

Antimikrobni učinak smjese ekstrakta lista kupine i odabranih fenolnih spojeva na patogene bakterije

Krivić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:676425>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ANTIMIKROBNI UČINAK SMJESE EKSTRAKTA LISTA KUPINE I
ODABRANIH FENOLNIH SPOJEVA NA PATOGENE BAKTERIJE**

DIPLOMSKI RAD

IVONA KRIVIĆ

Matični broj: 45

Split, listopad 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

**ANTIMIKROBNI UČINAK SMJESE EKSTRAKTA LISTA KUPINE I
ODABRANIH FENOLNIH SPOJEVA NA PATOGENE BAKTERIJE**

DIPLOMSKI RAD

IVONA KRIVIĆ

Matični broj: 45

Split, listopad 2022.

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

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BLACKBERRY LEAF EXTRACT
AND SELECTED PHENOLICS MIXTURES ON PATHOGENIC
BACTERIA**

DIPLOMA THESIS

IVONA KRIVIĆ

Parent number: 45

Split, October 2022.

Sveučilište u Splitu
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada je prihvaćena na 25. izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta održanoj 25. ožujka 2022. godine.

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza

Pomoć pri izradi: Mag. ing. agr. Martina Čagalj, doktorand

ANTIMIKROBNI UČINAK SMJESE EKSTRAKTA LISTA KUPINE I ODABRANIH FENOLNIH SPOJEVA NA PATOGENE BAKTERIJE

Ivona Krivić, 45

Sažetak: Sve je veća zabrinutost potrošača oko sigurnosti hrane zbog povećanja broja oboljenja uzrokovanih patogenim mikroorganizmima. Brojna znanstvena istraživanja ukazuju na mogućnost korištenja nusproizvoda za obogaćivanje drugih proizvoda ili kao zamjena za sintetska antimikrobna sredstva. Antioksidativno i antimikrobno djelovanje bobičastog voća je već potvrđeno, a navedeni učinci se uglavnom pripisuju njihovom fenolnom sastavu, odnosno spojevima poput flavonoida i antocijana, a poznato je da listovi kupine isto imaju zanimljiv kemijski profil kao i snažnu biološku aktivnost. U ovom radu proučavano je antimikrobno djelovanje ekstrakta lista kupine u kombinaciji s odabranim fenolnim spojevima (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) na patogene mikroorganizme: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Salmonella enteritidis*. Analiza je provedena korištenjem dviju različitih metoda: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimum inhibitory concentration*, MIC) i metodom određivanja minimalne baktericidne koncentracije (engl. *Minimum bactericidal concentration*, MBC). Interakcijski antimikrobni učinak između ekstrakta i spoja u smjesi određen je izračunavanjem frakcijskog inhibitornog koncentracijskog indeksa (eng. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, FICI). Niske MIC vrijednosti (0,63 mg/mL) i dobro baktericidno djelovanje (MBC 1,25 mg/mL) potvrđeno je za ekstrakt lista kupine prema *S. aureus*, dok su vrijednosti MIC za ostale ispitivane bakterije bile 5 mg/mL. Sve binarne smjese ekstrakta lišća kupine i odabranih fenolnih spojeva pokazale su vrlo dobru antimikrobnu aktivnost i uglavnom su ukazivale na aditivno djelovanje sastojaka smjese. Samo je smjesa ekstrakta lista kupine i oleuropeina pokazala sinergistički učinak prema *L. monocytogenes* (MIC=1,25+0,31 mg/L, te FICI 0,5).

Ključne riječi: ekstrakt lista kupine, antimikrobna aktivnost, fenoli, patogeni mikroorganizmi, MIC, MBC, FICI

Rad sadrži: 29 stranica, 6 slika, 7 tablica, 48 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 25. listopada 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Food Technology

Scientific area: Biotechnical science

Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, extraordinary session no. 25. held March 25th, 2022.

Mentor: Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

Technical assistance: Ph. D. Student, Martina Čagalj, M. Sc. in Marine Fishery

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BLACKBERRY LEAF EXTRACT AND SELECTED PHENOLICS MIXTURES ON PATHOGENIC BACTERIA

Ivona Krivić, 45

Abstract: Due to the increasing number of diseases caused by pathogenic microorganisms, consumers are becoming increasingly concerned about food safety. Numerous scientific studies point to the possibility of using by-products to fortify foods or their use as substitutes for synthetic antimicrobials. The antioxidant and antimicrobial effects of berries have been already confirmed and are primarily related to their phenolic content, mainly compounds such as flavonoids and anthocyanins, blackberry leaves have interesting chemical profile and strong biological activity. In this work, the antimicrobial activity of blackberry leaf extract in combination with selected phenolic compounds (vanillic acid, catechin, rutin, apigenin and oleuropein) against foodborne pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella enteritidis* was studied. Analysis was performed using two different methods: minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The interaction between extract and compounds in terms of antibacterial activity was determined by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). The low MIC (0.63 mg/mL) and good bactericidal activity (MBC 1.25 mg/mL) were confirmed for the blackberry leaf extract against *S. aureus*, while the MIC values for the other tested bacteria were 5 mg/mL. All binary mixtures of blackberry leaf extract and selected phenolic compounds showed very good antimicrobial activity and mostly indicated additive activity. Only mixture of blackberry leaf extract and oleuropein had a synergistic effect against *L. monocytogenes* (MIC=1.25+0.31 mg/L, and FICI 0.5).

Keywords: blackberry leaf extract, antimicrobial activity, phenolics, foodborne pathogens, MIC, MBC, FICI

Thesis contains: 29 pages, 6 figures, 7 tables, 48 references

Original in: Croatian

Defence committee:

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

Defence date: 25th October 2022.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Danijele Skroza u razdoblju od siječnja do rujna 2022. godine.

Ovaj rad je sufinanciran sredstvima projekta BioProMedFood (Reference Number:1467; 2019-SECTION2-4).

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Danijeli Skroza na uloženom trudu, brojnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem mag. ing. agr. Martini Čagalj na pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela rada te povjerenstvu na izdvojenom vremenu za pregled rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada bio je:

- Ispitati antimikrobnu aktivnost smjese ekstrakta lista kupine i odabranih fenolnih spojeva (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) na najčešće patogene mikroorganizme: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Salmonella enteritidis*.
- Antimikrobnu aktivnost ispitati metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metodom minimalne baktericidne koncentracije (MBC).
- Frakcionalni inhibitorni koncentracijski indeks (FICI faktor) iskoristiti za opis interakcijskog učinka ekstrakta lista kupine i fenolnog spoja u smjesi.
- Na osnovu dobivenih rezultata donijeti zaključke o združenom antimikrobnom učinku ekstrakta lista kupine i odabranih fenolnih spojeva.

SAŽETAK

Sve je veća zabrinutost potrošača oko sigurnosti hrane zbog povećanja broja oboljenja uzrokovanih patogenim mikroorganizmima. Brojna znanstvena istraživanja ukazuju na mogućnost korištenja nusproizvoda za obogaćivanje drugih proizvoda ili kao zamjena za sintetska antimikrobna sredstva. Antioksidativno i antimikrobno djelovanje bobičastog voća je već potvrđeno, a navedeni učinci se uglavnom pripisuju njihovom fenolnom sastavu, odnosno spojevima poput flavonoida i antocijana, a poznato je da listovi kupine isto imaju zanimljiv kemijski profil kao i snažnu biološku aktivnost. U ovom radu proučavano je antimikrobno djelovanje ekstrakta lista kupine u kombinaciji s odabranim fenolnim spojevima (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) na patogene mikroorganizme: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Salmonella enteritidis*. Analiza je provedena korištenjem dviju različitih metoda: metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimum inhibitory concentration*, MIC) i metodom određivanja minimalne baktericidne koncentracije (engl. *Minimum bactericidal concentration*, MBC). Interakcijski antimikrobni učinak između ekstrakta i spoja u smjesi određen je izračunavanjem frakcijskog inhibitornog koncentracijskog indeksa (eng. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, FICI). Niske MIC vrijednosti (0,63 mg/mL) i dobro baktericidno djelovanje (MBC 1,25 mg/mL) potvrđeno je za ekstrakt lista kupine prema *S. aureus*, dok su vrijednosti MIC za ostale ispitivane bakterije bile 5 mg/mL. Sve binarne smjese ekstrakta lišća kupine i odabranih fenolnih spojeva pokazale su vrlo dobru antimikrobnu aktivnost i uglavnom su ukazivale na aditivno djelovanje sastojaka smjese. Samo je smjesa ekstrakta lista kupine i oleuropeina pokazala sinergistički učinak prema *L. monocytogenes* (MIC=1,25+0,31 mg/L, te FICI 0,5).

