

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anja ČUK

**ANTIOKSIDATIVNA IN PROTIMIKROBNA
UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN
IZ BAZILIKE (*Ocimum basilicum*) IN TIMIJANA
(*Thymus citriodorus*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Anja ČUK (LIKAR)

**ANTIOKSIDATIVNA IN PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST
IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN IZ BAZILIKE (*Ocimum basilicum*)
IN TIMIJANA (*Thymus citriodorus*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIOXIDATIVE AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF
EXTRACTS OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BASIL (*Ocimum
basilicum*) AND THYME (*Thymus citriodorus*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil in v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Helena Abramovič, za somentorico prof. dr. Sonja Smole Možina in za recenzenta prof. dr. Rajko Vidrih.

Mentorica: prof. dr. Helena Abramovič

Somentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Anja Čuk

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 633.88:547.56:577.1+579.24(043)=163.6
KG	zelišča/rastlinski izvlečki/bazilika/ <i>Ocimum basilicum</i> /limonasti timijan/ <i>Thymus citriodorus</i> /antioksidativna učinkovitost/protimikrobna učinkovitost/antioksidanti/fenolne spojine/ <i>Campylobacter jejuni</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Listeria monocytogenes</i> / <i>Staphylococcus aureus</i>
AV	ČUK (LIKAR), Anja
SA	ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (somentorica)/VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	ANTIOKSIDATIVNA IN PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV FENOLNIH SPOJIN IZ BAZILIKE (<i>Ocimum basilicum</i>) IN TIMIJANA (<i>Thymus citriodorus</i>)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 72 str., 22 pregl., 24 sl., 67 vir
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Namen diplomske naloge je bil določiti vsebnost fenolnih spojin in ugotoviti antioksidativno ter protimikrobno učinkovitost (PU) izvlečkov bazilike (<i>Basilicum ocimum</i>) in limonastega timijana (<i>Thymus citriodorus</i>). Zanimal nas je vpliv sušenja in zamrzovanja bazilike in limonastega timijana na preiskovane lastnosti. S solventno ekstrakcijo smo pripravili etanolne izvlečke fenolnih spojin. V izvlečkih smo spektrofotometrično določili vsebnost skupnih fenolnih spojin (TP) s Folin-Ciocalteu metodo, vsebnost skupnih flavonoidov (TF) ter vsebnost flavonov in flavonolov (FF) na podlagi tvorbe kompleksnih spojin z Al ionom, oziroma vsebnost flavanonov in dihidroflavonolov (FD) na podlagi tvorbe kompleksnih spojin v reakciji z 2,4-dinitrofenilhidrazinom. Z metodo lovljenja prostega radikala 1,1'-difetil-2-pikrilhidrazil smo določili antioksidativno učinkovitost (AU) izvlečkov. Izvlečke smo posušili in suhi preostanek raztopili v manjšem volumnu dimetil sulfoksida ter te koncentrirane raztopine uporabili za določanje PU. PU smo določili z metodo mikrodilucije v bujonu in izrazili kot minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) na sevih štirih bakterijskih vrst – <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> in <i>Escherichia coli</i> . AU vseh izvlečkov je nižja v primerjavi s sintetičnim antioksidantom butiliranim hidroksitoluenom. Preiskovani izvlečki so pokazali PU, v največji meri na seve <i>C. jejuni</i> , sledijo <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , najbolj odporni pa so sevi <i>E. coli</i> . V limonastem timijanu je v primerjavi z baziliko višja vsebnost vseh skupin fenolnih spojin, ki imajo večjo PU, AU pa je primerljiva z AU bazilike. Izvlečki posušenih zelišč imajo v primerjavi z zamrznjenimi boljše AU, primerljivo vsebnost TP in TF ter nižjo vsebnost FF in FD.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 633.88:547.56:577.1+579.24(043)=163.6

CX herbs/plant extracts/basil/*Ocimum basilicum*/lemon thyme/*Thymus citriodorus*/antioxidative activity/antimicrobial activity/antioxidants/phenolics/*Campylobacter jejuni*/*Escherichia coli*/*Listeria monocytogenes*/*Staphylococcus aureus*

AU ČUK (LIKAR), Anja

AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (co-advisor)/VIDRIH, Rajko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2015

TI ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM BASIL (*Ocimum basilicum*) AND THYME (*Thymus citriodorus*)

DT Graduation thesis (University studies)

NO XII, 72 p., 22 tab., 24 fig., 67 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The purpose of this graduation thesis was to determine the phenolic content as well as antioxidative and antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum*) and lemon thyme (*Thymus citriodorus*) extracts. We investigated the effect of basil and lemon thyme preservation (drying, freezing) on studied characteristics. Phenolic compounds were extracted by solvent extraction with ethanol. Total phenolic content (TP) of extracts was determined spectrophotometrically according to Folin-Ciocalteu method, total flavonoid content (TF) and flavone and flavanole content (FF) were determined using aluminum chloride colorimetric assays, and to quantify flavanone and dihydroflavonol content (FD) we used the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. The antioxidative activity (AU) was evaluated using the 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging method. Extracts were dried, dissolved in a small volume of dimethyl sulfoxide and further used to determine antimicrobial activity. Broth microdilution method was used for determination of minimal inhibitory concentration (MIK) on strains of four bacteria – *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. All extracts show lower AU compared to synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene. We proved PU of all extracts, the greatest effect was observed on *C. jejuni* strains, followed by *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and the most resistant were *E. coli* strains. In lemon thyme, a higher content of all analyzed phenolic groups was determined in comparison to basil, resulting in greater PU, while AU of extracts of both herbs was similar. Extracts of dried herbs show greater AU, have comparable content of TP and TF, but less FF and FD than extracts of frozen herbs.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TIMIJAN	3
2.2 BAZILIKA.....	4
2.3 ANTIOKSIDANTI IN PROSTI RADIKALI.....	6
2.4 FENOLNE SPOJINE.....	7
2.4.1 Flavonoidi.....	8
2.4.2 Flavoni in flavonoli.....	10
2.4.3 Flavanoni in dihidroflavonoli.....	11
2.4.4 Antioksidativno delovanje fenolnih spojin.....	13
2.5 MIKROBIOLOŠKI KVAR ŽIVIL.....	14
2.5.1 Zaščita živil.....	14
2.5.2 <i>Campylobacter jejuni</i>	15
2.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.5.4 <i>Escherichia coli</i>	17
2.5.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	18
2.6 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI.....	18
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 MATERIALI	21
3.1.1 Rastlinski material.....	21
3.1.2 Mikroorganizmi.....	21
3.1.3 Mikrobiološka gojišča	22
3.1.4 Reagenti in pribor.....	22
3.2 METODE.....	24
3.2.1 Priprava vzorca.....	24
3.2.2 Ekstrakcija	24
3.2.3 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin	24
3.2.4 Določanje vsebnosti skupnih flavonoidov	27
3.2.5 Določanje vsebnosti skupnih flavonov in flavonolov.....	29
3.2.6 Določanje vsebnosti skupnih flavanonov in dihidroflavonolov.....	32
3.2.7 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo lovljenja radikala DPPH•.....	34
3.2.8 Koncentriranje izvlečkov timijana in bazilike za določanje protimikrobne učinkovitosti	35
3.2.9 Določanje protimikrobne učinkovitosti z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču	35
3.2.10 Statistična analiza	39

4	REZULTATI Z RAZPRAVO	40
4.1	VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN	40
4.2	VSEBNOST SKUPNIH FLAVONOIDOV	44
4.3	VSEBNOST FLAVONOV IN FLAVONOLOV	46
4.4	VSEBNOST FLAVANONOV IN DIHIDROFLAVONOLOV	48
4.5	ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV	49
4.6	PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV	55
5	SKLEPI	63
6	POVZETEK.....	64
7	VIRI	66
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Volumen (V) izhodne raztopine klorogenske kisline, masna koncentracija (γ) klorogenske kisline v reakcijski zmesi in povprečna vrednost izmerjenih absorbanč A_{746} .	25
Preglednica 2: Volumen (V) izhodne raztopine rutina, masna koncentracija (γ) rutina v reakcijski zmesi in povprečna vrednost izmerjenih absorbanč A_{510} .	27
Preglednica 3: Volumen (V) izhodne raztopine kvercetina, masna koncentracija (γ) kvercetina v reakcijski zmesi in povprečna vrednost izmerjenih absorbanč A_{425} .	30
Preglednica 4: Primer priprave mikrotitrne plošče s tremi sevi <i>S. aureus</i> , 1. del.	38
Preglednica 5: Primer priprave mikrotitrne plošče s tremi sevi <i>S. aureus</i> , 2. del.	38
Preglednica 6: Izmerjene in povprečne absorbance vzorcev pri valovni dolžini 746 nm (A_{746}).	40
Preglednica 7: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v timijanu in baziliki izražena v ekvivalentih klorogenske kisline kot mg klorogenske kisline na gram sveže rastline.	40
Preglednica 8: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v zamrznjenem timijanu (TZ) in zamrznjeni baziliki (BZ) izražena v ekvivalentih galne kisline kot mg galne kisline na gram sveže rastline.	41
Preglednica 9: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v posušeni baziliki izražena v ekvivalentih galne kisline kot mg galne kisline na gram suhe snovi.	42
Preglednica 10: Izmerjene in povprečne absorbance vzorcev pri valovni dolžini 510 nm (A_{510}).	44
Preglednica 11: Vsebnost skupnih flavonoidov v timijanu in baziliki izražena v ekvivalentih rutina kot mg rutina na gram sveže rastline.	45
Preglednica 12: Izmerjene in povprečne absorbance vzorcev pri valovni dolžini 425 nm (A_{425}).	46
Preglednica 13: Vsebnost flavonov in flavonolov v timijanu in baziliki, izražena v ekvivalentih kvercetina kot mg kvercetina na g rastline.	46
Preglednica 14: Izmerjene in povprečne absorbance vzorcev pri valovni dolžini 486 nm (A_{486}).	48
Preglednica 15: Vsebnost flavanonov in dihidroflavonolov v timijanu in baziliki izražena v ekvivalentih naringenina kot mg naringenina na gram sveže rastline.	48

Preglednica 16: Izmerjene absorbance kontrolnih vzorcev	49
Preglednica 17: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov dišavnic in BHT v reakcijski zmesi (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc pri valovni dolžini 517 nm (A_{517}) in delež inhibicije ($\omega_{inh DPPH\cdot}$) po 30 min inkubacije.....	50
Preglednica 18: Smerni koeficienti in koncentracije fenolnih spojin izvlečkov limonastega timijana, bazilike in BHT, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH•.	53
Preglednica 19: Masna koncentracija fenolnih spojin v izvlečkih limonastega timijana in bazilike, raztopljenih v DMSO	55
Preglednica 20: Koncentracije fenolnih spojin v izvlečkih limonastega timijana in bazilike v posameznih poljih mikrotitrne plošče	56
Preglednica 21: Izmerjena fluorescenca v primeru določanja MIK izvlečkov timijana in bazilike na <i>S. aureus</i> , sev 5.5. V zadnji vrsti so fluorescence kontrol.	56
Preglednica 22: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) fenolnih spojin izvlečkov iz timijana in bazilike na sevih <i>C. jejuni</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> in <i>E. coli</i>	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Limonasti timijan (Trusty, 2011)	3
Slika 2: Bazilika (Garden drum AU, 2012).....	4
Slika 3: Razvrstitev fenolnih spojin (Kočevar Glavač, 2013; Cai in sod., 2006).....	7
Slika 4: Osnovna enota flavonoidov (Graf in sod., 2005).....	8
Slika 5: Vrste flavonoidnih spojin (Cook in Samman, 1996)	9
Slika 6: Splošni strukturni formuli flavonov in flavonolov (Graf in sod., 2005).....	10
Slika 7: Flavona apigenin in luteolin ter flavonoli miricetin, kvercetin in kemferol (Škerget in sod., 2005)	11
Slika 8: Splošna formula flavanonov in dihidroflavonolov (Cook in Samman, 1996)	12
Slika 9: Flavanoni naringenin, eriodiktiol in hesperidin (Kočevar Glavač, 2013).....	12
Slika 10: Dihidroflavonola taksifolin in aromadedin (Kočevar Glavač, 2013)	13
Slika 11: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino za določitev skupnih fenolnih spojin	25
Slika 12: Umeritvena krivulja z rutinom za določanje vsebnosti skupnih flavonoidov	28
Slika 13: Umeritvena krivulja s kvercetinom za določanje vsebnosti flavonov in flavonolov	30
Slika 14: Umeritvena krivulja z naringeninom za določanje vsebnosti flavanonov in dihidroflavonolov	32
Slika 15: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v timijanu in baziliki.....	43
Slika 16: Vsebnost flavonoidov v timijanu in baziliki	45
Slika 17: Vsebnost flavonov in flavonolov v timijanu in baziliki	47
Slika 18: Vsebnost flavanonov in dihidroflavonolov v timijanu in baziliki.....	49
Slika 19: Delež inhibicije DPPH• v času 30 min v odvisnosti od masne koncentracije fenolnih spojin v izvlečku iz posušenega limonastega timijana.....	52
Slika 20: Odvisnost deleža inhibicije DPPH• v času 30 min od masne koncentracije fenolnih spojin v izvlečku iz posušenega limonastega timijana.....	52

Slika 21: EC50 vrednosti vzorcev limonastega timijana, bazilike in BHT	54
Slika 22: Črtni diagram za določanje MIK – odvisnost fluorescence (F) od masne koncentracije (γ) fenolnih spojin izvlečkov iz timijana in bazilike.....	57
Slika 23: MIK fenolnih spojin izvlečkov limonastega timijana in bazilike na sevih <i>S. aureus</i>	60
Slika 24: Občutljivost posameznih sevov <i>S. aureus</i> na fenolne spojine v izvlečkih limonastega timijana in bazilike	60

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AU	antioksidativna učinkovitost
a_w	vodna aktivnost
ALOA	selektivno gojišče za <i>L. monocytogenes</i> (ang. Agar Listeria selon Ottaviani & Agosti)
B	slepa proba (angl. blank, samo gojišče)
BHA	butiliran hidroksianizol
BHI	Brain Heart Infusion bujon
BHT	butiliran hidroksitoluen
BS	posušena bazilika
BZ	zamrznjena bazilika
DMSO	dimetil sulfoksid
DNP	2,4-dinitrofenilhidrazin
DPPH•	1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil
EC ₅₀	koncentracija fenolnih spojin, ki za 50 % zniža začetno vsebnost DPPH•
FC	Folin-Ciocalteu reagent
FD	skupni flavanoni in dihidroflavonoli
FF	skupni flavoni in flavonoli
GK	galna kislina
KK	klorogenska kislina
MHA	Müller Hinton agar
MHB	Müller Hinton bujon
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NK	negativna kontrola (gojišče in protimikrobno sredstvo, brez kulture)
PK	pozitivna kontrola (gojišče in kultura, brez protimikrobnega sredstva)
PU	protimikrobna učinkovitost
TBHQ	terciarni butiliran hidroksikinon

TF	skupni flavonoidi (angl. total flavonoids)
TP	skupne fenolne spojine (angl. total phenolics)
TS	posušeni timijan
TZ	zamrznjeni timijan
VBNC	živo, vendar nekultivabilno stanje celic (angl. viable but non culturable)
ŽM/ŽMJ	mikrobiološka zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete
ω_{inhDPPH}	delež inhibicije radikala DPPH•
γ	masna koncentracija

1 UVOD

Zelišča in začimbe uporabljamo pri pripravi hrane, da jedem izboljšamo okus, vonj in videz. Preproste jedi spremenijo v največje specialitete, ki so značilne za določeno regijo. Kombinacije zelišč in začimb so se znotraj posameznih kultur razvijale več stoletij. Odvisno od podnebnih razmer in prevladujočih osnovnih živil so postale prepoznavne točke svetovnih kuhinj. Dandanes so nam zelišča in začimbe povsod lahko dostopna, saj lahko že v vsaki trgovini kupimo kakovostno posušena ali zamrznjena zelišča in začimbne mešanice ali pa kupimo semena in jih gojimo v cvetličnih lončkih na okenskih policah. Uporaba zelišč pa sega že več tisočletij nazaj, obstajajo zapisi o uporabi v vseh starih civilizacijah, v Mezopotamiji, v Egiptu, na Kitajskem ... Že od nekdaj so jih uporabljali za izboljšanje okusa jedem, pogosto pa tudi v zdravstvene namene. Prva kitajska knjiga o zeliščih je vsebovala več kot 1000 opisov zdravil, sestavljenih iz zelišč. Včasih so imela pomembno vlogo pri verskih obredih, povezovali so jih z božanstvi, v srednjem veku tudi s čarovništvom (Lambert Ortiz, 1993).

Uživanje zelišč in začimb lahko pomaga pri preprečevanju oziroma upočasnjevanju oksidativnih poškodb celic, ki jim je človeški organizem ves čas izpostavljen. Oksidativni dejavniki so prisotni v zraku, hrani in vodi in so del normalnega fiziološkega stanja v zdravem organizmu, pomembno pa je, da so v ravnovesju z antioksidativnimi obrambnimi mehanizmi. Ravnovesje se lahko poruši zaradi povečanega fizičnega ali psihičnega stresa, zaradi premajhnega vnosa antioksidantov s hrano ali prevelikega vnosa oksidantov v obliki škodljivih snovi, kot so na primer nekatere kemikalije in težke kovine. Oksidativne procese pospešuje kajenje in vdihavanje onesnaženega zraka, elektromagnetno sevanje in celo izpostavljanje sončni svetlobi. Porušenje ravnovesja vodi v stanje oksidativnega stresa v telesu, to pa povzroča poškodbe celic, encimskih sistemov in dednega materiala. Oksidativni stres je povod za razvoj najpogostejših boleznih sodobnega časa. Uživanje hrane, ki je bogata z rastlinskimi antioksidanti, zmanjšuje tveganje za razvoj rakavih, srčno-žilnih in vnetnih bolezni (Kočevar Glavač, 2013; Patel, 2008).

Poleg pozitivnega učinka na zdravje imajo antioksidanti v živilih tudi vlogo zaščite pred kvarom v obliki oksidacije. Antioksidanti so v živilih lahko že naravno prisotni, pogosto pa tudi dodani z namenom podaljšanja obstojnosti. Dodani antioksidanti so lahko naravnega izvora ali umetno pridobljeni. Potrošniki raje posegajo po izdelkih z dodatki, ki so naravnega izvora, saj jih dojemajo kot varnejše v primerjavi s sintetično pridobljenimi. Zelišča in začimbe so dober vir spojin z antioksidativno učinkovitostjo in imajo kot taka potencial za uporabo njihovih izvlečkov kot dodatkov v živilih (Abramovič, 2011).

Številna zelišča in začimbe poleg antioksidativnega učinkovanja delujejo tudi protimikrobno, zato se uporabljajo v živilstvu tudi z namenom preprečevanja mikrobiološkega kvara. Seveda so v primerjavi s sintetično pridobljenimi konzervansi izvlečki zelišč in začimb s strani potrošnikov bolj zaželeni in sprejeti kot varnejši za uživanje (Shan in sod., 2007).

Zelišča in začimbe večinoma shranjujemo posušena. Z dehidracijo se aktivnost vode (a_w) zniža pod 0,6, kar mikroorganizmom prepreči razmnoževanje in s tem se poveča stabilnost. Najpogostejši način je sušenje s toplim zrakom, ki pa lahko poškoduje celice, vpliva na spremembo barve rastline in povzroči izgubo hlapnih spojin. Da je izguba hlapnih spojin čim manjša, mora biti temperatura sušenja največ 50 °C. Sušenje lahko poteka tudi z liofilizacijo ali pa v mikrovalovnem sušilniku. Drug način shranjevanja rastlin, pri katerem se izognemo izgubi snovi zaradi visoke temperature, je zamrzovanje. V gospodinjstvih to pomeni shranjevanje na približno -18 °C (Usai in sod., 2011).

1.1 NAMEN NALOGE

Cilj diplomskega dela je bil:

- Določiti vsebnost fenolnih spojin v izvlečkih dveh dišavnic: bazilike (*Ocimum basilicum*) in limonastega timijana (*Thymus citriodorus*),
- določiti antioksidativno in protimikrobno učinkovitost izvlečkov fenolnih spojin, pridobljenih iz omenjenih dišavnic,
- določiti, ali sušenje rastlinskega materiala vpliva na vsebnost fenolnih spojin ter antioksidativno in protimikrobno učinkovitost pridobljenih izvlečkov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Bazilika in timijan sta dišavnici, ki predstavljata bogat vir fenolnih spojin.

Izvlečki fenolnih spojin, pridobljeni iz omenjenih dišavnic, so antioksidativno in protimikrobno učinkoviti.

Sušenje in zamrzovanje rastlinskega materiala vpliva na vsebnost fenolnih spojin ter na antioksidativno in protimikrobno učinkovitost pridobljenih izvlečkov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TIMIJAN



Slika 1: Limonasti timijan (Trusty, 2011)

Timijan so poznale vse velike civilizacije na področju Sredozemlja. Egipčani so njegove antiseptične in konzervacijske lastnosti izkoriščali v zmesih za balzimiranje, Grki so ga uporabljali pri aromatiziranju pijač, rimski vojaki pa so se kopali v timijanovih kopelih za večjo moč. V srednjem veku je bil ena najpomembnejših rastlin, s katero so preganjali kugo in zle duhove. Danes ga v svojih receptih upoštevajo kuharji po vsej Evropi in cenijo njegovo čudovito aromo (Bremness, 1991; Lambert Ortiz, 1993; Rode, 2001).

Limonasti timijan (*Thymus citriodorus*) iz družine ustnatic (*Labiatae*) je do 30 cm visok zimzelen polgrm s številnimi pokončnimi poganjki z majhnimi, ozkimi in dlakavimi listi bleščeče zelene barve. Cvetovi so majhni, bele ali belorožnate barve (Mayer, 2013). Znanih je več kot 100 različnih vrst timijana, ki samoniklo rastejo na sončnih, suhih travnikih in med skalovjem v Sredozemlju in Mali Aziji. Čeprav je rastlina toplega podnebja, dobro prenaša tako nizke temperature kot tudi vročino. Najbolje raste na sončni legi, v plodni, nevtralni zemlji, zaradi močnega razvejanega koreninskega sistema pa uspeva tudi na revnih in skalnatih tleh (Nussdorfer, 1991).

Kot začimbo uporabljamo lističe in cvetne vršičke. Vsebuje 0,5 do 2,5 % eteričnega olja, katerega glavna sestavina je timol. Ta je zaslužen za prijeten, močno dišeč vonj cele rastline in aromatičen, rahlo oster okus. Bolj zastopane sestavine olja so še karvakrol, cineol, cimol,

borneol, pinen, od ostalih učinkovin pa timijan vsebuje še tanine, glikozide in smole (Nussdorfer, 1991).

Za izboljšanje okusa dodajamo timijan mnogim jedem, dušeni ali pečeni zelenjavi, jedem iz stročnic, paradižnikovim omakam, juham, perutnini, ovčjemu, svinjskemu in račjemu mesu, divjačini, kuncu, mešajo ga v sirove namaze in zeliščna masla, v solate in marinade in z njim odišavljajo olja in kise (Lambert Ortiz, 1993; Rode, 2001).

Limonasti timijan (*Thymus citriodorus*) je s svojim privlačnim vonjem po citrusih zelo primeren za pripravo zeliščnih čajev, v manjših odmerkih pa ga lahko dodajamo tudi ribam in piščancem ter desertom iz svežega sadja (Lambert Ortiz, 1993).

Kot v ostalih vrstah timijana je tudi v limonastem timijanu prevladujoča fenolna spojina rožmarinska kislina. V veliki količini sta prisotna flavona luteolin in apigenin, ki sta sicer običajna za timijan, vendar je njuna vsebnost v limonastem timijanu še posebno visoka. Vsebuje flavon krizoeriol, ki sicer za timijan ni značilen. Flavanona eriodiktiol in naringenin se nahajata tudi v drugih vrstah timijana, a nekateri derivati so značilni le za limonastega. Flavonoli so v timijanu na splošno zastopani skromno, v limonastem timijanu je prisoten kvercetagetin, ki je sicer pogost v družini ustnatic, ni pa običajen v drugih vrstah timijana (Pereira in sod., 2013).

