

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Klemen SAJE

**KOMBINIRANO DELOVANJE VISOKEGA
HIDROSTATSKEGA TLAKA IN IZVLEČKA
TIMIJANA (*Thymus vulgaris*) NA ZAVIRANJE RASTI
BAKTERIJ VRSTE *Listeria monocytogenes* V
MODELNEM ŽIVILU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Klemen SAJE

**KOMBINIRANO DELOVANJE VISOKEGA HIDROSTATSKEGA
TLAKA IN IZVLEČKA TIMIJANA (*Thymus vulgaris*) NA
ZAVIRANJE RASTI BAKTERIJ VRSTE *Listeria monocytogenes* V
MODELNEM ŽIVILU**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

**COMBINED EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE AND
THYME EXTRACT (*Thymus vulgaris*) ON GROWTH INHIBITION OF
Listeria monocytogenes IN A MODEL FOOD**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Katedri za živilsko mikrobiologijo na Fakulteti za živilsko tehnologijo, univerze "Dunarea de Jos din Galați" v Romuniji.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Leo Demšar.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Lea Demšar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Klemen Saje

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.67:579.24:547.9:582.929.4(043)=163.6
KG	patogene bakterije/ <i>Listeria monocytogenes</i> /timijan/ <i>Thymus vulgaris</i> L./rastlinski izvlečki/izvleček timijana/superkrična tekočinska ekstrakcija/visoki hidrostatski tlaki/protimikrobna aktivnost/sinergijski učinek/živila/sveži siri
AV	SAJE, Klemen, dipl. ing. živ. in preh. (UN)
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ DEMŠAR, Lea (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	KOMBINIRANO DELOVANJE VISOKEGA HIDROSTATSKEGA TLAKA IN IZVLEČKA TIMIJANA (<i>Thymus vulgaris</i>) NA ZAVIRANJE RASTI BAKTERIJ VRSTE <i>Listeria monocytogenes</i> V MODELNEM ŽIVILU
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)
OP	X, 59 str., 10 pregl., 13 sl., 74 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	S superkrično tekočinsko ekstrakcijo (SFE) smo pripravili izvlečke timijana (TE) in primerjali izbrane fizikalne lastnosti (izgled, topnost, količino pridobljenih frakcij) ter protimikrobno učinkovitost različnih frakcij na bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> v bujonu BHI in vzorcih svežega sira. Ugotovili smo, da so izvlečki, pridobljeni pri višjih tlakih, protimikrobno bolj učinkoviti, prav tako se poveča tudi izkoristek ekstrakcije. Ugotovili smo, da protimikrobna učinkovitost izvlečkov v bujonu BHI narašča z njihovo hidrofobnostjo, prisotnost maščob v siru pa zmanjša protimikrobno učinkovitost izvlečkov. V siru protimikrobno najučinkovitejšo frakcijo smo preizkusili tudi v vzorcih sira, ki so bili nato obdelani z visokimi hidrostatskimi tlaki. Pri tem sta višji hidrostatski tlak in 0,2 % vol/vol dodatek TE vzajemno vplivala na zaviranje rasti bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> . Obe uporabljeni metodi sta imeli tudi vpliv na senzorično kakovost obdelanega sira. Maksimalna senzorično sprejemljiva koncentracija timijanovega izvlečka v siru je znašala 0,2 % vol/vol. Hidrostatski tlaki, višji od 200 MPa, so povzročili povečano izločanje sirotke in spremembo teksture sira, najverjetneje zaradi denaturacije proteinov v siru. Kombinirana uporaba hidrostatskega tlaka in dodatka timijanovega izvlečka je torej protimikrobno učinkovita metoda, ki pa jo omejujejo senzorične spremembe živila.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 579.67:579.24:547.9:582.929.4(043)=163.6
CX pathogens/*Listeria monocytogenes*/thyme/*Thymus vulgaris* L./plant extracts/thyme extract/supercritical fluid extraction/high hydrostatic pressure/antimicrobial activity/synergistic effect/food/soft cheese
AU SAJE, Klemen
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ DEMŠAR, Lea (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2016
TY COMBINED EFFECT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE AND THYME EXTRACT (*Thymus vulgaris*) ON GROWTH INHIBITION OF *Listeria monocytogenes* IN A MODEL FOOD
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
NO X, 59 p., 10 tab., 13 fig., 74 ref.
LA sl
Al sl/en
AB In this study, we had observed how different pressure settings of supercritical fluid extraction process are affecting the properties and antimicrobial efficacy of different fractions of thyme extract (TE) on bacteria *L. monocytogenes* in laboratory medium BHI and in fresh cheese. At the first step, we prepared and analysed physical characteristics and the extraction yield of different fractions of TE, at the second step we compared their antimicrobial activity in BHI broth and soft cheese samples. We came to the conclusion that fractions of TE obtained by supercritical fluid extraction at higher pressure settings had better antilisterial properties and higher yields were obtained, while antilisterial activity of different fractions were decreasing with higher water solubility properties. The fat content in cheese resulted in decreased antilisterial efficacy of all obtained fractions. A fraction of TE with the highest antilisterial activity was used for combined treatment of soft cheese with high hydrostatic pressure treatment (HHP). In this trial, we observed that combination of HHP at higher pressures with the most effective fraction of TE in concentration 0,2% vol/vol contributed their part to inhibiting *L. monocytogenes* growth. Both preservative methods influenced a sensory acceptance of cheese. Maximum sensory acceptable concentration of TE in cheese was 0,2 % vol/vol while HHP carried out at pressures higher than 200 MPa resulted in increased wheying-off.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i> IN PROBLEMATIKA HUMANIH LISTERIOZ	3
2.1.1 Prenos listerioze s hrano	4
2.1.2 Pojavnost bakterij <i>L. monocytogenes</i> v siru	5
2.2 TEHNOLOGIJA VISOKIH HIDROSTATSKIH TLAKOV (HHP)	5
2.2.1 Protimikrobna učinkovitost HHP in njegovi mehanizmi delovanja	6
2.2.1.1 Vpliv HHP na celično membrano	7
2.2.1.2 Vpliv HHP na proteine	7
2.2.1.3 Vpliv HHP na DNK	8
2.2.1.4 Vpliv okoljskih dejavnikov na protimikrobno učinkovitost HHP	8
2.2.1.5 Uporaba HHP v proizvodnji sira	9
2.2.1.6 Vpliv matriksa, pH in a_w na učinek HHP	9
2.2.1.7 Fizikalne lastnosti sira	10
2.3 RASTLINSKI IZVLEČKI IN ETERIČNA OLJA	10
2.3.1 Pridobivanje izvlečkov in eteričnih olj	11
2.3.2 Superkritična tekočinska ekstrakcija (SFE)	11
2.3.3 Protimikrobne učinkovine izvlečkov in njihovo delovanje	12
2.3.3.1 Fenolne spojine	12
2.3.3.2 Karvakrol in timol	13
2.3.3.3 p-cimen	13
2.3.3.4 Terpeni	13

2.3.3.5	Flavoni, flavonoidi, tanini	14
2.3.4	Določanje protimikrobne učinkovitosti	14
2.3.5	Senzorični učinek rastlinskih izvlečkov	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	MATERIALI	17
3.1.1	Rastlinski material	17
3.1.2	Bakterije	18
3.1.3	Mikrobiološka gojišča	18
3.1.3.1	Selektivna gojišča	18
3.1.3.2	Neselektivna gojišča	19
3.1.4	Kemikalije	19
3.1.5	Naprave in pribor	20
3.2	METODE DELA	20
3.2.1	Pridobivanje timijanovega izvlečka (TE)	20
3.2.1.1	Priprava rastlinskega materiala	21
3.2.1.2	Merjenje vodne aktivnosti in vsebnosti vode v rastlinskem materialu	21
3.2.1.3	Superkritična tekočinska ekstrakcija (SFE)	21
3.2.2	Priprava in postopek razredčevanja in stabilizacije TE	22
3.2.3	Določitev MIK v BHI	23
3.2.3.1	Priprava inokuluma	24
3.2.4	Določitev minimalne baktericidne koncentracije (MBK)	26
3.2.5	Določitev kombiniranega protimikrobnega delovanja HHP in TE v siru	26
3.2.5.1	Priprava koncentracij	26
3.2.5.2	Priprava razredčitev	27
3.2.6	Preživelost bakterij <i>L. monocytogenes</i> v siru z različnimi koncentracijami TE	28
3.2.7	Določitev kombiniranega protimikrobnega delovanja HHP in TE v siru	29
3.2.7.1	Priprava vzorcev	29
3.2.7.2	Obdelava vzorcev z visokim tlakom	29
3.2.8	Senzorična analiza sira z dodatkom TE	31
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	32
4.1	PRIDOBIVANJE TIMIJANOVEGA IZVLEČKA (TE)	32

4.1.1	Masne bilance	33
4.1.2	Fizikalne lastnosti pridobljenih izvlečkov	33
4.1.3	Masni donos TE v odvisnosti od ekstrahiranega rastlinskega materiala	35
4.2	DOLOČANJE MIK IN MBK V GOJIŠČU BHI	36
4.2.1	Vpliv topil na MIK in MBK	38
4.3	PROTIMIKROBNI UČINEK TIMIJANOVEGA IZVLEČKA V SVEŽEM SIRU	39
4.3.1	Vpliv maščob na protimikrobne lastnosti TE	41
4.3.2	Vpliv pH na protimikrobne lastnosti TE	42
4.3.3	Vpliv vsebnosti vode na protimikrobne lastnosti TE	42
4.4	KOMBINIRANO DELOVANJE HHP IN TE NA ZAVIRANJE RASTI BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i> V SVEŽEM SIRU	42
4.4.1	Vpliv pH na hitrost inhibicije HHP	46
4.4.2	Vpliv a_w na hitrost inhibicije HHP	46
4.4.3	Vpliv matriksa živila na hitrost inhibicije HHP	46
4.5	VPLIV TE IN HHP NA SENZORIČNO KAKOVOST SIRA	47
4.5.1	Vpliv HHP na teksturo in barvo sira	47
4.5.2	Vpliv TE na okus sira	48
5	SKLEPI	51
6	POVZETEK	52
7	VIRI	53
ZAHVALA		
ACKNOWLEDGEMENTS		

KAZALO SLIK

Slika 1: Procesna shema pridobivanja timijanovega izvlečka in njegove uporabe pri postopku določanja MIK in MBK v mikrobiološkem mediju in svežem siru.	16
Slika 2: Procesna shema priprave izvlečkov in uporabe postopka HHP ter določanje njune protimikrobne učinkovitosti in preživelosti <i>L. monoytogenes</i> v svežem siru.	17
Slika 3: Tehnološka shema sistema za izvedbo superkritične tekočinske ekstrakcije (SFE) (Mihalcea, 2009).....	22
Slika 4: Razlika med homogenizacijo TE S45300 brez postopka sonifikacije (levo) in homogenizacijo TE S45300 s postopkom sonifikacije (desno).	23
Slika 5: Procesna shema pripravljene mikrotitrne plošče za določanje MIK v BHI.	25
Slika 6: Priprava vzorcev sira z različnimi koncentracijami TE in nacepljanje razredčitev vzorca sira z določeno koncentracijo TE (zaradi lažje preglednosti je v shemi predstavljen postopek priprave razredčitev in nacepljanja vzorcev samo ene paralelke).....	28
Slika 7: Procesna shema priprave vzorcev sira za izvedbo kombinirane obdelave s TE in HHP.	30
Slika 8: Pridobljene frakcije timijanovega izvlečka (TE).	34
Slika 9: Rezultati MBK različnih frakcij in različnih koncentracij TE, v gojišču MHA. ...	37
Slika 10: Inhibicija bakterij <i>L. monocytogenes</i> v odvisnosti od koncentracije TE S45300 v siru po 24 in 48 urah inkubacije na PALCAM agarju pri 37 °C.	40
Slika 11: Inhibicija bakterij <i>L. monocytogenes</i> v odvisnosti od koncentracije TE S45400 v siru po 24 in 48 urah inkubacije na PALCAM agarju pri 37 °C.	40
Slika 12: Inhibicija bakterij <i>L. monocytogenes</i> v kombiniranem postopku HHP in TE v odvisnosti od tlaka, koncentracije TE in časa obdelave.	44
Slika 13: Primerjava vrednosti D pri različnih tlakih postopka HHP v vzorcih svežega sira s in brez TE.....	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Inaktivacija celičnih funkcij mikroorganizmov v odvisnosti od jakosti tlaka (Abe, 2007).....	7
Preglednica 2: Uporabljene naprave in laboratorijski pribor.....	20
Preglednica 3: Lastnosti svežega sira, uporabljenega kot modelno živilo.	26
Preglednica 4: Nastavitve parametrov postopka SFE za ekstrahiranje in frakcioniranje timijanovega izvlečka.	32
Preglednica 5: Lastnosti rastlinskega materiala timijana pred in po prvi ekstrakciji.	32
Preglednica 6: Količina pridobljenega izvlečka timijana pri prvi in drugi ekstrakciji.	33
Preglednica 7: Povprečja izmerjenih absorbanč posameznih frakcij TE pri metodi določanja MIK v BHI po 24 urah inkubacije.	36
Preglednica 8: Koncentracija (CFU/mL) bakterij <i>L. monocytogenes</i> v vzorcih sira po 24 in 48 urah inkubacije na PALCAM agarju pri 37 °C pri različnih koncentracijah TE.	39
Preglednica 9: Koncentracija bakterij <i>L. monocytogenes</i> v odvisnosti od uporabe postopka HHP pri različnih tlakih, časovnih intervalih in koncentracijah TE.	43
Preglednica 10: Ocene senzoričnega ocenjevanja sira po dodatku različnih frakcij TE.	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% ut/ut	utežnostni delež
% vol/ut	utežnostno/volumski delež
% vol/vol	volumski delež
ALOA	selektivno gojišče za bakterije <i>L. monocytogenes</i>
ATP	adenozin trifosfat
a_w	vodna aktivnost
BHI	bujon (ang. Brain-heart infusion broth)
CFU	število kolonij (ang. Colony-forming units)
DNK	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
eV	elektron volt
FDA	Zvezna agencija za hrano in zdravila (ang. Food and Drug Administration)
GC-MS	plinska kromatografija z masno spektrometrijo (ang. Gas chromatography-mass spectrometry)
HHP	visok hidrostatski tlak (ang. High hydrostatic pressure)
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. International Organization for Standardization)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
m/z	razporeditev ionov po masi (ang. mass-to-charge ratio)
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MHA	Mueller-Hinton agar
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
PALCAM	selektivno gojišče za bakterije <i>L. monocytogenes</i>
PBS	raztopina fosfatnega pufra (ang. Phosphate buffered saline)
PK	pozitivna kontrola
RI	retenzijski indeks (ang. Retention index)
RT	retenzijski čas (ang. Retention time)
S40300	frakcija izvlečka timijana pridobljenega v separatorju S40 pri 300 MPa
S45300	frakcija izvlečka timijana pridobljenega v separatorju S45 pri 300 MPa
S40400	frakcija izvlečka timijana pridobljenega v separatorju S40 pri 400 MPa
S45400	frakcija izvlečka timijana pridobljenega v separatorju S45 pri 400 MPa
SFE	superkritična tekočinska ekstrakcija (ang. Supercritical fluid extraction)
SPME	trdno-fazna mikroekstrakcija (ang. Solid-phase microextraction)
TE	izvleček timijana (ang. Thyme extract)

1 UVOD

Kljub sodobnim izboljšavam na področju pridelave in predelave živil izzivi zagotavljanja varnosti hrane ostajajo. Med njimi je listerioza, ena izmed najresnejših, s hrano prenosljivih bolezni v industrijskih državah (Coelho in sod., 2014).