Ključne riječi: ekstrakt lista kupine, antimikrobna aktivnost, fenoli, patogeni mikroorganizmi, MIC, MBC, FICI

SUMMARY

Due to the increasing number of diseases caused by pathogenic microorganisms, consumers are becoming increasingly concerned about food safety. Numerous scientific studies point to the possibility of using by-products to fortify foods or their use as substitutes for synthetic antimicrobials. The antioxidant and antimicrobial effects of berries have been already confirmed and are primarily related to their phenolic content, mainly compounds such as flavonoids and anthocyanins, blackberry leaves have interesting chemical profile and strong biological activity. In this work, the antimicrobial activity of blackberry leaf extract in combination with selected phenolic compounds (vanillic acid, catechin, rutin, apigenin and oleuropein) against foodborne pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella enteitidis* was studied. Analysis was performed using two different methods: minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The interaction between extract and compounds in terms of antibacterial activity was determined by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). The low MIC (0.63 mg/mL) and good bactericidal activity (MBC 1.25 mg/mL) were confirmed for the blackberry leaf extract against *S. aureus*, while the MIC values for the other tested bacteria were 5 mg/mL. All binary mixtures of blackberry leaf extract and selected phenolic compounds showed very good antimicrobial activity and mostly indicated additive activity. Only mixture of blackberry leaf extract and oleuropein had a synergistic effect against *L. monocytogenes* (MIC=1.25+0.31 mg/L, and FICI 0.5).

Keywords: blackberry leaf extract, antimicrobial activity, phenolics, foodborne pathogens, MIC, MBC, FICI

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Kupina.....	2
1.1.1. Porodica Rosaceae	2
1.1.2. Botaničko podrijetlo kupine.....	2
1.1.3. Morfologija kupine	3
1.1.4. Kemijski sastav kupine	4
1.1.4.1. Glavne kemijske komponente.....	5
1.1.4.2. Fenolni spojevi u kupini	6
1.1.5. Kemijski sastav lista kupine	8
1.1.5.1. Ljekovita svojstva lista kupine	10
2. EKSPERIMENTALNI DIO	11
2.1. Biljni materijal i odabrani fenolni spojevi	11
2.2. Reagensi i uređaji.....	12
2.3. Bakterijske kulture	12
2.4. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti	12
2.4.1. Priprema i kontrola inokuluma	12
2.4.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC metoda) ...	13
2.4.3. Metoda određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC)	15
2.4.4. Antimikrobna interakcija odabranih mješavina ekstrakta i fenola	16
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4. ZAKLJUČAK.....	23
5. LITERATURA	24

UVOD

Bobičasto voće (aronija, borovnica, brusnica, kupina, malina, ribizl) predstavlja bogat izvor vrijednih nutrijenata i farmakološki aktivnih tvari. Svaka bobičasta vrsta je iznimno bogata hranjivim tvarima, vitaminima, mineralima, prehranbenim vlaknima te drugim biološki važnim spojevima, od kojih se posebno ističu fenolni spojevi, kao što su fenolne kiseline i flavonoidi. Obzirom na izrazito bogat sastav bobičastog voća, dokazani su i njegovi pozitivni učinci na imunološki sustav, kroz antioksidativno, antimikrobno, protuupalno, antimutageno i antikancerogeno djelovanje.

Kupina (*Rubus fruticosus* L.) je biljka koja pripada porodici ruža (Rosaceae) i spada u kozmopolitske biljke, odnosno u biljke koje uspijevaju na svim kontinentima. Smatra se da potječe iz Armenije, međutim danas je rasprostranjena po cijelom svijetu. Upotreba ploda i lista kupine u tradicionalnoj medicini je također poznata od davnina.

U Kini se kupina tradicionalno koristila za liječenje infekcija urinarnog sustava te bolesti bubrega, a stari Grci su je upotrebljavali za liječenje bolesti kostiju. U narodnoj medicini je posebno istaknuta upotreba listova kupine, koji su se koristili kao lijek protiv dijareje, hemoroida, upale crijeva, anemije, za zarastanje rana, kao antiseptik i dezinfekcijsko sredstvo.

Novije znanstvene studije ukazuju na mogućnost iskorištenja različitih nusproizvoda prehrambene industrije kao antimikrobnih i antioksidacijskih sredstava, pa tako i list kupine postaje sve češće predmet brojnih istraživanja. List kupine predstavlja dobar izvor tanina, flavonoida, triterpena, organskih kiselina, vitamina C te minerala.

Zbog navedenih svojstava lista kupine, cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost smjese ekstrakta lista kupine i fenolnih spojeva (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) na odabrane patogene mikroorganizme (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria. monocytog*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Salmonella enteritidis*).

1. OPĆI DIO

1.1. Kupina

1.1.1. Porodica Rosaceae

Kupina (*Rubus fruticosus* L.) je biljka koja pripada porodici ruža (Rosaceae). To je jedna od najraznovrsnijih i najrasprostranjenijih biljnih porodica, koju čini 2950 biljnih vrsta podijeljenih u 91 rod. Rod *Rubus* je najbrojniji rod ove porodice, a njegov naziv potječe od latinske riječi *ruber* (crven)obzirom da su plodovi više vrsta unutar ovog roda crvene boje (1).

1.1.2. Botaničko podrijetlo kupine

Kao što je ranije spomenuto, vjeruje se da kupina potječe iz Armenije. Postoji oko 300 različitih sorti kupina, a najznačajnije su: *Wilsonova rana*, *Smoothstem*, *Black Satin*, *Thorenfree*, *Thornless Evergreen*, *Thornless Logan*, *Ebony King*, *Eldorado*, *Bailey*, *Himalaya*, *Darow* i *Boysen* (2,3).

Ministarstvo poljoprivrede Sjedinjenih Država (United States Department of Agriculture, USDA) navodi sljedeću botaničku klasifikaciju kupine (4):

- Carstvo: *Plantae* (biljke)
- Podcarstvo: *Tracheobionta* (cijevnjače ili vaskularne biljke)
- Nadkoljeno: *Spermatophyta* (sjemenjače)
- Koljeno: *Magnoliophyta* (cvjetnice)
- Razred: *Magnoliopsida* (dvosupnice)
- Podrazred: *Rosidae*
- Red: *Rosales*
- Porodica: *Rosaceae* (porodica ruža)
- Rod: *Rubus* L.

Vrsta: *Rubus fruticosus* L. (kupina)

1.1.3. Morfologija kupine

Kupina je poluležeća do gotovo uspravna višegodišnja listopadna biljka koja može narasti i do 3 m. Stabljika kupine je drvenasti grm, zapleten, može biti bodljikav ili imati dlačice po sebi. Listovi kupine su prstasto složeni od pet listića koji rastu iz osnovne lisne drške. Na licu su tamno-zeleni i glatki, a na naličju svijetlo-zeleni prekriveni dlačicama. Cvijet kupine sastoji se od pet blijedo-rozih latica promjera 2-3 cm. Nakon opadanja latica iz cvijeta se razvija plod, odnosno nabrana bobica. Plod je u početku sitan i zelene boje, a poslije postaje sve veći i mijenja boju preko crvene do konačne crne, ovisno o prirodnim pigmentima prisutnim u samom plodu. Unutar ploda nalaze se sitne okrugle sjemenke, svijetlo do tamno-smeđe boje. Sjemenke su uglavnom nepravilnog oblika s malim jamicama, a promjer im je 2-3 mm (2,5).



Slika 1. Kupina(*Rubus fruticosus* L.) (1)

1.1.4. Kemijski sastav kupine

Kupina je bogat izvor ugljikohidrata, vitamina, minerala, fenolnih spojeva i prehrambenih vlakana. Kemijski sastav plodova kupine ovisi o sorti, podneblju, agrotehničkim mjerama, stupnju zrelosti te o samom načinu berbe, transporta i čuvanja plodova (1).