2.2 BAZILIKA



Slika 2: Bazilika (Garden drum AU, 2012)

Bazilika (*Ocimum basilicum*) je enoletnica iz družine ustnatic (*Lamiaceae*). Odvisno od sorte zraste 20 – 60 cm visoko na pokončnem in grmičasto razraslem stebelu. Listi so močno aromatični, podolgovate oblike, celorobi ali rahlo nazobčani, dolgi 2,5 do 5 cm. Majhni beli cvetovi so nanizani na vrhovih stranskih poganjkov. Čas cvetenja je od julija do oktobra (Rode, 2001).

Prvotna domovina bazilike je Indija. V Evropo se je razširila v času Grkov in Rimljanov, kasneje pa z gojenjem še v mnoge druge dežele, saj je ena najbolj cenjenih začimbnic. V toplejših predelih jo gojijo na poljih. Uspeva tudi v cvetličnih lončkih na okenskih policah in celo v stanovanjih. Bazilika je zelo občutljiva na nizke temperature, zato jo je potrebno zalivati z vodo, segreti na sobno temperaturo in zaščititi pred močnim vetrom (Pahlow, 1987).

Uporabno je celo zelišče, nabiramo ga tik pred cvetenjem. Sveže listke lahko tudi sproti trgamo z rastline. Zelišče lahko uporabimo sveže, ga posušimo, konzerviramo ali zamrznemo (Rode, 2001).

Bazilika ima pomembno mesto v sredozemski kuhinji. Posebej dobro se prilega jedem s paradižnikom in drugo zelenjavo, v omaki pa tudi k pečenemu mesu. Včasih so jo shranjevali v olju in soli, iz česar se je razvila vrsta pripravkov z različnimi dodatki, imenovanih pesto. Pesto se dodaja h kuhani zelenjavi, juham, omakam, lahko pa tudi neposredno k testeninam. Listi sveže bazilike se odlično podajo v različne solate (Rode, 2001).

Bazilika velja pri Hindujcih za sveto rastlino, velik pomen ima tudi v tradicionalnem življenju pravoslavcev. Ponekod jo uporabljajo za pripravo blagoslovljene vode. Opisujejo jo mnoge srbske pesmi. V Indiji nad njo prisežejo na sodišču (Bremness, 1991; Rode, 2001).

Glavne komponente eteričnega olja bazilike so linalol, eugenol in estragol (Politeo in sod, 2007). Najbolj zastopana fenolna spojina v baziliki je rožmarinska kislina, visoka je tudi vsebnost številnih drugih fenolnih kislin, kot so vanilinska, kumarinska, hidroksibenzojska, siringična, ferulna, protokatehujska in kavna kislina (Kruma in sod., 2008). Med flavonoidi je v največji koncentraciji prisoten rutin (Benedec in sod., 2012).

2.3 ANTIOKSIDANTI IN PROSTI RADIKALI

Prosti radikali so močno reaktivne spojine, ki reagirajo z večino molekul v svoji bližini. Imajo nesparjen elektron v zunanji orbitali, težijo pa k stanju stabilne molekule, kjer ima elektron v orbitali svoj par. Nastajajo s homolitsko cepitvijo kovalentne vezi, kar spodbudijo toplota, svetloba in ionizirajoče sevanje, pogosto pa že nastali radikali sprožijo verižno reakcijo, kjer prosti radikal ($A\bullet$) reagira s stabilno spojino (B). Rezultat je stabilna spojina (A) in nov radikal ($B\bullet$), ki zopet teži k reakciji z neko stabilno spojino v okolici.



Prosti radikali v organizmu reagirajo z ogljikovimi hidrati, beljakovinami, aminokislinami, maščobami in molekulami DNK, jih pretvarjajo ter tako poškodujejo celice (Abramovič, 2011).

Antioksidanti so snovi, ki upočasnjujejo ali preprečujejo oksidacijo substratov. So endogenega ali eksogenega izvora. Endogeni so tisti, ki so fiziološko prisotni v organizmu, na primer melatonin, glutation in nekateri encimi. Eksogene antioksidante pa vnašamo s hrano (Kočevar Glavač, 2013). V živilih so antioksidanti lahko naravno prisotni, lahko pa jih dodamo za zaščito živil pred oksidativnimi spremembami med predelavo in skladiščenjem. Med najpomembnejšimi oblikami kvara v živilih je oksidacija lipidov in nastanek arome po žarkem, kar antioksidanti upočasnijo. Z oksidacijo esencialnih maščobnih kislin je povezano poslabšanje prehranske vrednosti. Oksidacijski produkti, nastali med predelavo živil, pa so lahko tudi toksični (Abramovič, 2011).

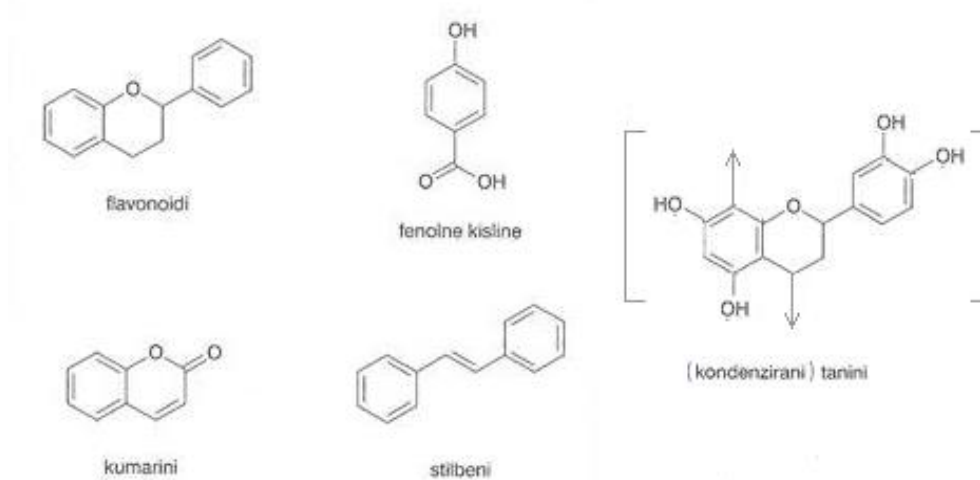
Najpomembnejši naravni rastlinski antioksidanti so fenolne spojine, karotenoidi ter vitamina E in C. S kemijsko sintezo pridobljeni antioksidanti, ki se uporabljajo kot dodatki v živilstvu, pa so: butiliran hidroksitoluen (BHT), butiliran hidroksianizol (BHA), terciarni butiliran hidroksikinon (TBHQ), eritorbinska kislina in estri galne kisline. Uporabo in največjo dovoljeno vsebnost sintetičnih aditivov v prehranskih izdelkih predpisuje Pravilnik o aditivih za živila (Abramovič, 2011).

Antioksidante glede na način delovanja razdelimo na primarne in sekundarne. Primarni antioksidanti reagirajo z radikali, jih pretvorijo v stabilne zvrsti, pri tem pa se sami pretvorijo v dokaj stabilno, nereaktivno obliko in tako zaključijo verižno reakcijo. Mednje sodijo tudi fenolne spojine. Sekundarni antioksidanti na različne načine upočasnijo iniciacijo – prvo stopnjo verižne radikalske oksidacije lipidov, s čimer zmanjšajo obseg oksidativnih reakcij. Sami ne reagirajo z radikali, pač pa povečujejo učinkovitost primarnih oksidantov. Delujejo tako, da v komplekse vežejo kovinske ione, ki so sicer katalizatorji oksidacije, reagirajo s

kisikom in ga tako odstranjujejo iz medija, absorbirajo UV svetlobo, deaktivirajo aktivni kisik ali pa razgrajujejo hidroperoksidi. Hidroperoksidi so primarni produkti oksidacije, ki v prisotnosti že majhnih količin kovinskih ionov ali pri visokih temperaturah (160 °C) razpadejo v radikale. Med sekundarne antioksidante sodijo tudi flavonoidi (Abramovič, 2011).

2.4 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so strukturno zelo raznolika skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov. Njihova prisotnost je pogoj za normalno vzdrževanje življenjskih funkcij, sodelujejo pri rasti in razmnoževanju rastlin, pri obrambi pred zajedalci in patogenimi mikroorganizmi, nudijo pa tudi zaščito pred zunanjimi stresnimi dejavniki. Spojine vsebujejo vsaj en aromatski obroč z vsaj eno hidroksilno skupino. Glede na strukturne značilnosti jih razdelimo na fenolne kisline, flavonoide, kumarine, stilbene in tanine (Kočev Glavač, 2013).



Slika 3: Razvrstitev fenolnih spojin (Kočev Glavač, 2013; Cai in sod., 2006)

Fenolne kisline se delijo na derivate benzojske in derivate cimetine kisline. V naravi so večinoma v obliki glikozidov ali zaestrene z organskimi kislinami. Primer fenolne kisline je klorogenska kislina, ki je najpomembnejša fenolna spojina v kavi. Najbolj zastopani v rastlinah pa sta kavna in ferulna kislina (Kočev Glavač, 2013).

Tanine razdelimo na kondenzirane in hidrolizirajoče. Kondenzirani tanini so oligomeri in polimeri flavan-3-olov, hidrolizirajoči tanini pa so estri galne oz. elagove kisline z glukozo

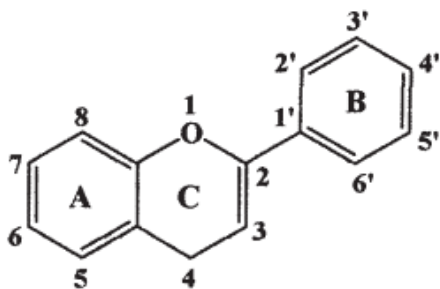
(Abramovič, 2011). Tanini so dobri antioksidanti. Večja kot je molekula tanina, večje je število hidroksilnih skupin in posledično njegova antioksidativna učinkovitost (Cai in sod., 2006).

Kumarini so skupina več kot 1300 spojin, zastopanih v rastlinah, glivah in bakterijah. Najbolj enostaven predstavnik je kumarin, dišeča spojina, ki daje značilen vonj po senu. Tudi drugi enostavni kumarini imajo značilne prijetne vonje, zato se včasih uporabljajo pri izdelavi parfumov. Sicer pa so molekule kumarinov v naravi največkrat glikolizirane ali zaestrene, pri čemer se vonj izgubi. Dokazali so številne terapevtske učinke kumarina, med drugim zmanjšuje otekline tkiva pri raznih poškodbah ali boleznih (Hoult in Payá, 1996).

Stilbeni so derivati cimetne kisline. V rastlinah nastajajo za zaščito. Tvorijo jih le nekatere vrste, ki so razvile osrednji encim v sintezi stilbenov – stilben sintazo. Med njimi so vinska trta, arašid in iglavci. Stilbeni so v rastlinah v prosti in glikolizirani obliki. Glikolizacija ima pomen pri shranjevanju in transportu stilbenov med celicami. Stilbeni so fitoaleksini, rastline jih uporabijo za zaščito pred patogenimi bakterijami in glivami, pospešeno pa jih proizvajajo tudi pri odzivu na oksidativni stres, ki ga povzroči UV sevanje (Chong, 2009). Najbolj poznan stilben je resveratrol, ki je najbolj zastopan v kožici rdečih grozdnih jagod in posledično tudi v rdečem vinu (Kočevar Glavač, 2013). Poznani so njegovi številni pozitivni učinki na zdravje. Znižuje holesterol in zmanjšuje verjetnost za nastajanje krvnih strdkov, s čimer ščiti pred boleznimi srca in ožilja. Varuje tudi pred nastankom raka in deluje kot nevroprotektant (Vuong in sod., 2014).

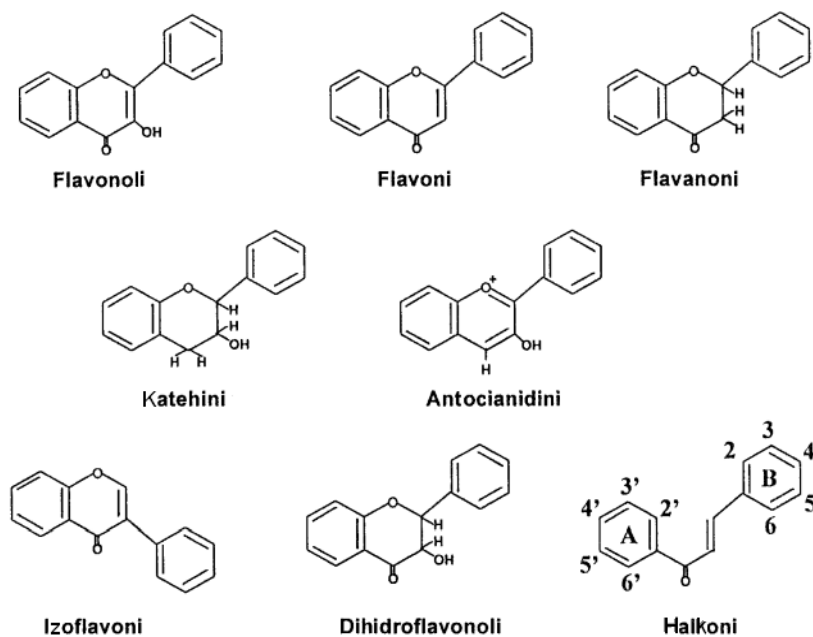
2.4.1 Flavonoidi

Ogrodje flavonoidov predstavlja veriga s 15 C atomi, prikazana na sliki 4. Osnovna struktura (C6-C3-C6) se imenuje flavan oz. 2-fenilbenzopiran (Abram in Simčič, 1997).



Slika 4: Osnovna enota flavonoidov (Graf in sod., 2005)

Sestavljeni so iz dveh aromatskih obročev (A in B), ki sta povezana preko tretjega, heterocikličnega obroča (C). Med seboj se razlikujejo v številu in mestu hidroksilnih skupin ter v stopnji nasičenosti heterocikličnega obroča, kar tudi določa antioksidativni potencial posameznih flavonoidov (Graf in sod., 2005). Najpomembnejše skupine flavonoidov so predstavljene na sliki 5.



Slika 5: Vrste flavonoidnih spojin (Cook in Samman, 1996)

V naravi so skoraj vedno v obliki glikozidov, zaradi tega so tudi vodotopni. V celicah se nahajajo v vakuolah. Sladkor je lahko mono-, di- ali trisaharid (npr. glukoza, galaktoza). V rastlinah so odgovorni za uravnavanje rasti, zaviranje bakterijskih in virusnih encimov in za zaščito pred ultravijoličnimi žarki UVB. Privabljajo tudi opraševalce, saj so med njimi rastlinski pigmenti, ki dajejo cvetovom, plodovom in listom rumeno, rdečo in modro barvo (Kočevar Glavač, 2013).

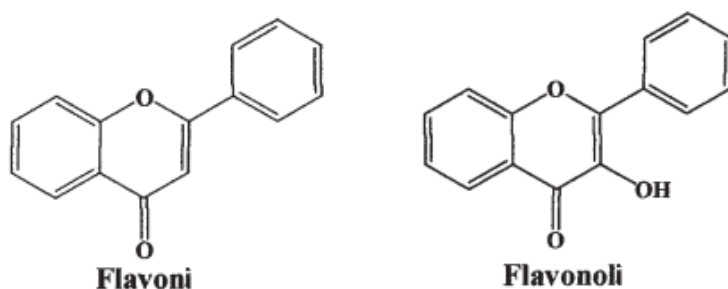
V organizmu imajo flavonoidi različne biološke učinke, pozitivno vplivajo pri številnih boleznih, predvsem po zaslugi močnega antioksidativnega potenciala. So dobri lovilci prostih radikalov in kelatorji divalentnih kationov. Kot močni antioksidanti delujejo protitumorno, za določene flavonoide (apigenin, nobiletin, viteksikarpin) pa so celo dokazali, da delujejo toksično na rakave celice. Za nekaj flavonoidov so ugotovili, da vplivajo na metabolizem arahidonske kisline in sicer zmanjšajo aktivnost encimov ciklooksigenaza in 5-lipoksidaza. Ciklooksigenaza je odgovorna za sintezo prostaglandinov

iz arahidonske kisline, 5-lipoksidaza pa za sintezo levkotrienov. Tako prostaglandini kot levkotrieni sodelujejo pri vnetnih procesih, z zaviranjem njihove sinteze pa flavonoidi delujejo protivnetno. Z lovljenjem prostih radikalov zmanjšujejo njihov toksičen učinek na celice, poleg tega pa zavirajo peroksidacijo lipidov, ki ima sicer veliko vlogo pri staranju celic in razvoju kroničnih bolezni. Dokazali so še številne druge pozitivne učinke, med drugim pri sladkorni bolezni, revmatičnih boleznih, astmi in alergijah, zmanjšujejo razvoj srčno-žilnih motenj, delujejo tudi analgetično, protibakterijsko in protivirusno (Cook in Samman, 1996; Kočever Glavač, 2013).

Flavonoidi predstavljajo približno dve tretjini fenolnih spojin, ki jih zaužijemo s prehrano (Kočever Glavač, 2013). Nahajajo se v sadju, zelenjavi, oreščkih, semenih, zeliščih, začimbah in polnovrednih žitih (Graf in sod., 2005). Najbogatejši viri so čaj, čebula in jabolka, v živilih najbolj zastopan flavonoid pa je kvercetin (Patel, 2008).

2.4.2 Flavoni in flavonoli

Flavoni so flavonoidi z osnovno verigo 2-fenilkromen-4-on, flavonoli pa 3-hidroksi-2-fenilkromen-4-on. Splošni strukturni formuli obeh skupin sta prikazani na sliki 6. Za obe skupini je značilna nenasičenost heterocikličnega obroča in karbonilna skupina na mestu 4, v strukturi, ki je prikazana na sliki 4. Flavonoli imajo v primerjavi s flavoni dodatno hidroksilno skupino na mestu 3.

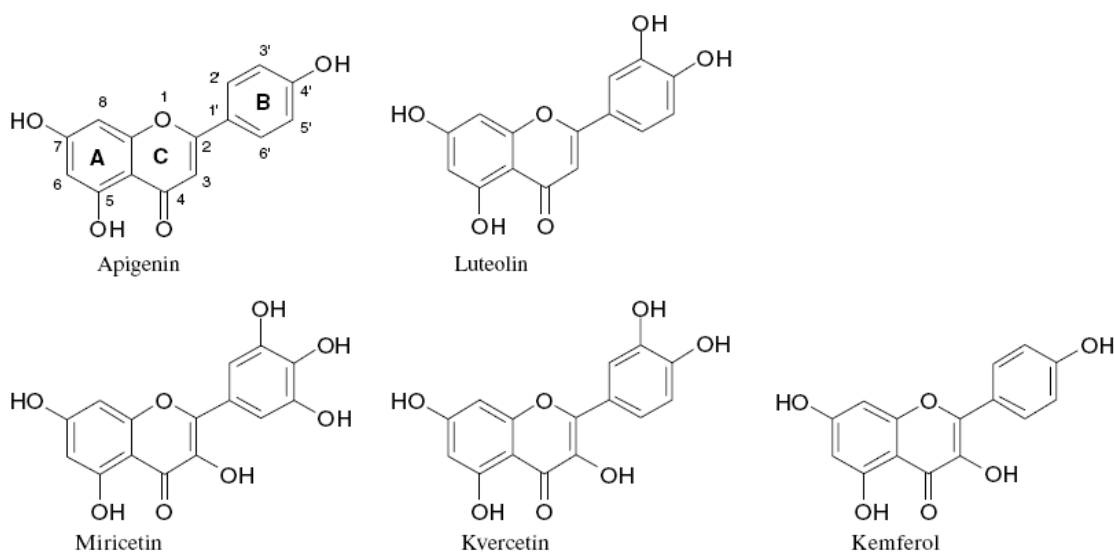


Slika 6: Splošni strukturni formuli flavonov in flavonolov (Graf in sod., 2005)

Flavoni, ki imajo po dve ali tri hidroksilne skupine na obročih A in B (mednje sodita tudi apigenin in luteolin, prikazana na sliki 7), kažejo zelo dobro antioksidativno učinkovitost že pri nizkih koncentracijah. So najbolj antioksidativno učinkovita skupina flavonoidov, k čemur veliko pripomoreta dvojna vez in karbonilna skupina na heterocikličnem obroču.

Ugotovili so, da večje število hidroksilnih skupin pomeni večjo učinkovitost pri lovljenju prostih radikalov, močnejši učinek imata tudi dve hidroksilni skupini na sosednjih ogljikovih atomih. Apigenin zmanjšuje tveganje za obolevnost za rakom dojk, prebavil, kože, prostate in rakavih krvnih boleznih. Izvlečki epigenina in luteolina kot naravnih flavonov, pa tudi sintetično pridobljeni flavoni, imajo lahko dober terapevtski učinek pri zdravljenju vnetij in avtoimunih boleznih. Ta lastnost je posebno uporabna pri kroničnih vnetjih, saj nimajo neželenih stranskih učinkov niti pri pogosti in dolgotrajni uporabi, za razliko od sintetičnih steroidnih in nesteroidnih protivnetnih učinkovin. Flavoni delujejo tudi protiglivično, protivirusno in protibakterijsko (Singh in sod., 2014).

Flavonoli so v naravi najbolj razširjena skupina flavonoidov. Znatno so zastopani v običajni prehrani in imajo širok spekter bioloških učinkov. Mednje sodi kvercetin, za katerega so ugotovili, da deluje antioksidativno, protivnetno in znižuje serumske maščobe. Ugotovili so, da uspešno zaščiti jetrne celice pred toksičnimi aflatoksini v hrani in bi lahko služil tudi za preventivo ali celo zdravljenje bolezni jeter (El – Nekeety in sod., 2014).

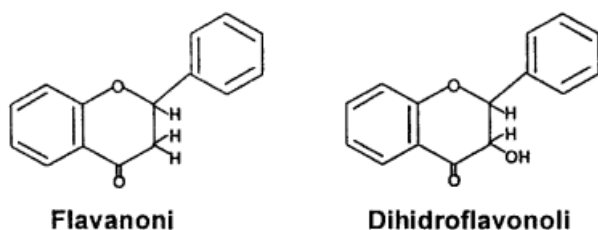


Slika 7: Flavona apigenin in luteolin ter flavonoli miricetin, kvercetin in kemferol (Škerget in sod., 2005)

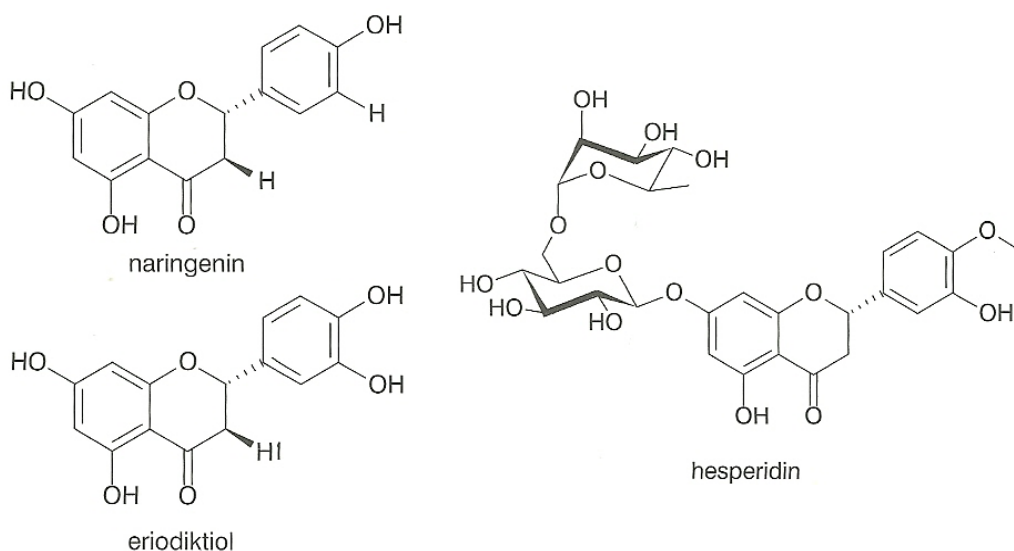
2.4.3 Flavanoni in dihidroflavonoli

Prav tako kot flavoni in flavonoli, imajo tudi flavanoni in dihidroflavonoli karbonilno skupino na mestu 4 v strukturi, ki je prikazana na sliki 4. Razlikujejo pa se v tem, da znotraj heterocikličnega obroča nimajo dvojne vezi. Posebnost, ki ti dve skupini loči od ostalih

flavonoidov, je kiralni center na mestu 2 pri flavanonih, dihidroflavonoli pa imajo še dodatni kiralni center na mestu 3 (Yáñez in sod., 2008).

