) sedam biljnih ekstrakata pripremljenih na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu. Testirani su uzorci kadulje iz 4 godišnja doba: Kadulja II mjesec; Kadulja V mjesec; Kadulja VIII mjesec i Kadulja IX mjesec, te crnike iz 3 godišnja doba: Crnika II mjesec; Crnika V mjesec i Crnika VIII mjesec. Navedenim alkoholnim ekstraktima testirala sam antimikrobno djelovanje na dvije gram pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) i dvije gram negativne (*Escherichia coli*, *Salmonella* liverpool) bakterije. Dobiveni pozitivni rezultati i niske MIC vrijednosti, ukazuju na jako dobra antimikrobna svojstva ispitivanih biljnih ekstrakata. MIC vrijednosti, kao i udio fenola u analiziranim biljnim ekstraktima prikazani su u *Tablici 1* i *Tablici 2* u prilogu.

Osim biljnih ekstrakata, testiram i antimikrobna svojstva čistih fenolnih spojeva za koje je ranijim analizama utvrđeno da su u značajnim koncentracijama prisutni u ekstraktima kadulje i crnike, kao i drugim biljnim ekstraktima (ljekovito bilje, pokožice, lišće vinove loze). Testirane otopine čistih fenolnih spojeva, pripravljene s 80 %-tnim etanolom u molarnim koncentracijama, uključuju: galnu kiselinu, kava kiselinu, katehin, epikatehin, kvercetin, kampferol, resveratrol, luteolin, vitamin C i BHT. Navedenim otopinama čistih fenolnih spojeva testirala sam antimikrobno djelovanje na dvije gram pozitivne (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) i dvije gram negativne (*Escherichia coli*, *Salmonella*) bakterije, pri čemu sam dobila pozitivne rezultate.

Osim antimikrobne aktivnosti čistih fenolnih spojeva testirala sam i njihov učinka u kombinaciji (prvenstveno resveratrola u kombinaciji s drugim fenolnim spojevima) na odabrane kulture bakterija, pri čemu sam dobila pozitivne rezultate. Rezultati MIC

vrijednosti do sada testiranih fenolnih spojeva kao i kombinacija prikazani su u *Tablici 3* i *Tablici 4* u prilogu.

U Laboratoriju za proteomiku metodom određivanja intracelularne oksidacije stanica kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*) određujem intracelularnu aktivnost fenolnih spojeva. Preliminarno istraživanje urađeno u lipnju, prilikom mog posjeta preko bilateralnog projekta, ukazala su da quercetin i resveratrol imaju potencijalno pozitivno djelovanje. Do sad je analiziran quercetin i dobiveni rezultati ukazuju na njegovo pozitivno djelovanje. Obzirom da je metoda modificirana, novi rezultati se ne mogu uspoređivati s rezultatima iz lipnja, stoga se dobiveni rezultati mogu smatrati preliminarnim dok se ne uradi dovoljan broj ponavljanja.

Plan daljnjeg istraživanja je testirati i ispitati antimikrobno i oksidativno djelovanje ostalih fenolnih spojeva kao i njihovih kombinacija.

Danijela Skroza, dipl. ing.

Zavod za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju

Kemijsko-tehnološki fakultet

Sveučilište u Splitu

Tel.: 00 385 021 558 217

E-mail: danci@ktf-split.hr

**Tablica 1.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata kadulje iz 4 godišnja doba izražena kao MIC vrijednost u g GAE / L ekstrakta. (UF – ukupni fenoli)

Uzorak	UF g GAE / L ekstrakta	Gram +		Gram-	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
Kadulja II	4,65	0,4645	0,2322	0,9289	0,9289
Kadulja V	5,16	0,0645	0,0161	0,5158	0,5158
Kadulja VIII	4,34	0,0543	0,0271	0,8685	0,4343
Kadulja XI	4,96	0,1240	0,0620	0,9920	0,4960

**Tablica 2.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata crnike iz 3 godišnja doba izražena kao MIC vrijednost u g GAE / L ekstrakta. (UF – ukupni fenoli)