Izpostavljena skupina živil za tveganje okužb z bakterijami vrste *Listeria monocytogenes* so tudi sveži siri. V to skupino spadajo mehki, nezorjeni siri, pridobljeni s kislinsko koagulacijo ali kombinacijo kislinske in encimske koagulacije. Sveži siri imajo mehko teksturo in majhno vsebnost soli, pH je višji od 4,7, vodna aktivnost pa se giblje med 0,98 in 0,99. Takšni pogoji omogočajo rast kvarljivcem in patogenim bakterijam, kot so bakterije vrste *L. monocytogenes* (Gadotti in sod., 2014).

Kljub temu, da se zaradi velike pojavnosti listerioze poraja vprašanje, ali so sedanja merila zagotavljanja varnosti hrane zadostna, pa se je zaradi vse močnejšega trenda "zelenega potrošništva" začela pojavljati težnja po manj predelani hrani in zmanjšani uporabi sintetičnih konzervansov, kar še dodatno povečuje razhajanje med zagotavljanjem varnosti živil in željami potrošnikov. Z namenom boljšega zagotavljanja varnosti hrane na eni strani in ugoditvi željam potrošnikov na drugi, predstavlja uvedba "zelenih tehnologij" k že obstoječim metodam zagotavljanja varnosti hrane možno rešitev opisane problematike (Smid in Gorris, 1999; Burt, 2004).

Ena izmed možnosti zmanjšanja uporabe sintetičnih konzervansov je uporaba naravnih dodatkov, kot so izvlečki nekaterih rastlin dišavnic s protimikrobnim delovanjem. Uporaba rastlinskih izvlečkov kot konzervansov je za zdaj še omejena predvsem zaradi senzoričnih omejitev in pomanjkanja zaključenih raziskav na področju njihovega delovanja v živilih. Ta problem lahko odpravimo z dodajanjem različnih mešanic rastlinskih izvlečkov ali njihovih protimikrobnih sestavin, mikroinkapsulacijo dodatkov, ki prispeva h kontroliranemu sproščanju učinkovin, izboljšanju topnosti, ali z uporabo kombiniranih metod za izboljšanje varnosti hrane (Sofos in sod., 1998; Smid in Gorris, 1999; Tajkarimi in sod., 2010).

Tehnologija visokih hidrostatskih tlakov (ang. High Hydrostatic Pressure ali HHP) predstavlja zanimivo alternativo toplotni obdelavi hrane. Uporaba visokih hidrostatskih tlakov povzroči inaktivacijo različnih mikroorganizmov in encimov. Ob številnih prednostih te tehnologije pa obstajajo tudi pomanjkljivosti, kot so neželene senzorične spremembe živila. Pri nekaterih občutljivih živilih, kot so sveži siri, pride do spremembe njihove strukture, ki se najpogosteje kaže kot povečano odpuščanje sirotke (Martínez-Rodríguez in sod., 2012; Van Hekken in sod., 2013; Tomasula in sod., 2014).

1.1 CILJI NALOGE

- Pripraviti izvlečke timijana (*Thymus vulgaris*) in njihove različne frakcije na osnovi superkritične tekočinske ekstrakcije (SFE) ter primerjati vpliv različnih parametrov SFE na proces ekstrakcije in lastnosti pridobljenih frakcij timijanovega izvlečka (TE).
- Določiti protimikrobno delovanje (določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) in minimalne baktericidne koncentracije (MBK)) pridobljenih frakcij timijanovega izvlečka na bakterije vrste *L. monocytogenes* v *in vitro* razmerah.
- Uporabiti protimikrobno najučinkovitejšo frakcijo TE glede na zaviranje rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* v modelnem živilu.
- Uporabiti najučinkovitejšo frakcijo TE v kombinaciji z obdelavo živila z visokimi hidrostatskimi tlaki (HHP) in ugotoviti morebitno sinergijsko protimikrobno delovanje na osnovi kombiniranega konzerviranja.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Izvlečki, oziroma njihove frakcije pridobljene pri različnih parametrih SFE bodo imele različen obseg protimikrobnega delovanja na bakterije vrste *L. monocytogenes*.
- Učinek timijanovega izvlečka na zaviranje rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* bo v modelnem živilu drugačen kot v mikrobiološkem mediju.
- Kombinirana uporaba HHP in dodatka TE oz. njegove učinkovite frakcije bo imela sinergijski učinek na inhibicijo bakterij vrste *L. monocytogenes* oz. podaljšano obstojnost živila ter ne bo poslabšala senzoričnih lastnosti živila.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE *L. monocytogenes* IN PROBLEMATIKA HUMANIH LISTERIOZ

Listerije so nesporogene, po Gramu pozitivne bakterije premera 0,5 µm ter dolžine od 1,0 µm do 2,0 µm. So aerobne, mikroaerofilne ali fakultativno anaerobne, s psihrotrofnimi ali mezofilnimi značilnostmi. So katalaza pozitivne in oksidaza negativne. Sposobne so uporabljati glukozo po aerobni in anaerobni poti (Rocourt, 1999).

Optimalne pogoje za rast imajo pri 37 °C, sicer pa rastejo v širokem temperaturnem območju med –1,5 in 45 °C. Sposobne so preživeti tudi zamrzovanje do –38 °C, pri čemer je odpornost na zamrzovanje odvisna od bakterijskega seva (Rocourt, 1999; Lake in sod., 2005).

Idealna vrednost pH za rast bakterij *L. monocytogenes* je 7,0, sposobne pa so razmnoževanja v območju pH od 4,4 do 9,4. Ocetna kislina deluje na rast listerij bolj zaviralno kot jabolčna ali citronska kislina ter nekatere druge anorganske kisline. Listerijam ustrezajo mikroaerofilni pogoji, lahko rastejo aerobno in anaerobno, tudi v vakuumu in prisotnosti dušika ali ogljikovega dioksida (do 30 %). Ob odsotnosti kisika so bakterije *L. monocytogenes* zmožne preživeti koncentracijo do 75 % ogljikovega dioksida (Lake in sod., 2005).

Sposobne so živeti v okolju z nizko vodno aktivnostjo (a_w), kot je a_w 0,90 pri 30 °C ob prisotnosti glicerola in pri a_w 0,92 ob prisotnosti natrijevega klorida in saharoze. Sposobne so rasti ob 10 % koncentraciji kuhinjske soli ali celo 12 % koncentraciji soli ob zadostno visokem pH. Bakterije *L. monocytogenes* lahko dalj časa preživijo tudi v okolju z vodno aktivnostjo, nižjo od 0,9 (Lake in sod., 2005).

Sevi bakterije *L. monocytogenes* pripadajo različnim serotipom, ki jih določa izražanje antigenov na celični površini. Na podlagi tega je bilo določenih več kot 14 tipov bakterije *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4bX, 4c, 4d, 5, 6a, 6b). Za več kot 95 % primerov obolelosti za listeriozo so odgovorni predvsem sevi 1/2a, 1/2b in 4b (Graves in sod., 1999).

Dojenčki, nosečnice, starejši ljudje, alkoholiki, sladkorni bolniki in ljudje s posebnostmi v imunskem odzivu, kot so bolniki z AIDS-om, rakom, so bolj dovzetni za listeriozo (Rocourt, 1999).

Bolezen lahko povzroči septicemijo, meningitis, encefalitis in posledično tudi smrt. Okužba nosečnic lahko pripelje do spontanega splava. Splošna umrljivost zaradi meningitisa, povzročenega z okužbo bakterije *L. monocytogenes*, je lahko 70-odstotna, septicemije 50-odstotna ter pri perinatalni ali neonatalni infekciji tudi do 80-odstotna (Weinsetel, 2006).

2.1.1 Prenos listerioze s hrano

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je bilo nekaj izbruhov listerioze, ki so bili povezani z zaužitjem kontaminiranega sira in sveže zelenjave. Čeprav so bili ti dogodki prvi dokaz za listeriozo, povzročeno z zaužitjem kontaminirane hrane, zgodovina izbruhov bolezni sega daleč v preteklost. V Nemčiji so za izbruhe med letoma 1949 in 1957 sumili bakterijo *L. monocytogenes*, prisotno v surovem mleku, vendar zaradi težav pri izoliranju mikroorganizma niso imeli dokazov, da je bila povzročiteljica omenjenih izbruhov prav bakterija *L. monocytogenes* (Ryser, 1999).

Odmevnejši primeri listerioze v Evropi so se zgodili v Franciji leta 1992, ko je zaradi kontaminirane svinjine zbolelo 179 ljudi, pri čemer je bilo 85 smrtnih izidov. V Italiji je zaradi kontaminirane koruzne solate zbolelo 1500 ljudi. Do okužbe z listeriozo je zaradi prisotnosti bakterij *L. monocytogenes* v pakiranih sendvičih leta 2003 prišlo tudi v Veliki Britaniji (Weinsetel, 2006).

Leta 2010 je bil v Evropi potrjen 1601 primer listerioze, med katerimi se je 17 % okužb končalo s smrtnim izidom. Največ okužb se je pojavilo na Finskem (1,33 obolelega na sto tisoč ljudi), sledili sta Danska in Španija (1,12 obolelega na sto tisoč ljudi) (EFSA, 2012; Coelho in sod., 2014).

Bakterije *L. monocytogenes* so lahko prisotne v vsej surovi hrani, pri čemer so primeri okužb povezani predvsem z uživanjem surovega mleka, sirov, posebno svežih sirov, sladoledov, surove zelenjave, puranjega mesa, hrenovk in hladno dimljenih rib (Weinsetel, 2006).

Prenos bakterij *L. monocytogenes* s hrano je močno povečalo hlajenje hrane z namenom podaljšanja roka njene uporabnosti. Nizka temperatura znatno upočasni rast večine organizmov, kar pa ne velja za bakterije *L. monocytogenes*, saj se te lahko uspešno razmnožujejo tudi pri temperaturi hladilnika. Drugi dejavnik, ki prispeva k povečani obolevnosti za listeriozo, je sprememba v demografski sestavi razvitih in visoko razvitih držav, to je povečanje števila ostarelih in ljudi z oslabljenim imunskim sistemom. V sodobni družbi se spreminja tudi način prehranjevanja. Poraba že pripravljene hrane raste iz leta v leto, zaradi česar se povečuje tudi možnost okužbe z *L. monocytogenes* (Weinsetel, 2006).

Evropska direktiva (Council Directive 92/46/EEC, 1992), ki podaja mikrobiološke kriterije na področju pridelave in predelave živil, določa ničelno toleranco za bakterije *L. monocytogenes* v 25 g živila, v živilih, ki omogočajo njeno rast. V živilih, kjer se listerije ne morejo razmnoževati, pa velja, da mora biti v gramu živila manj kot 100 CFU bakterij *L. monocytogenes*.

2.1.2 Pojavnost bakterij *L. monocytogenes* v siru

Preživetje in rast bakterij *L. monocytogenes* v sirih je odvisna od številnih notranjih dejavnikov, kot so pH sira, vodna aktivnost, uporaba konzervansov in starterskih kultur. Zunanji dejavniki vključujejo čas in temperaturo morebitnega zorenja sirov, vlažnost zraka v zorilnici ali skladišču in uporabo pasteriziranega ali surovega mleka. Če vzamemo v obzir, da varnostni standardi za proizvodnjo svežih sirov zahtevajo uporabo izključno pasteriziranega mleka, do njihove kontaminacije pride predvsem iz okolja po že opravljenem postopku pasterizacije. Zaradi razširjenosti bakterij *L. monocytogenes* v okolju lahko pride do navzkrižne kontaminacije kadarkoli po pasterizaciji, denimo pri prodaji ali rokovanju končnega potrošnika, zato je pravilna pasterizacija in pravilno rokovanje s sirom ključnega pomena za preprečitev kontaminacij (Lake in sod., 2005; de Carvalho in sod., 2015).

2.2 TEHNOLOGIJA VISOKIH HIDROSTATSKIH TLAKOV (HHP)

Za nadzor bakterij *L. monocytogenes* v hrani se v živilski industriji uveljavlja tudi uporaba tehnologije visokih hidrostatskih tlakov (HPP), ki predstavlja zanimivo alternativo toplotni obdelavi hrane. Tehnologija HHP pride v poštev tudi pri proizvodnji pakirane hrane. Tako lahko podaljšamo obstojnost in izboljšamo mikrobiološko varnost hrane, hkrati pa ohranimo njeno prehransko in senzorično kakovost. (Hugas in sod., 2002).