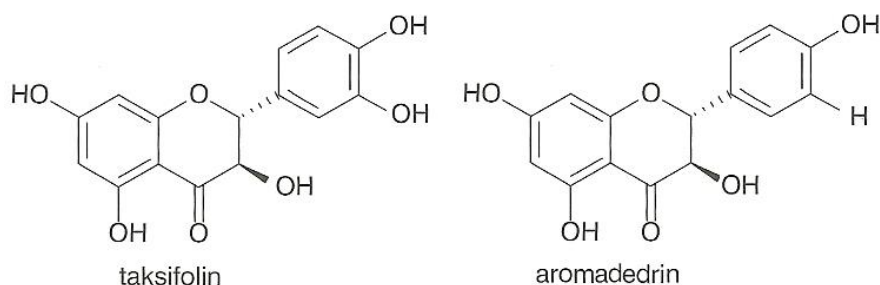


Slika 8: Splošna formula flavanonov in dihidroflavonolov (Cook in Samman, 1996)



Slika 9: Flavانونi naringenin, eriodiktiol in hesperidin (Kočevár Glavač, 2013)

Predstavnik dihidroflavonolov sta taksifolin (dihidrokvercetin) in aromadetrin (dihidrokvemferol). Za taksifolin so dokazali, da deluje protivnetno, ima pa tudi velik vpliv na metabolizem holesterola. Zavira delovanje MHG-CoA reduktaze – encima, ki določa hitrost poteka mevalonatne poti, produkt katere je med drugim tudi holesterol (González - Castejón in Rodríguez - Casado, 2011).



Slika 10: Dihidroflavonola taksifolin in aromadedrin (Kočevar Glavač, 2013)

2.4.4 Antioksidativno delovanje fenolnih spojin

Fenolne spojine preprečujejo oksidacijo na več načinov. Lovijo proste radikale, so reducenti, vežejo kovinske ione v komplekse in inhibirajo encime, ki katalizirajo reakcije, pri katerih nastajajo prosti radikali. Fenolne spojine radikalom oddajo vodikov atom, pri čemer nastane fenolni radikal, ki pa mora biti dovolj stabilen, da ne vzpodbuja nadaljnjih oksidacijskih reakcij. Stabilnost fenolnega radikala je posledica delokalizacije nesparjenega elektrona na benzenovem obroču (Abramovič, 2011).

Kako močno je posamezna fenolna spojina antioksidativno učinkovita, je odvisno od njene strukture. Učinkovitost povečujejo na benzenov obroč vezane funkcionalne skupine. To so hidroksilna, metilna in metoksi skupina. Vplivajo na večjo stabilnost fenolnega radikala (Abramovič, 2011). Na antioksidativno učinkovitost fenolnih kislin najbolj vplivata število in mesto hidroksilnih in metoksi skupin. Hidroksicimetne kisline so učinkovitejše od hidroksibenzojskih. Pri hidroksicimetnih kislinah je karboksilna skupina vezana na fenolni obroč preko etilenske skupine ($-\text{CH}=\text{CH}-$), kar poveča sposobnost oddaje vodikovega atoma in stabilnost fenolnega radikala. Pri flavonoidih je najpomembnejše število hidroksilnih skupin in tudi njihov položaj. Glikolizirani flavonoidi so manj učinkoviti kot pripadajoči aglikoni. Močno vplivata tudi dvojna vez in karbonylna skupina na mestu 4 v obroču C v strukturi, ki je prikazana na sliki 4. V povprečju so med flavonoidi najučinkovitejši katehini, sledijo flavonoli, halkoni, flavoni, flavanoni in nazadnje izoflavoni. Razvrstitev velja za spojine iz vsake skupine z enakim številom hidroksilnih skupin, ki so povezane s podobno sladkorno komponento. Dejansko pa lahko predstavniki skupin precej odstopajo zaradi velikega vpliva hidroksilnih skupin in glikolizacije (Cai in sod., 2006).

Nekateri fenoli imajo sposobnost, da vežejo kovinske ione v stabilne komplekse. Pogoji sta hidroksilni skupini v *orto* položaju. Če je hidroksilna skupina samo ena, ali pa sta skupini v *meta* ali *para* položaju, vezava ionov v komplekse ni mogoča. Pri flavonoidih vezavo ionov

omogočata hidroksilni skupini na mestu '3 in '4 ali 7 in 8. Pomembna pa je tudi prisotnost karbonilne skupine na mestu 4 in hkrati hidroksilne skupine na mestu 3 in/ali 5 v strukturi, ki je prikazana na sliki 4 (Abramovič, 2011).

2.5 MIKROBIOLOŠKI KVAR ŽIVIL

Mikroorganizmi so prisotni vsepovsod, v zraku, v vodi in tudi v večini prehranskih izdelkov. Nekatera živila nastanejo kot rezultat mikrobne aktivnosti, na primer jogurt, sir, kislo zelje in jabolčni kis. Probiotična živila vsebujejo žive mikroorganizme, ki bogatijo normalno črevesno floro pri človeku in imajo pozitiven učinek na zdravje. Včasih pa so živila lahko okužena z mikroorganizmi, ki delujejo kot kvarljivci. Kvar hrane so vse spremembe videza, okusa ali vonja, ki živilo napravijo nesprejemljivo za potrošnika. V živilu lahko pride celo do okužbe s patogenimi mikroorganizmi, ki po zaužitju povzročajo bolezni. Hrana namreč sestoji iz spojin, ki jih za svojo rast s pridom izkoriščajo mikroorganizmi. Nekatera živila so bolj pokvarljiva kot druga, odvisno od razmer za razmnoževanje bakterij. Glavni dejavnik je vodna aktivnost, ki je visoka na primer v mleku, mesu in svežem sadju, ki so hitro pokvarljiva živila. Nizka pa v moki in sladkorju, ki ju lahko shranimo za dlje časa. Svežo hrano kvarijo mnoge različne bakterije in kvasovke. Živila so zelo raznolika po kemijski sestavi in po drugih pogojih za preživetje in razmnoževanje mikroorganizmov, kot sta pH in temperatura shranjevanja. Vsako živilo zato naseljujejo le nekatere skupine organizmov, ki v danih pogojih lahko izkoriščajo prisotna hranila za svojo rast in razmnoževanje (Madigan in sod., 2012).

2.5.1 Zaščita živil

Živila pred mikrobiološkim kvarom zaščitimo tako, da vzpostavimo pogoje, ki upočasnijo rast mikroorganizmov, ki kvarijo hrano in povzročajo alimentarne bolezni.

Ključnega pomena pri shranjevanju živil je temperatura. Nižja temperatura pomeni počasnejše razmnoževanje mikroorganizmov in posledično počasnejše kvarjenje. Psihrotolerantni mikroorganizmi pa uspešno rastejo tudi pri nizkih temperaturah, ki so običajno v hladilniku (3–5 °C). Če želimo pokvarljiva živila shraniti za več kot nekaj dni, jih je potrebno zamrzniti. Običajna temperatura v zamrzovalniku je –20 °C. Ni pa mogoče zamrzniti prav vseh živil, saj zaradi spremembe teksture pri zamrzovanju in tajanju postanejo nesprejemljiva (Madigan in sod., 2012).

Mikroorganizmi za svoje metabolne procese potrebujejo vodo. Količino vode, ki jo imajo na razpolago, izrazimo z vodno aktivnostjo. Vodna aktivnost vode je 1. Po dodatku raznih

topljenec, največkrat sta to sladkor ali sol, pa se a_w zmanjša. Mikroorganizmi z molekulami topljenca tekmujejo za preostalo prosto vodo. Le redke bakterije uspevajo pri a_w nižji od 0,9, tako da dodan sladkor v marmeladi prepreči njihovo rast, medtem ko nekatere plesni rastejo celo pri a_w 0,65 in lahko pokvarijo sadne sirupe, v katerih je vsebnost sladkorja še višja. Količino vode, ki je za rast na razpolago mikroorganizmom, pa se lahko zmanjša tudi s sušenjem. Sušenje se lahko izvaja na več načinov. Živila najmanj poškoduje sušenje z liofilizacijo, kjer se živila zamrzne in vodo odstrani pri znižanem tlaku, a tak način je energetsko prezahteven za široko uporabo (Madigan in sod., 2012). Sušenje pri visoki temperaturi je hitro, a poškoduje živilo. Ne vpliva le na senzorično kakovost, pač pa tudi na prehransko vrednost, saj prihaja do kemijskih sprememb (Özcan in sod., 2005).

Zmanjševanje števila mikroorganizmov s segrevanjem je uporabno predvsem za živila z visoko vsebnostjo vode. S pasterizacijo uničimo patogene bakterije in večino tehnološko škodljivih bakterij. UHT pasterizacija se pogosto uporablja pri obdelavi mleka. Uniči vse mikroorganizme in podaljša obstojnost mleka celo do 6 mesecev brez potrebe po skladiščenju v hladilniku. Konzerviranje je proces, pri katerem se živilo, zapakirano v pločevinko ali steklen kozarec, segreje in s tem sterilizira (Madigan in sod., 2012).

Rast mikroorganizmov v živilih nadzorujemo tudi s kemijskimi dodatki. Nekateri izmed konzervansov lahko negativno vplivajo na zdravje, lahko delujejo na primer karcinogeno ali mutageno. Način uporabe in najvišja dovoljena koncentracija v živilih sta zakonsko predpisana in morata biti dosledno upoštevana (Madigan in sod., 2012). Potrošniki so vseeno nezaupljivi do sintetičnih aditivov, saj so zaskrbljeni zaradi morebitne toksičnosti in so bolj naklonjeni naravnim učinkovinam, ki jih dojemajo kot varne. Izvlečki začimb in zelišč so bogat vir fenolnih spojin in uspešno zavirajo rast patogenih bakterij, ki izvirajo iz hrane. Uporaba takšnih izvlečkov kot dodatkov v živilih prinaša veliko možnosti za zaščito pred kvarom brez sintetičnih dodatkov (Shan in sod., 2007).

2.5.2 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni je po Gramu negativna bakterija spiralne oblike z bičkom na enem ali na obeh koncih. Je mikroaerofilna, primerna koncentracija kisika v okolju za njeno rast znaša med 3 in 15 %, in termofilna, najboljša raste pri temperaturi 42 °C (Ketley, 1997). Kampilobakter je zahteven mikroorganizem, zelo občutljiv na okoljske strese, kot so izčrpanost zaloge hranil, pomanjkanje vode, neugoden pH ali prisotnost višje koncentracije kisika. V stresnih razmerah se celice pretvorijo v stanje VBNC – to so žive, a ne kultivabilne celice. V taki obliki lahko bakterije preživijo tudi več mesecev, ob pojavu boljših razmer pa zopet pridobijo kultivabilnost in s tem tudi sposobnost, da povzročijo kampilobakteriozo (He in Chen, 2010).

C. jejuni je del normalne črevesne flore perutnine, saj so v črevesju zanj ugodne mikroaerofilne in temperaturne razmere. *C. jejuni* lahko okuži tudi domače živali, na primer pse, in tudi pri njih sproži bolezenske znake, ki pa so običajno blažji kot pri človeku. Človek se s *C. jejuni* okuži z zaužitjem kontaminirane hrane. Poleg perutnine je lahko vir okužbe tudi svinjina ali okužena pitna voda, redko tudi goveje meso ali okuženo surovo mleko. Pojavijo se visoka vročina, glavobol, splošno slabo počutje, slabost, trebušni krči in huda vodeno-krvava driska. Bolezenski znaki se umirijo v 7 ali največ 10 dneh (Madigan in sod., 2012).

V Sloveniji je bil v letu 2013 kampilobakter najpogostejši povzročitelj črevesnih okužb. Enako velja tudi za številne ostale evropske države. Letna incidenčna stopnja kampilobakterskih okužb je znašala 48,4/100000 prebivalcev (IVZ, 2014).

2.5.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus so po Gramu pozitivne, fakultativno anaerobne bakterije okrogle oblike. Bolje uspevajo v aerobnem okolju. Delijo se v več ravninah in oblikujejo nepravilne skupke celic. Tvorijo gladke kolonije rumene barve, na krvnem agarju okrog njih opazimo pas hemolize (Madigan in sod., 2012). Pogosto so prisotni v normalni mikrobnii flori zgornjih dihal in na koži. Kar 20–30 % odraslih oseb je zdravih prenašalcev te bakterije (Seme, 2002). Pri tem ne razvijejo bolezenskih znakov, so pa bolj izpostavljeni morebitni okužbi. Večina infekcij je posledica prenosa stafilokokov iz normalne flore okuženega človeka brez simptomov na občutljive osebe, lahko tudi kot primer bolnišnične okužbe (Lowy, 1998).

Prek osebja, ki pripravlja hrano, je možna tudi kontaminacija živil s sevi *S. aureus*, ki izločajo enterotoksine, zaužitje pa povzroči zastrupitev. *S. aureus* povzroča gnojne okužbe, ki se preko krvnega obtoka lahko prenesejo v različne organe. Povzroča lokalizirane okužbe kože in mehkih tkiv, kot so gnojne okužbe ran in impetigo, okužbe zgornjih in spodnjih dihal, kot so vnetje sinusov, srednjega ušesa in pljučnica. Med možnimi okužbami osrednjega živčnega sistema so meningitis ter možganski in epiduralni absces. Povzroča še okužbe lokomotorne aparata in sečil, možna je bakteriemija, ki lahko preide v sepsa ali prenese vnetje na srčne zaklopke. Poleg zastrupitve s hrano sta med stafilokoknimi okužbami, ki so posledica sproščanja toksinov, še sindrom toksičnega šoka in stafilokokni kožni sindromi z luščenjem (Seme, 2002).

S. aureus je razvil številne sposobnosti prilagoditve, s katerimi si olajša okužbo človeka in preživetje v človeškem organizmu. Izloča encime, s katerimi si omogoči lažje prehajanje v zdrava tkiva in hitrejšo širjenje okužbe, na primer lipazo in nukleazo. Pred makrofagi se zaščiti s površinskimi polisaharidi, z beljakovinskimi receptorji pa se dobro pritrdi na različne strukture in tam povzroči vnetje. Delujejo še s tvorbo toksinov, na primer

hemolitičnih encimov, ki razkrajajo eritrocite in delujejo citotoksično, ali enterotoksinov, ki povzročajo drisko in bruhanje (Seme, 2002).

2.5.4 *Escherichia coli*

E. coli je po Gramu negativen, fakultativno anaeroben bacil (Andlovic, 2002). Večina sevov je nepatogenih in so del normalne črevesne mikroflore človeka. Ostali, patogeni sevi, povzročajo okužbe v prebavilih. Poznanih je okrog 200 patogenih sevov *E. coli*. Številni med njimi proizvajajo močne enterotoksine, ki lahko povzročijo zelo hudo, celo življenje ogrožajočo drisko ali vnetje urinarnega trakta (Madigan in sod., 2012).

E. coli je povzročitelj velikega dela okužb sečil. Vir okužbe s patogenimi sevi je lastna črevesna flora. Možen, zelo nevaren zaplet pri okužbi z *E. coli*, je meningitis. Druge okužbe, ki jih *E. coli* še povzroča, so sepsa pri bolnikih v bolnišnici, do katere največkrat pride preko okužbe sečil, vnetje slepiča, trebušne mrene, okužbe kirurških ran in rodil ter pljučnica. Okužbe prebavil povzroča več skupin *E. coli*. To so: verotoksigene, enteropatogene, enterotoksigene, enteroinvazivne in enteroagregativne *E. coli* (Andlovic, 2002).

Za enteropatogeno *E. coli* je značilno pritrjevanje s fimbrijami na resice epitelijskih celic tankega črevesa, pri čemer celice uničijo. Povzroča drisko pri otrocih do treh let starosti. Naravni vir enteropatogene *E. coli* so ljudje in domače živali, bolezen se prenaša fekalno oralno med otroki v vrtcih in bolnišnicah, lahko pa tudi preko okužene hrane. Enterotoksigena *E. coli* tvori termolabilni enterotoksin, ki deluje podobno kot toksin kolere in povzroča obilno vodeno drisko pri majhnih otrocih. Enterotoksigena *E. coli* povzroča potovalno drisko. Okužba se večinoma prenaša z vodo ali hrano, le redko preko stika z okuženo osebo. Enteroinvazivna *E. coli* je po lastnostih in načinu okužbe podobna šigeli. Uniči epitelijske celice tankega črevesa s pritrjevanjem na resice. Pojavi se krvava driska, značilna je tudi vročina. Epidemije so pogostejše v državah v razvoju, pojavljajo pa se tudi v razvitih državah. Povzročajo tudi potovalno drisko. Sevi enteroagregativne *E. coli* se na epitelne celice črevesa pritrjujejo v značilnih skupkih in izločajo enterotoksin (Andlovic, 2002). V državah v razvoju povzročajo dolgotrajno vodeno drisko pri otrocih, sicer pa se pojavljajo pri ljudeh z znižano odpornostjo in pri potnikih, ki potujejo v manj razvite države. Glavni vir okužbe z enteroagregativno *E. coli* je kontaminirana hrana. Ne povzroča le akutne oblike bolezni, ampak lahko v črevesu ostane dolgo časa, ne da bi povzročila bolezenske znake. Posledica je kronično vnetje črevesa, kar vodi v podhranjenost zaradi poslabšane absorpcije hranil in vedno hujše izbruhe bolezni (Okhuysen in DuPont, 2010).

Verotoksigena *E. coli* izloča dva tipa enterotoksinov. Podobni so Šigovim toksinom, ki so značilni za bakterijo *Shigella dysenteriae*. Verotoksini so glavni virulenčni dejavnik verotoksigene *E. coli*. Delujejo tako, da v celicah gostitelja zaustavijo sintezo proteinov.

Klinični znaki okuženih so različni, od blage driske do obilne krvave driske in možnih hudih zapletov. Zelo nevaren je hemolitični uremični sindrom. Vir verotoksigena *E. coli* so prebavila prežvekovalcev, predvsem goveda. Bolezen se prenaša z okuženo govedino, z nepasteriziranim mlekom, preko kravjih iztrebkov se lahko prenese v vodo, bakterije v vodi pa lahko kontaminirajo tudi zelenjavo in sadje. Možen je tudi prenos s stikom z okuženimi ljudmi in živalmi (Andlovic, 2002; Trkov in sod., 2012).

2.5.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je po Gramu pozitiven, aeroben bacil, ki pri človeku povzroča listeriozo (Müller Premru, 2002). Nahaja se v prsti, v vodi, na rastlinah in v živalih. Dolgo časa lahko preživi v neugodnih pogojih. Glavni način okužbe je preko kontaminirane hrane. Mogoč, čeprav redek, je tudi prenos s stikom z okuženo živaljo ali človekom. Zaradi odpornosti je v živilstvu *L. monocytogenes* zelo problematičen mikroorganizem. Preživi nekatere tehnološke procese, pri katerih druge bakterije zaradi kislosti in nizke a_w pomrejo. Za razliko od številnih patogenov se počasi, a uspešno, razmnožuje pri nizkih temperaturah, zato so tudi pravilno skladiščena živila v hladilniku vir tveganja (Allerberger in Wagner, 2009). S segrevanjem pri 60 °C se uniči v 30 min (Müller Premru, 2002).

Listerioza se kaže v različnih oblikah. Pri odraslih zdravih ljudeh povzroči za gripo značilne simptome – vročino in splošno slabo počutje ali pa vnetje črevesa z vročino. Pri ljudeh z oslABLJENO odpornostjo, kot so starejši, majhni otroci in osebe, ki jemljejo imunosupresive, pa lahko poteka kot meningitis ali sepsa (Allerberger in Wagner, 2009). Vnetje se lahko razširi celo na srčne zaklopke. Okužba je lahko tudi lokalna in se kaže kot abscesi ali gnojne rane (Müller Premru, 2002). Zelo nevarna je okužba nosečnice z *L. monocytogenes*. Nosečnica razvije bolezenske znake, značilne za gripo, ali pa ostane povsem brez simptomov. Posledice listerioze so odvisne od gestacijske starosti ploda, ki se okuži preko posteljice. Okužba v nosečnosti v tretjini primerov povzroči splav ali mrtvorojenost, pri ostalih novorojenčkih pa zgodnjo neonatalno listeriozo (Allerberger in Wagner, 2009). Zgodnja neonatalna listerioza se pokaže v nekaj urah ali dneh po rojstvu. Okužba novorojenčka med porodom povzroči pozno neonatalno listeriozo, bolezenski znaki se pojavijo vsaj 5 dni po rojstvu. Običajni simptomi so dihalna stiska, vročina, izpuščaji, zlatenica in otrplost (Mardis in sod., 2012).

2.6 METODE UGOTAVLJANJA PROTIMIKROBNE UČINKOVITOSTI

Rastline vsebujejo številne spojine s protimikrobnim delovanjem, na primer fenolne spojine, terpenoide in alkalioide. Posebej bogata s takimi snovmi so začimbe in zelišča. Uporaba protimikrobno učinkovitih rastlinskih pripravkov predstavlja možno alternativo tako

antibiotikom kot tudi kemijskim dodatkom v živilstvu z namenom preprečevanja kvara (Low Dog, 2006). Uspešnost rastlinskih pripravkov v boju proti mikroorganizmom ovrednotimo z različnimi metodami, ki se delijo na difuzijske metode, metode z razredčevanjem in bioavtografične metode. Na rezultate analiz vpliva veliko dejavnikov, kot so geografsko poreklo in rastni pogoji rastlin, izbrana metoda ekstrakcije, izbrano topilo, koncentracija in rastna faza kulture ter izbrana mikrobiološko metoda za določanje protimikrobne učinkovitosti. Protimikrobno učinkovitost vzorca najpogosteje izrazimo z minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), to je najnižja koncentracija protimikrobnega sredstva, ki še zaustavi rast mikroorganizmov (Rios in sod., 1988).

Bioavtografija je metoda, pri kateri preiskovani vzorec s protimikrobnim delovanjem najprej ločimo na posamezne komponente s kromatografijo. Možni so trije načini izvedbe. Pri direktni bioavtografiji na gelski ali papirni kromatogram z razprševanjem nanese testirani mikroorganizem in ga inkubiramo v primernih pogojih. Na površini kromatograma zrastejo bakterije, kar opazimo kot tanek film, na mestih, kjer je rast onemogočena zaradi protimikrobne snovi, pa so vidne cone inhibicije. Pri kontaktni avtobiografiji kromatogram za določen čas (15 – 30 min) položimo na površino hranilnega agarja, ki je že inokuliran s preiskovano kulturo. Pri imerzijski bioavtografiji razvit kromatogram prelijemo z agarjem, po nekaj urah pa ga premažemo s preiskovano kulturo. V obeh primerih snovi s kromatograma difundirajo v plast agarja in ponekod zaustavijo rast bakterij. Po inkubaciji na teh mestih nastanejo vidne cone inhibicije (Rios in sod., 1988).