Tablica 1. Kemijski sastav kupine izražen na 100 g ploda (2)

KOMPONENTA	HRANJIVA VRIJEDNOST
Energija	43 kcal
Voda	88,20 g
Ugljikohidrati	9,61 g
Masti	0,49 g
Proteini	1,39 g
Vlakna	5,30 g
Kolesterol	0,00 mg
Folati	25,00 µg
Piridoksin	0,03 mg
Niacin	0,65 mg
Pantotenska kiselina	0,28 mg
Tiamin	0,02 mg
Vitamin C	21,00 mg
Vitamin A	11,00 µg
Vitamin K	19,80 µg
Vitamin E	1,17 mg
Kalij	162,00 mg
Kalcij	29,00 mg
Natrij	1,00 mg
Magnezij	20,00 mg
Bakar	0,17 mg
Željezo	0,62 mg
Cink	0,53 mg
Mangan	0,65 mg
Selen	0,40 mg
α -karoten	0,00 mg
β -karoten	0,13 mg
Lutein - zeaksantin	0,12 mg

U tablici 1 prikazan je kemijski sastav kupine izražen na 100 g ploda. Najveći udio u plodu zauzima voda i to čak 88%. U tablici je vidljivo da kupina ima malu energetska vrijednost, nizak udio masti, a bogata je i proteinima (2).

1.1.4.1. Glavne kemijske komponente

Ugljikohidrati i organske kiseline su najznačajnije komponente koje sudjeluju u stvaranju okusa kupine. Od ugljikohidrata u plodu kupine ističu se glukoza, fruktoza i saharoza, a ponekad u malim količinama sorbitol. Sorbitol je šećerni alkohol i uglavnom potječe od nezrelih plodova ili zbog enzimske obrade kupina jer nije pronađen u zrelih plodovima. Opor okus kupini daju organske kiseline, od kojih se ističu askorbinska kiselina (vitamin C), limunska, izocitrična, jabučna, fumarna i jantarna kiselina. Famiani i Walker (6) pratili su promjene primarnih metabolita kupine tijekom zrenja i dokazano je da se povećava udio suhe tvari, a smanjuje titracijska kiselost.

Kupina je bogat izvor vitamina i minerala. Od vitamina ističu se vitamin C i K. Sadrži također vitamine B skupine, kao što su folati (vitamin B9), piridoksin (vitamin B6), niacin (vitamin B3), pantotenska kiselina (vitamin B5) i tiamin (vitamin B1). Najzastupljeniji mineral u kupini je kalij, a slijede ga kalcij, natrij, magnezij, bakar, željezo, cink, mangan i selen (6).

Od ostalih tvari u kupini ističu se karotenoidi, proteini, prehrambena vlakna i spojevi arome. Najznačajniji karotenoidi u kupini su lutein, β -karoten, zeaksantin i β -kriptoksantin (6).

Aroma predstavlja kombiniranu percepciju mirisa i okusa, gdje su za okus odgovorne nehlapljive tvari, a za miris hlapljive. Utvrđeno je da su glavni aromatski spojevi kupine furani, odnosno furfural i njegovi derivati. Među furfuralima je najzastupljeniji 5-hidroksimetilfurfural (79,7 do 96,1%). Drugi važni spojevi koji sudjeluju u formiranju arome kupine su 3,5-dihidroksi-6-metil-2,3-dihidropiran-4-on (5,7-9,8%), 3,4-dimetoksialilbenzen, heptan-2-ol (43,06%), *p*-cimen-8-ol (3,72%), heptan-2-on (3,32%), heksan-1-ol (3,05%), 4-terpineol (2,38%), pulegon (2,05%) i oktan-1-ol (1,83%) (3,6).

1.1.4.2. Fenolni spojevi u kupini

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti biljaka te predstavljaju jednu od najbrojnijih i najprisutnijih skupina spojeva, tj. fitokemikalija. Imaju različite uloge u biljci, kao što su na primjer mehanička potpora, zaštita od štetnog UV zračenja, privlačenje oprašivača, zaštita od prekomjernog gubitka vode, sudjeluju u različitim obrambenim reakcijama i sl. (7). Podjela fenola na osnovi kemijske strukture aglikona je na fenolne kiseline, flavonoide, polifenolne amide i ostale polifenole. Flavonoidi se dijele na flavonole, flavanole i ostale flavonoide, gdje spadaju flavoni, antocijani i flavanoni (3,8).

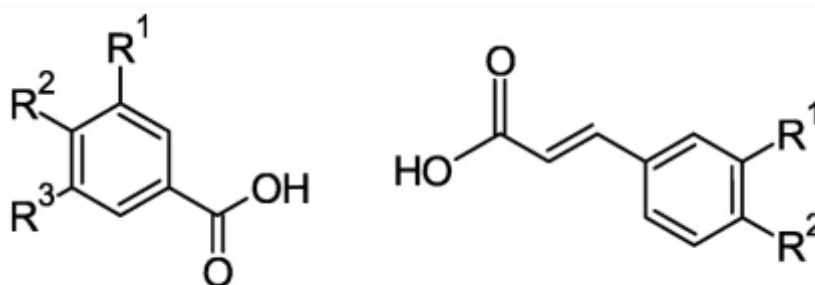
Kupina sadrži od 77 do 820 mg fenolnih spojeva na 100 g voća (1), od kojih su najzastupljeniji antocijani (28-366 mg na 100 g ploda), odgovorni za tamno-plavu do crnu boju kupine (6). U prirodi se uvijek javljaju u obliku glikozida čijom hidrolizom nastaje antocijanidin (aglikon) i šećerna komponenta. Postoje vrste koje sadrže manji udio antocijana od navedenog i plodovi su im bijele do žute boje, a to su npr. Snowbank (*Rubus allegheniensis*) ili Clark Gold (*Rubus trivalis*) (6).

Kupine uglavnom sadrže ne-acilirane antocijane, a najznačajniji su cijanidin-glukozid, cijanidin-rutinozid, cijanidin-ksilozid, cijanidin-malonilglukozid i cijanidin-dioksalilglukozid. Najzastupljeniji je cijanidin-glukozid kojeg kupine sadrže u koncentraciji 44 do 95%, ovisno o sorti i genotipu (6).

Fenolni monomeri pronađeni u plodu kupine uključuju fenolne kiseline: hidroksibenzojeve kiseline (elaginska kiselina, galna kiselina) i hidroksicimetne kiseline (esteri *p*-kumarinske kiseline, kava kiselina i njeni esteri, poput neoklorogenske kiseline, ferulinska kiselina i njeni esteri) (6).

Fenolne kiseline su najvažnija skupina neflavonoida u voću i povrću. One sadrže fenolni prsten supstituiran jednom karboksilnom grupom i jednom ili više hidroksilnih (OH) grupa. Na slici 2 prikazane su dvije važne vrste fenolnih kiselina: hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, koje su izvedene iz nefenolnih molekula benzojeve, odnosno cimetne kiseline (9,10). Hidroksibenzojeve kiseline (kostur C6-C1) se rijetko nalaze u slobodnom obliku, uglavnom su povezane s organskim kiselinama (vinska, maleinska) ili sa strukturnim komponentama biljke (celuloza, protein ili lignin).

U derivate hidroksibenzojeve kiseline spadaju hidroksibenzojevi aldehidi, kao što je vanilin (izveden iz vanilinske kiseline). Vanilinska kiselina je monohidroksibenzojeva kiselina, koja na trećem atomu ugljika sadrži metoksi skupinu, a na četvrtom OH skupinu (11).



Slika 2. Struktura hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (12)

Flavonoidi čine gotovo dvije trećine ukupnih fenolnih spojeva u voću i povrću. To su spojevi male molekulske mase, koji se sastoje od 15 atoma ugljika raspoređenih u obliku difenolpropanskog kostura (C₆-C₃-C₆) (13). Pored antocijana kupina sadrži i flavanole, flavonoli i flavan-3-oli (1,14).

Kupina sadrži 10,20-16,02 mg flavonola na 100 g voća (3). Flavonoli su skupina flavonoida koji imaju tri C atoma supstituirani to na položajima 4-karbonil, 3-hidroksilna grupa, 2,3-dvostruka veza (15). Najčešći flavonoli su kempferol, kvercetin i miricetin (16). Smatraju se jednim od najboljih antioksidanasa jer hidroksilna skupina na položaju 3 povećava stabilnost flavonoidnog radikala nastalog nakon što je spoj djelovao kao *hvatač* radikala (8). Flavonoli se najvećim dijelom akumuliraju u pokožici plodova kupine (1).

Flavan-3-oli su najsloženija skupina flavonoida jer dolaze u širokom rasponu od jednostavnih monomera pa preko oligomera do polimernih proantocijanidina koji su poznati i kao kondenzirani tanini (16). Sadrže zasićenu vezu između dva asimetrična ugljikova atoma, odnosno C₂-C₃. Glavni monomerni spojevi iz ove skupine su (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin (12). Ova podskupina

fenolnih spojeva zastupljena je obično u sjemenkama bobičastog voća, a u sjemenkama kupine koncentracija epikatehina je i do četiri puta veća nego li u ostatku ploda (1).