HHP se uporablja za obdelavo pakirane ali nepakirane hrane v trdnem ali tekočem agregatnem stanju pri tlakih od 100 do 800 MPa. Temperaturo obdelave lahko nastavimo pod temperaturo ledišča za zmanjšanje učinka adiabatnega segrevanja, lahko pa jo nastavimo nad 100 °C za izboljšanje inaktivacije mikroorganizmov, predvsem njihovih spor (FDA, 2014).

V primerjavi s tradicionalno toplotno obdelavo živil tehnologija HHP bolje ohranja barvo, okus in prehransko vrednost hrane. HHP lahko vpliva le na strukturo molekul večjih molekulskih mas, kot so proteini in ogljikovi hidrati. Majhne molekule, kot so aromatične spojine, pigmenti in ostale senzorično pomembne molekule, ostanejo nepoškodovane. Kemijske spremembe, povzročene zaradi HHP, so minimalne, saj HHP nima učinka na kovalentne vezi v hrani, zato hrana, izpostavljena visokemu tlaku blizu sobne temperature, ni izpostavljena kemijskim spremembam. Te so odvisne predvsem od razmerja med temperaturo in časom obdelave. Tehnologija HHP zmanjšuje tudi potrebo po dodatkih za ohranjanje varnosti in podaljševanje uporabnosti živil (Hugas in sod., 2002; Mújica-Paz in sod., 2011).

Prednost uporabe HHP je tudi ta, da se tlak enakomerno razporedi po celotnem živilu ne glede na velikost, obliko ali sestavo živila. Tlak zaradi adiabatnega segrevanja skozi postopek HHP lahko dvigne temperaturo za približno 3 °C na 100 MPa, odvisno od sestave hrane. Če ta vsebuje velik delež maščob, bo povišanje temperature večje. Hrana se nato

ohladi na prvotno temperaturo skozi postopek zniževanja tlaka ob predpostavki, da ni prišlo do prenosa toplote skozi stene tlačnega cilindra med samim postopkom HHP (Rasanayagam in sod., 2003).

Dvig temperature med obdelavo živila s HHP nad sobno temperaturo pospeši uničenje mikroorganizmov. Temperature od 45 do 50 °C se uporabljajo proti večini patogenih organizmov in kvarljivcev, temperature od 90 do 100 °C v kombinaciji s tlaki od 500 do 700 MPa pa za inaktivacijo sporogenih bakterij, kot je *Clostridium botulinum* (Patterson, 2005; FDA, 2014).

Izpostavljenost živila visokim hidrostatskim tlakom lahko pripelje do možnih sprememb v izgledu živila, pri čemer se možnost za pojav sprememb povečuje s časom in jakostjo uporabljenih hidrostatskih tlakov. Za spremembe, povzročene zaradi HHP, je najbolj dovzetna surova hrana z veliko vsebnostjo proteinov, saj lahko visok tlak povzroči njihovo denaturacijo. Poškodbe celičnih sten in celične membrane se lahko pokažejo kot zmehčanje in odpuščanje vode ali seruma. Navadno so omenjene spremembe neželene, saj takšna hrana izgubi lastnosti sveže, neobdelane hrane. Danes se HHP že komercialno uporablja za obdelavo številnih živilskih izdelkov, kot so marmelade, sadni sokovi, solatni preliv, šunke in drugi mesni ali ribji izdelki ter morski sadeži (FDA, 2014).

2.2.1 Protimikrobna učinkovitost HHP in njegovi mehanizmi delovanja

Učinkovitost HHP na zaviranje rasti mikroorganizmov v hrani je odvisna od številnih tehnoloških dejavnikov, kot so tlak, čas in temperatura obdelave živila. Protimikrobna učinkovitost HHP je odvisna tudi od lastnosti živil, ki jih obdelamo, največkrat od pH, a_w ter uporabe različnih prehranskih dodatkov, kot so sladkorji, soli in emulgatorji. HHP v kombinaciji z nižjim pH ali višjo vodno aktivnostjo deluje sinergijsko na inhibicijo bakterij, dodatki, kot so glicerol, maščobe in številne vrste sladkorjev, pa ščitijo bakterije pred HHP, saj delujejo kot zaščitni koloidi okrog bakterijske celice (Jordan in sod., 2001; Patterson, 2005; Abe 2007; Martínez-Rodríguez in sod., 2012).

Visok hidrostatski tlak deluje zaviralno na rast bakterijskih celic na podlagi različnih mehanizmov. Razvrščamo jih v tlačno povzročene celične spremembe, biokemične ali metabolne spremembe in spremembe genetskega materiala. Celična struktura in rast celic ob izpostavitvi visokemu tlaku se dokazano spreminjata. Čeprav se inhibicija večine mikroorganizmov dogaja pri tlakih, višjih od 200 MPa, so bakterije pri nižjih tlakih bolj dovzete za ostale okoljske dejavnike, kot so pH, a_w ali prisotnost protimikrobnih učinkovin (Abe, 2007).

Primerjava literature kaže, da so na HHP prokarionti odpornejši od evkariontov, grampozitivne bakterije odpornejše od gramnegativnih, koki odpornejši od bacilov in spore odpornejše od vegetativnih celic. Spore so lahko odporne tudi na tlak, večji od 1000 MPa, zato za uničenje spor postopek HHP poteka pri približno 100 °C (Patterson, 2005).

Preglednica 1: Inaktivacija celičnih funkcij mikroorganizmov v odvisnosti od jakosti tlaka (Abe, 2007).

Proces/Celična funkcija	Tlak za povzročitev inhibicije (MPa <)
Giblјivost	10
Delitev celice	20
Privzemanje hranil	15–20
Alkoholna fermentacija	25–50
Delovanje membranskih proteinov	25–50
Replikacija DNK	50
Transkripcija DNK	50–100
Sinteza proteinov	50
Encimska aktivnost	100
Delovanje znotrajceličnih proteinov	50–100
Tvorba proteinske strukture (monomer)	200
Tvorba DNK strukture (dvojni heliks)	1000

2.2.1.1 Vpliv HHP na celično membrano

Celična membrana bakterij je ena izmed najpogostejših tarč delovanja HHP. Osnovna funkcija membrane je vzdrževanje celične sestave, uravnavanje koncentracije snovi in ionov znotraj ter zunaj celice. Povečanje tlaka v okolju celice za 200 MPa povzroči povečano prepustnost membrane, ki vodi v izgubo membranske funkcije ter spremembe v celični sestavi in lastnostih celice (Abe, 2007).

Tlak lahko povzroči denaturacijo proteinov celične membrane, povzroči pa lahko tudi mešanje faz fosfolipidnega dvosloja. Z elektronskim mikroskopom lahko opazimo, da HHP povzroči številne spremembe v strukturi bakterijskih celic, kot je npr. nastanek kanalčkov v celični membrani. Mikroorganizmi z več večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami v celični membrani so praviloma odpornejši na HHP zaradi bolj tekoče membrane (Bartlett, 2002).

2.2.1.2 Vpliv HHP na proteine

Poleg denaturacije membranskih proteinov lahko pride tudi do denaturacije encimskih mest na membrani. Tlak pri 50 MPa lahko zmanjša aktivnost ribosomov, kar vodi do zmanjšane sinteze proteinov. Tlak 100 MPa lahko povzroči delno denaturacijo proteinov, povečanje tlaka do 300 MPa pa povzroči ireverzibilno denaturacijo encimov in proteinov. Sprememba strukture proteinov vodi v njihovo inaktivacijo ali zmanjšanje metabolne aktivnosti mikroorganizmov (Abe, 2007).

Vpliv HHP na proteine je povezan s pretrganjem nekovalentnih vezi v molekulah proteinov. HHP lahko spremeni sekundarno, terciarno ali kvartarno strukturo proteina. Primarna struktura proteinov je sestavljena iz kovalentnih vezi aminokislin, zaradi česar osnovna kemijska struktura proteinov ostane nedotaknjena. Sekundarna struktura proteinov

je sestavljena iz peptidnih verig, ki so med seboj povezane z vodikovimi vezmi. Te se pretrgajo ob tlakih, višjih od 700 MPa. Spremembe sekundarne proteinske strukture so ireverzibilne. Povezave med peptidnimi verigami in kovalentnimi vezmi aminokislin dajejo proteinom terciarno strukturo. Za pretrganje teh vezi zadostuje tlak, višji od 200 MPa. Kvartarno strukturo proteina tvorijo hidrofobne interakcije med različnimi deli molekul proteinov in so najbolj izpostavljene vplivu visokega tlaka. Te spremembe se začnejo dogajati že pri tlakih, višjih od 50 MPa (Huang in sod., 2014).

Encimska inaktivacija proteinov s HHP je odvisna tudi od vrednosti pH, pri čemer so encimi različno občutljivi na svojo denaturacijo. Predpostavljeno je, da encimi igrajo ključno vlogo pri inhibiciji mikroorganizmov (Mújica-Paz in sod., 2011). Študije so pokazale, da HHP moti tudi tvorbo ATP, saj inaktivira ATPaze, podobno je tudi z inaktivacijo proteinov protonskih črpalk, ki vodi v porušenje ravnotežja pH znotraj celice. Vrednost pH v bakterijski celici se pri 50 MPa lahko zniža od 0,3 do 0,5 (Tholozan in sod., 2000; Abe, 2007).

Visok tlak lahko vpliva tudi na pH samega medija. Vrednost pH se lahko ob dvigu tlaka zniža za 0,2. Smer in obseg spremembe pH se razlikujeta glede na vrsto in kemijsko sestavo živila, izpostavljenega tlačnim spremembam (FDA, 2014).

2.2.1.3 Vpliv HHP na DNK

HHP vpliva tudi na delovanje in izražanje genetskega materiala mikroorganizmov, npr. na replikacijo in transkripcijo genov. Tlak povzroči zgostitev in transformacijo kromosomske DNK. Študije so pokazale, da imajo nekateri mikroorganizmi, tudi bakterije *L. monocytogenes*, regulatorne gene za prilagoditev stresnim razmeram. Običajna genska regulacija za stresno odpornost vključuje kopičenje proteinov toplotnega šoka v celici z namenom povečanja odpornosti na stresne dejavnike iz okolja (Bartlett, 2002).

2.2.1.4 Vpliv okoljskih dejavnikov na protimikrobno učinkovitost HHP

Po principu ovir (ang. Hurdle technology) oziroma kombiniranega učinka različnih postopkov deluje HHP vzajemno z ostalimi dejavniki, ki vplivajo na preživelost bakterij. Kombinacija neugodnih dejavnikov lahko na inhibicijo bakterij deluje sinergijsko, kar pomeni, da je skupni učinek dejavnikov, ki vplivajo na inhibicijo bakterij, večji od vsote učinkov posameznih dejavnikov. HHP deluje na inhibicijo bakterij vzajemno s temperaturo izven optimalnega območja rasti bakterij, nizkim pH ter spremembami vodne aktivnosti rastnega medija ali živila (Huang in sod., 2014).

HHP se lahko uporablja tudi v kombinaciji s protimikrobnimi snovmi, ki dodatno ali sinergijsko vplivajo na inhibicijo rasti mikroorganizmov. Karatzas in sod. (2000) ter Espina in sod. (2013) so opazili sinergijski protimikrobni učinek kombinirane uporabe HHP in karvakrola na bakterije *L. monocytogenes* v posnetem mleku in sadnem soku.

2.2.1.5 Uporaba HHP v proizvodnji sira

V proizvodnji sira se tehnologija HHP uporablja predvsem za obdelavo mleka in sira z namenom inaktivacije mikroorganizmov, zmanjšanja časa in povečanja izkoristka sirjenja (Martínez-Rodríguez in sod., 2012).

Novejše raziskave so pokazale učinkovito uporabo HHP na skuti in zorjenem siru. Tlaki med 200 in 800 MPa so pokazali sposobnost inaktivacije mlečnokislinskih bakterij, kvarljivcev in patogenih organizmov ter celo njihovih spor, prisotnih v siru. Učinek HHP je na proces zorenja različnih sirov prinesel različne rezultate, ki so se kazali predvsem v spremembi fizikalnih, kemijskih in senzoričnih lastnosti sirov. HHP vpliva tudi na čas zorenja sira (Huang in sod., 2014).

2.2.1.6 Vpliv matriksa, pH in a_w na učinek HHP

Sir je sestavljen iz proteinov, maščob, ogljikovih hidratov, soli in mineralov. Sestavine sira različno vplivajo na občutljivost mikroorganizmov, saj se omenjene sestavine sira obnašajo kot zaščitni koloidi okrog bakterijskih celic, ki vzdržujejo njihovo celično membrano skozi postopek HHP v bolj tekočem stanju in posledično povečajo odpornost na spremembe, povzročene z visokimi tlaki (Smelt, 1998).

Pri odpornosti na visokotlačne spremembe igrata vodna aktivnost in pH pomembno vlogo. V okolju, kjer je vodna aktivnost nizka, se zaradi zmanjšane prepustnosti celične membrane poveča preživelost mikroorganizmov, po drugi strani pa so poškodovane bakterijske celice zaradi izpostavljenosti HHP bolj občutljive na nizko vodno aktivnost, saj zaradi porušanja osmotskega ravnovesja prihaja do večjih izgub celične vsebine v okolje. Bakterije so občutljive tudi na nizek pH med in po postopku obdelave živila s HHP. Nizek pH ne le poveča inaktivacije bakterij med samim postopkom HHP, temveč tudi prepreči obnovo poškodovanih bakterijskih celic (Smelt, 1998).