Difuzijske metode se izvajajo v trdnih gojiščih z uporabo diskov ali luknjic. V obeh primerih se takoj po inokulaciji gojišča s preiskovano kulturo nanese preiskovani protimikrobno učinkovit vzorec. S protimikrobno snovjo prepojimo papirnate diske in jih položimo na površino trdnega gojišča oziroma v gojišče napravimo luknjice in vanje damo določeno količino vzorca. Protimikrobna snov prehaja iz diskov oziroma luknjic v trdno gojišče in zavira rast mikroorganizmov v času inkubacije. Okrog diskov oziroma luknjic nastanejo vidne cone inhibicije, katerih premer uporabimo kot merilo protimikrobne učinkovitosti (Rios in sod., 1988).

Metode z razredčevanjem se izvajajo v trdnih ali tekočih gojiščih. Za določanje v trdnih gojiščih se pripravi različne koncentracije preiskovanega vzorca v hranilnem agarju že pred razlitjem na plošče. Na ploščah, kjer je vzorec dovolj koncentriran, da je protimikrobno učinkovit, bakterije po nacepiti in inkubaciji ne zrastejo. Na isto ploščo lahko nacepimo več različnih mikroorganizmov, ki jim ustrezajo enaki pogoji inkubacije. Slabost metode je velika poraba materiala in časa za pripravo trdnih gojišč. V tekočem gojišču prav tako pripravimo različne razredčitve preiskovanega vzorca pred nacepitvijo in inkubacijo. Rast bakterij vidimo kot motnost v gojišču, stopnjo inhibicije lahko ovrednotimo tudi spektrofotometrično (Rios in sod., 1988). Možna je izvedba na mikrotitrski plošči, kjer so

potrebni zelo majhni volumni preiskovanih vzorcev. Mikrodilucija v tekočem gojišču je zanesljiva metoda, ki omogoča analizo velikega števila vzorcev v kratkem času. Prisotnost oziroma odsotnost rasti bakterij v posameznih poljih mikrotitrne plošče lahko ovrednotimo na več načinov, in sicer na podlagi merjenja fluorescence, bioluminiscence ali z odčitavanjem spremembe barve gojišča pod vplivom barvnega indikatorja (Grare in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski material

V raziskavi smo uporabili naslednji rastlinski material:

- zamrznjen limonasti timijan,
- zamrznjena bazilika,
- posušen limonasti timijan,
- posušena bazilika.

Rastlinski material smo dobili z Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Zamrznjeni vzorci so bili shranjeni pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posušeni vzorci so se sušili dva dni pri $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Shranjeni so bili v papirnati vrečki v suhem prostoru. Svež pridelek limonastega timijana je vseboval 71,8 % vlage. Svež pridelek bazilike je vseboval 84,5 % vlage.

3.1.2 Mikroorganizmi

Uporabili smo po šest sevov štirih vrst bakterij iz mikrobiološke zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. Vsi uporabljeni mikroorganizmi so bili predhodno shranjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v krioeprevetah, v tekočem gojišču BHI z dodatkom 20 % glicerola (v/v).

Uporabljeni sevi:

Campylobacter jejuni: C2, C33, 11168, 375/05, 573/03, K49/4

Staphylococcus aureus: 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 5.6, ŽMJ 72

Listeria monocytogenes: ŽM 52, ŽM 60, ŽM 62, ŽM 71, ŽM 72, L 95

Verotoksigena *Escherichia coli*: 2-3, 2-4, 62-4, 80-8, 80-21, 81-30

3.1.3 Mikrobiološka gojišča

Uporabili smo naslednja mikrobiološka gojišča, pripravljena v skladu z navodili na embalaži:

- ALOA (Biolife, Italija),
- Baird Parker (Biolife, Italija),
- Karmali (Oxoid, Anglija),
- MHA (Oxoid, Anglija),
- MHB (Oxoid, Anglija).

3.1.4 Reagenti in pribor

Za analize smo uporabili naslednje reagente:

- aluminijev triklorid (Sigma, Nemčija),
- BHT (Sigma, Nemčija),
- DMSO (Merck, Nemčija),
- DNP (Sigma, Avstrija),
- DPPH• reagent (Sigma, Nemčija),
- etanol (96 %, Merck, Nemčija),
- Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, Švica),
- kalijev hidroksid (Sigma, Švedska),
- klorogenska kislina hemihidrat (Fluka, Indija),
- kvercetin (Sigma, Nemčija),
- menadion (Sigma, ZDA),
- naringenin (Sigma, Nemčija),
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija),
- natrijev karbonat (Merck, Nemčija),
- natrijev nitrit (Alkaloid, Makedonija),
- resazurin (Sigma, ZDA),
- rutin,
- žveplena kislina (96 %, Merck, Nemčija).

Za pripravo raztopin smo uporabljali bidestrilirano vodo.

Uporabljali smo sledeče naprave in pribor:

- avtoklav (Sutjeska, Srbija),
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija; Gilson, Francija),
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija),
- centrifuga (Centric 322B, Tehnica, Slovenija),
- čitalec mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan, Švica),
- hladilnik (LTH, Slovenija),
- inkubator (Sutjeska, Srbija),
- magnetno mešalo (IKA[®] RH basic KT/C, Nemčija),
- mešalec mikrotitrskih plošč (Eppendorf, Nemčija),
- plinska jeklenka z mešanico plinov (10 % CO₂, 3 % O₂, 87 % N₂, Istragas, Slovenija),
- spektrofotometer za merjenje optične gostote (MA 9520, Iskra, Slovenija),
- tehtnica (Mettler Toledo AT201, Švica),
- ultrazvočna kopel (Bandelin Sonorex TK52, Nemčija),
- UV-VIS spektrofotometer (Hewlett - Packard 8453, ZDA),
- vakuumška centrifuga (GeneVac HT-4 series II, ZDA),
- vodna kopel (WB-30 STE, Kambič, Slovenija),
- vrtinčnik (IKA[®] MS3 baxis, Nemčija),
- zamrzovalnik (LTH, Slovenija).

Pribor:

- 96-mestne mikrotitrške ploščice za merjenje fluorescence,
- aluminijeva folija,
- bučke,
- čaše,
- epice (Eppendorf, Nemčija, Sarstedt, Nemčija),
- keramična terilnica,
- ladjice za tehtanje,
- nastavki za pipete (Eppendorf, Nemčija; Gibson),
- petrijeve ploščice (Labortechnika Golias, Slovenija),
- plastične centrifugirke (Eppendorf, Nemčija),
- plastične kivete (Brand, Nemčija),
- plinski gorilnik,
- razmazovalne palčke (hokejke) (Labortechnika Golias, Slovenija),
- rokavice,

- steklene epruvete,
- spatula,
- stoparica,
- žlička za tehtanje.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorca

Zamrznjene vzorce timijana in bazilike smo na drobno narezali.

Posušene vzorce smo strli v možnarju.

3.2.2 Ekstrakcija

V centrifugirke smo zatehtali 3,00 g zamrznjenih vzorcev timijana in bazilike ter 1,50 g posušenih vzorcev. Dodali smo 30,0 mL 96 % etanola. Ekstrakcija je potekala 24 ur na stresalniku v vodni kopeli pri 60 °C. Za vsak vzorec smo opravili ekstrakcijo v dveh paralelkah.

Po ekstrakciji smo vzorce centrifugirali 10 min pri 3900 g. Supernatant smo previdno odlili in shranili v hladilnik. Usedlino smo zavrgli.

3.2.3 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določali po metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). V reakciji Folin-Ciocalteu reagenta s fenolnimi spojinami nastane modro obarvan kompleks, ki smo ga določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 746 nm (A_{746}).

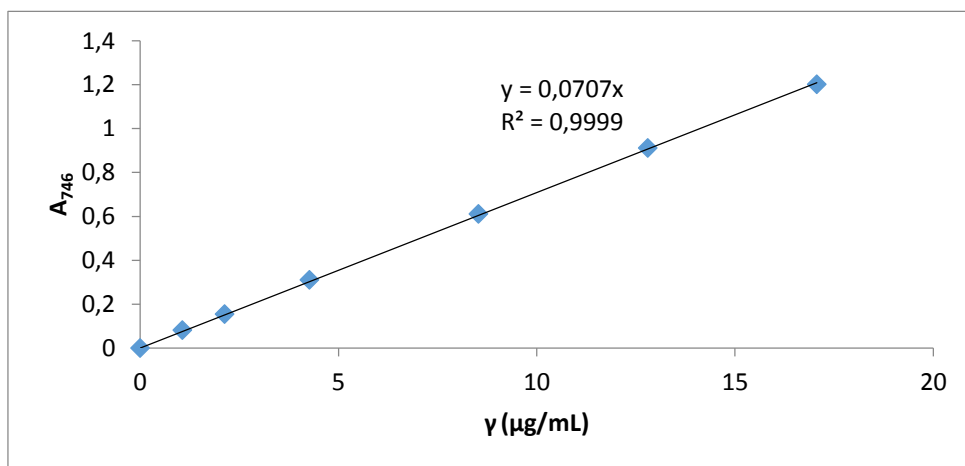
Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili klorogensko kislino. V 25 mL bučko smo zatehtali 10,25 mg klorogenske kisline hemihidrata ($C_{16}H_{18}O_9 \cdot 0,5H_2O$) in z etanolom dopolnili do oznake. Koncentracija klorogenske kisline v izhodni raztopini je bila 400 µg/mL. Uporabili smo različne razredčitve pripravljene raztopine. K ustreznemu volumnu raztopine klorogenske kisline (Preglednica 1) smo odmerili destilirano vodo do 2,75 mL in postopali tako, kot je v nadaljevanju opisano v postopku za določitev skupnih fenolnih snovi v izvlečkih. Za vsako razredčitev smo opravili meritev A_{746} v treh ponovitvah.

Slepi vzorec smo pripravili po istem postopku, le da smo namesto raztopine klorogenske kisline dodali etanol.

Preglednica 1: Volumen (V) izhodne raztopine klorogenske kisline, masna koncentracija (γ) klorogenske kisline v reakcijski zmesi in povprečna vrednost izmerjenih absorban A_{746} .

V (μ L)	γ (μ g/mL)	$\bar{A}_{746}$
10	1,07	0,0807
20	2,13	0,1540
40	4,27	0,3100
80	8,53	0,6107
120	12,80	0,9112
160	17,07	1,2012

Iz masne koncentracije klorogenske kisline v reakcijski zmesi in povprečne vrednosti izmerjene A_{746} smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili smerni koeficient premice. Vrednost koeficienta, k, je $0,0707 \pm 0,0003$ ($R^2=0,9999$).



Slika 11: Umeritvena krivulja s klorogensko kislino za določitev skupnih fenolnih spojin

Za določitev vsebnosti skupnih fenolnih spojin v izvlečkih iz zamrznjenih in posušenih vzorcev timijana in bazilike smo 100 μ L ustrezno razredčenega izvlečka dopolnili z destilirano vodo do 2,75 mL. Dodali smo 0,5 mL Folin-Ciocalteu reagenta, razredčenega z destilirano vodo v razmerju 1:2, in čez 5 min še 0,5 mL 20 % raztopine Na_2CO_3 . Po 90 min smo izmerili A_{746} proti slepemu vzorcu. Slepi vzorec smo pripravili po istem postopku, le da smo namesto izvlečka uporabili etanol. Vse vzorce smo analizirali v treh paralelkah.

Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v reakcijski zmesi smo izračunali iz zveze:

$$\gamma_{rz} = \frac{A_{746}}{k} \quad \dots(2)$$

γ_{rz} – masna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi ($\mu\text{g/mL}$)

A_{746} – izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 746 nm

k – smerni koeficient umeritvene krivulje

Masno koncentracijo fenolnih spojin v izvlečkih smo določili tako, da smo najprej izračunali masno koncentracijo v 100 μL razredčenega izvlečka, uporabljenega v analizi.

$$\gamma_i = \frac{\gamma_{rz} \times V_{rz}}{V_i} \quad \dots(3)$$

γ_i – masna koncentracija fenolnih spojin v razredčenem izvlečku ($\mu\text{g/mL}$)

V_{rz} – volumen reakcijske zmesi (3,75 mL)

V_i – volumen razredčenega izvlečka (100 μL)

Dobljeni rezultat smo pomnožili z razredčitvenim faktorjem, saj smo vsak izvleček predhodno ustrezno razredčili.

$$\gamma = \gamma_i \times R \quad \dots(4)$$

γ – masna koncentracija fenolnih spojin v izvlečku ($\mu\text{g/mL}$)

R – razredčitveni faktor

Izračunali smo maso fenolnih spojin v izvlečku.

$$m_{TP} = \gamma \times V \quad \dots(5)$$

m_{TP} – masa fenolnih spojin v izvlečku (μg)

V – volumen izvlečka (30 mL)

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v posušeni oziroma zamrznjeni vzorci limonastega timijana in bazilike smo izrazili v ekvivalentih klorogenske kisline kot mg klorogenske kisline na gram rastlinskega materiala (mg KK/g), iz katerega smo pripravili izvleček.

$$m_{TP}/g = \frac{m_{TP}}{m_{rast}} \quad \dots(6)$$

m_{TP}/g – masa skupnih fenolnih spojin v gramu rastlinskega materiala (mg KK/g)

$m_{rast.}$ – masa rastline (g)

3.2.4 Določanje vsebnosti skupnih flavonoidov

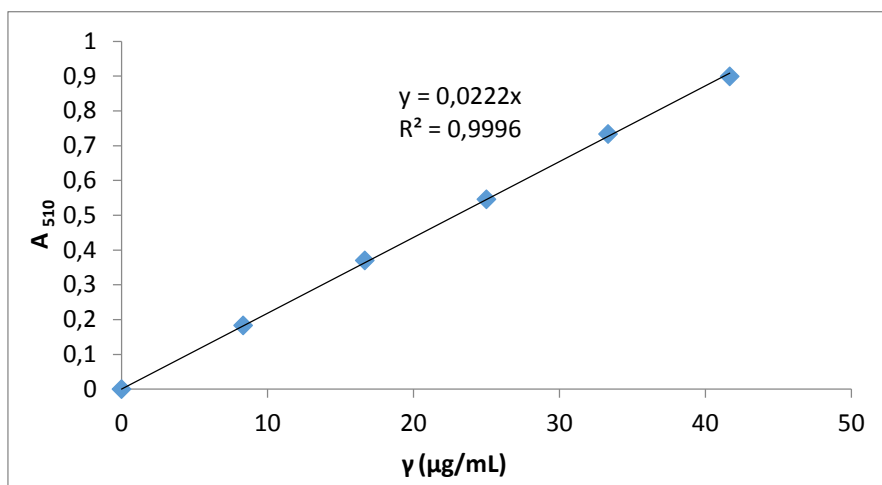
Vsebnost skupnih flavonoidov smo določili spektrofotometrično. Flavonoidi v reakciji z $AlCl_3$ vežejo aluminijev ion v kompleksno spojino, ki absorbira svetlobo pri valovni dolžini 510 nm (Yang in sod., 1999).

Umeritveno krivuljo za določanje vsebnosti skupnih flavonoidov smo pripravili z rutinom. Pri tem smo 5 mg rutina zatehtali v 10 mL bučko in do oznake dopolnili s 96 % etanolom. Uporabili smo različne razredčitve osnovne raztopine, vsako razredčitev smo pripravili v treh paralelkah. K 250 μ L različno razredčenih raztopin rutina smo dodali 1,25 mL destilirane vode in 0,075 mL 5 % raztopine $NaNO_2$. Po 5 min smo dodali 0,15 mL 5 % raztopine $AlCl_3$. Po 6 min smo dodali še 0,5 mL 1M $NaOH$ in z destilirano vodo dopolnili do končnega volumna 3 mL. Po dodatku vsakega reagenta smo vzorce dobro premešali. Po 30 min od dodatka zadnjega reagenta smo izmerili absorbanco proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 510 nm (A_{510}). Slepí vzorec smo pripravili na enak način, le da smo namesto raztopine rutina dodali etanol.

Preglednica 2: Volumen (V) izhodne raztopine rutina, masna koncentracija (γ) rutina v reakcijski zmesi in povprečna vrednost izmerjenih absorbanc A_{510} .

V (μ L)	γ (μ g/mL)	$\bar{A}_{510}$
50	8	0,1832
100	17	0,3699
150	25	0,5459
200	33	0,7333
250	42	0,8995

Iz masne koncentracije rutina in povprečne vrednosti izmerjene A_{510} smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili smerni koeficient premice. Vrednost smernega koeficienta, k, je $0,0222 \pm 0,0002$ ($R^2=0,9996$).



Slika 12: Umeritvena krivulja z rutinom za določanje vsebnosti skupnih flavonoidov

Vsebnost skupnih flavonoidov v timijanu in baziliki smo določili tako, da smo odmerili 250 μL izvlečka, ustrežno razredčenega v etanolu, in z njim postopali enako kot pri pripravi umeritvene krivulje. Za vsak izvleček smo opravili določitev v treh paralelkah. Za slepi vzorec smo namesto izvlečka dodali etanol.

Masno koncentracijo skupnih flavonoidov v reakcijski zmesi smo izračunali iz zveze:

$$\gamma_{rz} = \frac{A_{510}}{k} \quad \dots(7)$$

γ_{rz} – masna koncentracija skupnih flavonoidov v reakcijski zmesi ($\mu\text{g/mL}$)

A_{510} – izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 510 nm

k – smerni koeficient umeritvene krivulje

Z upoštevanjem volumna reakcijske zmesi in volumna uporabljenega vzorca smo izračunali masno koncentracijo skupnih flavonoidov v razredčenem izvlečku.

$$\gamma_i = \frac{\gamma_{rz} \times V_{rz}}{V_i} \quad \dots(8)$$

γ_i – masna koncentracija skupnih flavonoidov v razredčenem izvlečku ($\mu\text{g/mL}$)

V_{rz} – volumen reakcijske zmesi (3 mL)

V_i – volumen razredčenega izvlečka (0,25 mL)

Izračunano masno koncentracijo skupnih flavonoidov v 250 µL razredčenega izvlečka, uporabljenega v analizi, smo pomnožili z razredčitvenim faktorjem, saj smo vse izvlečke predhodno razredčili in sicer izvlečke iz sušenih rastlin 10-krat, iz zamrznjenega timijana 5-krat, iz zamrznjene bazilike pa 2-krat.

$$\gamma = \gamma_i \times R \quad \dots(9)$$

γ – masna koncentracija skupnih flavonoidov v izvlečku (µg/mL)

R – razredčitveni faktor

Izračunali smo maso skupnih flavonoidov celotnem pripravljenem izvlečku.

$$m_{TF} = \gamma \times V \quad \dots(10)$$

m_{TF} – masa skupnih flavonoidov v izvlečku (µg)

V – volumen etanola, uporabljenega pri ekstrakciji (30 mL)

Vsebnost skupnih flavonoidov v posušenih oziroma zamrznjenih vzorcih limonastega timijana in bazilike smo izrazili v ekvivalentih rutina kot mg rutina na gram rastlinskega materiala, iz katerega smo pripravili izvleček (mg RU/g).

$$m_{TF}/g = \frac{m_{TF}}{m_{rast.}} \quad \dots(11)$$

m_{TF}/g – masa skupnih flavonoidov v gramu rastlinskega materiala (mg RU/g)

$m_{rast.}$ – masa rastline (g)

3.2.5 Določanje vsebnosti skupnih flavonov in flavonolov

Vsebnost skupnih flavonov in flavonolov smo določili z metodo, ki jo je opisala Popova s sodelavci (2005). Flavoni in flavonoli tvorijo stabilne komplekse z aluminijevim ionom, ki se veže na keto- skupino na mestu 4 in hidroksilno skupino na mestu 3 ali 5 v strukturi, ki je prikazana na sliki 4 (Humadi in Istudor, 2008).

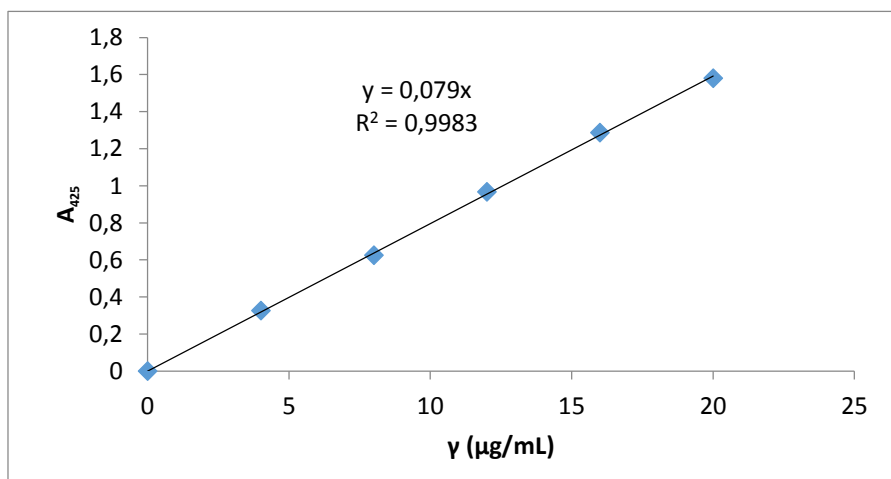
Umeritveno krivuljo za določitev vsebnosti flavonov in flavonolov smo pripravili s kvercetinom. 10 mg kvercetina smo zatehtali v 10 mL bučko in do oznake dopolnili z

etanolom. Uporabili smo različne razredčitve osnovne raztopine. Za vsako razredčitev smo opravili določitev v treh paralelkah. K 0,1 mL razredčene raztopine kvercetina smo dodali 1,0 mL etanola in 0,05 mL AlCl_3 . Z etanolom smo dopolnili do 2,5 mL. Po dodatku vsakega reagenta smo vzorce dobro premešali. Po 30 min od dodatka AlCl_3 smo izmerili absorbanco proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 425 nm (A_{425}). Slepí vzorec smo pripravili tako, da smo namesto raztopine kvercetina uporabili etanol.

Preglednica 3: Volumen (V) izhodne raztopine kvercetina, masna koncentracija (γ) kvercetina v reakcijski zmesi in povprečna vrednost izmerjenih absorbanc A_{425} .

V (μL)	γ ($\mu\text{g/mL}$)	$\bar{A}_{425}$
10	4	0,326
20	8	0,624
30	12	0,967
40	16	1,286
50	20	1,580

Iz masne koncentracije kvercetina in povprečne vrednosti izmerjene absorbance smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili smerni koeficient premice. Vrednost koeficienta, k, je $0,079 \pm 0,001$ ($R^2=0,9983$)



Slika 13: Umeritvena krivulja s kvercetinom za določanje vsebnosti flavonov in flavonolov

Za določitev vsebnosti flavonov in flavonolov v izvlečkih pripravljenih iz zamrznjenih rastlin smo k 2,1 mL etanola dodali 0,1 mL vzorca, za določitev v izvlečkih, pripravljenih iz

posušenih rastlin, pa 0,2 mL vzorca k 2,0 mL etanola. Dodali smo 0,1 mL AlCl_3 in z etanolom dopolnili do 5 mL. Po dodatku vsakega reagenta smo dobro premešali. Po 30 min od dodatka AlCl_3 smo izmerili A_{425} . Pri pripravi slepega vzorca smo namesto izvlečka uporabili etanol.

Masno koncentracijo flavonov in flavonolov v reakcijski zmesi smo izračunali iz zveze:

$$\gamma_{rz} = \frac{A_{425}}{k} \quad \dots(12)$$

γ_{rz} – masna koncentracija skupnih flavonov in flavonolov v reakcijski zmesi ($\mu\text{g/mL}$)

A_{425} – izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 425 nm

k – smerni koeficient umeritvene krivulje

Z upoštevanjem volumna reakcijske zmesi in volumna izvlečka, uporabljenega v analizi, smo iz masne koncentracije v reakcijski zmesi izračunali masno koncentracijo skupnih flavonov in flavonolov v izvlečku.

$$\gamma = \frac{\gamma_{rz} \times V_{rz}}{V_i} \quad \dots(13)$$

γ – masna koncentracija skupnih flavonov in flavonolov v izvlečku ($\mu\text{g/mL}$)

V_{rz} – volumen reakcijske zmesi (5 mL)

V_i – volumen izvlečka, uporabljenega v analizi (mL)

Izračunali smo maso flavonov in flavonolov v celotnem pripravljenem izvlečku.

$$m_{FF} = \gamma \times V \quad \dots(14)$$

m_{FF} – masa flavonov in flavonolov v izvlečku (μg)

V – volumen izvlečka (30 mL)

Vsebnost skupnih flavonov in flavonolov v posušenih oziroma zamrznjenih vzorcih limonastega timijana in bazilike smo izrazili v ekvivalentih kvercetina kot mg kvercetina na gram rastlinskega materiala, iz katerega smo pripravili izvleček (mg KV/g).