Uzorak	UF g GAE / L ekstrakta	Gram +		Gram-	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
Crnika II	6,72	0,3362	0,1681	0,6724	1,3447
Crnika V	4,96	0,4956	0,1239	0,4956	0,4956
Crnika VIII	6,83	0,3414	0,1707	0,6828	0,6828

**Tablica 2.** Antimikrobna aktivnost čistih fenolnih spojeva izražena kao MIC vrijednost u  $\mu\text{M}$ .

Uzorak	Gram +		Gram-	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
<b>Galna kiselina</b>	1250	1250	1250	1250
<b>Kava kiselina</b>	1250	1250	625	625
<b>Katehin</b>	1250	1250	625	625
<b>Epikatehin</b>	2500	1250	2500	2500
<b>Quercetin</b>	312,5	625	312,5	312,5
<b>Kampferol</b>	312,5	312,5	1250	1250
<b>Resveratrol</b>	312,5	312,5	625	625
<b>Luteolin</b>	156,3	312,5	312,5	312,5
<b>Vitamin C</b>	2500	1250	2500	2500
<b>BHT</b>	2500	1250	2500	2500

**Tablica 3.** Antimikrobna aktivnost čistih fenolnih spojeva u kombinaciji s resveratrolom izražena kao MIC vrijednost u  $\mu\text{M}$ .

Uzorak	Gram +		Gram-	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
<b>Resveratrol+Galna kiselina</b>	625+625	625+625	625+625	625+625
<b>Resveratrol+Kava kiselina</b>	625+625	625+625	625+625	625+625
<b>Resveratrol+Katehin</b>	625+625	625+625	625+625	625+625
<b>Resveratrol+Epikatehin</b>	625+625	625+625	1250+1250	1250+1250
<b>Resveratrol+Quercetin</b>	312,5+156,3	312,5+156,3	312,5+156,3	312,5+156,3
<b>Resveratrol+Kampferol</b>	312,5+156,3	312,5+156,3	625+312,5	625+312,5
<b>Resveratrol+Luteolin</b>	312,5+156,3	625+312,5	625+312,5	625+312,5
<b>Resveratrol+Vitamin C</b>	625+625	625+625	625+625	625+625
<b>Resveratrol+BHT</b>	625+625	625+625	625+625	625+625

\*\*\*Testirani spojevi su pomiješani u omjeru 1:1 i u tablici su koncentracije spojeva bez razrjeđenja!

Neda Lakić  
Pharmacist, Teaching Assistant on Pharmacognosy  
Department of Pharmacy  
Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Serbia

**Subject: Report on experimental work done within the bilateral project BI-SR/SLO-0043, 31. 01. – 11. 03. 2011.**

As a postgraduate student I participated in the bilateral project 'Exploitation of waste plant material after hydrodistillation of essential oils'. In agreement with my mentor, professor assistant Biljana Božin, PhD I visited Department of biotechnology, microbiology and food safety, Faculty of Biotechnology, University of Ljubljana where I did experimental work under the tuition of prof. dr Sonja Smole Možina, between 31. 01. – 11. 03. 2011.

Experimental work in laboratory for food microbiology consisted of:

- preparation of extracts of waste plant material after hydrodistillation of essential oils (thyme, lemon balm, peppermint (6 different extracts for each plant) and oregano with 4 different extracts) for microbiological analysis
- determination of minimal inhibitory concentration (MIC) of examined extracts using broth microdilution method with INT as an indicator
- determination of MIC of essential oils of thyme and oregano using broth microdilution method with INT as an indicator
- synergy testing between thymol and carvacrol using checkerboard method
- synergy testing between essential oils of thyme and oregano using checkerboard method
- determination of bacterial concentration (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*) in inoculum using drop plate method

Experiments were conducted in laboratory for food microbiology on weekdays. During the exchange I stayed in Dom Podiplomcev Ljubljana (9 Gosarjeva Street, 1000 Ljubljana, Slovenia)

On 11<sup>th</sup> of March I finished laboratory work and concluded my stay in Ljubljana.