Carminati in sod. (2004) so določali učinkovitost postopka HHP pri 30 °C v časovnem okviru od 1 do 15 minut ter tlaku od 400 do 700 MPa za inaktivacijo sedmih hemolitičnih sevov bakterij *L. monocytogenes* serotipa 1/2a v skorji Gorgonzole. V omenjeni raziskavi so znanstveniki poročali o veliki odpornosti bakterij *L. monocytogenes* na tlačne spremembe tudi pri tlaku 500 MPa. Za zmanjšanje bakterijske rasti za 5 log so morali bakterije izpostaviti tlaku 700 MPa za 15 minut, po drugi strani pa je Gallot-Lavallee (1998) zabeležil zmanjšanje preživelosti bakterij *L. monocytogenes* F13 v siru Sainte Maure de Touraine za 5,6 log, ko je bil ta za 10 minut izpostavljen tlaku 450 MPa oziroma za 5 minut tlaku 500 MPa pri 11 °C.

Razlika v pH in a_w bi lahko prispevala k odstopanju rezultatov obeh študij, saj sta bila postopka HHP medsebojno primerljiva. Nižji pH sira Sainte Maure de Touraine (4,7) v primerjavi s pH skorje pri siru Gorgonzola (7,0) in višja vodna aktivnost slednjega, se

odraža v razliki zaviralnega učinka na rast bakterij *L. monocytogenes* v obeh sirih. HHP povzroči povečano zaviranje rasti mikroorganizmov v siru z višjo vodno aktivnostjo in nižjim pH (Martínez-Rodríguez in sod., 2012).

Morales in sod. (2006) so preučevali vpliv ogljikovih hidratov in različne vodne aktivnosti v siru na barotolerantne bakterije *L. monocytogenes* Scott A. Kot je bilo pričakovano, se je v siru z višjo vodno aktivnostjo povečala inaktivacija bakterij, ki je znašala 3,8 log pri tlaku 400 MPa ob času 3 min (a_w 0,983) in 1 log pri tlaku 400 MPa ob času 18 min v siru z nižjo vodno aktivnostjo (a_w 0,922). Študija je prav tako pokazala tudi zaščitno vlogo galaktoze pred vplivom visokih tlakov na zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes*.

2.2.1.7 Fizikalne lastnosti sira

Ko je govora o hrani, je ena od glavnih nalog, poleg zagotavljanja varnosti hrane, tudi ohranjanje njene senzorične kakovosti, zato moramo biti pozorni na spremembe, ki jih lahko povzroči uporabljena tehnologija predelave hrane. V nekaterih vrstah sira, kot je sveži sir, lahko uporaba visokih temperatur (višjih od 40 °C) povzroči odpuščanje sirotke in senzorično nesprejemljivo strukturo sira (Martínez-Rodríguez in sod., 2012).

Saldo in sod. (2001) so opazili podobne spremembe na siru Garrotxa, ko je bil ta izpostavljen tlaku 50 MPa za 72 ur pri 25 °C. Njihovi rezultati so pokazali, da imajo vzorci, izpostavljeni HHP, enako vsebnost vode kot kontrolni vzorci. Sir je le spremenil sposobnost zadrževanja vode. Sir, obdelan s tlakom, je imel 12,7 % proste in 27,6 % vezane vode, medtem ko je imel kontrolni vzorec 18,9 % proste in 21,4 % vezane vode. Opazili so tudi izboljšanje difuzije in boljšo razporeditev soli v obdelanem siru. V primerjavi s kontrolnim vzorcem se je obdelanemu siru spremenila čvrstost. Sir je zaradi oslabiljene kazeinske mreže postal mehkejši. Sirom, izpostavljenim višjim tlakom (400 MPa za 5 min pri 14 °C), se je zmanjšala drobljivost in povečala elastičnost.

2.3 RASTLINSKI IZVLEČKI IN ETERIČNA OLJA

Rastlinski izvlečki in eterična olja so aromatične, oljnate tekočine s številnimi snovmi s protimikrobnim delovanjem. Nekateri imajo širok spekter protimikrobnega delovanja, drugi delujejo le na določene skupine mikroorganizmov, kot so plesni, kvasovke ali bakterije, ali še ožje skupine znotraj omenjenih mikroorganizmov (Bem in sod., 2003).

Mehanizmi protimikrobnega delovanja izvlečkov in eteričnih olj so različni. Večinoma imajo bakteriostatičen učinek, le redko pa v matriksu živila delujejo baktericidno. Rastlina po izpostavitvi stresu nekatere protimikrobne snovi sintetizira konstitutivno, druge inducibilno. Vsebnost protimikrobnih snovi v rastlinskih izvlečkih je v veliki meri odvisna od vrste rastline, rastnih pogojev, metode sušenja, metode izolacije in drugih dejavnikov (Bem in sod., 2003).

Eterična olja so v zdravilstvu uporabljali že v času antike. Uporaba termina eterično olje izhaja iz šestnajstega stoletja, ko je švicarski reformator medicine Paracelsus von Hohenheim poimenoval učinkovino zdravilne rastline Quinta essentia. Uporaba eteričnih olj se je v Evropi razširila v sedemnajstem stoletju. Farmacevti so takrat imeli na svojih policah že običajno med 15 in 20 različnih eteričnih olj. Danes poznamo več kot 3000 eteričnih olj, med katerimi se jih približno 300 uporablja v komercialne namene v proizvodnji parfumov, arom in farmacevtskih izdelkov. Zaradi sodobnih trendov in porasta "zelenih" tehnologij, protimikrobne in antioksidativne lastnosti rastlinskih učinkovin uporabljamo tudi za podaljšanje obstojnosti različnih živil (Burt, 2004).

2.3.1 Pridobivanje izvlečkov in eteričnih olj

Eterična olja pridobivamo z različnimi postopki destilacije. Destilacija je metoda ločevanja snovi, ki so jo razvil na vzhodu (Egipt, Indija, Perzija) pred več kot 2000 leti. Postopek destilacije so nato v devetem stoletju izboljšali Arabci. Metodo pridobivanja eteričnih olj je med prvimi opisal fizik iz Katalonije, Villanova (1235–1311) (Burt, 2004).

Rastlinske izvlečke pridobivamo z metodami ekstrakcije, pri katerih uporabljamo različna topila. Danes se najpogosteje uporabljajo ekstrakcija po Soxhletu, tekočinska ekstrakcija in superkritična tekočinska ekstrakcija. Prednost slednje je hitrejši postopek ekstrakcije in uporaba zdravju neškodljivih topil. Tako pridobljeni izvlečki so bolj koncentrirani, prav tako se izognemo tudi težavi odstranjevanja topil (da Silva in sod., 2016). Zaradi omenjenih prednosti smo za pridobitev timijanovih izvlečkov uporabili superkritično tekočinsko ekstrakcijo z ogljikovim dioksidom.

2.3.2 Superkritična tekočinska ekstrakcija (SFE)

SFE je nova oblika ekstrakcije, s katero lahko iz različnega rastlinskega materiala ekstrahiramo zelene snovi brez njihove toplotne degradacije in ostankov topil. SFE deluje na principu metode ekstrakcije po Soxhletu, le da namesto organskega topila uporabljamo topila, kot je ogljikov dioksid v njegovi superkritični obliki. Superkritične tekočine imajo zaradi svoje pretočnosti lastnosti kapljev, s prostornino, ki jo zavzamejo, pa lastnosti plinov. SFE z ogljikovim dioksidom navadno poteka v območju med 20 in 40 °C. Visok tlak v sistemu zagotavlja, da je ogljikov dioksid v času ekstrakcije prisoten v obliki superkritične tekočine, ki prodira skozi rastlinski material in s seboj odnaša nopolarne snovi (Reverchon in De Marco, 2016).

Ogljikov dioksid v superkritični obliki je nopolarno topilo, v katerem se topijo nopolarne snovi, ki pridejo v stik z njim. Ob znižanju tlaka v separatorjih ogljikov dioksid izgubi superkritične lastnosti, zato se začnejo v njem raztopljene snovi izločati v obliki izvlečka. Pomembna prednost ekstrakcije SFE je tudi ta, da lahko kontroliramo tlak v vsakem separatorju posebej, kar pripelje do ločevanja različnih frakcij izvlečka z različno kemijsko

sestavo. Na ta način ločimo različne skupine spojin, kar vpliva na protimikrobni učinek pridobljenih frakcij izvlečka (da Silva in sod., 2016; Reverchon in De Marco, 2016).

Ekstrakcija SFE se danes uporablja na številnih področjih živilske industrije, npr. ekstrakcija izvlečka hmelja za pivovarsko industrijo, ekstrakcija izvlečkov v industriji arom ali odstranjevanje kofeina iz kavnih zrn za pripravo brezkofeinske kave. V primerjavi z ostalimi ekstrakcijskimi tehnikami s tehnologijo SFE pridobimo izvlečke z bolj naravnim organoleptičnim profilom, ekstrahira pa se tudi manj nearomatičnih snovi, kot so različni rastlinski voski in njihovi estri (Burt, 2004; Reverchon in De Marco, 2016).

2.3.3 Protimikrobne učinkovine izvlečkov in njihovo delovanje

Rastlinski izvlečki so lahko sestavljeni iz več kot 60 glavnih spojin, ki so skupno zastopane v več kot 85 odstotkih, ostale pa so prisotne v sledovih. Glede na to, da so izvlečki sestavljeni iz številnih protimikrobno učinkovitih spojin, njihova aktivnost ne izhaja le iz enega specifičnega mehanizma, temveč iz več različnih mehanizmov na več tarčnih mestih mikrobne celice. Nekateri mehanizmi protimikrobnega delovanja sami po sebi ne delujejo tarčno na inhibicijo mikroorganizmov, temveč sinergijsko sodelujejo z ostalimi mehanizmi inhibicije. Pomembna lastnost rastlinskih izvlečkov je njihova hidrofobnost, ki omogoča, da se izvlečki raztopijo v lipidih celične in mitohondrijske membrane in tako vplivajo na njeno prepustnost (Burt, 2004).

Rastlinski izvlečki izražajo svoje protimikrobno delovanje na podlagi različnih mehanizmov, kot je poškodba fosfolipidnega dvosloja celične membrane, inaktivacija encimov, kar vodi v porušenje encimskega sistema, deformacija nukleinskih kislin in posledično moteno delovanje genetskega materiala bakterije, tvorba maščobnokislinske hidroperoksidaze, ki nastane z oksidacijo nenasičenih maščobnih kislin ter ostalih biokemijskih in metabolnih funkcij, kot je tvorba kislin in drugih metabolitov (Bem in sod., 2003).

2.3.3.1 Fenolne spojine

Prisotnost hidroksilne skupine fenolnih spojin in njihova ciklična struktura igrata ključno vlogo pri izražanju protimikrobnih lastnosti teh spojin. Fenoli motijo funkcijo citoplazemske membrane, izmenjavo ionov in aktivni transport. Citoplazemska membrana ima funkcijo pregrade, ki zagotavlja selektivno prepustnost snovi med notranjim in zunanjim okoljem celice. Fenolne spojine lahko poškodujejo citoplazemsko membrano in posledično povzročijo izgubo celične vsebine, reagirajo pa lahko tudi z membranskimi proteini, kar pripelje do njihove deformacije in posledično do njihove inaktivacije. Aktivnost delovanja protimikrobnih snovi je odvisna tudi od njihove koncentracije. Pri manjših koncentracijah fenoli zmanjšujejo aktivnost encimov, povezanih s proizvodnjo energije, v večjih koncentracijah pa povzročijo denaturacijo proteinov (Cowan, 1999; Ultee in sod., 2002).

Fenoli ob stiku z nukleofilnimi aminokislinami v proteinih tvorijo ireverzibilne komplekse, ki vodijo do inaktivacije proteinov in izgube njihove funkcije. Najpogostejše fenoli tvorijo komplekse z α - in β -tubulini, ki se nahajajo na flagelu bakterije *L. monocytogenes*. Podoben učinek imajo tudi tanini (Cowan, 1999).

2.3.3.2 Karvakrol in timol

Karvakrol in timol sta sestavini timijana, ki jima znanstveniki posvečajo največ pozornosti. Timol je strukturno zelo podoben karvakrolu. Njegova hidroksilna skupina se nahaja na drugem mestu na fenolnem obroču. Tako karvakrol kot timol sta odgovorna za povzročitev protonskih por v citoplazemski membrani, kar vodi do neselektivne prepustnosti membrane in kasneje do celične smrti (Ultee in sod., 2002).

Študije z bakterijo *Bacillus cereus* so pokazale, da se karvakrol topi v fosfolipidnem dvosloju, kjer se vrine med verige maščobnih kislin. Membrana tako postane manj stabilna, bolj tekoča, se bolj razteza, zato postane tudi bolj prepustna. Karvakrol prav tako vpliva na zmanjšano sintezo ATP znotraj celične membrane, kar pripelje do zmanjšanega protonskega gradienta celice (Ultee in sod., 2002).

Juven in sod. (1994) so ugotovili, da se lahko timol s pomočjo vodikovih vezi poveže z membranskimi proteini in tako spremeni prepustnost membrane. Timol kaže boljše protimikrobne lastnosti pri nižjem pH, saj se molekule timola v takšnih pogojih nahajajo v nedisociirani, bolj hidrofolbni obliki, ki se kot taka lažje poveže s hidrofolbnimi deli proteinov in se bolj raztopi v lipidni fazi.

2.3.3.3 p-cimen

p-cimen je prekurzor karvakrola, ki je velikokrat prisoten v izvlečku timijana. Je hidrofolbna molekula, ki povzroča spremembo lastnosti citoplazemske membrane. Nekateri viri navajajo, da p-cimer samostojno protimikrobno ni aktiven, v kombinaciji s karvakrolom pa pride do sinergijskega protimikrobnega učinka, saj se protimikrobna mehanizma enega in drugega medsebojno dopolnjujeta. p-cimen se vgradi v lipidni dvosloj in tvori kanalčke, po katerih karvakrol lažje prehaja v bakterijsko celico (Ultee in sod., 2002).