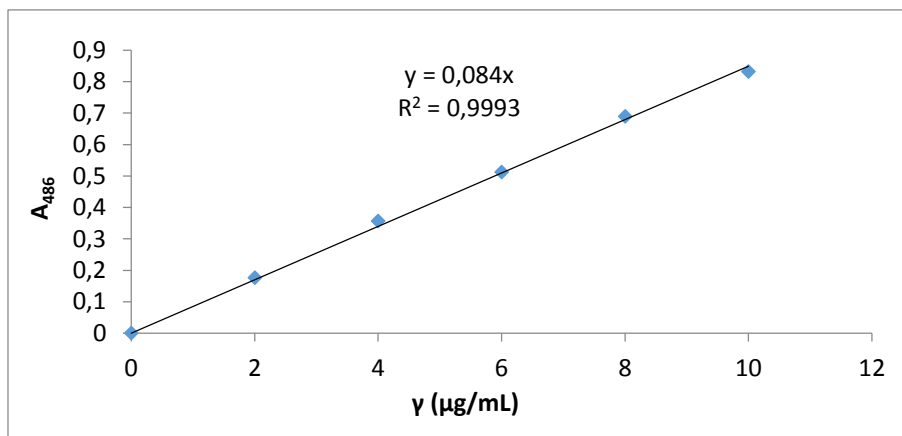
$$m_{FF}/g = \frac{m_{FF}}{m_{rast.}} \quad \dots(15)$$

m_{FF}/g – masa skupnih flavonov in flavonolov v gramu rastlinskega materiala (mg KV/g)

$m_{rast.}$ – masa rastline (g)

3.2.6 Določanje vsebnosti skupnih flavanonov in dihidroflavonolov

Vsebnost skupnih flavanonov in dihidroflavonolov smo določili s spektrofotometrično metodo, ki jo je opisala Popova s sodelavci (2005). Flavanoni in dihidroflavonoli pri reakciji z 2,4–dinitrofenilhidrazinom (DNP) v kislem okolju tvorijo stabilne barvne komplekse. Umeritveno krivuljo z naringeninom smo pripravili po istem postopku, kot je v nadaljevanju opisan za analizo vzorcev. Smerni koeficient premice, k , je $0,084 \pm 0,001$ ($R^2=0,9993$).



Slika 14: Umeritvena krivulja z naringeninom za določanje vsebnosti flavanonov in dihidroflavonolov

V epice smo odmerili 0,1 mL izvlečka in 0,2 mL raztopine DNP in 50 min segrevali v vodni kopeli na 50 °C. Ko se je zmes ohladila na sobno temperaturo, smo dodali 0,7 mL 10 % raztopine KOH v etanolu. Nato smo 10 min centrifugirali pri 13500 obr/min. 0,25 mL supernatanta smo odpipetirali k 2,25 mL etanola. Po 30 min od dodatka KOH smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 486 nm proti slepemu vzorcu (A_{486}). Za vse vzorce smo izvedli določitev v treh paralelkah. Za pripravo slepega vzorca smo namesto izvlečka uporabili etanol.

Masno koncentracijo flavanonov in dihidroflavonolov v kivetu smo izračunali iz zveze:

$$\gamma_k = \frac{A_{486}}{k} \quad \dots(16)$$

γ_k – masna koncentracija flavanonov in dihidroflavonolov v kivetu ($\mu\text{g/mL}$)

A_{486} – povprečna vrednost izmerjene absorbance pri valovni dolžini 486 nm

k – smerni koeficient umeritvene krivulje

Rezultate smo pomnožili z 10, saj smo pred merjenjem supernatant 10-krat razredčili z etanolom.

$$\gamma_{rz} = \gamma_k \times 10 \quad \dots(17)$$

γ_{rz} – masna koncentracija flavanonov in dihidroflavonolov v supernatantu ($\mu\text{g/mL}$)

Z upoštevanjem, da je masna koncentracija flavanonov in dihidroflavonolov v supernatantu enaka kot v reakcijski zmesi, smo iz volumna reakcijske zmesi, volumna izvlečka in masne koncentracije v supernatantu izračunali masno koncentracijo flavanonov in dihidroflavonolov v izvlečkih.

$$\gamma_{FD} = \frac{\gamma_{rz} \times V_{rz}}{V_i} \quad \dots(18)$$

γ_{FD} – masna koncentracija flavanonov in dihidroflavonolov v izvlečku ($\mu\text{g/mL}$)

V_{rz} – volumen reakcijske zmesi (1 mL)

V_i – volumen uporabljenega izvlečka (0,1 mL)

Izračunali smo maso flavanonov in dihidroflavonolov v celotnem izvlečku.

$$m_{FD} = \gamma_{FD} \times V \quad \dots(19)$$

m_{FD} – masa flavanonov in dihidroflavonolov v izvlečku (μg)

V – volumen izvlečka (30 mL)

Vsebnost flavanonov in dihidroflavonolov v posušenih oziroma zamrznjenih vzorcih limonastega timijana in bazilike smo izrazili v ekvivalentih naringenina kot mg naringenina na gram rastlinskega materiala, iz katerega smo pripravili izvleček (mg NA/g).

$$m_{FD}/g = \frac{m_{FD}}{m_{rast.}} \quad \dots(20)$$

m_{FD}/g – masa flavanonov in dihidroflavonolov v gramu rastlinskega materiala (mg NA/g)

$m_{rast.}$ – masa rastline (g)

3.2.7 Določanje antioksidativne učinkovitosti z metodo lovljenja radikala DPPH•

Antioksidativno učinkovitost smo določali z metodo, ki jo je opisal Brand - Williams s sodelavci (1995). Antioksidanti v reakciji s stabilnim radikalom DPPH• oddajo vodikov atom, pri čemer radikal preide v nereaktivno obliko DPPH-H. Radikal DPPH• absorbira svetlobo pri valovni dolžini 517 nm, ker pa se med reakcijo z antioksidanti njegova vsebnost v reakcijski zmesi zmanjšuje, pada tudi izmerjena absorbanca. Iz razlike med izmerjeno absorbanco raztopine radikala brez dodatka antioksidanta in absorbanco reakcijske zmesi s preiskovanim vzorcem lahko izračunamo antioksidativno učinkovitost vzorca (Abramovič, 2011).

V mikrocentrifugirke smo odmerili 1,45 mL raztopine DPPH• in 50 µL ustrezno razredčenega vzorca. Kontrolni vzorec smo pripravili tako, da smo namesto vzorca odmerili 96 % etanol, kot slepi vzorec pa smo uporabili samo 96 % etanol. Dobro smo premešali in po 30 min izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm proti slepemu vzorcu (A_{517}). Uporabili smo 6 različnih razredčitev vsakega vzorca. Vsako razredčitev smo pripravili v treh paralelkah.

Za vsako razredčitev vzorcev smo izračunali delež inhibicije radikala DPPH• iz zveze:

$$W_{inh\ DPPH} = \frac{(A_{k517} - A_{vz517})}{A_k} \times 100 \% \quad \dots(21)$$

$W_{inhDPPH}$ – delež inhibicije (%)

A_{k517} – absorbanca kontrolnega vzorca pri valovni dolžini 517 nm

A_{vz517} – povprečna izmerjena absorbanca vzorca pri valovni dolžini 517 nm po 30 min inkubacije

Za vsak vzorec smo narisali diagram odvisnosti $w_{ihh\ DPPH}$ od masne koncentracije skupnih fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Smerni koeficient smo izračunali z linearno regresijsko analizo, tako da smo upoštevali točke, kjer velja linearna odvisnost. S smernim koeficientom te premice smo izračunali koncentracijo fenolnih spojin, ki za 50 % zniža začetno vsebnost DPPH• (EC_{50}), iz zveze:

$$EC_{50} = -\frac{50\%}{k} \quad \dots(22)$$

Vrednosti EC_{50} vzorcev smo primerjali s komercialnim antioksidantom BHT.

Za določanje sposobnosti BHT za lovljenje DPPH• smo pripravili pet različno koncentriranih raztopin BHT in postopali enako kot pri določanju antioksidativne učinkovitosti vzorcev limonastega timijana in bazilike.

3.2.8 Koncentriranje izvlečkov timijana in bazilike za določanje protimikrobne učinkovitosti

Del etanolnih izvlečkov smo do suhega posušili v vakuumskem izparilniku pri 35 °C in posušene izvlečke raztopili v DMSO. Pri pripravi raztopin v DMSO smo si pomagali tako, da smo vzorce raztapljali v ultrazvočni kopeli in tako pripravili raztopine brez vidnih delcev.

Posušene izvlečke iz zamrznjenega limonastega timijana in zamrznjene bazilike smo raztopili v 600 µL DMSO, izvlečke iz posušenih zelišč pa v 700 µL DMSO.

Preverili smo, ali se je med sušenjem izvlečkov in raztapljanjem v DMSO ohranila masa fenolnih spojin, zato smo v pripravljenih raztopinah ponovno določili koncentracijo fenolnih spojin.

3.2.9 Določanje protimikrobne učinkovitosti z metodo mikrodilucije v tekočem gojišču

Protimikrobno učinkovitost izvlečkov iz limonastega timijana in bazilike smo določili po metodi, ki so jo opisale Klančnik in sod. (2010).

Priprava protimikrobnega sredstva (PS):

Izvlečke limonastega timijana in bazilike smo raztopili v 100 % DMSO, ki pa ima že sam po sebi protimikrobni učinek, zato je potrebno izvlečke ustrezno razredčiti. Na plošči je lahko največja koncentracija topila 2,5 %, ker pa se 4-krat razredči še na plošči (najprej z gojiščem, nato še s kulturo), je lahko v pripravljenem PS topila največ 10 %. Izvlečke smo zato 10-krat razredčili v MHB gojišču in tako pripravili založno PS.

Priprava resazurina za ugotavljanje živosti bakterij:

Zatehtali smo 2,8 mg resazurina in ga raztopili v 1 mL sterilne vode. Dodali smo 9 mL gojišča MHB in dobro premešali. Raztopljen resazurin smo razdelili v posamezne epice, v vsako po 900 μ L, in dodali po 100 μ L menadiona. Menadion smo pripravili tako, da smo 1,4 g raztopili v 1 mL DMSO. Pripravljeno zmes smo do uporabe zamrzili (Tsukatani in sod., 2008).

Oživitev in namnožitve bakterij:

Dva dni pred začetkom dela smo kulturo vzeli iz skrinje in nacepili na selektivno gojišče. *C. jejuni* na gojišče Karmali, *S. aureus* na gojišče Baird Parker, *L. monocytogenes* na gojišče ALOA. Za *E. coli* selektivnega gojišča nismo uporabili, nacepili smo direktno na MHA. Inkubirali smo čez noč na ustrezni temperaturi: 37 °C za *S. aureus*, *L. monocytogenes* in *E. coli* ter 42 °C za *C. jejuni*. Naslednji dan smo precepili na neselektivno gojišče MHA in ponovno inkubirali preko noči pri enaki temperaturi. *C. jejuni* smo inkubirali v mikroaerofilni atmosferi v anaerobnem loncu po preprihavanju z mešanico plinov iz jeklenke.

Priprava mikrotitrsko plošče:

Pripravili smo mikrotitrsko ploščo. Najprej smo z multikanalno pipeto v vse luknjice nanegli po 50 μ L gojišča MHB. V luknjice v prvi vrsti smo nanegli po 50 μ L pripravljenega PS. Naredili smo serijsko redčitev po plošči s prenašanjem po 50 μ L raztopine iz prve luknjice v drugo, iz druge luknjice v tretjo in tako nadaljevali do predzadnje vrste, iz katere smo 50 μ L zavrgli. Pred prenosom iz vsake luknjice v naslednjo, smo vsebino dobro premešali s pipeto. Končna koncentracija PS je bila v vsaki naslednji vrsti dvakrat manjša kot v prejšnji.

V zadnji vrsti smo pripravili kontrole.

- Slepa proba (B): 100 μ L MHB,
- negativna kontrola (NK): 50 μ L MHB + 50 μ L PS v največji uporabljeni koncentraciji,
- pozitivna kontrola (PK): 50 μ L MHB + 50 μ L kulture (pozitivno kontrolo smo pripravili kasneje, ko smo na ploščo dodali kulturo).

Slepa proba pri merjenju fluorescenčnega signala služi kot referenčna vrednost. Izmerjena vrednost v naših poskusih je bila za slepe probe med 1000 in 2000. Z negativno kontrolo preverimo, da PS ni kontaminirano z mikroorganizmi in da samo PS ne vpliva na izmerjen signal. Izmerjena fluorescenca NK mora biti v istem rangi kot slepa proba. S pozitivno kontrolo preverimo, ali je rast kulture na mikrotitrski plošči ustrezna. Izmerjena fluorescenca PK je bistveno višja od B in NK. V naših poskusih je v večini primerov znašala med 35000 in 45000.

Ko je bila mikrotitrski plošča pripravljena, smo pripravili še kulturo.

Priprava kulture:

Z vatirano palčko smo postrgali kolonije s plošče in jih resuspendirali v MHB. Umerili smo optično gostoto na $OD_{600} = 0,1$, kar je približno 10^7 CFU/mL za *C. jejuni*, 10^8 CFU/mL za *S. aureus* in *E. coli* ter 5×10^8 CFU/mL za *L. monocytogenes*. Suspenzijo *C. jejuni* smo razredčili 100-krat, ostale pa 1000-krat, saj smo za nanos na ploščo potrebovali kulture v koncentraciji $10^5 - 10^6$ CFU/mL.

V vse luknjice, razen slepih prob in negativnih kontrol, smo nanесли po 50 μ L kulture. Premešali smo na mešalniku mikrotitrskih plošč in inkubirali preko noči pri enakih pogojih kot pri gojenju kultur.

Poskus smo hkrati izvajali s šestimi sevi vsake bakterije. Ker smo vsak poskus ponovili v dveh paralelakah, smo za eno bakterijo napolnili štiri mikrotitrski plošče. Primera dveh pripravljenih mikrotitrskih plošč sta v preglednicah 4 in 5.

Preglednica 4: Primer priprave mikrotitrne plošče s tremi sevi *S. aureus*, 1. del. V prvi vrsti so nanešeni izvlečki timijana in bazilike v najvišji uporabljeni koncentraciji. Puščica prikazuje smer razredčevanja. V zadnji vrsti so kontrole.

5.1								5.2			
TZ	TZ	BZ	BZ	TS	TS	BS	BS	TZ	TZ	BZ	BZ
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
PK	PK	NK TZ	NK BZ	NK TS	NK BS	B	B	PK	PK	B	B

Legenda: PK – pozitivna kontrola, NK – negativna kontrola, B – slepa proba, TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Preglednica 5: Primer priprave mikrotitrne plošče s tremi sevi *S. aureus*, 2. del. V prvi vrsti so nanešeni izvlečki timijana in bazilike v najvišji uporabljeni koncentraciji. Puščica prikazuje smer razredčevanja. V zadnji vrsti so kontrole.

5.2				5.3							
TS	TS	BS	BS	TZ	TZ	BZ	BZ	TS	TS	BS	BS
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
PK	PK	B	B								

Legenda: PK – pozitivna kontrola, B – slepa proba, TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Kontrola koncentracije kultur:

Preverili smo koncentracijo v poskusu uporabljenih kultur. Vzeli smo v MHB razredčeno kulturo, kakršno smo nanesli na ploščo, in pripravili 5 serijskih redčitev (100 µL kulture v 900 µL MHB). 10 µL vsake redčitve smo s pipeto v treh paralelkah nanesli na gojišče MHA in čez noč inkubirali pod enakimi pogoji kot pri gojenju kultur. Naslednji dan smo s štetjem kolonij določili CFU/mL.

Določanje živosti bakterij:

Po enem dnevu inkubacije na mikrotitrskih ploščah, kamor smo bakterije nacepili v gojišče z različno koncentracijo protimikrobnega sredstva (PS), smo določili, v katerih luknjicah so bakterije preživele. Živost bakterij smo določili z resazurinom. V vsako luknjico smo dodali po 10 µL resazurina, premešali na mešalniku in 2 uri inkubirali v temi. Nato smo na čitalcu mikrotitrskih plošč Tecan izmerili fluorescenco in na podlagi odsotnosti fluorescenčnega signala glede na slepo probo določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK). Resazurin je temno modre barve in ne fluorescira. Žive celice ga reducirajo v resorufin, ki je močne rožnate barve in oddaja fluorescenco (Liu in sod., 2007). V luknjicah, kjer smo določili fluorescenčni signal, je bila koncentracija PS torej prenizka, da bi zaustavila rast bakterij. Kjer fluorescence ni bilo, barva pa je ostala modra, bakterije s svojo metabolno aktivnostjo niso pretvorile resazurina v resorufin. Koncentracija PS je bila dovolj visoka, da je preprečila rast bakterij. V zgornjem delu mikrotitrške plošče je bila višja koncentracija PS, v spodnjem delu pa nižja, torej so bila v zgornjem delu polja modre barve, spodaj pa rožnate. Zadnja luknjica, ki je bila še modre barve, je predstavljala MIK protimikrobnega sredstva.

Vse meritve smo izvajali v dveh paralelkah. V primerih, ko je bilo odstopanje med paralelkama večje od ene vrste, smo meritev ponovili in upoštevali povprečje vseh štirih meritev.

3.2.10 Statistična analiza

Vse meritve smo izvajali vsaj v dveh paralelkah. Rezultate smo izrazili kot povprečje $\pm$ standardni odklon, ki smo ga izračunali po enačbi 23 (Košmelj, 2007).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{N}} \quad \dots(23)$$

SD – standardni odklon

x_i – vrednost i-te meritve

$\bar{X}$ – povprečje

N – število meritev

Smerni koeficient premic smo izračunali z linearno regresijsko analizo z metodo najmanjših kvadratov z uporabo računalniškega programa Origin.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih limonastega timijana in bazilike smo določili spektrofotometrično z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta. Izmerjene in povprečne vrednosti za A_{746} so podane v preglednici 6.

Preglednica 6: Izmerjene in povprečne absorbance vzorcev pri valovni dolžini 746 nm (A_{746})

vzorec	$A_{746\ 1}$	$A_{746\ 2}$	$A_{746\ 3}$	$\bar{A}_{746}$
TZ1	0,4454	0,4534	0,4505	$0,450 \pm 0,004$
TZ2	0,4584	0,4634	0,4606	$0,461 \pm 0,003$
BZ1	0,3803	0,3807	0,3846	$0,382 \pm 0,002$
BZ2	0,3917	0,3967	0,3780	$0,390 \pm 0,010$
TS1	0,4507	0,4476	0,4441	$0,447 \pm 0,003$
TS2	0,3670	0,3731	0,3774	$0,372 \pm 0,005$
BS1	0,7037	0,6952	0,6916	$0,697 \pm 0,006$
BS2	0,5943	0,5941	0,5871	$0,592 \pm 0,004$

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Maso skupnih fenolnih spojin smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo prikazuje slika 11. Da smo vrednosti za vse vzorce med seboj lahko primerjali, smo s pomočjo podatka o vsebnosti vode v svežih rastlinah vse rezultate o vsebnosti skupnih fenolnih spojin izrazili na gram svežega rastlinskega materiala. Rezultat smo izrazili v ekvivalentih klorogenske kisline kot mg KK na gram svežega rastlinskega materiala, iz katerega je bil pripravljen izvleček.

Preglednica 7: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v timijanu in baziliki izražena v ekvivalentih klorogenske kisline kot mg klorogenske kisline na gram sveže rastline

vzorec	m_{TP} (mg KK/g)
TZ	$12,1 \pm 0,2$
BZ	$4,1 \pm 0,1$
TS	$12,3 \pm 1,2$
BS	$5,3 \pm 0,5$

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

V vzorcih limonastega timijana smo določili občutno višjo vsebnost fenolnih spojin kot v baziliki. Tako pri zamrznjenih kot pri posušenih rastlinah je bila vsebnost skupnih fenolnih spojin v timijanu več kot dvakrat višja v primerjavi z baziliko.

Zheng in Wang (2001) sta preiskovala vsebnost skupnih fenolnih spojin v limonastem timijanu, baziliki in nekaterih drugih rastlinah. Kot standard sta uporabila galno kislino, mi pa klorogensko kislino. Da bi rezultate lahko primerjali, smo tudi vrednosti iz naše raziskave izrazili v ekvivalentih galne kisline; to pomeni kot mg galne kisline na gram rastlinskega materiala (mg GK/g).

Preglednica 8: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v zamrznjenem timijanu (TZ) in zamrznjeni baziliki (BZ) izražena v ekvivalentih galne kisline kot mg galne kisline na gram sveže rastline

	m (mg GK/g)	
	Naša raziskava	Zheng in Wang (2001)
TZ	$8,2 \pm 0,1$	$1,78 \pm 0,03$
BZ	$2,77 \pm 0,05$	$2,23 \pm 0,15$

Če primerjamo samo izvlečke pripravljene iz zamrznjenih rastlin (ker sta Zheng in Wang uporabila zamrznjene rastline), ugotovimo, da smo v izvlečkih, ki smo jih pripravili iz zamrznjene bazilike, določili podobne vrednosti kot Zheng in Wang. Naš rezultat znaša za vzorec zamrznjene bazilike ($2,77 \pm 0,05$) mg GK/g, Zheng in Wang pa sta določila ($2,23 \pm 0,15$) mg GK/g. Odstopanje znaša manj kot 20 %. V vzorcu zamrznjenega limonastega timijana sta Zheng in Wang določila ($1,78 \pm 0,03$) mg GK/g, mi pa kar ($8,2 \pm 0,1$) mg GK/g, kar je več kot 4-krat višja vrednost. Zanimivo je, da sta Zheng in Wang v baziliki določila za približno 25 % višjo vsebnost skupnih fenolov kot v timijanu, v našem primeru pa je bila vsebnost skupnih fenolov v timijanu več kot dvakrat višja v primerjavi z baziliko in sicer tako pri zamrznjenih kot pri posušenih rastlinah. Do razlik med rezultati obeh raziskav je lahko prišlo zaradi več dejavnikov: pri pripravi izvlečkov smo izbrali drugačno ekstrakcijsko topilo (Zheng in Wang sta uporabila fosfatni pufer), ekstrakcija je trajala različno dolgo in priprava vzorcev na analizo se je razlikovala.