Kupina sadrži i značajnu količinu tanina koji se mogu hidrolizirati, tj. elagitanina. Tanini koji se mogu hidrolizirati su heterogeni polimeri koji sadrže fenolne kiseline, osobito galnu kiselinu i jednostavne šećere. Kupina sadrži oko 108 mg elagitanina na 100 g ploda i oko 20 mg konjugata elaginske kiseline na 100 g ploda. Slobodna elaginska kiselina predstavlja oko 37 % ukupnih konjugata elaginske kiseline u kupini. Među elagitaninima u kupini, prevladavaju sanguin H-6 i lambertianin C (3). U ustima ovi spojevi daju oštar, trpak osjećaj jer vežu proteine sline i u nezrelim biljnim plodovima je njihov udio jako visok. Biljni tanini služe biljkama kao zaštita jer odbijaju životinje. Također im služe kao obrana od mikroorganizama jer sprječavaju propadanje biljke uslijed djelovanja bakterija i gljiva (17).

1.1.5. Kemijski sastav lista kupine

Lišće je nusprodukt uzgoja bobičastog voća i često se tretira kao otpad. Iako ne postoji puno informacija o kemijskom sastavu lista kupine, dokazano je da na sadržaj fenola u listu kupine utječu prvenstveno okolišni čimbenici (18).

Paczkowska-Walendowska i sur. (19) su dokazali prisutnost sljedećih fenolnih spojeva u ekstraktu lista kupine:

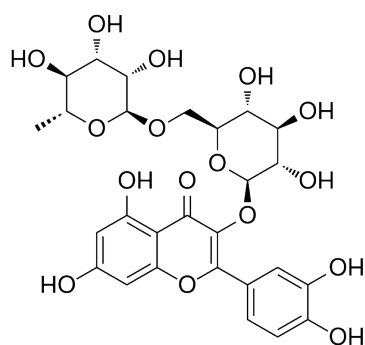
- fenolne kiseline (kava kiselina, elaginska kiselina, galna kiselina te siringinska kiselina)
- flavonoli (kvercetin, kempferol i njihovi glikozidi kao što su rutin, izokvercetin i hiperozid)
- flavan-3-oli (katehin i epikatehin).

Osim navedenih fenolnih spojeva, list kupine sadrži tanine, organske kiseline, vitamin C te minerale, kao što su kalij, kalcij, bakar, magnezij i fosfor, te u manjoj mjeri željezo, mangan i cink (20,21).

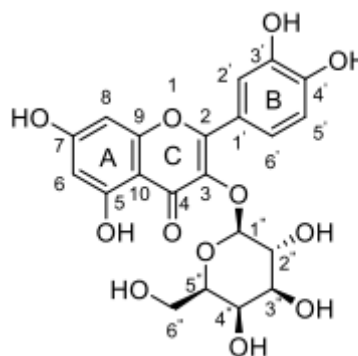
Kava kiselina je jedna od najzastupljenijih fenolnih kiselina u voću s dokazanim snažnim antioksidativnim i antimikrobnim djelovanjem (22).

Elaginska kiselina je hidrolitički produkt elagitanina, koji se prirodno nalazi u mnogim biljnim vrstama (23). Elagitanini su fenolni spojevi topljivi u vodi, velike su molekulske mase i prisutni u biljnim vakuolama. Njihovom hidrolizom nastaje heksahidroksidifenska kiselina, koja se spontano pretvara u elaginsku kiselinu (24). Elaginska kiselina otkrivena u ekstraktu lista kupine pokazuje antioksidativna, antimutagena, protuupalna i kardioprotektivna svojstva (19).

Na slici 3 je prikazana struktura rutina. To je kemijski flavonolni glikozid koji se uglavnom sintetizira u višim biljkama te ih štiti od štetnog ultraljubičastog zračenja i od raznih patogena. Sastoji se od osnovnog fenolnog dijela povezanog s molekulom šećera, koji smanjuje njegovu biološku aktivnost, ali čini molekulu topljivom u polarnoj komponenti. Najviše se nakuplja u gornjim dijelovima lista kupine (25).



Slika 3. Struktura rutina (26)



Slika 4. Struktura hiperozida (27)

Hiperozid je glikozid koji kao aglikon sadrži kvercetin. Njegovo antioksidativno djelovanje može biti povezano s hidroksilnim skupinama na prstenovima A i B te glikozidno povezanim prstenom C, što je prikazano na slici 4 (27).

Katehin i epikatehin, flavan-3-oli, su dva važna antioksidansa, a u kupini su najzastupljeniji u lisnim pupoljcima i mladim listovima (19).

1.1.5.1. Ljekovita svojstva lista kupine

Od davnina je poznato da list kupine, zbog svog kemijskog sastava, pozitivno djeluje na ljudsko zdravlje. Stari Grci i Rimljani koristili su ga u liječenju mnogih bolesti. Antioksidativno, antimikrobno, protuupalno i antikancerogeno djelovanje su samo od nekih bioloških učinaka, koji se pripisuju flavonodima i drugim fenolnim spojevima u kupini. Većina farmakoloških učinaka lista kupine može se povezati upravo s fenolnim spojevima, koji pomažu u uklanjanju slobodnih radikala odgovornih za različite kliničke i metaboličke bolesti (19).

Tanini su adstrigensi, odnosno oni djeluju stezajuće pa se koriste protiv dijareja, upala desni, paradontoze, gastritisa te kao oblozi u liječenju hemoroida. Međutim, treba naglasiti da tanini u većim količinama i tijekom dužeg vremenskog perioda oštećuju jetru i ometaju resorpciju kalcija i željeza (21). Čaj od lista kupine je toliko učinkovit da ga je Njemačka komisija uvrstila u svoj registar kao tretman u liječenju proljeva. Flavonoidi i fenolni spojevi općenito poboljšavaju imunološki sustav te je dokazano da čaj od lista kupine, ukoliko se konzumira mjesec dana prije poroda, kod trudnica olakšava porod (20).

List kupine također djeluje hipoglikemijski, odnosno povećava lučenje inzulina pa se može koristiti i za liječenje dijabetesa (20).

2007. godine u Velikoj Britaniji je provedeno istraživanje u kojem je dokazano da ekstrakt lista kupine djeluje inhibicijski na enzim Matrix metalloproteinase (MMPs), koji je odgovoran za reakcije kolagena kože kojima nastaju bore (20).

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal i odabrani fenolni spojevi

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su listovi kupine (*Rubus fruticosus* L.) prikupljeni na području Dalmacije u 2021. godini. Ekstrakcija je izvršena korištenjem mikrovalova u uređaju Ethos X (Milestone, Italija) u trajanju od 5 min 600 W (50 g uzorka i 250 mL 50%-tnog etanola). Po završetku ekstrakcije uzorak je filtriran preko naboranog filter papira, potom liofiliziran i do trenutka analize skladišten na sobnoj temperaturi. Neposredno prije analize 40 mg liofiliziranog ekstrakta otopljeno je u 1 mL 4%-tnog DMSO i tako pripremljen ekstrakt je korišten u daljnjim analizama i pripremanama binarnih smjesa.

Tablica 2. Odabrani fenolni spojevi

SKUPINA	SPOJ	IME PO IUPACU
Derivat benzojeve kiseline	Vanilinska kiselina	4-hidroksi-3-metoksi benzojeva kiselina
Flavan-3-oli	Katehin	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihidro-3,5,7-kromantriol
Flavonoli	Rutin	kvercetin-3-O-rutinozid
Flavoni	Apigenin	5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4 <i>H</i> -1-benzopiran-4-on
Monoterpeni	Oleuropein	Methyl (2 <i>S</i> ,3 <i>E</i> ,4 <i>S</i>)-4-{2-[2-(3,4-Dihydroxyphenyl)ethoxy]-2-oxoethyl}-3-ethylidene-2-[[2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy}-2 <i>H</i> -pyran-5-carboxylate

U tablici 2 prikazani su korišteni fenolni spojevi, njihovo ime po IUPAC nomenklaturi te fenolna podskupina kojoj pripadaju. Fenolni spojevi su pripremljeni u različitim koncentracijama: vanilinska kiselina, katehin i rutin pri koncentraciji 10 mg/mL, apigenin 4,09 mg/mL te oleuropein 11,06 mg/mL. Binarne smjese su pripremljena miješanjem 2 mL ekstrakta lista kupine i 2 mL otopine fenolnog spoja.

2.2. Reagensi i uređaji

Sve korištene kemikalije bile su odgovarajuće analitičke čistoće, a proizvođači su im Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka), Fluka (Buchs, Švicarska), Kemika (Zagreb, Hrvatska), Merck (Darmstadt, Njemačka) i Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska).