2.3.3.4 Terpeni

Močna protimikrobna aktivnost rastlinskih izvlečkov na bakterije *L. monocytogenes* je povezana tudi z veliko vsebnostjo monoterpenov. Slednji imajo najboljšo protimikrobno učinkovitost, ko delujejo skupaj z ostalimi snovmi, saj zaradi svojih različnih mehanizmov delovanja sinergijsko vplivajo na zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes* (Lis-Balchin in Deans, 1997).

Terpeni so sekundarni metaboliti, katerih struktura temelji na strukturi izoprena. Njihova kemijska struktura je C₁₀H₁₆, v naravi pa se pojavljajo kot diterpeni, triterpeni, tetraterpeni in tudi kot hemiterpeni (C₅) ter sekviterpeni (C₁₅) (Cowan, 1999).

2.3.3.5 Flavoni, flavonoidi, tanini

Flavoni so fenolne strukture z eno karbonilno skupino. Flavonoidi so prav tako hidroksilirani fenoli, ki se pojavljajo kot C₆-C₃ enote, podobne aromatskemu obroču. Rastline jih sintetizirajo kot odgovor na mikrobo okužbo, zato se jih uporablja kot protimikrobne snovi proti številnim mikroorganizmom (Cowan, 1999).

Tanini so skupina polimernih fenolnih spojin, ki jih lahko najdemo v vseh delih rastline. Delimo jih na hidrolizirane in kondenzirane tanine. Tanini preko svojih nespecifičnih vezi, kot so hidrofbne interakcije ali vodikove vezi, in kovalentnih vezi tvorijo komplekse s proteini in encimi (Cowan, 1999).

2.3.4 Določanje protimikrobne učinkovitosti

Prvi poskus vpliva eteričnih olj na bakterije je že leta 1881 opravil De la Croix, ko je preizkušal protimikrobno učinkovitost hlapov eteričnih olj. Danes se za določanje protimikrobne aktivnosti rastlinskih izvlečkov raziskovalci poslužujejo različnih metod. Če k temu dodamo še ostale dejavnike, ki vplivajo na učinkovitost rastlinskih pripravkov, kot so metoda pridobivanja, vrsta in količina uporabljenega emulgatorja, količina uporabljenega inokuluma, faza rasti uporabljene kulture, lastnosti medija in čas ter temperatura inkubacije, so rezultati različnih študij še težje primerljivi (Burt, 2004).

V naši študiji smo za določanje protimikrobne učinkovitosti timijanovih pripravkov uporabili metodo določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) in minimalne baktericidne koncentracije (MBK), ki sta hkrati tudi najbolj uporabljani metodi. Omenjeni vrednosti smo dobili s pomočjo merjenja absorbance mikrotitrskih plošč.

Protimikrobna učinkovitost rastlinskih izvlečkov je odvisna tudi od uporabljenega medija. V laboratorijskih medijih imajo rastlinski pripravki navadno večjo protimikrobno učinkovitost kot v živilu predvsem zaradi enostavnejše sestave medija (Bem in sod., 2003; Tajkarimi in sod., 2010).

Stereokemija, lipofilnost, vsebnost proteinov, vode, maščob, antioksidantov, konzervansov, čas in temperatura inkubacije imajo pomemben vpliv na učinkovitost protimikrobnih dodatkov (Cowan, 1999).

Smith-Palmer in sod. (2001) so ugotovili, da TE dobro inhibira bakterije *L. monocytogenes* v svežih sirih z normalno in zmanjšano vsebnostjo maščob. TE v koncentraciji 1 % vol/vol v svežem siru z majhno vsebnostjo maščob je v njihovi raziskavi zmanjšal preživelost

bakterij *L. monocytogenes* na manj kot 1 log CFU, v siru z normalno vsebnostjo maščob pa je bil TE manj učinkovit. V omenjeni raziskavi so uporabili TE v rangi koncentracij 1, 0,5 in 0,1 % vol/vol, pri čemer sta le koncentraciji 0,5 in 1 % vol/vol TE v siru delovali zaviralno na rast bakterij *L. monocytogenes*. V predposkusih v bujonu BHI so vse tri koncentracije pokazale protimikrobni učinek na bakterije *L. monocytogenes*. Ugotovili so, da vsebnost maščob negativno vpliva na protimikrobne lastnosti izvlečka timijana.

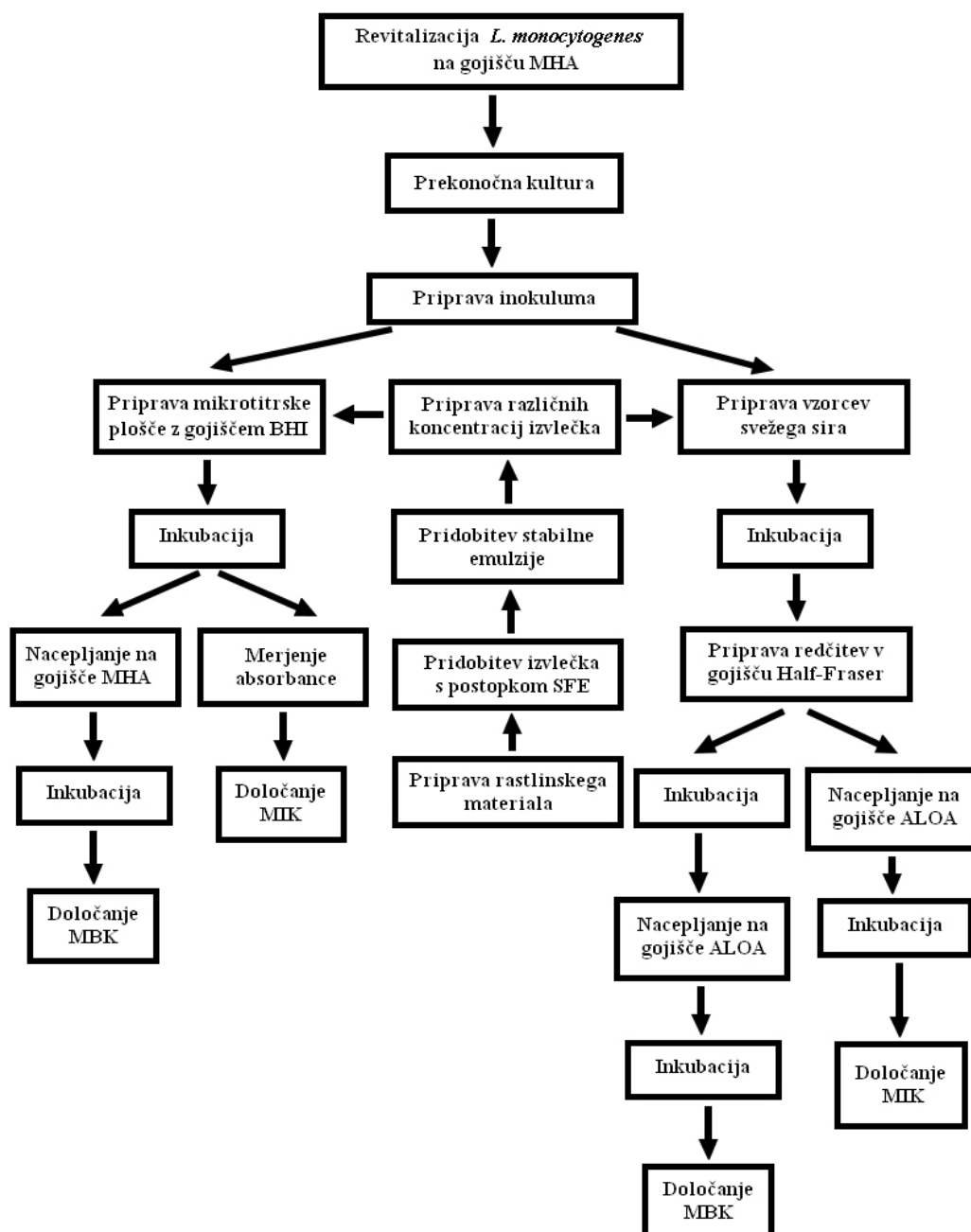
Maščobe, prisotne v hrani, tvorijo plašč okoli bakterijskih celic, ki omogoča, da hidrofbne protimikrobne spojine timijanovega izvlečka lažje prihajajo v stik z bakterijsko celico, po drugi strani pa maščoba v hrani absorbira protimikrobne učinkovine in zmanjša njihovo prisotnost v vodni fazi hrane ter tako omeji vpliv na bakterijske celice (Burt, 2004).

2.3.5 Senzorični učinek rastlinskih izvlečkov

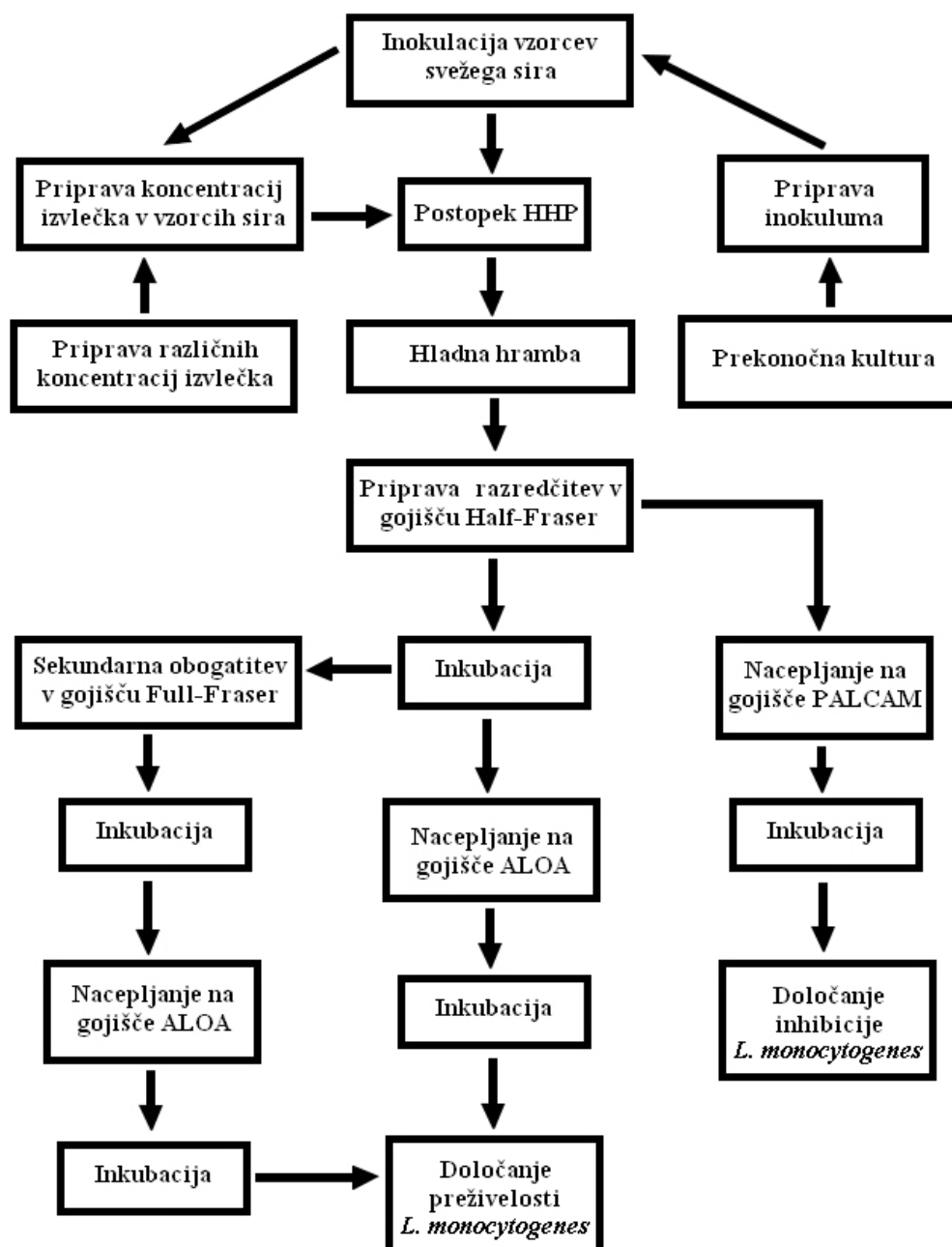
Ko govorimo o dodatkih v hrani, ne smemo pozabiti na njihov senzorični vpliv. Študije so pokazale, da lahko večjo količino rastlinskih izvlečkov dodamo hrani, ki se kasneje toplotno obdela, saj visoka temperatura zmanjša njihovo senzorično zaznavo. V hrani, ki se toplotno ne obdela, je dodatek izvlečkov praviloma manjši in ne sme presegati 1 % vol/vol, saj ima v tako veliki koncentraciji negativen vpliv na organoleptične lastnosti živila (Burt, 2004).

3 MATERIALI IN METODE

Namen našega dela je bil pridobiti različne frakcije izvlečka iz posušenih listov timijana in ugotoviti, kako različni parametri postopka SFE vplivajo na protimikrobno aktivnost TE v mikrobiološkem mediju. Najprimernejšo frakcijo smo uporabili v vzorcih sira, ki smo jih obdelali s HHP, nato pa smo primerjali posamezno in skupno protimikrobno delovanje obeh postopkov. Spodnji shemi prikazujeta potek našega dela.



Slika 1: Procesna shema pridobivanja timijanovega izvlečka in njegove uporabe pri postopku določanja MIK in MBK v mikrobiološkem mediju in svežem siru.



Slika 2: Procesna shema prilave izvlečkov in uporabe postopka HHP ter določanje njune protimikrobne učinkovitosti in preživelosti *L. monocytogenes* v svežem siru.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski material

Izhodiščni rastlinski material so predstavljali nadzemski deli timijana, ki so ga identificirali v herbariju botaničnega vrta v mestu Galați (Romunija) kot *Thymus vulgaris* L. Rastlinski material smo s pomočjo naravne zračne vektacije posušili pri 21 °C in hranili v temnem, zračnem prostoru do nadaljnje uporabe.