Ljubljana, 11 March 2011.

Neda Lakić

## ANTIMIKROBNO DELOVANJE EKSTRAKATA OTPADNOG MATERIJALA

Tip ekstrakta	<i>Staphylococcus aureus</i> MIC (mg UF/ml)	<i>Salmonella liverpool</i> MIC (mg UF/ml)	<i>Escherichia coli</i> MIC (mg UF/ml)	<i>Bacillus cereus</i> MIC (mg UF/ml)
<b><i>Timijan</i></b>				
T1	0,28	0,82	0,41	0,41
T2	0,34	0,96	1,37	3,8
T3	0,125	0,37	0,37	0,09
T4	0,2	0,4	0,4	0,1
T5	0,26	0,36	0,53	0,18
T6	0,34	0,49	0,69	0,12
<b><i>Menta</i></b>				
N1	0,27	0,28	0,57	0,79
N2	0,37	0,37	0,74	1,49
N3	0,18	0,37	0,44	0,18
N4	0,4	0,56	0,4	0,28
N5	0,14	0,41	0,21	0,29
N6	0,66	1,32	0,46	0,66
<b><i>Melisa</i></b>				
M1	0,57	0,57	0,57	0,57
M2	0,46	0,64	0,64	1,28
M3	0,22	0,22	0,22	0,3
M4	0,04	0,21	0,21	0,21
M5	0,53	0,74	0,53	0,67
M6	0,44	0,78	0,57	0,57
<b><i>Origano</i> (mg s.e./ml)</b>				
O1	0,68	3,91	0,68	0,68
O2	1,95	5,47	3,91	3,91
O3	0,97	3,91	1,95	1,36
O4	1,95	3,91	1,95	0,68



**REZULTATI TESTIRANJA SINERGISTIČKOG DELOVANJA ETARSKOG  
ULJA TIMIJANA I ORIGANA**

<b>Soj bakterija</b>	<b>MICt (<math>\mu</math>l/ml)</b>	<b>MICt (komb.) (<math>\mu</math>l/ml)</b>	<b>MICo (<math>\mu</math>l/ml)</b>	<b>MICo (komb.) (<math>\mu</math>l/ml)</b>	<b>FICt</b>	<b>FICo</b>	<b>FIC indeks</b>
<i>S.aureus</i>	0,6	0,3	0,5	0,25	0,5	0,5	<b>1</b>
<i>Salmonella</i>	0,8	1	0,2	0,5	0,25	0,5	<b>0,75</b>
<i>E. coli</i>	1,15	0,57	1,25	0,31	0,5	0,25	<b>0,75</b>
<i>B. cereus</i>	1	0,25	1	0,5	0,25	0,5	<b>0,75</b>

**REZULTATI TESTIRANJA SINERGISTIČKOG DELOVANJA TIMOLA I  
KARVAKROLA**

<b>Soj bakterija</b>	<b>MICt (<math>\mu</math>g/ml)</b>	<b>MICt (komb.) (<math>\mu</math>g/ml)</b>	<b>MICk (<math>\mu</math>g/ml)</b>	<b>MICk (komb.) (<math>\mu</math>g/ml)</b>	<b>FICt</b>	<b>FICk</b>	<b>FIC indeks</b>
<i>S.aureus</i>	250	62,5	125	62,5	0,25	0,5	<b>0,75</b>
<i>Salmonella</i>	250	125	125	31,25	0,5	0,25	<b>0,75</b>
<i>E. coli</i>	250	62,5	250	125	0,25	0,5	<b>0,75</b>
<i>B. cereus</i>	250	125	125	31,25	0,5	0,25	<b>0,75</b>

**Određivanje koncentracije bakterijskih ćelija u inokulumu**

<b>Soj bakterija</b>	<b>CFU/ml</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>8,0E+06</b>
<i>Salmonella</i>	<b>1,9E+07</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>1,58E+07</b>
<i>Bacillus cereus</i>	<b>1,18E+06</b>