2.3. Bakterijske kulture

Za određivanje antimikrobne aktivnosti smjese ekstrakta lista kupine i odabranih fenolnih spojeva korišteni su bakterijski sojevi ATCC (engl. *American Type Culture Collection*): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29219, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Bakterijske kulture su prenesene s dubokog hranjivog agara na hranjivi agari inkubirane u aerobnim uvjetima pri 37 °C. Ovako uzgojeni sojevi čuvani su u hladnjaku pri +4 °C.

2.4. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost ekstrakta lista kupine i odabranih fenolnih spojeva te njihovih smjesa određena je MIC i MBC metodama.

Otopine, pribor i posuđe, koje je korišteno prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela prethodno je sterilizirano, a svi postupci provedeni u ovom istraživanju urađeni su također pri sterilnim uvjetima.

2.4.1. Priprema i kontrola inokuluma

Prije početka pokusa svaka od navedenih bakterijskih kultura je revitalizirana na hranjivom Mueller-Hinton agaru (MHA) i nakon toga se koristila za pripremu inokuluma. Ezom se uzela jedna kolonija kulture s krute podloge (MHA) i prenijela u 3-

5 mL MHB-a, kako bi se pripravila prekonoćna kultura (37°C/14-16 h). Nakon inkubacije, otpipetiralo se 3 mL kulture u 27 mL MHB-a te se smjesa stavila na inkubaciju na 37°C tijekom 1-1,5 h (ovisno o vrsti bakterije), uz miješanje (110 rpms). Densitometrom se očitala gustoća bakterija te se na osnovu umjerenih krivulja napravio izračun za pripravu željene koncentracije radnog inokuluma. Od suspenzije se otpipetirao određeni volumen kulture u novu sterilnu posudicu s MHB i ovako pripremljen inokulum imao je koncentraciju bakterijskih stanica od 1×10^5 CFU/mL (engl. *Colony Forming Units*) i koristio se u daljnjim postupcima testiranja antimikrobnog djelovanja.

Kao potvrda koncentracije bakterijskih stanica u inokulumu koristila se metoda po Kochu. Od inokuluma se pripravila serija decimalnih razrjeđenja u destiliranoj vodi te se po 20 µL nakapalo na hranjivu MHA podlogu te stavilo na inkubaciju na 37°C tijekom 24 h. Nakon provedene inkubacije izbrojane su porasle kolonije na hranjivoj podlozi te je izračunat broj živih stanica po mililitru uzorka (28).

$$\text{CFU / mL} = \frac{\text{broj kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja}}{\text{volumen uzorka}}$$

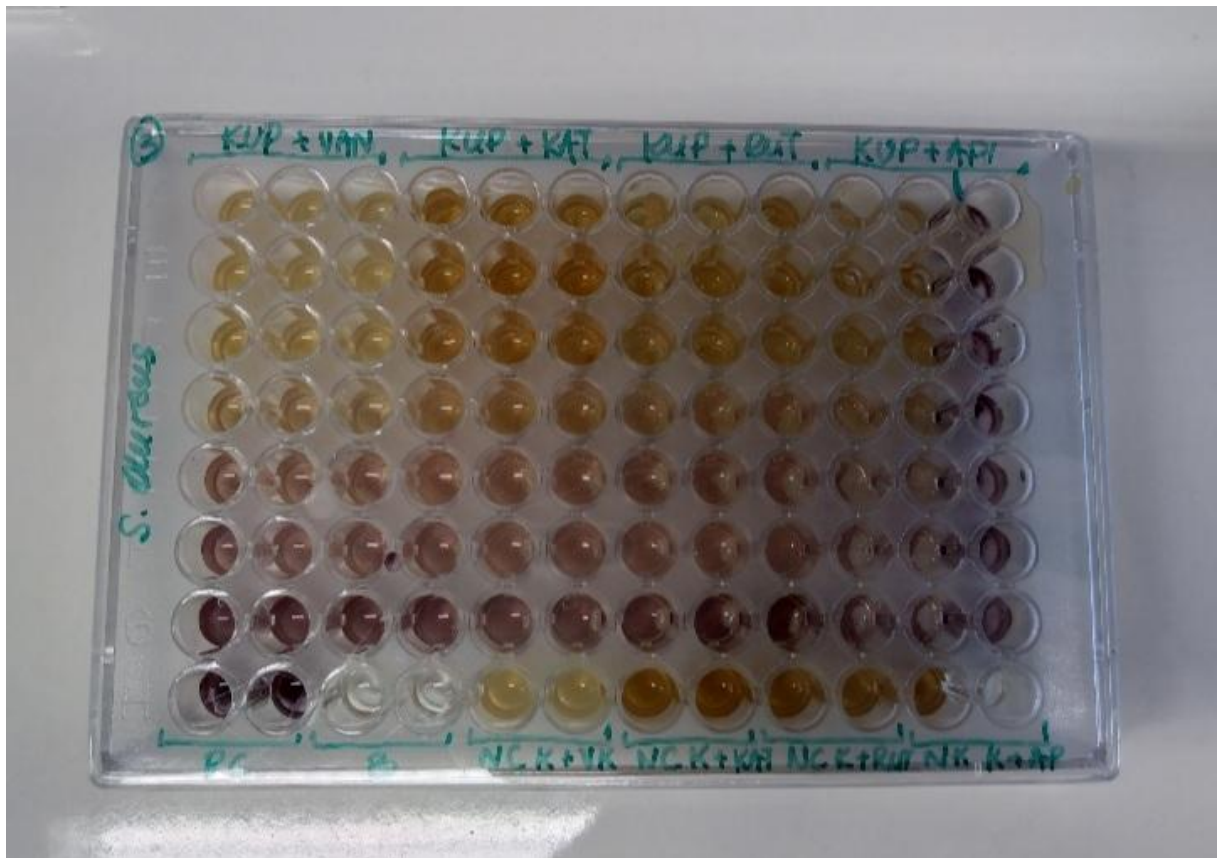
2.4.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC metoda)

Test minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) provodi se korištenjem MHA, koji je najbolji medij za rutinske testove osjetljivosti jer se lako ponovno pripravi, odnosno reproducira, ima nizak udio sulfonamida, trimetoprima i tetracikličnih inhibitora te daje zadovoljavajući rast većine patogenih bakterija (29).

MIC je vrijednost definirana kao najmanja koncentracija antimikrobnog uzorka koji inhibira vidljivi prirast testiranog mikroorganizma, a izražava se u µg/mL ili mg/L(30,31).

Za određivanje MIC vrijednosti u ovom radu koristila se metoda mikrodilucije, a primjer mikrotitarske pločice s 96 jažica prikazan je na slici 5. Testirani uzorak ekstrakta lista kupine serijski se razrijedio duž pločice na način da se 50µL uzorka prenijelo u sljedeći otvor na pločici, u kojem je bilo 50µL MHB-a te izmiješalo. Postupak se ponavljao do kraja pločice te je ovakvim načinom razrjeđivanja svaka

sljedeća koncentracija, odnosno jažica, sadržavala koncentraciju uzorka upola nižu od one u prethodnoj jažici. Konačni volumen u svakoj jažici nakon razrjeđivanja bio je 50 μ L. U svrhu kontrole rezultata na svakoj pločici pripremljena je slijepa proba (100 μ L MHB), pozitivna kontrola (50 μ L MHB + 50 μ L bakterijske kulture) te negativne kontrole za uzorak (50 μ L MHB + 50 μ L ekstrakta lista kupine). Nakon toga, u sve otvore pločice, osim u slijepu probu i negativne kontrole se dodalo 50 μ L ispitivanih kultura bakterija te izmiješalo i inkubiralo 24 h pri 35 $^{\circ}$ C. Po dodatku INT reagensa se promijenila boja u jažici, a usporedbom promjene boje pozitivne kontrole, slijepe probe i negativne kontrole s obojenjima u jažicama odredila se MIC vrijednost.