3.1.2 Bakterije

Uporabili smo bakterijski sev *Listeria monocytogenes* EGD-e (serotip 1/2a) iz mikrobiološke zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Fakultete za živilsko tehnologijo na univerzi "Dunarea de Jos din Galați" v Romuniji. Kultura je bila shranjena pri -80°C v kriopruvetah v bujonu BHI z dodatkom 20 % vol/vol glicerola.

3.1.3 Mikrobiološka gojišča

3.1.3.1 Selektivna gojišča

- Gojišče ALOA

Pri pripravi gojišča ALOA smo uporabili naslednji sestavini:

- ALOA Confirmation Agar (Biolife, 401606, Italija),
- selektivni dodatek ALOA enrichment selective supplement (Biolife, 423501, Italija).

ALOA agar je selektivno kromogeno gojišče, ki omogoča identifikacijo bakterij *L. monocytogenes* na podlagi treh biokemijskih lastnosti: fosfolipazna aktivnost bakterije se izrazi kot cona okrog nastalih kolonij, β -glukozidazna aktivnost kromogenega substrata se izrazi v modro-zelenem obarvanju kolonij, fermentacija ramnoze, ki je povezana s spremembo pH, pa obarva medij okrog kolonij rumeno.

V naših poskusih smo to gojišče uporabili za ugotavljanje prisotnosti bakterij *L. monocytogenes* pri določanju MBK v vzorcih svežega sira z dodatkom timijanovega izvlečka in vzorcih sira obdelanega s HHP (ISO 11290-1, 2004). Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Po homogenizaciji smo gojišče prelili v petrijevke, katere smo do uporabe hranili v hladilniku (4°C).

- Gojišče PALCAM

Pri pripravi PALCAM agarja smo uporabili naslednji sestavini:

- *Listeria* PALCAM Agar Base (Biolife, 4016042, Italija),
- *Listeria* PALCAM Antimicrobial Supplement (Biolife, 4240042, Italija).

PALCAM agar s selektivnim dodatkom je selektivno gojišče, ki omogoča izolacijo in kvantitativno določanje listerij v hrani. Glukoza in peptoni, prisotni v mediju, omogočajo odlično rast listerij, eskulin glukoza, ki jo listerije hidrolizirajo v β -D-glukozo in eskuletin, pa skupaj z železovimi ioni tvori črne cone okrog zeleno-sivih kolonij listerij.

V naših poskusih smo PALCAM agar uporabili za določitev števila bakterij *L. monocytogenes* v svežem siru (ISO 11290-2, 1998). Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Po homogenizaciji smo gojišče prelili v petrijevke, katere smo do uporabe hranili v hladilniku (4°C).

- Gojišči FRASER in HALF FRASER

Pri pripravi gojišč Fraser in Half Fraser smo uporabili naslednji sestavini:

- FRASER Listeria Selective Enrichment Broth base (Merck, 1.10398.050, Nemčija),
- FRASER Listeria Supplement (Merck, 1.10399.0001, Nemčija).

Gojišče Half Fraser je primarno polselektivno obogatitveno tekoče gojišče, ki smo ga uporabili pri določanju protimikrobne učinkovitosti TE na bakterije vrste *L. monocytogenes* v svežem siru. Gojišče Fraser je sekundarno obogatitveno gojišče, ki smo ga uporabili za določanje preživelosti bakterij *L. monocytogenes* v svežem siru po postopku HHP. Eskulin glukoza, prisotna v gojiščih Half Fraser in Fraser, ki jo listerije hidrolizirajo v β -D-glukozo in eskuletin, skupaj z železovimi ioni tvori črno obarvanje obeh gojišč (ISO 11290-1, 2004).

Gojišči Half Fraser in Fraser smo pripravili v skladu z navodili proizvajalca ter ga do uporabe hranili v steklenih epruvetah.

3.1.3.2 Neselektivna gojišča

- Bujon BHI

Bujon BHI je neselektivno tekoče gojišče. V naših poskusih smo ga uporabili kot medij za pripravo inokuluma in rastni medij za določanje MIK ter MBK (CLSI M07-A4, 2012).

Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Pripravljeno gojišče smo sterilizirali 15 min pri 121 °C, ohladili na približno 45 °C in ga do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

- Gojišče MHA

Gojišče MHA je neselektivno trdno gojišče. Uporabili smo ga za določitev števila bakterij v inokulumu in kot rastni medij za določanje MBK v BHI (CLSI M07-A4, 2012).

Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca. Pripravljeno gojišče smo sterilizirali 15 min pri 121 °C, ohladili na približno 45 °C in prelili v petrijevke, ki smo jih do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.1.4 Kemikalije

- Etanol 96 % (Merck, 1.00971.6025, Nemčija)
- Tween 80 (Roth, 4859.1, Avstrija)
- Rastopina fosfatnega pufra (PBS) 50mM, pH 7
- Destilirana voda
- Glikol

3.1.5 Naprave in pribor

Preglednica 2: Uporabljene naprave in laboratorijski pribor.

NAPRAVE	ZNAMKA	MODEL	POREKLO
Avtoklav	Raypa	AE 75 DRY	Španija
a _w meter	GBX	FA-st lab	Francija
Čitalec MT plošč	Tecan	Infinite 200 Pro	Avstrija
Digestorij	Microflow	Advanced bio safety, class II	Velika Britanija
Gnetilnik	Interscience	Bag-mixer 400	Francija
HHP Sistem	Resato	4 multi-vessel (100mL)	Nizozemska
Inkubator	Memmert	U-10	Nemčija
Laboratorijski sušilnik	Memmert	UL 50	Nemčija
Magnetno mešalo	Heidolph	MR Hei Standard	Nemčija
Palični mešalnik	Philips	HR7625	Kitajska
pH meter	WTW	pH 315i	Avstrija
Pipeta	Eppendorf	Research plus, 100-1000 µL	Nemčija
Pipete	Gilson	Pipetman 1000-5000 µL; 10-100 µL; 2,5-20 µL	Francija
SFE Sistem	Natex	2L/500 MPa	Avstrija
Sonifikator	Sonoplus HD 3200	Bandelin	Češka
Spektrofotometer	GBC Scientific Equipment Ltd.	Cintra 202, Software Cintral	Avstralija
Tehtnica 1	Kern	PCE-PM	Velika Britanija
Tehtnica 2	ADA/L	Laboratory Balance	Velika Britanija
Termostatska kopel	R-Espinar	BAD-4	Španija
Vakuumski pakirnik	Trisa	Fresh&Save, 170 W, 0,6 bar	Italija
Vrtinčnik	IKA	MS3 basic	Nemčija

Poleg naprav, navedenih v preglednici 2, smo uporabili tudi veliko drobnega laboratorijskega pribora, kot so plastične vrečke, sita, ventilator, mikrotitrne plošče, kivete, steklene epruvete, epice, plastične petrijevke, plastične cepilne zanke, steklene bučke, čaše, erlenmajerice, merilni valji, stekleničke, parafilm.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Pridobivanje timijanovega izvlečka (TE)

TE smo pridobili s postopkom SFE, ki smo ga izvedli pri dveh različnih tlačnih režimih z dvema različnima tlačnima nastavitvama dveh separatorjev (separatorja S40 in S45). S tem smo pridobili 4 različne frakcije TE.

3.2.1.1 Priprava rastlinskega materiala

Posušene dele timijana smo najprej ločili od prisotnih primesi, npr. prašnih delcev, ki lahko zamašijo filtre ekstraktorja in posledično pripeljejo do nihanja tlaka med procesom SFE. Uporabili smo sita različnih velikosti, s katerimi smo ločevali različno velike rastlinske delce. V prvem delu ločevanja smo s sitom večje velikosti ločili večje rastlinske delce od delcev srednje velikosti. Večji rastlinski delci so bili rastlinska stebila, vejice in nezdobljeni listi, delci srednje velikosti pa so bili sestavljeni predvsem iz zdrobljenih listov in semen timijana. Po končanem prvem presejanju rastlinskega materiala smo rastlinske delce srednje velikosti ujeli med dvojce sit manjše velikosti, ki smo jih nato preprihovali z ventilatorjem. Na ta način smo odstranili večji del prašnih delcev. Večje delce in delce srednje velikosti smo zdrobili oziroma zmleli v kuhinjskem multipraktiku. Na ta način smo dobili rastlinske delce v velikostnem rangi od 500 do 1000 μm , ki smo jih kasneje uporabili v postopku SFE. Velikost delcev smo določili z velikostjo uporabljenega sita (Fornari in sod., 2012).

3.2.1.2 Merjenje vodne aktivnosti in vsebnosti vode v rastlinskem materialu

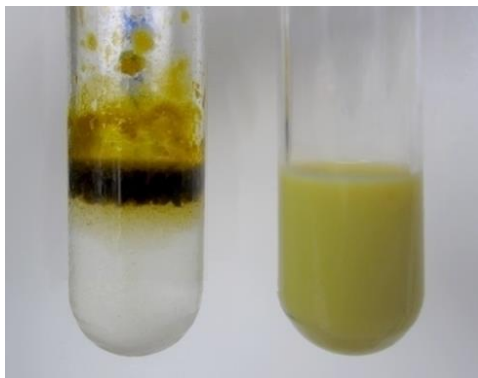
Pred začetkom SFE smo sveže zmletemu rastlinskemu materialu izmerili vodno aktivnost (a_w) in vsebnost vode. Vrednost a_w smo v vzorcu izmerili z merilnikom a_w (GBX, FA-st Lab, Irska), vsebnost vode pa smo izračunali na podlagi razlike v masi odvzetega vzorca in masi vzorca, ki smo ga sušili 2 uri pri 130 °C v laboratorijskem sušilniku (Memmert, UL-50, Nemčija). Razliko v masi obeh vzorcev smo pripisali izgubi vode, ki smo jo kasneje izrazili v masnem deležu (% ut/ut). Vzorec zmletga timijana smo odvzeli tudi po končanem postopku SFE in mu na enak način izmerili a_w ter vsebnost vode dve uri po koncu ekstrakcije. Pred in po vsakem postopku SFE smo izmerili tudi skupno količino zmletga timijana. Razliko v masi rastlinskega materiala pred in po SFE smo povezali z ekstrakcijo TE, izgubo vode in drobnih rastlinskih delcev, ki so se sprostili v okolje med postopkom praznjenja sistema ekstraktorja.

3.2.1.3 Superkritična tekočinska ekstrakcija (SFE)

300–320 g zmletga suhega timijana smo stresli v ekstraktor (C30) kapacitete 2 L. Za boljši pretok CO₂ skozi ekstraktor smo slednjega tako napolnili le do treh četrtin. Prvi del ekstrakcije, ki je bil sestavljen iz treh šarž, smo izvedli pri tlaku 30 MPa. Ekstrakcija posamezne šarže je trajala 4 ure. Tlak v separatorju S40 je bil nastavljen na 10 MPa, v separatorju S45 pa na 5 MPa, obakrat pri temperaturi 40 °C. Nastavitve omenjenih parametrov smo določili s pomočjo diagrama T-s za CO₂, ki nam je omogočal vpogled v spremembe agregatnih stanj CO₂ pri določenem tlačnem in temperaturnem režimu. Namen je bil zagotoviti tlak in temperaturo CO₂ nad njegovo kritično točko, ki zagotavlja, da se CO₂ v sistemu nahaja v obliki superkritične tekočine.

izvlečka. Ob hitrem mešanju vrtinčnika smo dodali 80 μL 96 % etanola in nato še 40 μL stabilizatorja Tween 80. Nato smo v epruveto odpipetirali še 1600 μL PBS. S tem smo pridobili 2 mL suspenzije z 10 % vol/vol TE, 4 % vol/vol etanola in 2 % vol/vol stabilizatorja Tween 80. Tako pripravljena suspenzija je ostala stabilna nekaj ur, za pridobitev daljše stabilnosti pa smo uporabili postopek ultrasonifikacije v hladni kopeli pri 6 °C za 210 sekund.

Ultrasonifikacija je metoda, pri kateri s pomočjo nizkofrekvenčnega valovanja (40 kHz) v tekočini ustvarimo področja z nizkim in visokim tlakom, zaradi česar se velike oljne kapljice razpršijo v manjše, kar poveča homogenost in stabilnost emulzije (Pokeržnik, 2013). Postopek smo izvedli z napravo Bandelin Sonoplus s sonifikacijsko iglo premera 8–9 mm. Tako pripravljena suspenzija je ostala obstojna tudi teden dni.



Slika 4: Razlika med homogenizacijo TE S45300 brez postopka sonifikacije (levo) in homogenizacijo TE S45300 s postopkom sonifikacije (desno).

3.2.3 Določitev MIK v BHI

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najmanjša koncentracija snovi, ki prepreči rast mikroorganizmov v trdnem ali tekočem gojišču. MIK za frakcije TE S45300, S40300, S45400, S40400 smo najprej določili v bujonu BHI po navodilih CLSI M07-A9 (2012).

V 18 epic smo odpipetirali 700 μL bujona BHI. Nato smo po homogenizaciji predhodno pripravljene osnovne suspenzije z vsebnostjo 10 % vol/vol TE, odpipetirali 240 μL suspenzije v prvo epico s 700 μL bujona BHI. Tako smo dobili 940 μL zmesi bujona BHI in suspenzije s koncentracijo 2,56 % vol/vol TE. Po homogenizaciji prve razredčitve smo iz te odvzeli 700 μL in jih dodali v drugo epico s 700 μL bujona BHI ter s tem pridobili njeno dvakratno razredčitev (1,28 % vol/vol TE). S pomočjo nadaljnjih sedmih dvakratnih razredčitev smo pridobili zmes bujona BHI in suspenzije s koncentracijo TE od 2,56 % vol/vol do 0,01 % vol/vol. Po pripravi devetih razredčitev suspenzije TE v bujonu BHI smo zadnjih 8 razredčitev (od 1,28 % vol/vol do 0,01 % vol/vol TE) dodali na mikrotitrsko ploščo s 96 polji. Dodajanje razredčitev na mikrotitrsko ploščo je potekalo tako, da smo iz najmanjše razredčitve (0,01 % vol/vol TE) odvzeli šestkrat po 100 μL in

jih dodali v polja na mikrotitrski plošči (od A3 do A8). Po enakem postopku smo iz naslednje večje razredčitve (0,02 % vol/vol TE) odvzeli šestkrat po 100 μ L ter jih dodali v polja (od B3 do B8). Na ta način smo na mikrotitrsko ploščo dodali še ostalih šest razredčitev in tako na mikrotitrski plošči zapolnili kolone od 3. do 8.