Javanmardi in sod. (2003) so izvedli raziskavo na 23 primerkih posušene bazilike (*Ocimum basilicum*). Določili so vsebnost skupnih fenolnih spojin in jo izrazili v ekvivalentih galne kisline kot mg galne kisline v gramu suhe snovi (mg GK/g_{s.s.}). V različnih vzorcih bazilike so določili precej različne vrednosti in sicer od 22,9 do 65,5 mg GK/g_{s.s.}. Za primerjavo smo tudi rezultate naše raziskave izrazili na enak način. Mi smo v vzorcu iz posušene bazilike določili ($23,1 \pm 2,1$) mg GK/g_{s.s.}, kar se sklada z rezultati, ki so jih pridobili Javanmardi in

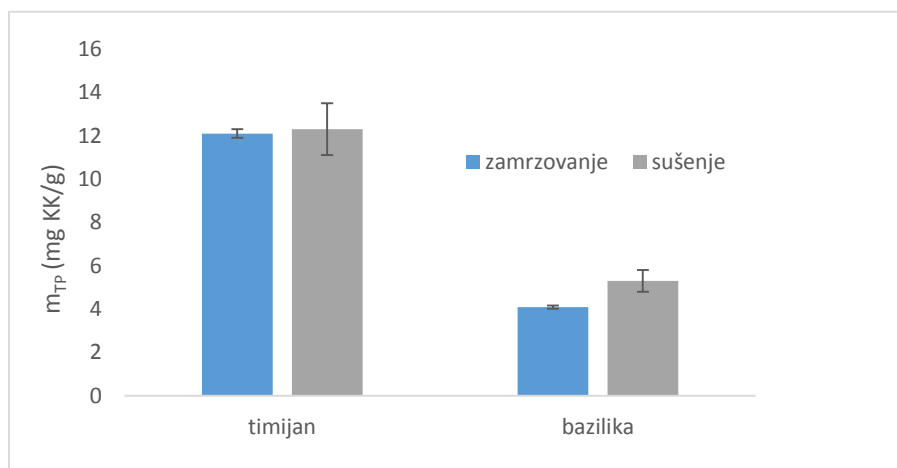
sod. Zanimivo je, da so Javanmardi in sod. dobili precej različne rezultate med posameznimi vzorci, saj gre pri vseh za enako vrsto. Vse rastline so rasle pod enakimi, kontroliranimi pogoji, razlika je le v geografskem poreklu semen, saj so jih pridobili od kmetov in trgovin po vsej državi. Rastline iste vrste, ki izhajajo iz različnih geografskih območjih, pridobijo določene posebne znake, po katerih se sicer nekoliko ločijo med seboj, ne kažejo pa bistvenih razlik in imajo značilne lastnosti za dano vrsto. Tako skupino imenujemo podvrsta (Slovensko društvo ..., 2014). Upoštevati moramo torej, da je znotraj iste vrste možna precejšnja variabilnost zaradi vpliva geografskega porekla. Rastline, uporabljene v naši raziskavi, so zrasle na Inštitutu za pivovarstvo in hmeljarstvo v Žalcu.

Flanigan in Niemeyer (2014) sta opravila raziskavo o vplivu kultivarja bazilike na vsebnost skupnih in posameznih fenolnih spojin, na vsebnost posameznih antocianinov in na antioksidativno učinkovitost. Rastline sta najprej shranila zamrznjene, nato pa pred analizami posušila. Ugotovljena vsebnost skupnih fenolnih spojin v različnih vzorcih je znašala od 13,1 do 26,9 mg GK/g_{s.s.}. Vzorec z najvišjo določeno vsebnostjo skupnih fenolnih spojin je vseboval več kot dvakratno koncentracijo v primerjavi z vzorcem z najnižjo vrednostjo. Velik razpon rezultatov tudi v tem primeru kaže na veliko variabilnost znotraj vrste *O. basilicum*. Vsebnost skupnih fenolnih spojin, ki sta jo v baziliki določila Flanigan in Niemeyer, je v skladu z rezultati naše raziskave.

Preglednica 9: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v posušeni baziliki izražena v ekvivalentih galne kisline kot mg galne kisline na gram suhe snovi

m (mg GK/g _{s.s.})		
Naša raziskava	Javanmardi in sod. (2003)	Flanigan in Niemeyer (2014)
23,1 ± 2,1	22,9–65,5	13,1–26,9

Zanimal nas je vpliv načina shranjevanja dišavnic na vsebnost fenolnih spojin. Ugotovili smo, da se pri vzorcih, pripravljenih iz zamrznjenega in posušenega limonastega timijana, vsebnost skupnih fenolnih spojin v okviru eksperimentalne napake ne razlikuje. Pri vzorcih, ki so bili pripravljeni iz zamrznjene in posušene bazilike, pa smo v izvlečkih iz posušenih rastlin določili nekoliko višjo vsebnost skupnih fenolov kot v izvlečkih iz zamrznjenih rastlin. Predvidevamo, da k rezultatu pripomore tudi način priprave vzorcev, ki lahko vodi v različno učinkovitost ekstrakcije. Zamrznjene rastline smo ročno razrezali na čim manjše koščke, posušene pa smo v možnarju strli v droben prah. Zaradi manjših delcev pri posušenih rastlinah poteka ekstrakcija na večji površini v primerjavi z ekstrakcijo iz zamrznjenih rastlin in je zato lahko učinkovitejša. Po drugi strani pa se lahko spojine že med trenjem posušenih rastlin hitreje pretvorijo v reakciji s kisikom, saj pridejo zaradi večje površine prašnega materiala v večji meri v stik z zrakom.



Slika 15: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v timijanu in baziliki

Hajimehdipoor in sod. (2012) so preučevali vpliv različnih načinov sušenja na vsebnost skupnih fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost poprove mete, zelene mete, vrtnega timijana in navadnega kopra. Primerjali so sveže rastline z rastlinami, posušenimi na soncu, v senci, v pečici pri 80 °C in v mikrovalovni pečici. V primerjavi s svežimi rastlinami je posušen koper po vseh načinih sušenja vseboval manj skupnih fenolnih spojin. Poprova meta, zelena meta in vrtni timijan so po sušenju v pečici ali mikrovalovni pečici vsebovali manj fenolnih spojin, po sušenju na soncu ali v senci pa se je vsebnost skupnih fenolnih spojin v primerjavi s svežimi rastlinami pri vseh treh zeliščih povečala. Kot razlog so raziskovalci navedli možnost, da se pri sušenju med razgradnjo rastlinskega materiala sproščajo določene kemijske spojine. Omenili so tudi, da moramo upoštevati, da je za različne rastlinske vrste lahko primerna različna tehnika sušenja. Poprova in zelena meta ter vrtni timijan spadajo v družino ustnatic. Pri vseh treh so različni načini sušenja podobno učinkovali tako na vsebnost fenolnih spojin kot tudi na antioksidativno učinkovitost. Učinek sušenja je bil pri navadnem kopru drugačen. Koper spada v družino kobulnic in ostalim trem preiskovanim rastlinam ni soroden.

Vpliv načina shranjevanja so preučevali tudi Usai in sod. (2011). Sveže liste timijana (*Thymus officinalis* L.) in rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) so zamrznili ali posušili na zraku oziroma z liofilizacijo. Zanimal jih je izkoristek pridobivanja eteričnega olja in to, kako se med postopkom ohranijo posamezne sestavine. Vse vzorce so najprej analizirali takoj po sušenju, liofilizaciji oziroma zamrzovanju, nato pa še nekajkrat med shranjevanjem. Kot najboljši način shranjevanja se je pri obeh vrstah zelišč izkazalo zamrzovanje, ki je najmanj vplivalo na izkoristek pridobivanja eteričnega olja in na vsebnost posameznih snovi. V raziskavi so analizirali vsebnosti skupnega eteričnega olja in posamezne sestavine, česar ne moremo enačiti z našo raziskavo, saj je nas zanimala vsebnost fenolnih spojin. Mi smo pripravili izvlečke zelišč s solventno ekstrakcijo s pomočjo etanola, Usai in sod. pa so

analizirali eterična olja, ki so jih pridobili z destilacijo. Vseeno je primerjava smiselna, saj fenolne spojine predstavljajo pomemben delež eteričnih olj. Glavni sestavini eteričnega olja timijana sta fenolni spojini timol in karvakrol (Novak, 2013), timol je tudi med bolj zastopanimi sestavinami eteričnega olja bazilike (Lončar in sod., 2012).

Vpliv zamrzovanja in sušenja na vsebnost fenolnih spojin in antioksidativno učinkovitost sta preučevali tudi Tomsone in Kruma (2014) v listih hrena in listih ter cvetovih luštreka. Oba načina obdelave rastlinskega materiala, tako zamrzovanje kot sušenje, sta pomembno vplivala na vsebnost skupnih fenolnih spojin. Učinek je bil podoben pri vseh vzorcih. V vseh analiziranih vzorcih se je vsebnost fenolnih spojin v rastlinah po zamrzovanju povečala in sicer je znašalo povečanje od 0,5 do 20 % v primerjavi z vsebnostjo v svežih vzorcih. Kot razlog povečanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin po zamrzovanju sta navedli tvorbo vodnih kristalov, ki poškodujejo strukturo celic in s tem omogočijo boljše ekstrakcijo snovi. Torej oba uporabljena način shranjevanja, tako zamrzovanje kot sušenje, lahko vplivata celo na večjo določeno vsebnost skupnih fenolnih spojin v primerjavi s svežim rastlinskim materialom.

4.2 VSEBNOST SKUPNIH FLAVONOIDOV

Vsebnost skupnih flavonoidov v vzorcih limonastega timijana in bazilike smo določili spektrofotometrično. Flavonoidi v reakciji z AlCl_3 tvorijo kompleksne spojine, ki smo jih določili z merjenjem A_{510} . Izmerjene in povprečne vrednosti za A_{510} so navedene v preglednici 10.

Preglednica 10: Izmerjene in povprečne absorbance vzorcev pri valovni dolžini 510 nm (A_{510})

vzorec	$A_{510\ 1}$	$A_{510\ 2}$	$A_{510\ 3}$	$\bar{A}_{510}$
TZ1	0,44211	0,43129	0,43347	$0,436 \pm 0,006$
TZ2	0,42336	0,43249	0,45191	$0,436 \pm 0,015$
BZ1	0,48029	0,48582	0,46770	$0,478 \pm 0,009$
BZ2	0,43114	0,44742	0,43005	$0,436 \pm 0,010$
TS2	0,34607	0,38827	0,37609	$0,370 \pm 0,020$
BS1	0,37037	0,36101	0,36199	$0,364 \pm 0,005$
BS2	0,35462	0,34992	0,35661	$0,354 \pm 0,003$

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Maso skupnih flavonoidov v vzorcih limonastega timijana in bazilike smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo prikazuje slika 12. Rezultat smo izrazili kot ekvivalent rutina v mg rutina na gram svežega rastlinskega materiala (mg RUT/g) (Preglednica 11).

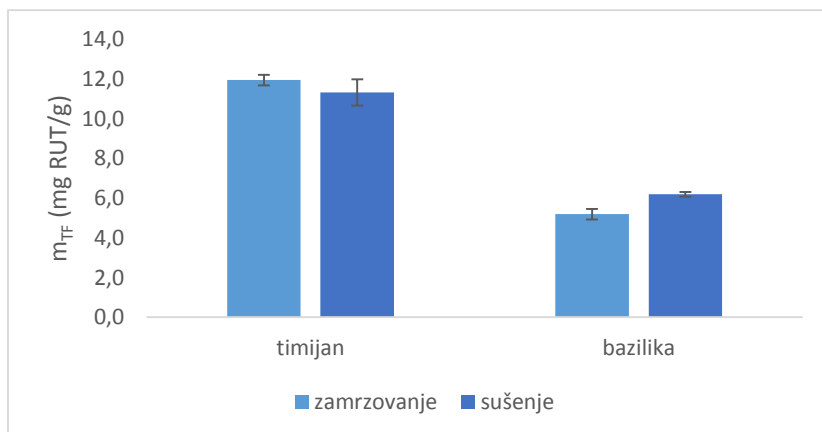
Preglednica 11: Vsebnost skupnih flavonoidov v timijanu in baziliki izražena v ekvivalentih rutina kot mg rutina na gram sveže rastline

vzorec	m_{TF} (mg RUT/g)
TZ	$11,9 \pm 0,3$
BZ	$5,2 \pm 0,3$
TS	11 ± 1
BS	$6,2 \pm 0,1$

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

V izvlečkih limonastega timijana smo določili približno dvakratno količino skupnih flavonoidov v primerjavi z baziliko. Razmerje med vsebnostjo skupnih flavonoidov v limonastem timijanu in baziliki je podobno razmerju med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v obeh vrstah. To nam pove, da flavonoidi v obeh rastlinskih vrstah predstavljajo podoben delež skupnih fenolnih spojin.

Podobno kot pri določanju skupnih fenolnih spojin smo v izvlečkih iz posušene bazilike v primerjavi z zamrznjeno določili nekoliko višjo vsebnost skupnih flavonoidov, pri timijanu pa razlika ni znatna. Kot že omenjeno, je razlog lahko v načinu priprave vzorca zelišč. Pri ekstrakciji iz posušenih rastlin so bili delci občutno manjši. Tako je ekstrakcija potekala na večji površini in je bila zato učinkovitejša.



Slika 16: Vsebnost flavonoidov v timijanu in baziliki

4.3 VSEBNOST FLAVONOV IN FLAVONOLOV

Vsebnost flavonov in flavonolov v vzorcih limonastega timijana in bazilike smo določili spektrofotometrično na podlagi tvorbe specifičnih kompleksov z aluminijevim kloridom. V preglednici 12 so podane izmerjene in povprečne vrednosti za A_{425} .

Preglednica 12: Izmerjene in povprečne absorbance vzorcev pri valovni dolžini 425 nm (A_{425})

vzorec	$A_{425\ 1}$	$A_{425\ 2}$	$A_{425\ 3}$	$\bar{A}_{425}$
TZ1	0,2963	0,2966	0,3011	$0,298 \pm 0,003$
TZ2	0,2974	0,2888	0,2641	$0,283 \pm 0,017$
BZ1	0,1788	0,1757	0,1801	$0,178 \pm 0,002$
BZ2	0,1793	0,1757	0,1776	$0,178 \pm 0,002$
TS1	0,5605	0,5566	0,5559	$0,558 \pm 0,002$
TS2	0,5565	0,5671	0,5522	$0,559 \pm 0,008$
BS1	0,7740	0,7950	0,7852	$0,785 \pm 0,010$
BS2	0,7218	0,7050	0,6997	$0,709 \pm 0,012$

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Maso flavonov in flavonolov v vzorcih limonastega timijana in bazilike smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo prikazuje slika 13. Rezultat smo izrazili kot ekvivalent kvercetina v mg kvercetina na gram svežega rastlinskega materiala (mg KV/g) (Preglednica 13).

Preglednica 13: Vsebnost flavonov in flavonolov v timijanu in baziliki, izražena v ekvivalentih kvercetina kot mg kvercetina na g rastline

vzorec	m_{FF} (mg KV/g)
TZ	$1,84 \pm 0,09$
BZ	$1,13 \pm 0,01$
TS	$1,00 \pm 0,01$
BS	$0,73 \pm 0,04$

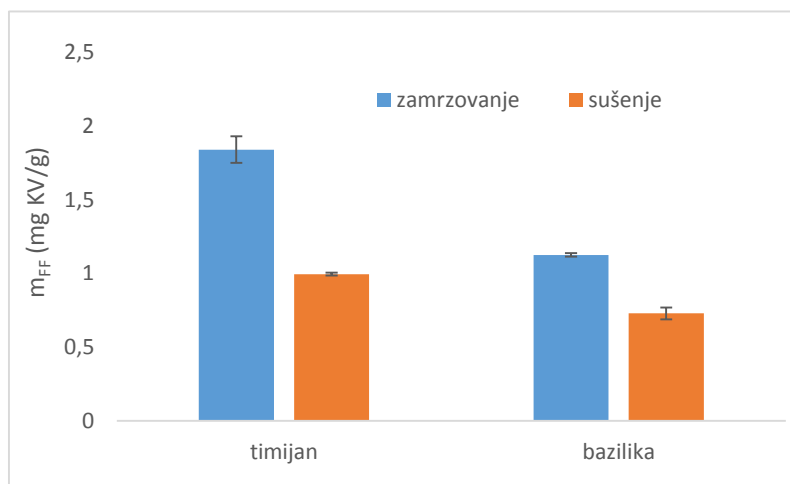
Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Vsebnost flavonov in flavonolov je pri limonastem timijanu tako v zamrznjenih kot posušenih zeliščih višja od vsebnosti flavonov in flavonolov v baziliki. Vendar pa je razlika

manjša kot pri predhodno določenih skupnih fenolnih spojinah in skupnih flavonoidih. Skupnih fenolnih spojin je pri zamrznjenih vzorcih v limonastem timijanu skoraj 3-krat toliko kot v baziliki in pri posušenih okoli 2,5-krat toliko kot v baziliki. Skupnih flavonoidov je v limonastem timijanu 2-krat toliko kot v baziliki. Vsebnost flavonov in flavonolov pa je v limonastem timijanu le za okoli 60 % večja pri zamrznjenih vzorcih in za 35 % pri posušenih vzorcih od vsebnosti v baziliki.

Če primerjamo vrednosti za skupne flavonoide v preglednici 10 in skupne flavone in flavonole v preglednici 11, ugotovimo, da predstavljajo flavoni in flavonoli v obeh dišavnicah majhen delež skupnih flavonoidov. Pri tem predstavljajo flavoni in flavonoli v limonastem timijanu manjši delež skupnih flavonoidov kot v baziliki. To potrjuje raziskava, ki so jo opravili Pereira in sod. (2013), kjer navajajo, da so v limonastem timijanu flavonoli prisotni v zelo majhni količini. Medtem pa raziskava Taie in sod. (2010), ki pravi, da so flavoni in flavonoli v baziliki poleg fenolnih kislin med najbolj zastopanimi fenolnimi spojinami, ne potrjuje naših rezultatov.

Za razliko od rezultatov pri določanju skupnih fenolnih spojin in skupnih flavonoidov, je vsebnost flavonov in flavonolov v posušenih vzorcih nižja. Pri limonastem timijanu je v posušenih vzorcih vsebnost manjša skoraj za polovico, v baziliki pa za približno 35 %. Predvidevamo, da je med sušenjem zelišč prišlo do izgub omenjenih fenolnih spojin.



Slika 17: Vsebnost flavonov in flavonolov v timijanu in baziliki

4.4 VSEBNOST FLAVANONOV IN DIHIDROFLAVONOLOV

Vsebnost flavanonov in dihidroflavonolov v vzorcih smo določili spektrofotometrično na podlagi tvorbe stabilnih barvnih kompleksov pri reakciji z DNP. Izmerjene in povprečne vrednosti za A_{486} so podane v preglednici 14.

Preglednica 14: Izmerjene in povprečne absorbance vzorcev pri valovni dolžini 486 nm (A_{486})

vzorec	$A_{486\ 1}$	$A_{486\ 2}$	$A_{486\ 3}$	$\bar{A}_{486}$
TZ1	0,3455	0,3426	0,3446	$0,344 \pm 0,002$
TZ2	0,3709	0,3493	0,3706	$0,364 \pm 0,012$
BZ1	0,2037	0,1941	0,2010	$0,200 \pm 0,005$
BZ2	0,2392	0,2152	0,2316	$0,229 \pm 0,012$
TS1	0,3443	0,3458	0,3601	$0,350 \pm 0,009$
TS2	0,3594	0,3414	0,3321	$0,344 \pm 0,014$
BS1	0,4040	0,4253	0,4411	$0,423 \pm 0,019$
BS2	0,4381	0,4462	0,4575	$0,447 \pm 0,010$

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Maso flavanonov in dihidroflavonolov v vzorcih limonastega timijana in bazilike smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo prikazuje slika 14. Rezultat smo izrazili kot ekvivalent naringenina v mg naringenina na gram svežega rastlinskega materiala (mg NAR/g) (Preglednica 15).

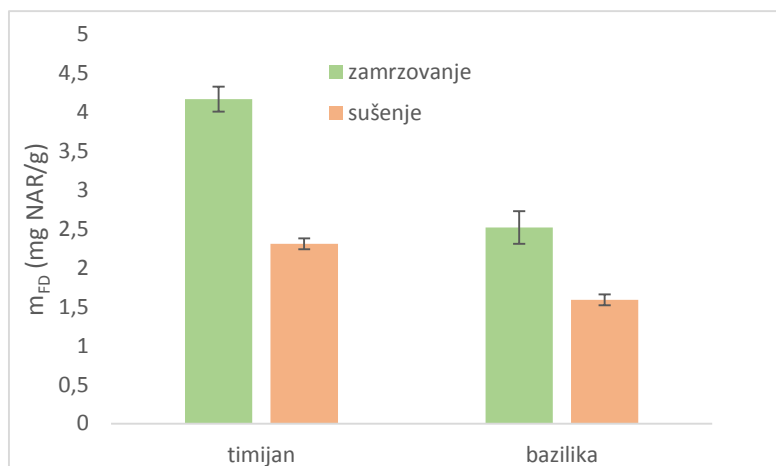
Preglednica 15: Vsebnost flavanonov in dihidroflavonolov v timijanu in baziliki izražena v ekvivalentih naringenina kot mg naringenina na gram sveže rastline

vzorec	m_{FD} (mg NAR/g)
TZ	$4,17 \pm 0,16$
BZ	$2,52 \pm 0,21$
TS	$2,31 \pm 0,07$
BS	$1,59 \pm 0,07$

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Tako kot skupne fenolne spojine, skupni flavonoidi ter skupni flavoni in flavonoli, so tudi flavanoni in dihidroflavonoli v limonastem timijanu prisotni v višji koncentraciji kot v baziliki. Podobno kot pri določanju flavonov in flavonolov je vsebnost flavanonov in

dihidroflavonolov nižja v izvlečkih, pripravljenih iz posušenih rastlin. Tudi razmerje je podobno, pri limonastem timijanu je v vzorcih iz posušenih zelišč določena vsebnost nižja skoraj za polovico, pri baziliki pa za približno 35 %.



Slika 18: Vsebnost flavanonov in dihidroflavonolov v timijanu in baziliki

4.5 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV

Antioksidativno učinkovitost vzorcev limonastega timijana in bazilike smo določili z metodo lovljenja radikala DPPH•. Kako učinkovito antioksidant pretvori DPPH• v DPPH-H določimo spektrofotometrično. Z nižanjem vsebnosti DPPH• v reakcijski zmesi se niža tudi izmerjena A_{517} . Izmerjeno A_{517} smo primerjali z absorbanco kontrolnega vzorca A_{k517} , to je brez dodanega antioksidanta. Izmerjene vrednosti za A_{k517} so navedene v preglednici 16. Meritve smo izvedli pri različnih koncentracijah posameznih izvlečkov in komercialnega antioksidanta BHT in izračunali, kolikšen delež DPPH• je v 30 min inkubacije pretvoril vsak vzorec.

Preglednica 16: Izmerjene absorbance kontrolnih vzorcev

vzorec	TZ1	TZ2	BZ1	BZ2	TS1	TS2	BS1	BS2	BHT
A_{k517}	1,029	1,140	0,996	1,102	1,004	1,120	0,918	1,011	1,051

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Preglednica 17: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov dišavnic in BHT v reakcijski zmesi (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc pri valovni dolžini 517 nm (A_{517}) in delež inhibicije ($\omega_{\text{inh DPPH}}$) po 30 min inkubacije.

	γ ($\mu\text{g/mL}$)	$\bar{A}_{517}$	$\omega_{\text{inh DPPH}}$ (%)
BHT	33,3	0,397	62,2
	26,7	0,493	53,1
	20,0	0,611	41,9
	13,3	0,760	27,6
	6,7	0,912	13,2
TZ1	594,6	0,112	89,1
	396,4	0,208	79,8
	297,3	0,427	58,5
	169,9	0,663	35,6
	74,3	0,864	16,0
	18,6	0,984	4,3
TZ2	609,4	0,155	86,4
	406,2	0,439	61,5
	304,7	0,568	50,2
	174,1	0,788	30,9
	76,2	1,007	11,7
	19,0	1,103	3,2
BZ1	403,9	0,326	70,4
	302,9	0,489	55,7
	201,9	0,681	38,2
	101,0	0,860	22,0
	25,2	1,047	5,0
	12,6	1,083	1,7
BZ2	411,2	0,326	70,4
	308,4	0,489	55,7
	205,6	0,681	38,2
	102,8	0,860	22,0
	25,7	1,047	5,0
	12,9	1,083	1,7

...se nadaljuje

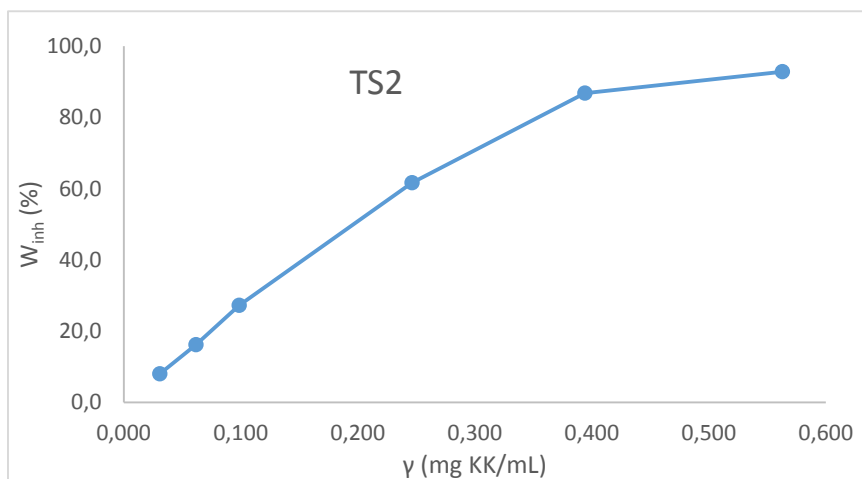
Nadaljevanje preglednice 17: Koncentracije fenolnih spojin izvlečkov dišavnic in BHT v reakcijski zmesi (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc pri valovni dolžini 517 nm (A_{517}) in delež inhibicije ($\omega_{\text{inh DPPH}}$) po 30 min inkubacije.