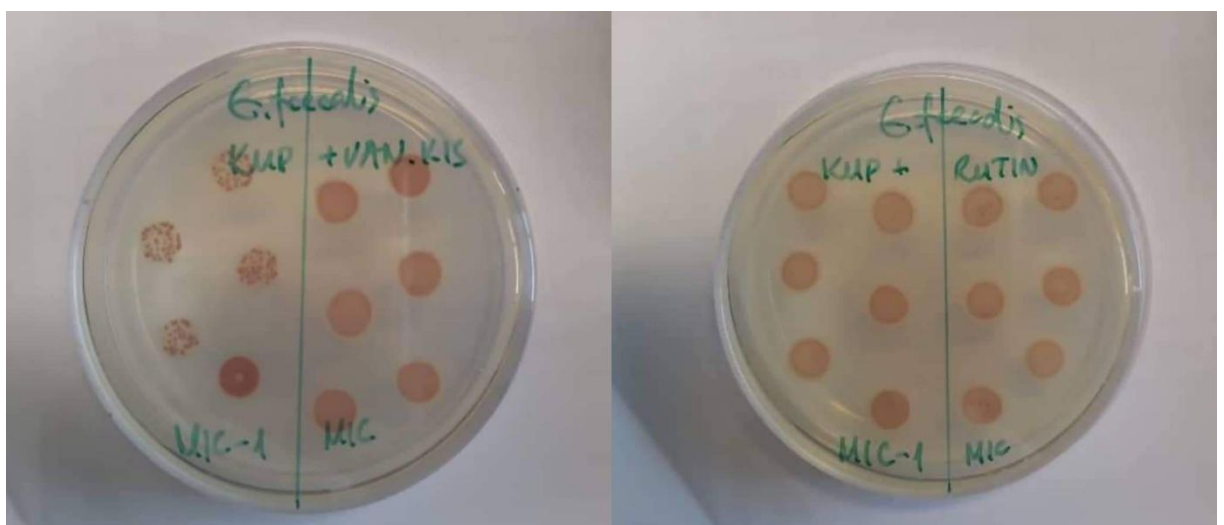


Slika 5. Izgled mikrotitarske pločice nakon dodatka INT-a (vlastita fotografija)

2.4.3. Metoda određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

MBC, odnosno minimalna baktericidna koncentracija predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog sredstva potrebnu za ubijanje 99,9 % konačnog inokuluma nakon inkubacije od 24 h pri standardnim uvjetima. MBC se može odrediti nakon dilucije u bujonu ili u agaru (30,32).

Na neselektivne agar pločice nasijali su se uzorci iz mikrotitarske pločice za koje je utvrđeno da predstavljaju MIC vrijednosti, te stavili na inkubaciju tijekom 24 h. Nakon inkubacije se odredio broj preživjelih stanica mikroorganizma (CFU/mL) te se na taj način odredila MBC vrijednost za pojedini mikroorganizam. Primjeri agar pločica nakon inkubacije prikazani su na slici 6. Na lijevom dijelu prve fotografije vidljive su točkice, koje zapravo predstavljaju bakterijske kolonije, što znači da testirana koncentracija ekstrakta lista kupine u kombinaciji s vanilinskom kiselinom nije uništila bakteriju *E. faecalis* (uzorak prenesen iz jažice koja je predstavljala MIC vrijednost), a duplo viša koncentracija je u potpunosti uništila bakteriju (desni dio prve fotografije; jažica u kojoj je koncentracija smjese bila veća od MIC vrijednosti). Druga fotografija prikazuje kombinaciju ekstrakta lista kupine s rutinom te je vidljivo da ova kombinacija potpuno uništava navedenu bakteriju (jažica s MIC vrijednosti i jažica u kojoj je koncentracija smjese bila veća od MIC vrijednosti).



Slika 6. Izgled agar pločica nakon 24-satne inkubacije (vlastita fotografija)

2.4.4. Antimikrobna interakcija odabranih mješavina ekstrakta i fenola

U ovom dijelu istraživanja proučavana je antimikrobna aktivnost ekstrakta lista kupine u kombinaciji s odabranim fenolnim spojevima (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) protiv najčešćih patogena koji se prenose hranom: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 te *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Interakcija između spojeva u smislu antibakterijskog djelovanja određena je izračunavanjem frakcijskog inhibitornog koncentracijskog indeksa (FICI), koji je za svaku smjesu izračunat prema sljedećoj formuli:

$$FIC_A + FIC_B = FICI,$$

gdje je $FIC_A = MIC$ spoja A u mješavini fenola / MIC samog spoja A, te $FIC_B = MIC$ spoja B u smjesi fenola / MIC samog spoja B. Sinergistička interakcija definirana je kada FICI iznosi 0,5 ili manje, a antagonistička interakcija kada je FICI veći od 4. FICI vrijednosti između 0,5 i 1 tumačene su kao aditivna interakcije, a između 1 i 4 kao indiferentne interakcije.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 3. Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, mg/mL) ekstrakta lista kupine i čistih fenolnih spojeva za G(+) bakterije

	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
UZORAK	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Ekstrakt lista kupine	0,63	1,25	5	>10	5	5
Vanilinska kiselina	>1,25	/	>1,25	/	>1,25	/
Katehin	>1,25	/	1,25	>1,25	0,63	>1,25
Rutin	>1,25	/	1,25	>1,25	1,25	>1,25
Apigenin	>0,51	/	>0,51	/	>0,51	/
Oleuropein	>1,45	/	>1,45	/	>1,45	/

Tablica 4. Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, mg/mL) ekstrakta lista kupine i čistih fenolnih spojeva za G(-) bakterije

	<i>E. coli</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. enteritidis</i>	
UZORAK	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Ekstrakt lista kupine	5	>10	5	>10	5	>10
Vanilinska kiselina	>1,25	/	>1,25	/	>1,25	/
Katehin	1,25	>1,25	1,25	>1,25	1,25	>1,25
Rutin	1,25	>1,25	1,25	>1,25	1,25	>1,25
Apigenin	>0,51	/	0,51	>0,51	>0,51	/
Oleuropein	>1,45	/	>1,45	/	>1,45	/

U tablicama 3 i 4 prikazane su MIC i MBC vrijednosti čistih fenolnih spojeva i ekstrakta lista kupine prema najčešćim patogenim uzročnicima kvarenja hrane. Čisti ekstrakt lista kupine, s MIC vrijednosti od 0,63 mg/mL, je pokazao najbolji antimikrobni učinak protiv bakterije *S. aureus*, dok su MIC vrijednosti prema ostalim bakterijskim vrstama iznosile 5 ili >10 mg/mL.

Odabrani fenolni spojevi uglavnom pokazuju sličnu antimikrobnu aktivnost prema testiranim bakterijama, s MIC vrijednostima od 1,45 mg/mL, uz iznimku apigenina koji je pokazao najbolju aktivnost i najniže MIC vrijednosti (0,51 mg/mL) prema G (+) i G (-) vrstama. Dobiveni rezultati nisu bili iznenađujući obzirom da postoji niz studija i istraživanja koji dokazuju dobro antibakterijsko djelovanje fenola na patogene bakterije. Pretraživanjem dostupne literature, izdvojena su neka istraživanja antimikrobnog učinka koja uključuju odabrane fenolne spojeve.

Ibrahim i sur. (33) su ispitivanjem antimikrobne aktivnosti kava kiseline i njenih metabolita (vanilinska kiselina i katehol) metodom difuzije i metodom određivanja MIC vrijednosti ustanovili najvišu MIC vrijednost protiv *S. aureusa* za vanilinsku kiselinu (2 mg/mL), što je približno jednako dobivenim rezultatima u ovom radu. Kalogeropoulos i sur. (34) su potvrdili antibakterijsko djelovanje vanilinske kiseline protiv patogena koji se prenose hranom poput bakterija *S. aureus* i *E. coli*, dok su Kuete i sur. (35) dokazali antimikrobno djelovanje vanilinske kiseline prema *B. cereus*, *E. coli* i *P. aeruginosa*.

Bhattacharya i sur. (36) su dokazali da katehin ekstrahiran iz Kombuche (gazirani, fermentirani napitak koji se dobije od zelenog ili crnog čaja, šećera i kombucha gljive) ima antimikrobni učinak protiv *E. coli*, s MIC vrijednosti od 6,25 mg/mL i MBC od 6,25 mg/mL. Ma i sur. (37) navode antimikrobni učinak katehina prema *E. coli* i *Salmonella*, s MIC vrijednostima 6-50 mg/mL.

Araruna i sur. (38) ističu rutin koji je u njihovoj studiji pokazao izuzetnu inhibiciju rasta bakterije *E. coli*. U istraživanju, koje su proveli Arima i sur. (39), rutin je sinergistički pojačao antibakterijsko djelovanje drugih flavonoida prema *B. cereus* i *S. enteritidis*. Također navode kako je MIC vrijednost za kempferol bila značajno smanjena dodatkom rutina smjesu.

Dong i sur. (40) su u svom istraživanju istaknuli antimikrobnu aktivnost apigenina, koji je inhibirao rast bakterije *S. aureus*. Liu i sur. (41) testirali su antimikrobnu aktivnost

derivata apigenina prema *S. aureus*, *B. subtilis*, *E.coli* i *P. aeruginosa* metodom disk difuzije te određivanjem MIC vrijednosti. Dobiveni rezultati ukazuju na umjereno do izvrsno antibakterijsko djelovanje svih derivata apigenina prema testiranim patogenima.