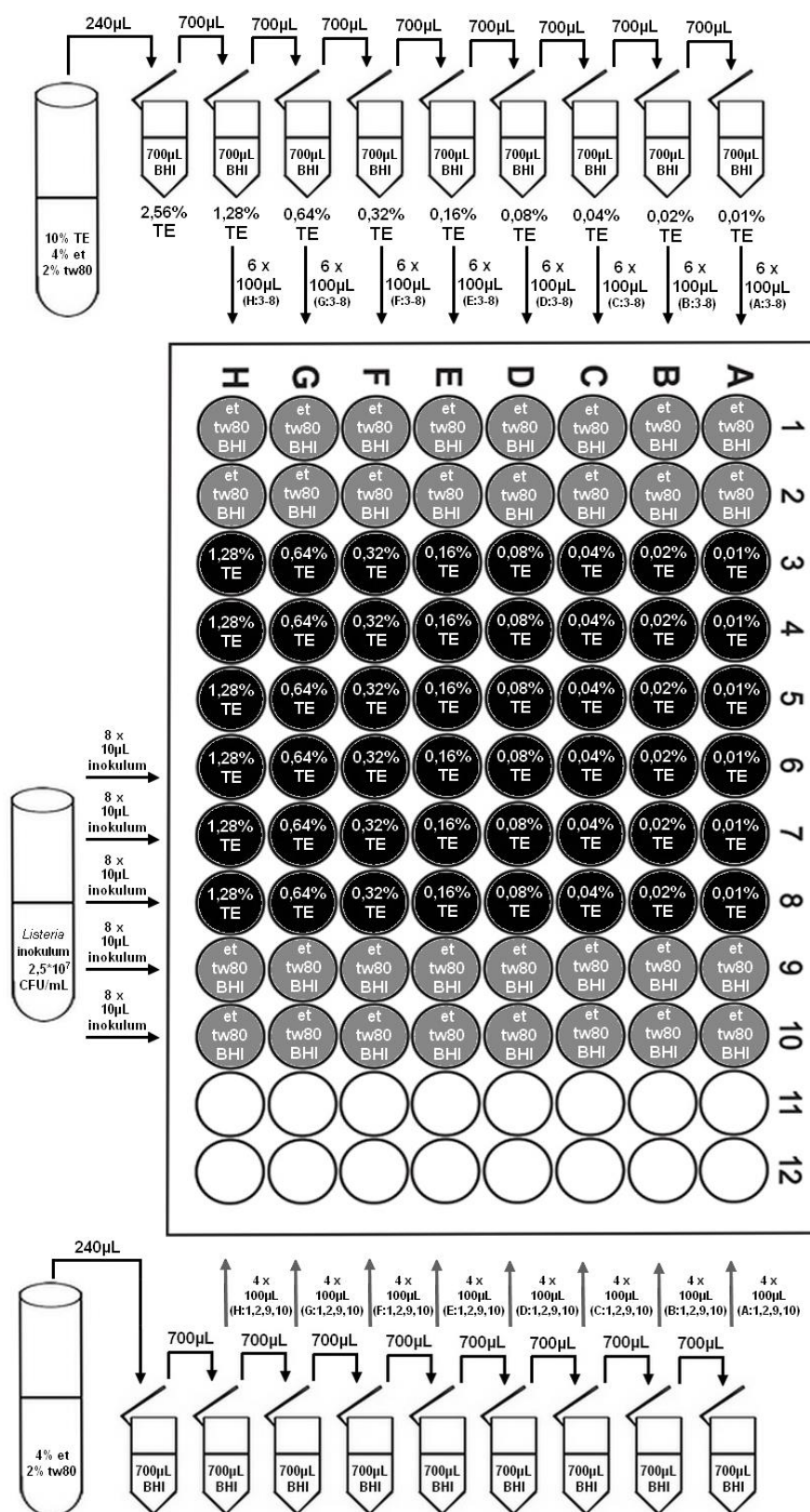
V poskus smo vključili tudi negativno in pozitivno kontrolo. Pripravili smo suspenzijo, ki je vsebovala 4 % vol/vol etanola, 2 % vol/vol stabilizatorja Tween 80, ostalih 94 % vol/vol pa je predstavljal PBS. Iz suspenzije smo pripravili 9 razredčitev v bujonu BHI na enak način kot pri pripravi razredčitve suspenzije z 10 % vol/vol TE. Zadnjih 8 razredčitev smo dodali na mikrotitrsko ploščo tako, da smo s pripravljenimi razredčitvami zapolnili 1., 2., 9. in 10. kolono. Na ta način smo izničili morebiten vpliv topil in stabilizatorjev, uporabljenih pri pripravi suspenzije TE na rast bakterij *L. monocytogenes*.

V naslednjem koraku smo na mikrotitrski plošči od 6. do 10. kolone dodali še 10 μ L predhodno pripravljenega inokuluma s koncentracijo bakterijskih celic $2,5 \cdot 10^7$ CFU/mL. Na ta način smo v vrsticah 6, 7 in 8 dobili tri paralelke vzorcev z enako koncentracijo TE ter inokulumom bakterij *L. monocytogenes*, v kolonah 9 in 10 pa duplikata pozitivnih kontrol. Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo inkubirali pri 37 °C. Po 20-urni inkubaciji pri 37 °C smo mikrotitrski plošči izmerili absorbanco pri valovni dolžini 600 nm na čitalcu mikrotitrskih plošč (Tecan Infinite 200 Pro) in dobljene rezultate primerjali med seboj (CLSI M07-A9, 2012).

3.2.3.1 Priprava inokuluma

Za pripravo inokuluma, ki je bil ključen korak za pravilno izvedbo našega eksperimenta, smo se orientirali po navodilih CLSI M07-A9 (2012). Vzorec zamrznjene bakterijske kulture *L. monocytogenes* smo s cepilno zanko prenesli v stekleno epruveto z 10 mL bujona BHI. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C smo s cepilno zanko prenesli vzorec na petrijevko z gojiščem MHA ki smo ga inkubirali 48 ur pri 37 °C. Petrijevko z gojiščem MHA in kolonijami bakterij *L. monocytogenes* smo nato hranili pri temperaturi 4 °C ter iz nje izolirali posamezne kolonije za nadaljnje priprave inokulumov. Posamezno kolonijo smo prenesli v stekleno epruveto z 10 mL svežega bujona BHI, inkubirali 16–18 ur do zgodnje stacionarne faze rasti celic in tako dosegli koncentracijo $2,5 \cdot 10^9$ CFU/mL. Število celic smo potrdili s serijo 10-kratnih razredčitev.

Vsaki razredčitvi smo predhodno izmerili tudi absorbanco pri valovni dolžini 600 nm. Ugotovili smo, da je najmanjša merljiva razredčitev $2,5 \cdot 10^8$ CFU/mL. Pri tej koncentraciji je absorbanca pri valovni dolžini 600 nm znašala 1,100 ($\pm$ 0,005). Za določitev MIK in MBK v bujonu BHI smo uporabili inokulum s koncentracijo bakterijskih celic $2,5 \cdot 10^7$ CFU/mL. 10 μ L inokuluma smo dodali v polja pripravljene mikrotitrsko plošče, s čimer smo dosegli končno koncentracijo $2 \cdot 10^6$ CFU/mL (CLSI M07-A9, 2012).



Slika 5: Procesna shema pripravljene mikrotitrne plošče za določanje MIK v BHI.

3.2.4 Določitev minimalne baktericidne koncentracije (MBK)

Po 20-urni inkubaciji mikrotitrne plošče pri 37 °C in odčitani absorbanci smo iz kolon od 6 do 8 s pipeto odvzeli po 10 µL vzorca, jih prenesli na plošče s trdnim gojiščem MHA in jih nato inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo preverili, pri kateri koncentraciji bakterije *L. monocytogenes* niso več tvorile kolonij. Koncentracijo TE v vzorcu, pri katerem po 24-urni inkubaciji pri 37 °C do rasti bakterij *L. monocytogenes* ni prišlo ali pa je na MHA zraslo za 99,9 % manj kolonij v primerjavi s pozitivno kontrolo, smo določili kot MBK (CLSI M07-A9, 2012; Santurio in sod., 2014).

3.2.5 Določitev kombiniranega protimikrobnega delovanja HHP in TE v siru

Preučevanje kombinirane uporabe HHP in TE na zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes* je zahtevalo predhodno določitev protimikrobne učinkovitosti TE na bakterije *L. monocytogenes* v svežem siru, pri čemer smo uporabljene koncentracije TE določili na podlagi predhodnih rezultatov določanja MIK posameznih frakcij TE v bujonu BHI, količine pridobljenega TE in senzorične sprejemljivosti sira z dodatkom TE. Sir, ki smo ga uporabili v naših poskusih, je bil sveži kravji sir proizvajalca Pilos.

Preglednica 3: Lastnosti svežega sira, uporabljenega kot modelno živilo.

Ogljikovi hidrati	4 % ut/ut
Proteini	11 % ut/ut
Maščobe (nasičene maščobne kisline)	6,5 % ut/ut (3,5 % ut/ut)
pH	4,64
a _w	0,970 pri 24 °C

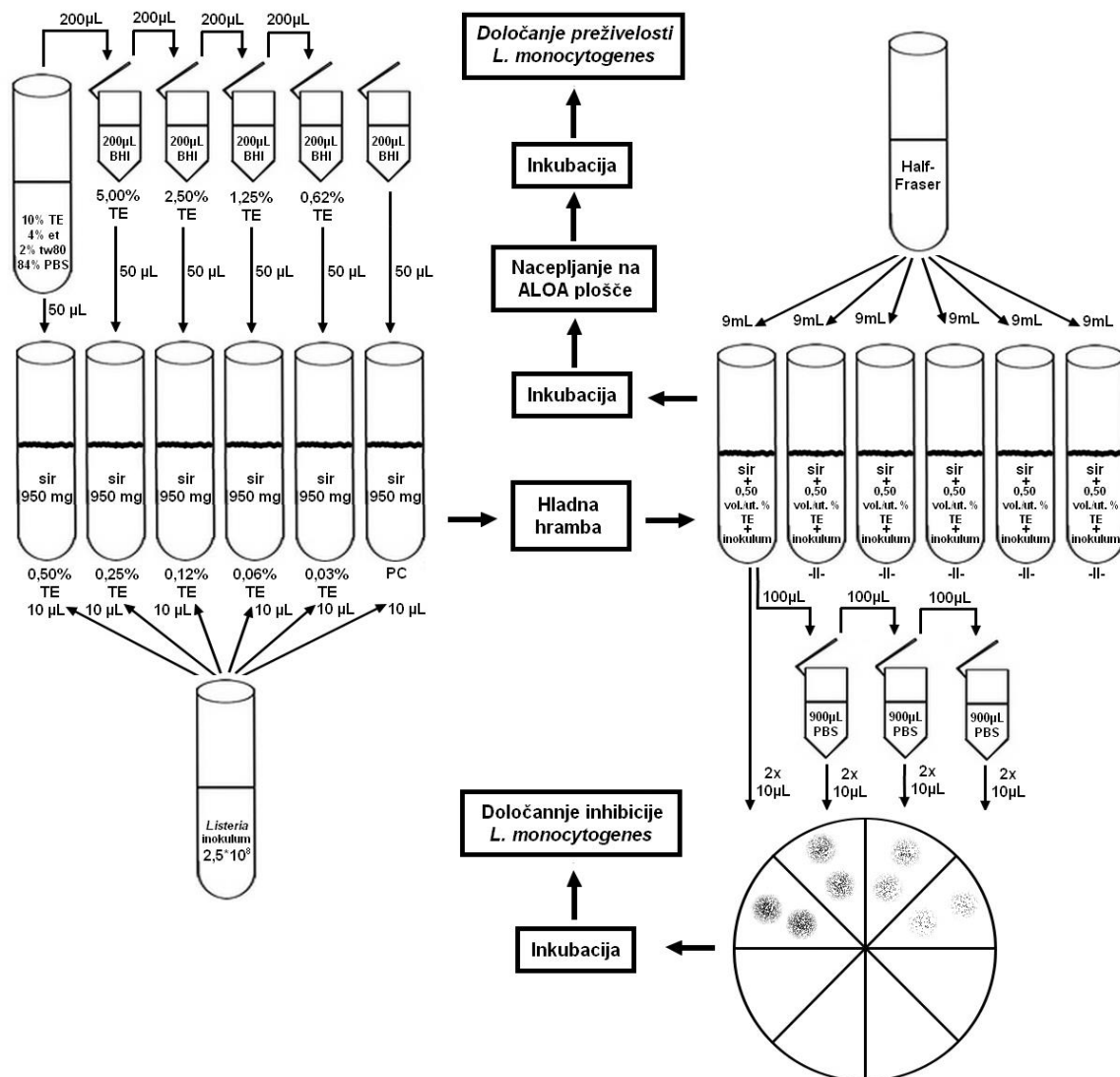
3.2.5.1 Priprava koncentracij

Pri poskusu določitve protimikrobne učinkovitosti vseh štirih frakcij TE na bakterije *L. monocytogenes* v siru smo v 12 steklenih epruvet odtehtali po 950 mg ($\pm$ 15 mg) sira. Nato smo v 4 epice odpipetirali po 200 µL PBS. V prvo smo dodali 200 µL pripravljene suspenzije z 10 % vol/vol TE in tako dobili prvo razredčitev. Po homogenizaciji smo postopek razredčevanja nadaljevali do suspenzije z 0,3 % vol/vol TE. Po pripravi različnih koncentracij TE (5; 2,5; 1,2; 0,6 % vol/vol) smo iz vsake odvzeli dvakrat po 50 µL suspenzije in jo dodali v dva vzorca svežega sira ter tako pridobili paralelki vzorca sira z 20-krat manjšo koncentracijo TE. Dvakrat po 50 µL vzorca smo odvzeli tudi iz osnovne suspenzije z vsebnostjo 10 % vol/vol TE in odvzema na enak način dodali dvema vzorcema ter s tem pridobili 2 paralelki vzorcev sira s koncentracijo 0,5 % vol/ut TE. Po homogenizaciji vzorcev smo tako dobili paralelke vzorcev sira z vsebnostjo od 0,5 do 0,03 % vol/ut TE.