	γ ($\mu\text{g/mL}$)	$\bar{A}_{517}$	$\omega_{\text{inh DPPH}}$ (%)
TS1	676,1	0,063	93,7
	473,3	0,085	91,6
	295,8	0,298	70,3
	118,3	0,729	27,4
	74,0	0,837	16,6
	37,0	0,915	8,8
TS2	562,8	0,080	92,8
	394,0	0,148	86,8
	246,2	0,430	61,6
	98,5	0,815	27,2
	61,6	0,939	16,2
	30,8	1,031	8,0
BS1	526,4	0,065	92,9
	368,5	0,124	86,5
	230,3	0,372	59,5
	92,1	0,690	24,8
	57,6	0,797	13,2
	28,8	0,853	7,0
BS2	447,1	0,091	91,0
	313,0	0,292	71,1
	195,6	0,567	43,9
	78,2	0,816	19,2
	48,9	0,907	10,2
	24,5	0,952	5,8

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

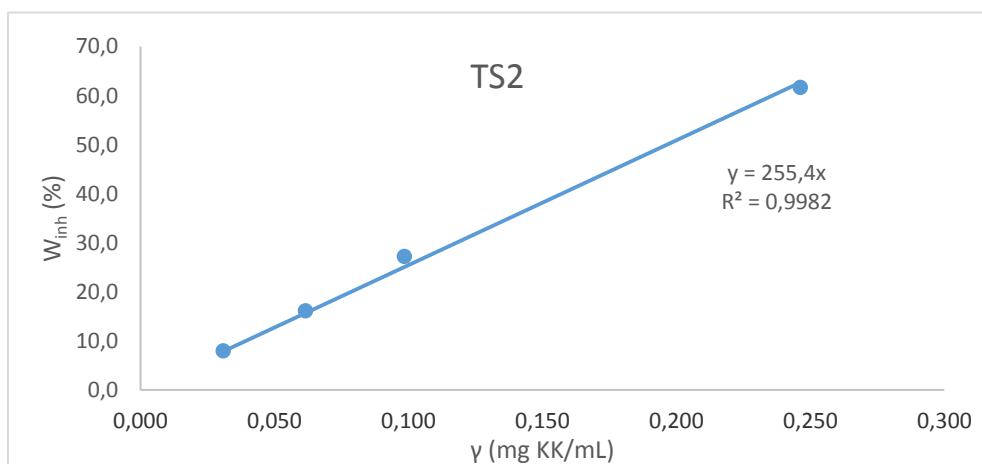
Za vsak vzorec smo narisali diagram odvisnosti $\omega_{\text{inh DPPH}}$ od masne koncentracije skupnih fenolnih spojin v reakcijski zmesi. V določenem koncentracijskem območju delež inhibicije DPPH• linearno narašča v odvisnosti od masne koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Pri visoki koncentraciji odvisnost ni linearna. Za vzorce, pri katerih se točke z visokimi koncentracijami ne ujemajo s premico, smo narisali še en diagram. V tem smo upoštevali le štiri ali pet točk z nižjimi koncentracijami, za katere velja linearna odvisnost.

Na sliki 19 je za izvleček iz posušenega limonastega timijana prikazan primer odvisnosti W_{inh} DPPH• od masne koncentracije skupnih fenolnih spojin v reakcijski zmesi.



Slika 19: Delež inhibicije DPPH• v času 30 min v odvisnosti od masne koncentracije fenolnih spojin v izvlečku iz posušenega limonastega timijana

Na sliki 19 vidimo, da je naraščanje deleža inhibicije DPPH• v odvisnosti od masne koncentracije fenolnih spojin linearno v območju prvih štirih preiskovanih koncentracij, nato pa ne več. Na sliki 20 je prikazan diagram, v katerem smo upoštevali le nižje štiri koncentracije.



Slika 20: Odvisnost deleža inhibicije DPPH• v času 30 min od masne koncentracije fenolnih spojin v izvlečku iz posušenega limonastega timijana

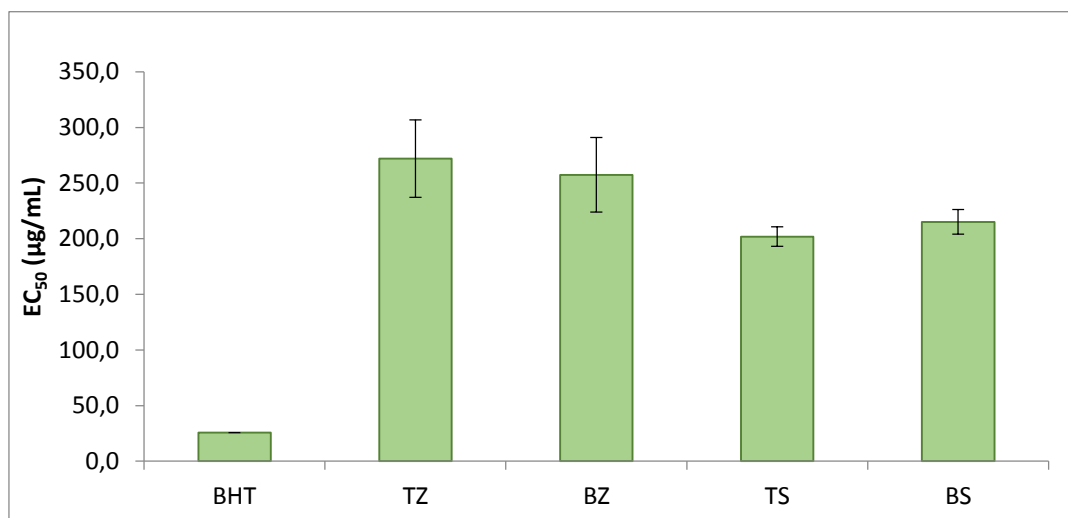
Smerni koeficient smo izračunali z linearno regresijsko analizo, tako da smo upoštevali točke, kjer velja linearna odvisnost. S pomočjo smernega koeficienta premic smo izračunali EC_{50} . Podatek nam pove, kakšna koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi pretvori 50 % začetne vsebnosti radikala DPPH• v neaktivno obliko v času 30 min.

Preglednica 18: Smerni koeficienti in koncentracije fenolnih spojin izvlečkov limonastega timijana, bazilike in BHT, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH•

	k	EC_{50} (μg/ml)
BHT	1947 ± 51	26
TZ1	202 ± 3	247
TZ2	169 ± 3	297
BZ1	214 ± 5	234
BZ2	178 ± 4	281
TS1	240 ± 4	208
TS2	255 ± 5	196
BS1	241 ± 6	207
BS2	224 ± 2	223

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

EC_{50} vrednosti vzorcev smo primerjali med seboj in s komercialnim antioksidantom BHT. Nižja vrednost EC_{50} pomeni, da je potrebna majhna koncentracija fenolnih spojin, ki v 30 min reagira s 50 % prisotnih radikalov. Višja vrednost EC_{50} pove, da mora biti v reakcijski zmesi večja koncentracija antioksidantov, da se bo v istem času deaktivirala enaka količina radikalov DPPH•. Nižja vrednost EC_{50} torej pomeni boljšo antioksidativno učinkovitost. Za lažjo primerjavo so na sliki 21 rezultati podani grafično, pri čemer smo za vsak vzorec prikazali povprečje dveh paralelno določenih vrednosti iz preglednice 18.

Slika 21: EC₅₀ vrednosti vzorcev limonastega timijana, bazilike in BHT

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Iz slike lahko razberemo, da so vsi vzorci občutno slabše antioksidativno učinkoviti v primerjavi s sintetičnim antioksidantom BHT. Da bi izvlečke analiziranih zelišč lahko uporabili kot dodane antioksidante za zaščito živil, bi jih torej za doseganje enakega učinka morali dodati v veliko večji količini.

Lagouri in Nisteropoulou (2009) sta pripravila izvlečke iz posušenega timijana in bazilike, v katerih sta določila vsebnost skupnih fenolnih spojin in sposobnost lovljenja DPPH• radikala. Ugotovila sta, da je izvleček timijana ($EC_{50} = 526 \mu\text{g/ml}$) nekoliko boljši v lovljenju DPPH• radikalov od izvlečka bazilike ($EC_{50} = 278 \mu\text{g/ml}$), vendar znatno slabši od BHT ($EC_{50} = 82 \mu\text{g/ml}$). In nasprotno, v neki drugi raziskavi (Mata in sod., 2007) so določili nekoliko slabšo antiradikalno učinkovitost BHT ($EC_{50} = 15,7 \mu\text{g/ml}$) v primerjavi z izvlečkom timijana ($EC_{50} = 13,2 \mu\text{g/ml}$).

Kot vidimo na sliki 21 so izvlečki fenolnih spojin iz posušenih zelišč pokazali boljšo antioksidativno učinkovitost v primerjavi z zamrznjenimi zelišči. V izvlečkih iz posušenih zelišč je bila s Folin-Ciocalteu metodo ugotovljena tudi višja vsebnost skupnih fenolnih spojin kot v izvlečkih iz zamrznjenih vzorcev. Pri tem je bila vsebnost skupnih fenolnih spojin v limonastem timijanu tako pri zamrznjenih kot posušenih vzorcih več kot dvakrat višja od bazilike. Če pa primerjamo antioksidativno učinkovitost izvlečkov iz obeh zamrznjenih dišavnic, ugotovimo, da sta v okviru eksperimentalne napake vrednosti za EC_{50} enaki. V okviru eksperimentalne napake sta enaki tudi vrednosti za EC_{50} izvlečkov iz obeh posušenih dišavnic. To pomeni, da sta izvlečka obeh dišavnic pokazala primerljivo sposobnost lovljenja radikalov. Pri tem pa je, kot že omenjeno, na sposobnost izvlečkov za

lovljenje radikalov vplivala obdelava rastlinskega materiala, iz katerega so izvlečki pripravljeni.

4.6 PROTIMIKROBNA UČINKOVITOST IZVLEČKOV

V preliminarjem poskusu smo ugotovili, da je koncentracija fenolnih spojin v izvlečkih premajhna, da bi se pokazala protimikrobna učinkovitost, zato smo morali izvlečke močno skoncentrirati. Ugotovili smo tudi, da etanol ni najprimernejše topilo v naši raziskavi določanja protimikrobne učinkovitosti. Da smo protimikrobno učinkovitost uspeli določiti na vzorcih, katerim smo predhodno določili antioksidativno učinkovitost, smo najprej odstranili etanol. Etanolne izvlečke fenolnih spojin iz limonastega timijana in bazilike smo zato posušili do suhega. Suhi preostanek smo raztopili v čim manjšem volumnu DMSO, saj smo želeli pripraviti dovolj koncentrirane raztopine fenolnih spojin. Pri tem pa smo bili omejeni s topnostjo spojin in posledično tudi s količino razpoložljivega PS. Vsebnost PS, to je fenolnih spojin, smo izrazili v mg klorogenske kisline na mL raztopine.

Preglednica 19: Masna koncentracija fenolnih spojin v izvlečkih limonastega timijana in bazilike, raztopljenih v DMSO

vzorec	γ (mg KK/mL)
TZ	85,1
BZ	30,5
TS	134,4
BS	104,1

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Protimikrobno učinkovino na mikrotitrski plošči razredčimo z gojiščem in kulturo, kar upoštevamo pri izračunu koncentracije. V vsa polja mikrotitrške plošče smo najprej nanesti 50 μ L gojišča MHB. Nato smo v prvo vrsto dodali 50 μ L pripravljene založne raztopine desetkrat razredčenih vzorcev. S pipeto smo dobro premešali in 50 μ L zmesi prenesli v naslednjo vrsto, kjer smo spet dobro premešali in 50 μ L prenesli naprej. Tako smo dobili serijo 2-kratnih razredčitev. Ko je bila celotna plošča pripravljena, smo nanesti še 50 μ L kulture. PS smo torej najprej desetkrat razredčili z gojiščem MHB. Koncentracijo smo razpolovili, ko smo PS dodali že nanešenemu gojišču na plošči, nato pa še enkrat, ko smo dodali kulturo. Zadnja vrsta je bila namenjena kontrolam, koncentracije PS v prvih 7 vrstah za posamezne izvlečke pa so navedene v preglednici 20.

Preglednica 20: Koncentracije fenolnih spojin v izvlečkih limonastega timijana in bazilike v posameznih poljih mikrotitrne plošče

vrsta na plošči:	γ ($\mu\text{g KK/mL}$)			
	TZ	BZ	TS	BS
A	2127	763	3359	2603
B	1064	381	1680	1302
C	532	191	840	651
D	266	95	420	325
E	133	48	210	163
F	66	24	105	81
G	33	12	52	41

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

V preglednici 21 je prikazan primer izmerjenih vrednosti fluorescence z napravo Tecan. Uporabljeni mikroorganizem je *S. aureus*, sev 5.5. Okrepljeno so zapisane vrednosti na mestih, kjer smo določili MIK – torej v poljih z najnižjo koncentracijo PS, ki še inhibira rast bakterij.

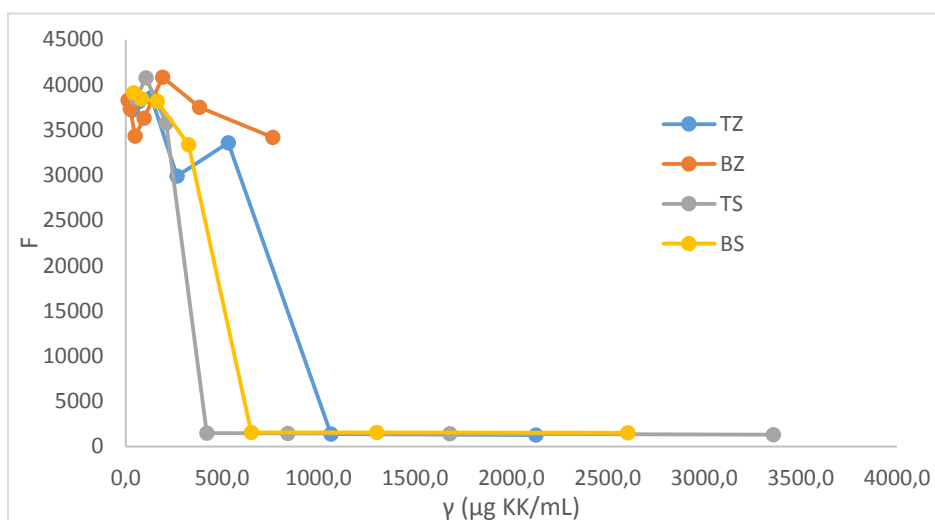
Preglednica 21: Izmerjena fluorescence v primeru določanja MIK izvlečkov timijana in bazilike na *S. aureus*, sev 5.5. V zadnji vrsti so fluorescence kontrol.

Fluorescenca							
TZ ₁	TZ ₂	BZ ₁	BZ ₂	TS ₁	TS ₂	BS ₁	BS ₂
1194	1333	40295	28078	1283	1350	1518	1513
1326	1415	30801	44225	1421	1423	1572	1535
35683	31510	45967	35731	1440	1453	1534	1528
28746	31036	37823	34834	1480	1479	33234	33511
37658	39503	34367	34275	35659	35903	38667	37730
36112	40147	36865	37783	37693	43861	37972	38873
35958	38422	38268	38350	38177	38762	39043	39157
39899	37949	1575	1521	1310	1748	1285	1645
PK	PK	B	B	NK TZ	NK BZ	NK TS	NK BS

Legenda: PK – pozitivna kontrola, B – slepa proba, NK – negativna kontrola, TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

V primerih, ko je izmerjen signal med dvema poljema drastično narasel, za približno 10-kratno vrednost, smo kot MIK odčitali zadnje polje, kjer je bil signal še nizek. Kjer je izmerjena vrednost naraščala postopno, smo kot MIK odčitali srednjo vrednost.

Pri odčitavanju MIK si lahko pomagamo tudi s črtnim grafikonom, na katerem je prikazana odvisnost fluorescence od koncentracije fenolnih spojin v poljih mikrotitrne plošče. Vsak izvleček smo za vsak sev testirali v dveh paralelkah. Na sliki 22 je za primer omenjen v preglednici 21 prikazan graf, kjer smo uporabili povprečje izmerjenih vrednosti za fluorescenco.



Slika 22: Črtni diagram za določanje MIK – odvisnost fluorescence (F) od masne koncentracije (γ) fenolnih spojin izvlečkov iz timijana in bazilike

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Na grafu je v območju koncentracije, ki predstavlja MIK, zelo strm porast premice, ko izmerjena fluorescenca preide z nivoja slepe probe (B) na nivo pozitivne kontrole (PK).

V preglednici 22 so prikazani rezultati določanja MIK za izvlečke fenolnih spojin iz zamrznjenih in posušenih vzorcev timijana in bazilike na sevih štirih bakterijskih vrst. Nizka vrednost MIK pomeni, da že nizka koncentracija fenolnih spojin v pripravku iz uporabljenega zelišča zaustavi bakterijsko rast. V takem primeru je PS bolj učinkovito, kot če je vrednost MIK višja. Visoka vrednost MIK pomeni, da bakterijsko rast zaustavi šele visoka koncentracija fenolnih spojin. Pripravljeno PS je tako manj učinkovito v inhibiciji rasti bakterij oziroma so bakterije nanj bolj odporne.

V nekaterih primerih MIK nismo uspeli določiti, saj niti najvišja uporabljena koncentracija PS ni zaustavila rasti bakterij. Kjer niti najvišja na mikrotitrski plošči uporabljena masna koncentracija PS ni zaustavila bakterijske rasti, smo v preglednici 22 označili kot > najvišja uporabljena masna koncentracija fenolnih spojin na mikrotitrski plošči.

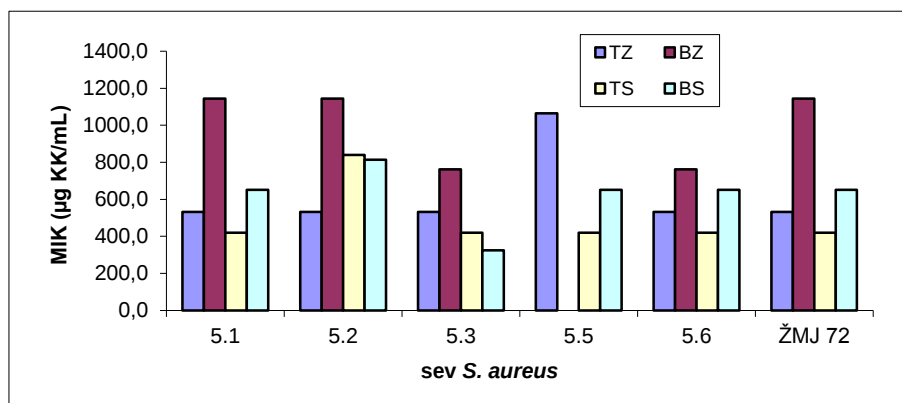
V nekaterih primerih je bila v prvi vrsti – v polju z najvišjo uporabljenjo koncentracijo PS, rast občutno zmanjšana, izmerjena intenziteta fluorescence pa še vedno nekoliko nad nivojem slepe probe. Takrat smo kot MIK določili dvakratno največjo uporabljenjo masno koncentracijo fenolnih spojin.

Preglednica 22: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) fenolnih spojin izvlečkov iz timijana in bazilike na sevih *C. jejuni*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* in *E. coli*

MIK (µg KK/mL)				
<i>Campylobacter jejuni</i>				
	TZ	BZ	TS	BS
C2	798	191	840	163
C33	133	>763	157	325
11168	199	>763	105	163
375/06	199	286	105	203
573/03	233	>763	210	244
K49/4	166	>763	420	244
<i>Staphylococcus aureus</i>				
	TZ	BZ	TS	BS
5.1	532	1144	420	651
5.2	532	1144	840	814
5.3	532	763	420	325
5.5	1064	>763	420	651
5.6	532	763	420	651
ŽMJ 72	532	1144	420	651
<i>Listeria monocytogenes</i>				
	TZ	BZ	TS	BS
ŽM 52	1064	>763	840	1302
ŽM 60	1064	>763	840	1302
ŽM 62	1064	>763	1260	1302
ŽM 71	1064	>763	1680	2603
ŽM 74	1064	1525	1680	2603
L 95	1064	1525	840	2603
<i>VT Escherichia coli</i>				
	TZ	BZ	TS	BS
VTEC 2-3	4254	>763	3359	>2603
VTEC 2-4	4254	>763	6718	>2603
VTEC 62-4	4254	>763	6718	>2603
VTEC 80-8	>2127	>763	6718	>2603
VTEC 80-21	4254	>763	6718	>2603
VTEC 81-30	4254	>763	6718	>2603

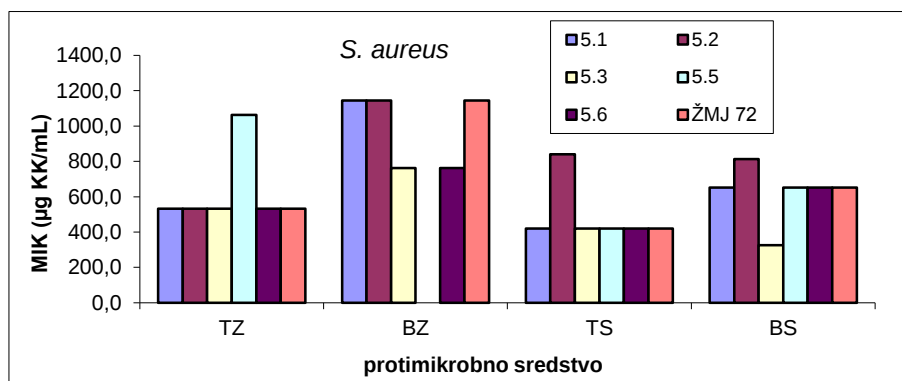
Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

Na slikah 23 in 24 so na dva različna načina grafično prikazane MIK fenolnih spojin izvlečkov limonastega timijana in bazilike na sevih *S. aureus*.