Istraživanja su također pokazala da oleuropein i produkti njegove hidrolize mogu inhibirati rast i proizvodnju enterotoksina B kod *S. aureus* (42, 43), rast bakterije *S. enteritidis* (44) te klijanje i rast spora kod *B. cereusa* (45). Aziz i sur. (46) su uz oleuropein istaknuli i druge fenolne spojeve poput *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske i *p*-kumarinske kiseline, obzirom da mogu potpuno inhibirati rast *E. coli*, *K. pneumoniae* i *B. cereus*.

Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost smjese ekstrakta lista kupine i odabranih fenolnih spojeva na patogene uzročnike kvarenja hrane, odnosno pokušati dokazati da li dodatak fenolnog spoja može utjecati na bolji antimikrobni učinak ekstrakta lista kupine. Dobiveni rezultati su prikazani u tablicama 5 i 6 iz kojih se može vidjeti da su smjese ekstrakta lista kupine i odabranih fenolnih spojeva pokazale bolju antimikrobnu aktivnost prema G (+) bakterijskim vrstama u odnosu na G (-). Interakcijska aktivnost smjese ekstrakta i fenolnog spoja opisana je korištenjem FICI faktora (tablica 7), pri čemu su vrijednosti $FICI \leq 0,5$ ukazivale na sinergističku interakciju, $FICI = 0,5-1,0$ na aditivnu reakciju, $FICI = 1,0-4,0$ na indiferentnu interakciju te $FICI > 4,0$ na antagonizam između testiranih uzoraka.

Tablica 5. Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, mg/mL) ekstrakta lista kupine (u tablici ekstrakt) i odabranih fenolnih spojeva za G(+) bakterije

	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
UZORAK	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Ekstrakt	0,63	1,25	5	>10	5	5
Ekstrakt + Vanilinska kiselina	1,25 + 0,31	2,5 + 0,63	5 + 1,25	>5 + 1,25	2,5 + 0,63	>5 + 1,25
Ekstrakt + Katehin	0,63 + 0,16	1,25 + 0,31	5 + 1,25	>5 + 1,25	1,25+0,31	5 + 1,25
Ekstrakt + Rutin	1,25 + 0,31	2,5 + 0,63	5 + 1,25	>5 + 1,25	5 + 1,25	5+1,25
Ekstrakt + Apigenin	1,25 + 0,13	2,5 + 0,26	5 + 1,25	>5 + 0,51	5 + 0,51	>5+0,51
Ekstrakt + Oleuropein	0,63 + 0,18	1,25 + 0,36	5 + 1,25	>5 + 1,45	1,25+0,36	1,25+0,36

Tablica 6. Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, mg/mL) ekstrakta lista kupine (u tablici ekstrakt) i odabranih fenolnih spojeva za G(-) bakterije

	<i>E. coli</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>S. enteritidis</i>	
UZORAK	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Ekstrakt	5	>10	5	>10	5	>10
Ekstrakt + Vanilinska kiselina	2,5 + 0,63	≥5 + 1,25	5 + 1,25	>5 + 1,25	5 + 1,25	>5 + 1,25
Ekstrakt + Katehin	5 + 1,25	>5 + 1,25	5 + 1,25	5 + 1,25	5 + 1,25	>5 + 1,25
Ekstrakt + Rutin	5 + 1,25	>5 + 1,25	5 + 1,25	>5 + 1,25	5 + 1,25	>5 + 1,25
Ekstrakt + Apigenin	nije rađeno					
Ekstrakt + Oleuropein	5 + 1,25	>5 + 1,45	2,5 + 0,73	≥5 + 1,25	5 + 1,45	5 + 1,45

Tablica 7. Interakcijska aktivnost smjese ekstrakta i fenolnih spojeva izražena kao FICI

Ekstrakt +	G (+)			G (-)		
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. enteritidis</i>
Vanilinska kiselina	1,25	2,00	1,00	1,00	2,00	2,00
Katehin	2,11	2,00	0,74	2,00	2,00	2,00
Rutin	2,23	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Apigenin	2,24	3,45	2,00	2,00	2,00	2,00
Oleuropein	1,12	1,86	0,50	1,86	1,00	2,00

Usporedbom rezultata antimikrobne aktivnosti pojedinih fenola i ekstrakta lista kupine s rezultatima dobivenim za smjese, vidljivo je da binarne smjese imaju gotovo jednak učinak. Zahvaljujući FICI faktoru interakcijska aktivnost između pojedinih komponenti u smjesi se može puno jednostavnije interpretirati, pa se tako iz tablice 7 uočava da samo jedna smjesa ukazuje na sinergistički učinak, dok ostale smjese imaju aditivnu ili indiferentnu interakciju. Iako niske MIC vrijednosti smjese ekstrakta lista kupine i katehina prema *S. aureus* (tablica 5) ukazuju na mogući sinergistički učinak, FICI faktor $\leq 0,5$, a time i sinergistički učinak, potvrđen je samo za smjesu ekstrakta lista kupine i oleuropeina prema *L. monocytogenes* (FICI vrijednost od 0,5). Najlošiji interakcijski učinak i najveće FICI vrijednosti (\geq od 2) zabilježene su za smjese ekstrakta lista kupine uz dodatak apigenina i rutina prema svim testiranim bakterijskim vrstama.

Metoda određivanja MBC je pokazala da najbolji baktericidni učinak pokazuju smjese prema bakteriji *S. aureus*, te smjesa ekstrakta lista kupine i oleuropeina prema *L. monocytogenes*. Ostale binarne smjese su imale MBC vrijednosti veće od MIC-a ili se nije mogao potvrditi MIC.

Znanstvene studije koje ističu antimikrobnu aktivnost lista kupine su brojne, no jako je mali broj literaturnih podataka o antimikrobnoj aktivnosti lista kupine na patogene mikroorganizme i samo je nekoliko studija koje daju uvid u učinak ekstrakta lista kupine na najčešće uzročnike kvarenja hrane.

Denev i sur. (47) su istraživali antimikrobno djelovanje ekstrakata šest ljekovitih biljaka, uključujući i list kupine, prema nekoliko bakterijskih vrsta: *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Salmonella enterica*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* i gljivi *Candida albicans*. Ekstrakt lista kupine pokazao je antimikrobno djelovanje prema svim ispitivanim mikroorganizmima, uz nešto slabiju aktivnost prema *E. coli*, *Salmonella*, *L. monocytogenes* te *C. albicans*, koje su nastavile rasti u njegovoj prisutnosti. Ono što se posebno izdvaja u ovoj studiji je činjenica da niti jedan od korištenih ekstrakata, pa tako ni ekstrakt lista kupine, nije smanjio rast *L. monocytogenes* ispod 50% početnog broja živih stanica.

Paczkowska-Walendowska i sur (19) su dokazali visoku antimikrobnu aktivnost ekstrakta lista kupine prema *E. coli* i *Candida spp.* Krzepilko i sur (21) su u svom istraživanju metodom disk-difuzije ispitali antimikrobno djelovanje ekstrakata lisnih pupoljaka maline, kupine i njihovih hibrida prema *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *Salmonella. enterica* i *Serratia marcescens*. Svi korišteni ekstrakti, pa i ekstrakt lisnih pupoljaka kupine, pokazali su vrlo dobro antimikrobno djelovanje prema *E. faecalis* i *S. aureus*. Ekstrakti su pokazali slab učinak prema *E. aerogenes*, dok su *E. coli*, *S. enterica* i *S. marcescens* bile otporne na istraživane ekstrakte.

Ferlemi i Lamari (48) su u svom radu dali pregled znanstvenih studija koje su se bavile lišćem kupine, a većina njih je pokazala da lišće kupine pokazuje bolju antimikrobnu aktivnost od samog ploda prema patogenim vrstama, kao što su *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *B. subtilis* itd.

Jako male koncentracije pojedinih fenolnih spojeva i/ili ekstrakta lista kupine koje su korištene u ovom radu mogu biti razlog slabe interakcijske aktivnosti. Također postoje brojne kombinacije i omjeri koji se mogu primijeniti u daljnjem testiranju kako bi se utvrdilo može li dodatak fenolne komponente biljnom ekstraktu pozitivno utjecati na biološku aktivnost smjese. Pregledom dostupne literature može se zaključiti da ekstrakt lista kupine posjeduje antimikrobna svojstva, no njegov interakcijski učinak s fenolima je nedovoljno ispitan, te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se potvrdili rezultati dobiveni u ovom radu.

4. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenog istraživanja i dobivenih rezultata utvrđeno je:

- Za ekstrakt lista kupine potvrđene su niske MIC vrijednosti (0,63 mg/mL) i dobro baktericidno djelovanje (MBC 1,25 mg/mL) prema *S. aureus*.
- Binarne smjese ekstrakta lista kupine i odabranih fenolnih spojeva pokazale su bolju antimikrobnu aktivnost prema G (+) vrstama u usporedbi s G (-).
- Sve smjese su pokazale indiferentnu interakciju, osim smjese ekstrakta lista kupine i oleuropeina, koja je pokazala sinergističko djelovanje prema *L. monocytogenes* (MIC = 1,25+0,31 te FICI 0,5).

5. LITERATURA

1. Jazić M. Hemijski sastav i biološki potencijal ploda, soka i tropa kultivisane i divlje kupine (*Rubus fruticosus* L.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad; 2019.
2. Zia-Ul-Haq M, Riaz M, De Feo V, Jaafar H. Z. E, Moga M. *Rubus fruticosus* L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses. *Molecules*. 2014; 19(8):10998-11029.
<https://doi.org/10.3390/molecules190810998>
3. Horvatić I. Utjecaj količine saharoze i trehaloze na fenolne i hlapljive komponente u punilima na bazi kupine. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno - tehnološki fakultet, 2020.
4. USDA Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Rubus fruticosus* L. Dostupno na: <https://plants.usda.gov/home/classification/91219>
Pristupljeno: 25.7.2022.
5. <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Rubus>
Pristupljeno: 25.7.2022.
6. Lee J. Blackberry fruit quality components, composition and potential health benefits. *Crop Production Science in Horticulture*, CABI International 2017.
7. De la Rosa L A, Moreno-Escamilla J O, Rodrigo-Garcia J, Alvarez-Parrilla E. Phenolic Compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. 2019:253-271.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
8. Nacz M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006;41(5):1523-1542.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.002>
9. Robbins R J. Phenolic Acids in Foods: An Overview od Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(10):2866-2887.
<https://doi.org/10.1021/jf026182t>
10. https://bahasa.wiki/bs/Phenolic_acid
Pristupljeno: 12.8.2022.
11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vanillic-acid>

Pristupljeno: 12.8.2022.

12. Mutha R E, Tatiya A U, Surana S J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Science* 2021;7:25.

<https://doi.org/10.1186/s43094-020-00161-8>

13. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 2006;99(1):191-203.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>

14. Morović M. Flavonoidi - metaboličke promjene i utjecaj na enzimske sustave. Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet & Medicinski fakultet, 2018.

15. Harborne J B, Grayer R J. *The Flavonoids advances in research*. Springer Science and Business Media Dordrecht. 1994.

16. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer P E, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013;18(14):1818-1892.

<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>

17. Galić L. Fenolni spojevi u biljkama. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti, 2020.

18. Oszmiański J, Wojdyło A, Nowicka P, Teleszko M, Cebulak T, Wolanin M. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in leaves from wild *Rubus* L. species. *Molecules* 2015;20(3):4951-4966.

<https://doi.org/10.3390/molecules20034951>

19. Paczkowska-Walendowska M, Gosciniak A, Szymanowska D, Sz wajgier D, Baranowska-Wojcik E, Szulc P, Dreczka D, Simon M, Cielecka-Piontek J. Blackberry Leaves as New Functional Food? Screening Antioxidant, Anti-Inflammatory and Microbiological Activities in Correlation with Phytochemical Analysis. *Antioxidant* 2021;10:1945.

<https://doi.org/10.3390/antiox10121945>

20. <https://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/kupina>

Pristupljeno: 30.7.2022.

21. Krzepiłko A, Prazak R, Świąciło A. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Raspberry, Blackberry and Raspberry-Blackberry Hybrid Leaf Buds. *Molecules* 2021;26(2):327.
<https://doi.org/10.3390/molecules26020327>
22. Khan F, Bamuniarachchi N I, Tabassum N, Kim Y - M. Caffeic Acid and Its Derivatives: Antimicrobial Drugs toward Microbial Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2021;69(10):2979-3004.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07579>
23. Lin T Y, Vine R P. Identification and Reduction of Ellagic Acid in Muscadine Grape Juice. *Journal of Food Science* 1990;55(6):1607-1609.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03581.x>
24. Williner M R, Pirovani M E, Guemes D R. Ellagic Acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003;83(8):842-845.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.1422>
25. Patel K, Patel D K. The Beneficial Role of Rutin, A Naturally Occurring Flavonoid in Health Promotion and Disease Prevention: A Systematic Review and Update. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* 2019;457-479.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00026-X>
26. <https://www.medchemexpress.com/Rutin.html>
Pristupljeno: 11.9.2022.
27. Xu S, Chen S, Xia W, Sui H, Fu X. Hyperoside: A Review of Its Structure, Synthesis, Pharmacology, Pharmacokinetics and Toxicity. *Molecules* 2022;27(9):3009.
<https://doi.org/10.3390/molecules27093009>
28. Ivančić M, Kovač G. Sinteza, konformacijska analiza i biološka evaluacija tripeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s Ala-Pro sekvencom. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2021.
29. Ruangpan L. Minimal inhibitory concentration (MIC) test and determination of antimicrobial resistant bacteria. In *Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment* 2004:31-55.
30. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda S K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2016;6(2):71-79.

<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

31. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 2008;3(2):163-175.

32. Owuama CI. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African Journal of Microbiology Research*. 2017;11(23):977-980.

<https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8545>

33. Ibrahim H A, Solman H S. M, Hamed F M, Marrez D A, Othman S M. Antibacterial activity of vanillic acid and catechol produced by microbial biotransformation of caffeic acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2020;12(6):740-743.

34. Kalogeropoulos N, Konteles S J, Troullidou E, Mourtzinis I, Karathanos V T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* 2009;116(2):452-461.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.060>

35. Kuete V, Poumale H M. P, Guedam A N, Shiono Y, Randrianasolo R, Ngadjui B T. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). *South African Journal of Botany* 2010;76(3):536-542.

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.04.003>

36. Bhattacharya D, Bhattacharya S, Patra M M, Chakravorty S, Sarkar S, Chakravorty W, Koley H, Gachhui R. Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens. *Current Microbiology* 2016;73:885-896.

<https://doi.org/10.1007/s00284-016-1136-3>

37. Ma Y, Ding S, Fei Y, Liu G, Jang H, Fang J. Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Food Control* 2019;106:106712.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106712>

38. Araruna M K A, Brito S A, Morais-Braga M F B, Santos K K A, Souza T M, Leite T R, Costa J G M, Coutinho H D M. Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. *Indian Journal of Medical Research* 2012;135(2):252-254.

39. Arima H, Ashida H, Danno G. Rutin-enhance Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2002;66(5):1009-1014.
<https://doi.org/10.1271/bbb.66.1009>
40. Dong J, Qiu J, Wang J, Li H, Dai X, Zhang Y, Wang X, Tan W, Niu X, Deng X, Zhao S. Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin. *FEMS Microbiology Letters* 2013;338(2):124-131.
<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12040>
41. Liu R, Zhang H, Yuan M, Zhou J, Tu Q, Liu J-J, Wang J. Synthesis and Biological Evaluation of Apigenin Derivatives as Antibacterial and Antiproliferative Agents. *Molecules* 2013;18(9):11496-11511.
<https://doi.org/10.3390/molecules180911496>
42. Tranter H S, Tassou S C, Nychas G J. The effect of the olive phenolic compound oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Bacteriology* 1993;74(3):253-259.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03023.x>
43. Tassou C C, Nychas G J E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Olive Phenolics in Broth and in a Model Food System. *Journal of Food Protection* 1994;57(2):120-124.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.2.120>
44. Tassou C C, Nychas G J. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Letters in Applied Microbiology* 1995;20(2):120-124.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1995.tb01301.x>
45. Tassou C C, Nychas G J, Board R G. Effect of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1991;13(2):231-7.
46. Aziz N H, Farag S E, Mousa L A, Abo-Zaid M A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 1998;93(374):43-54.
47. Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Blazheva D, Nedelcheva P, Vojtek L, Hyrsil P. Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. *Acta Biochimica Polonica* 2014;61(2):359-367.

48. Ferlemi A-V, Lamari F N. Berry Leaves: An Alternative Source of Bioactive Natural Products of Nutritional and Medicinal Value. *Antioxidants* 2016;5(2):17.

<https://doi.org/10.3390/antiox5020017>