Slika 23: MIK fenolnih spojin izvlečkov limonastega timijana in bazilike na sevih *S. aureus*

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika



Slika 24: Občutljivost posameznih sevov *S. aureus* na fenolne spojine v izvlečkih limonastega timijana in bazilike

Legenda: TZ – zamrznjeni timijan, BZ – zamrznjena bazilika, TS – posušeni timijan, BS – posušena bazilika

V preglednici 22 vidimo, da so v splošnem najnižje določene vrednosti MIK pri *C. jejuni*, kjer se za vse uporabljene izvlečke in vse seve večina MIK giblje do 400 µg/mL. Pri *S. aureus* so skoraj vse določene vrednosti MIK višje od 400 µg KK/mL, najvišje MIK znašajo do približno 1100 µg KK/mL. Pri *L. monocytogenes* se MIK gibljejo od 800 µg KK/mL navzgor. MIK pri *E. coli* smo določili le z izvlečki, pripravljenimi iz zamrznjenega in posušenega limonastega timijana, kjer znašajo vse določene MIK vrednosti več kot 4000 µg KK/mL. Za izvlečke iz zamrznjene in posušene bazilike nismo uspeli določiti MIK pri *E. coli*, čeprav je bila za izvlečke iz posušene bazilike uporabljena koncentracija fenolnih spojin na plošči višja kot za izvlečke iz zamrznjenega limonastega timijana. MIK vrednosti kažejo,

da je med testiranimi bakterijami *C. jejuni* najbolj občutljiv na protimikrobne pripravke iz limonastega timijana in bazilike, sledi *S. aureus*, nato *L. monocytogenes*, *E. coli* pa je najbolj odporna. Shan in sod. (2007) so raziskovali protimikrobno aktivnost 46 zelišč in začimb na petih bakterijskih vrstah. Uporabili so tudi navadni timijan (*Thymus vulgaris*) in baziliko (*Ocimum basilicum*) ter bakterije *S. aureus*, *L. monocytogenes* in *E. coli*. Rasti *E. coli* ni inhibiral niti izvleček timijana, niti izvleček bazilike. *E. coli* se je izkazala kot najodpornjša na izvlečke vseh preiskovanih zelišč in začimb. Timijan je učinkovito preprečil rast bakterij *L. monocytogenes* in *S. aureus*, pri čemer je bil premer cone inhibicije pri *S. aureus* večji. Bazilika je inhibirala rast *S. aureus*, ki se je med omenjenimi bakterijskimi vrstami izkazal kot najbolj občutljiv na izvlečke timijana in bazilike. Izvleček timijana pa se je v primerjavi z izvlečkom bazilike izkazal kot učinkovitejše protimikrobno sredstvo. Rezultati se ujemajo z našo raziskavo.

Z izvlečkom fenolnih spojin iz zamrznjene bazilike smo uspeli MIK določiti le pri nekaj sevih. Razlog je verjetno precej nizka koncentracija fenolnih spojin iz zamrznjene bazilike, ki smo jo dosegli v gojišču, 763 µg KK/mL. V večini poskusov z izvlečki iz zamrznjene bazilike je bila rast bakterij prisotna pri tej koncentraciji. Vsekakor pa lahko z naslednjo primerjavo potrdimo, da je ta izvleček med testiranimi najmanj protimikrobno učinkovit. Pri *C. jejuni* in *S. aureus* so za izvlečke iz timijana (tako zamrznjenega kot posušenega) in posušene bazilike določene MIK vrednosti v glavnem precej nižje od 763 µg KK/mL. Tako je na primer pri *C. jejuni* izvleček zamrznjenega timijana dosegel MIK za večino preiskovanih sevov pri okoli 200 µg KK/mL in za *S. aureus* pri 530 µg KK/mL, medtem ko izvleček iz zamrznjene bazilike za večino preiskovanih sevov *C. jejuni* in *S. aureus* ni pokazal protimikrobne učinkovitosti niti pri 763 µg KK/mL.

Za pregled morebitnih razlik v občutljivosti na fenolne spojine v izvlečkih limonastega timijana in bazilike med posameznimi sevi istih mikroorganizmov lahko uporabimo grafični prikaz rezultatov, kot je upodobljen na sliki 24.

Pri sevih *C. jejuni* so trije preizkušeni izvlečki (TZ, TS in BS) pokazali protimikrobno učinkovitost na vse seve, le izvleček iz zamrznjene bazilike rasti štirih sevov ni inhibiral. Pri tem opazimo, da je TZ pokazal primerljive MIK vrednosti na pet sevov, pri sevu C2 pa je MIK znatno večja. Podobno je večja MIK vrednost na ta sev tudi v primeru TS.

Pri ostalih treh testiranih mikroorganizmih, to so *S. aureus*, *L. monocytogenes* in *E. coli*, so se sevi istega mikroorganizma na posamezna PS odzvali tako, da smo s posameznim PS za vse seve istega mikroorganizma določili podobne MIK. Pri tem moramo upoštevati, da je odstopanje v vseh primerih le za eno polje v mikrotitrski plošči, pri čemer je bila razlika med uporabljenimi koncentracijami PS na sosednjih poljih na mikrotitrskih ploščah dvakratna. Izjema sta primera, ko z izvlečki iz zamrznjene bazilike pri *S. aureus* in *L. monocytogenes*

pri nekaterih sevih nismo določili MIK, saj niti najvišja uporabljena koncentracija PS ni zaustavila rasti.

Izvečki, pripravljeni iz limonastega timijana, so bolj protimikrobno učinkoviti kot izvlečki iz bazilike. Tako z izvlečki iz zamrznjenega kot posušenega limonastega timijana smo MIK določili pri vseh sevih razen pri enem sevu *E. coli*. Izvlečki iz bazilike (bodisi posušene bodisi zamrznjene) niso inhibirali rasti *E. coli*. Poleg tega izvlečki iz zamrznjene bazilike niso inhibirali niti rasti večine sevov *L. monocytogenes* in *C. jejuni* ter enega seva *S. aureus*. Vzorci limonastega timijana so pri *L. monocytogenes* in *S. aureus* inhibirali rast bakterij pri nižjih koncentracijah kot vzorci iz bazilike. Protimikrobna učinkovitost se ujema z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin v vzorcih, ki je tako pri zamrznjenih kot pri posušenih vzorcih višja v limonastem timijanu. Najmanjša vsebnost skupnih fenolnih spojin pa je v izvlečkih iz zamrznjene bazilike. Tudi Shan in sod. (2007) so ugotovili tesno povezavo med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in protimikrobno učinkovitostjo. S tem potrjujejo, da fenolne spojine najverjetneje bistveno prispevajo k protibakterijskemu delovanju izvlečkov zelišč in začimb.

Protimikrobno učinkovitost fenolnih spojin v timijanu sta preučevali tudi Petan (2012) in Žnidar (2014). MIK sta izrazili v ekvivalentih galne kisline ($\mu\text{g GK/mL}$), zato smo za primerjavo tudi rezultate naše raziskave pretvorili v enake enote. Petan je med drugimi mikroorganizmi določila MIK tudi na štirih sevih *C. jejuni*, Žnidar pa na 8 sevih *C. jejuni* in petih sevih *S. aureus*. Petan je v svoji raziskavi določila nižje MIK fenolnih spojin v izvlečkih timijana na sevih *C. jejuni* kot mi. Z rezultati Žnidar se naša raziskava mejno ujema, še vedno pa so naše vrednosti MIK višje. Tudi na sevih *S. aureus* smo v primerjavi z Žnidar določili višje MIK. Naši izvlečki iz timijana so bili slabše protimikrobno učinkoviti. K razliki lahko prispeva drugačna priprava rastlinskih pripravkov, pri *S. aureus* pa tudi uporaba druge metode za določanje živosti bakterij.

5 SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo ugotovili, da bazilika in limonasti timijan predstavljata vir fenolnih spojin. Potrdili smo tudi prisotnost posameznih skupin fenolnih spojin – flavonoidov, flavonov in flavonolov ter flavanonov in dihidroflavonolov. Vsebnost vseh določenih skupin fenolnih spojin je večja v limonastem timijanu.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin in skupnih flavonoidov se pri limonastem timijanu s sušenjem ni spremenila, pri baziliki pa se je nekoliko povečala. Vsebnost flavonov in flavonolov ter flavanonov in dihidroflavonolov se je s sušenjem znatno zmanjšala pri obeh dišavnicah.

Vsi pripravljene etanolni izvlečki so antioksidativno učinkoviti. V primerjavi s sintetičnim antioksidantom BHT je njihova sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• slabša. Antioksidativna učinkovitost izvlečkov iz bazilike je primerljiva z učinkovitostjo izvlečkov iz limonastega timijana.

Izvlečki iz posušenih zelišč so antioksidativno učinkovitejši od izvlečkov iz zamrznjenih.

Izvlečki fenolnih spojin iz limonastega timijana so pokazali boljšo protimikrobno učinkovitost od izvlečkov iz bazilike, saj so bili učinkoviti proti vsem sevom vseh preiskovanih bakterij. Najbolj uspešno inhibirajo rast *C. jejuni*, sledijo *S. aureus* in *L. monocytogenes*. Bakterije *E. coli* pa so med testiranimi najodpornejše, saj njihovo rast inhibirajo le izvlečki iz timijana.

Proti sevom *S. aureus* so učinkovitejši izvlečki iz posušenih zelišč, proti sevom *E. coli* iz zamrznjenih, pri ostalih dveh bakterijskih vrstah, *C. jejuni* in *L. monocytogenes*, pa vpliv sušenja na protimikrobno učinkovitost ni enoten.

6 POVZETEK

S solventno ekstrakcijo v etanolu smo pripravili izvlečke fenolnih spojin iz zamrznjenih in posušenih vzorcev limonastega timijana (*Thymus citriodorus*) in bazilike (*Ocimum basilicum*).

V dišavnicah smo spektrofotometrično določili vsebnost skupnih fenolnih spojin, skupnih flavonoidov ter posameznih skupin flavonoidov – flavonov in flavonolov ter flavanonov in dihidroflavonolov. Skupne fenolne spojine smo določili z uporabo reagenta Folin-Ciocalteu, skupne flavonoide ter flavone in flavonole na podlagi nastanka kompleksa v reakciji z AlCl_3 , flavanone in dihidroflavonole pa na podlagi nastanka kompleksa v reakciji z 2,4-dinitrofenilhidrazinom. Vsebnost vseh skupin fenolnih spojin je bila višja v izvlečkih iz limonastega timijana.

Pri limonastem timijanu nismo ugotovili razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin in skupnih flavonoidov v zamrznjenih in posušenih rastlinah, pri baziliki pa smo v posušenih rastlinah določili nekoliko višjo vsebnost kot v zamrznjenih. Pri baziliki se je morda bolj izrazil vpliv različne predpriprave vzorcev. Flavoni in flavonoli ter flavanoni in dihidroflavonoli so se v naši raziskavi izkazale kot tiste skupine flavonoidov, ki se pri sušenju očitno delno uničijo, saj smo jih v izvlečkih iz zamrznjenih zelišč določili več kot v izvlečkih iz posušenih.

Določili smo antioksidativno učinkovitost izvlečkov in jo primerjali s sintetičnim antioksidantom BHT. Spektrofotometrično smo spremljali, kako uspešni so različno razredčeni vzorci fenolnih spojin pri lovljenju prostih radikalov DPPH•. Določili smo koncentracijo fenolnih spojin posameznih izvlečkov in BHT v reakcijski zmesi, ki je potrebna, da v 30 min zniža začetno vsebnost DPPH• za 50 % (EC_{50}). EC_{50} vrednosti smo primerjali med seboj in ugotovili, da je BHT veliko učinkovitejši lovilec DPPH• kot izvlečki limonastega timijana in bazilike, saj BHT v 30 min za 50 % zniža vsebnost DPPH• pri koncentraciji 25,7 $\mu\text{g/mL}$. Med vzorci je bil najučinkovitejši izvleček iz posušenega limonastega timijana z EC_{50} (202 ± 9) $\mu\text{g/mL}$, sledil je izvleček iz posušene bazilike z (215 ± 11) $\mu\text{g/mL}$, izvleček iz zamrznjene bazilike z (257 ± 34) $\mu\text{g/mL}$, najmanj učinkovit lovilec radikalov pa je izvleček iz zamrznjenega timijana z EC_{50} (272 ± 35) $\mu\text{g/mL}$. Pri tem je potrebno poudariti, da se EC_{50} vrednosti izvlečkov zamrznjenega timijana in bazilike med seboj znatno ne razlikujeta. Prav tako sta EC_{50} vrednosti izvlečkov posušenega timijana in bazilike znotraj napake določitve enaki.

Da smo lahko testirali protimikrobno učinkovitost izvlečkov, smo jih koncentrirali tako, da smo jih najprej do suhega posušili, nato pa raztopili v majhnem volumnu DMSO. Tako

koncentrirane raztopine smo uporabili kot protimikrobno sredstvo proti različnim sevom bakterij *C. jejuni*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* in *E. coli*. Rast bakterij ob prisotnosti protimikrobnih sredstev pri različnih koncentracijah smo opazovali na mikrotitrskih ploščah in določili minimalne inhibitorne koncentracije fenolnih spojin (MIK). Živost bakterij smo detektirali z resazurinom. Ugotovili smo, da so preiskovani izvlečki najbolj uspešno inhibirali rast *C. jejuni*, sledijo *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* pa so na izvlečke iz limonastega timijana in bazilike od testiranih mikroorganizmov najbolj odporne. Rast *E. coli* so inhibirali samo izvlečki iz limonastega timijana, ki so bili tudi pri ostalih bakterijah v večini primerov učinkovitejši že pri nižjih koncentracijah fenolnih spojin.

7 VIRI

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573 – 589

Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti: Učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.

Allerberger F., Wagner M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clinical Microbiology and Infection, 16, 1: 16 – 23

Andlovic A. 2002. Patogene bakterije: *Escherichia coli*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185 – 188

Benedec D., Vlase L., Hanganu D., Oniga I. 2012. Antioxidant potential and polyphenolic content of Romanian *Ocimum basilicum*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 7, 3: 1263 – 1270

Brand - Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 28: 25 – 30

Bremness L. 1991. Zelišča. Murska Sobota, Pomurska založba: 239 str.

Cai Y. Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H. 2006. Structure – radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. Life Sciences, 78: 2872 – 2888

Chong J., Poutaraud A., Hugueney P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Science, 177: 143 – 155

Cook N. C., Samman S. 1996. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutritional Biochemistry, 7: 66 – 76

El - Nekeety A. A., Abdel - Azein S. H., Hassan A. M., Hassan N. S., Aly S. E., Abdel - Wahhab M. A. 2014. Quercetin inhibits the cytotoxicity and oxidative stress in liver of rats fed aflatoxin-contaminated diet. Toxicology Reports, 1: 319 – 329

Flanigan P. M., Niemeyer E. D. 2014. Effect of cultivar on phenolic levels, anthocyanin composition and antioxidant properties in purple basil (*Ocimum basilicum* L.). Food Chemistry, 164: 518 – 526

Garden Drum AU. 2012. Basil and rocket. Garden Drum AU: 2 str.

<http://gardendrum.com/2012/09/02/basil-and-rocket/> (26. mar. 2015)

González - Castejón M., Rodríguez - Casado A. 2011. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. Pharmacological Research, 64: 438 – 455

Graf B. A., Milbury P. E., Blumberg J. B. 2005. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence. Journal of Medicinal Food, 8, 3: 281 – 290

Grare M., Fontanay S., Cornil C., Finance C., Duval R.E. 2008. Tetrazolium salts for MIC determination in microplates: Why? Which salt to select? How? Journal of Microbiological Methods, 75: 156 – 159

Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemist's Society, 58: 966 – 968

Hajimehdipoor H., Adib N., Khanavi M., Mobli M., Amin G. R., Moghadam M. H. 2012. Comparative study on the effect of different methods of drying on phenolics content and antioxidant activity of some edible plants. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3, 10: 3712 – 3716

He Y., Chen C. Y. 2010. Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of *Campylobacter jejuni* strain 81 – 176. Food Microbiology, 27: 439 – 446

Hoult J. R. S., Payá M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. General Pharmacology, 27, 4: 713 – 722

Humadi S. S., Istudor V. 2008. Quantitative analysis of bio-active compound in *Hibiscus Sabdariffa* L. extracts. Note 1: Quantitative analysis of flavonoids. Farmacia, 56, 6: 699 – 707

IVZ. 2014. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2013. Ljubljana, Nacionalni inštitut za varovanje zdravja: 51 – 52

http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=attName.png&_5_MediaId=9114&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (15. dec. 2014)

Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E., Vivanco J. M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. Food Chemistry, 83: 574 – 550

Ketley J. M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. Microbiology, 143: 5 – 21

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

Kočevar Glavač N. 2013. Antioksidanti. V: Sodobna fitoterapija: Z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin. 2. izd. Kreft S., Kočevar Glavač N. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 511 – 537

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 249 str.

http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (20. dec. 2014)

Kruma Z., Andjelkovic M., Verhe R., Kreicbergs V. 2008. Phenolic compounds in basil, oregano and thyme. V: FOODBALT 2008: Conference proceedings. 3rd Baltic conference on food science and technology »Foodbalt 2008«, Jelgava, Apr 17 – 18, 2008. Straumite E. (ed.). Jelgava, Latvia University of Agriculture: 99 – 103

Lagouri V., Nisteropoulou E. 2009. Antioxidant properties of *O. onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. Journal of Food Lipids, 16: 484 – 498

Lambert Ortiz E. 1993. Enciklopedija zelišč, začimb in dišav: Praktični vodik za kuharske mojstre. Ljubljana, Domus: 285 str.

Liu M., Seidel V., Katerere D. R., Gray A. I. 2007. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. Methods, 42: 325 – 329

Lončar S., Topolovec S., Kočevar Fetah M., Baćac N. 2012. Ščepec rešitve: Zamolčane zdravilne moči začimb. 2. izd. Ljubljana, Svetovanje Aleš Pevc: 415 str.

Low Dog T. 2006. A reason to season: The therapeutic benefits of spices and culinary herbs. *Explore*, 2, 5: 446 – 449

Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 339, 8: 520 – 532

Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P. 2012. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. Boston, Benjamin Cummings: 1152 str.

Mardis B. A., Conley C. S., Kyle J. A. 2012. Listeriosis: An overview. *US Pharmacist*, 37, 8: 38 – 41

Mata A. T., Proença C., Ferreira A. R., Serralheiro M. L. M., Nogueira J. M. F., Araújo M. E. M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103: 778 – 785

Mayer J. 2013. *Kuhinjska zelišča*. Kranj, Narava: 125 str.

Müller Premru M. 2012. Patogene bakterije: Nesporogeni po Gramu pozitivni bacili. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 355 – 363

Novak A. 2013. *Dihala*. V: *Sodobna fitoterapija: Z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*. 2. izd. Kreft S., Kočevar Glavač N. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 125 – 173

Nussdorfer N. 1991. *V kraljestvu začimb*. Portorož, Droga: 156 str.

Okhuysen P. C., DuPont H. L. 2010. Enteraggregative *Escherichia coli* (EAEC): A cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *Journal of Infectious Diseases*, 202, 4: 503 – 505

Özcan M., Arslan D., Ünver A. 2005. Effect of drying methods on the mineral content of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Food Engineering*, 69: 375 – 379

Pahlow M. 1987. *Velika knjiga o zdravilnih rastlinah*. Ljubljana, Cankarjeva založba: 465 str.

Patel J. M. 2008. A review of potential health benefits of flavonoids. Lethbridge Undergraduate Research Journal, 3, 2: 5 str.

<http://www.lurj.org/issues/volume-3-number-2/flavonoids> (13 dec. 2014)

Pereira O. R., Peres A. M., Silva A. M. S., Domingues M. R. M., Cardoso S. M. 2013. Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC-UV and ESI-MS combined method. Food Research International, 54: 1773 – 1780

Petan A. 2012. Protimikrobno delovanje rastlinskih fenolnih izvlečkov na antibiotsko odporne in občutljive seve bakterij rodov *Campylobacter* in *Staphylococcus*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 57 str.

Politeo O., Jukic M., Milos M. 2007. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. Food Chemistry, 101: 379 – 385

Popova M., Silici S., Kaftanoglu O., Bankova V. 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine, 12: 221 – 228

Rode J. 2001. Zeliščni vrt: domača lekarna. Ljubljana, Kmečki glas: 231 str.

Rios J. L., Recio M. C., Villar A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. Journal of Ethnopharmacology, 23: 127 - 149

Seme K. 2002. Patogene bakterije: Stafilokoki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 139 – 145

Shan B., Cai Y. Z., Brooks J. D., Corke H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International Journal of Food Microbiology, 117: 112 – 119

Singh M., Kaur M., Silakari O. 2014. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. European Journal of Medicinal Chemistry, 84: 206 – 239

Slovensko društvo za kulturo vrtov in narodne zbirke rastlin. 2014. Vrsta, podvrsta, sorta, klon. Šentjur, Slovensko društvo za kulturo vrtov in narodne zbirke rastlin: 1 str.

http://www.svz-si.eu/sl/Vrsta_podvrsta_sorta_klon/ (28. dec. 2014)

Škerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rižner H. A., Simonič M., Knez Ž. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry, 89: 191 – 198

Taie H. A. A., Salama Z. A. R., Radwan S. 2010. Potential activity of basil plants as a source of antioxidants and anticancer agents as affected by organic and bio-organic fertilization. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38, 1: 119 – 127

Tomsone L., Kruma Z. 2014. Influence of freezing and drying on the phenol content and antioxidant activity of horseradish and lovage. V: FOODBALT 2014: Conference proceedings. 9th Baltic conference on food science and technology »Food for consumer well-being«, Jelgava, May 8 – 9, 2014. Straumite E. (ed.). Jelgava, Latvia University of Agriculture: 192 – 197

Trkov M., Andlovic A., Berce I., Štorman A., Ravnik M., Paragi M. 2012. Verotoksigeni sevi bakterije *Escherichia coli*, osamljeni v Sloveniji iz humanih vzorcev. Zdravniški Vestnik, 83: 32 – 43

Trusty S. 2011. Gardener's bloom day June 2011. Cincinnati, The Trusty Gardener's Blog: 7 str.

<http://thetrustygardener.com/blog/2011/06/16/gardeners-bloom-day-june-2011/> (26. mar. 2015)

Tsukatani T., Suenaga H., Higuchi T., Akao T., Ishiyama M., Ezoe K., Matsumoto K. 2008. Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. Journal of Microbiological Methods, 75: 109 – 116

Usai M., Marchetti M., Foddai M., Del Caro A., Desogus R., Sanna I., Piga A. 2011. Influence of different stabilizing operations and storage time on the composition of essential oil of thyme (*Thymus officinalis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) LWT – Food Science and Technology, 44: 244 – 249

Vuong T. V., Franco C., Zhang W. 2014. Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Biotechnology Reports, 1 – 2: 15 – 21

Yáñez J. A., Remsberg C. M., Miranda N. D., Vega - Villa K. R., Andrews P. K., Davis N. M. 2008. Pharmacokinetics of selected chiral flavonoids: hesperetin, naringenin and eriodictyol in rats and their content in fruit juices. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 29: 63 – 82

Yang J., Meyers J. K., van der Heide J., Lui R. H. 2004. Varietal differences in phenolic content and antioxidant and antiproliferative activities of onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6787 – 6793

Zheng W., Wang S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 11: 5165 – 5170

Žnidar K. 2014. Protimikrobna aktivnost izbranih rastlinskih izvlečkov, eteričnih olj in odpadnih materialov po destilaciji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije: 56 str.

ZAHVALA

Iskrena hvala mentorici prof. dr. Heleni Abramovič za vso strokovno pomoč, natančna navodila za izvedbo eksperimentalnega dela, hiter in skrben pregled ter popravke mojega diplomskega dela. Hvala za prijaznost, razumevanje in za ves čas, ki ste si ga vzeli zame.

Hvala somentorici prof. dr. Sonji Smole Možina in recenzentu prof. dr. Rajku Vidrihu za koristne napotke.

Za tehnični pregled in pomoč pri urejanju naloge se zahvaljujem univ. dipl. inž. Lini Burkan Makivić.

Za pomoč v laboratoriju in vedno pozitivno vzdušje se zahvaljujem vsem, s katerimi sem se srečevala na Katedri za kemijo in biokemijo živil in na Katedri za mikrobiologijo, biotehnologijo in varnost živil. Za izčrpno pomoč, ogromno namenjenega časa in veliko mero razumevanja še posebej hvala Jasni Kovač.

Katji hvala za pomoč pri spopadanju s slovničnimi izzivi in za spodbudo pri pisanju.

Hvala mami Martini in tatu Daretu – za vse, v zadnjih letih pa predvsem za varstvo. Brez vajine pomoči ne bi šlo. Hvala tudi sestram Petri, Evi, Mojci in Tini za varstvo in moralno podporo ter Marjetki za računalnik, na katerem je nastala ta naloga.

Hvala možu Srečku, ker mi vedno stojiš ob strani. In hvala mojima Juliji in Danijelu. Z vama je vse lepše.