V vse epruvete z vzorci smo dodali še 10 µL predhodno pripravljenega inokuluma bakterij *L. monocytogenes* v stacionarni fazi z vsebnostjo celic $2,5 \cdot 10^9 (\pm 1 \cdot 10^8)$ CFU/mL in tako dosegli, da je bila končna koncentracija bakterij *L. monocytogenes* v vseh vzorcih sira $2,5 \cdot 10^7 (\pm 1 \cdot 10^6)$ CFU/g vzorca. Tako pripravljene vzorce smo 24 ur hranili pri 4 °C in s tem omogočili protimikrobno delovanje TE na bakterije *L. monocytogenes*.

3.2.5.2 Priprava razredčitev

Za pripravo razredčitev smo se orientirali po standardih ISO 6887-1 (1999) in ISO 11290-2 (1998). Po 24-urni hrambi vzorcev pri 4 °C smo vse vzorce sira prelili z 9 mL gojišča Half-Fraser, kar smo v naslednjih korakih upoštevali kot prvo desetkratno razredčitev, katere 100 µL smo prenesli v epico z 900 µL PBS in tako pridobili drugo desetkratno razredčitev. Na enak način smo pridobili še tretjo in četrto desetkratno razredčitev. Trikrat po 10 µL vsake razredčitve smo prenesli na PALCAM agar. Po 48-urni inkubaciji plošč pri 37 °C smo na števnih ploščah prešteli kolonije in izračunali koncentracijo bakterij v vzorcih sira.



Slika 6: Priprava vzorcev sira z različnimi koncentracijami TE in nacepljanje razredčitev vzorca sira z določeno koncentracijo TE (zaradi lažje preglednosti je v shemi predstavljen postopek priprave razredčitev in nacepljanja vzorcev samo ene paralelke).

3.2.6 Preživelost bakterij *L. monocytogenes* v siru z različnimi koncentracijami TE

Preživelost bakterij *L. monocytogenes* v siru z različnimi koncentracijami TE smo določili s klasično analizo prisotnosti bakterij *L. monocytogenes* v vzorcih sira. Po pripravi vseh razredčitev smo prvo razredčitev z 1 g vzorca v 9 mL gojišča Half Fraser inkubirali 24 ur pri 30 °C. Če se po inkubaciji gojišče ni obarvalo črno, smo izvedli še sekundarno obogatitev v gojišču Fraser. Po inkubaciji sekundarne obogatitve smo iz vsakega vzorca odvzeli dvakrat po 10 µL ter jih nanесли na ALOA agar, ki smo ga nato inkubirali 48 ur pri 37 °C. Če po inkubaciji ni bilo vidnih kolonij bakterij *L. monocytogenes*, ta v vzorcu sira ni bila prisotna (ISO 11290-1, 2004).

3.2.7 Določitev kombiniranega protimikrobnega delovanja HHP in TE v siru

Tlaki, ki smo jih uporabili pri postopku HHP, so se gibali med 200 in 300 MPa. Velikostni rang uporabljenih tlakov smo določili v predposkusih, kjer smo vzorce sira s in brez TE za 5 minut izpostavili tlakom 100, 200, 300, 400, 500 in 600 MPa. Koncentracija uporabljenega TE je bila 0,2 % vol/ut, izbrali pa smo jo na podlagi določitve protimikrobne učinkovitosti TE na bakterije *L. monocytogenes* v siru in senzorični sprejemljivosti sira z dodatkom TE.

Poskuse smo izvedli pri naslednjih parametrih:

- tlak 200MPa, čas: 0, 3, 6, 9, 12, 15 minut;
- tlak 225MPa, čas: 0, 2, 4, 6, 8, 10 minut;
- tlak 250MPa, čas: 0, 3, 6, 9, 12, 15 minut;
- tlak 300MPa, čas: 0, 1, 2, 3, 4, 5 minut;

3.2.7.1 Priprava vzorcev

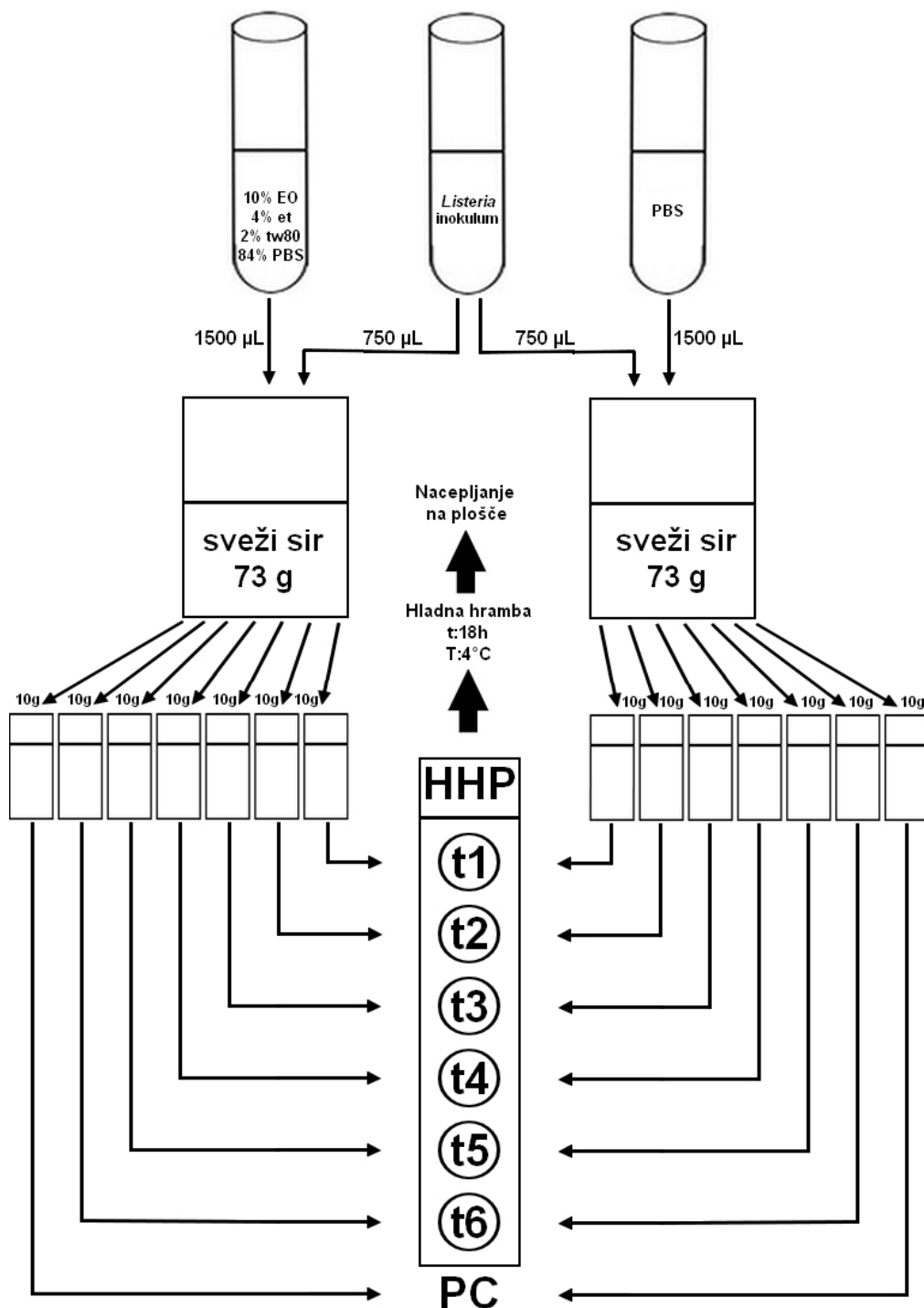
Za vsakega od petih poskusov smo v dve plastični vrečki odtehtali po 73 g ($\pm 0,5$ g) sira. V prvo vrečko smo dodali 1,5 mL začetne suspenzije z vsebnostjo 10 % vol/vol TE in tako dosegli koncentracijo 0,2 % vol/ut TE v vzorcu sira. V drugo vrečko smo dodali 1,5 mL PBS. Po dveh minutah homogenizacije v gnetilniku smo v obe vrečki dodali po 750 μ L predhodno pripravljene suspenzije bakterij *L. monocytogenes* v PBS s koncentracijo celic $2,5 \cdot 10^9$ CFU/mL. Tako smo pridobili vzorce sira s koncentracijo bakterijskih celic $2,5 \cdot 10^7$ CFU/g vzorca. Iz vsake vrečke smo nato odvzeli 7-krat po 10 g ($\pm 0,5$ g) vzorca in odvzeme prepakirali v manjše plastične vrečke. Iz vrečk smo iztisnili zrak in jih zaprli s pomočjo vakuumskega pakirnika.

3.2.7.2 Obdelava vzorcev z visokim tlakom

Iz vzorcev smo nato pripravili 7 parov, pri čemer je bil vsak par sestavljen iz enega vzorca sira s TE in enega vzorca sira brez TE. Vsak par vzorcev je bil izpostavljen enakemu tlaku (primer: 200 MPa) za različen čas (primer: $t_1=0$, $t_2=3$, $t_3=6$, $t_4=9$, $t_5=12$ in $t_6=15$ minut). Sedmi par vzorcev ni bil izpostavljen tlaku in je služil kot pozitivna kontrola. Šest parov vzorcev smo vstavili v visokotlačne komore in vanje do ustreznega nivoja natočili glikol, ki je služil kot medij za prenos tlaka. Po zaprtju vseh komor smo v programu (ABC, Natex) nastavili želen tlak in različen čas postopka HHP za vsako komoro. Po končanem postopku HHP smo vse vzorce hranili 18 ur pri temperaturi 4 °C z namenom, da bi opazili morebitno protimikrobno delovanje TE na bakterije *L. monocytogenes*.

Po 18 urah hrambe vzorcev pri 4 °C smo iz vsake vrečke prenesli dvakrat po 1 g ($\pm 0,05$ g) vzorca sira v stekleno epruveto (dve paralelki). Na ta način smo pripravili 28 steklenih epruvet, ki so vsebovale po 1 g vzorca sira. V vse epruvete smo nato nalili 9 mL gojišča

Half-Fraser, kar smo upoštevali kot prvo razredčitev vzorca, postopek pa nadaljevali, kot je opisano poglavju 3.2.5.2 in poglavju 3.2.6 (ISO 6887-1, 1999 in ISO 11290-2 1998).



Slika 7: Procesna shema priprave vzorcev sira za izvedbo kombinirane obdelave s TE in HHP.

Pri določanju inhibicije mikroorganizmov s pomočjo HHP nas zanima predvsem njena hitrost, torej koliko časa potrebujemo za inaktivacijo določenega števila bakterij pri danih

pogojih. Hitrost inaktivacije baterij je navadno podana z vrednostjo D, ki predstavlja čas, pri katerem se število bakterijskih celic pri določenih pogojih zmanjša za 90 % oziroma za 1 log (Block, 2000).

3.2.8 Senzorična analiza sira z dodatkom TE

Da bi z vidika zagotavljanja varnosti in kakovosti uporabili optimalno količino timijanovega izvlečka, ki ne bi poslabšal senzoričnih lastnosti sira, hkrati pa bi bil protimikrobno še vedno dovolj učinkovit, smo izvedli senzorično ocenjevanje sprejemljivosti sira z različnimi koncentracijami različnih frakcij timijanovega izvlečka. Ocenjevanje sirov, ki smo ga izvedli v prostorih univerze "Dunarea de Jos din Galați" v Romuniji, je temeljilo na principu hedonske senzorične analize. V panelu desetih preizkuševalcev je sodelovalo šest žensk in štirje moški. Ocenjevalci so senzorične parametre preizkušenih vzorcev sira, kot so okus, barva in splošna sprejemljivost sira, ovrednotili po petstopenjski številčni Linkertovi lestvici z ocenami od 1 do 5 (1–zelo nevšečen, 2–nevšečen, 3–nevtralen, 4–všečen, 5–zelo všečen).

Da bi se izognili morebitnim velikim odstopanjem ocen ocenjevalcev, smo rezultate ocenjevanja obdelali s programom Anova in Turkeyevim testom ($p < 0,05$). V naslednjem koraku smo izračunali povprečja ocen in njihove standardne odklone.

Panel je s pomočjo petstopenjske opisne Linkertove lestvice z ocenami od 1 do 5 ovrednotil tudi prisotnost dveh negativnih senzoričnih lastnosti, in sicer grenak okus (1–odsoten, 2–rahlo prisoten, 3–prisoten, 4–grenak, 5–zelo grenak) in pekoč okus (1–odsoten, 2–rahlo prisoten, 3–prisoten, 4–pekoč, 5–zelo pekoč). Povprečje dobljenih ocen smo zaokrožili na najbližje celo število. Dobljene variabilne spremenljivke smo pretvorili v atributne spremenljivke, saj je bil namen senzorične analize ovrednotiti senzorično sprejemljivost vzorcev sira. Pri tem so za senzorično sprejemljive veljali le vzorci sira, pri katerih sta bila oba negativna senzorična deskriptorja odsotna.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Zaradi boljše preglednosti bomo rezultate z razpravo razvrstili po enakem vrstnem redu kot podpoglavja v poglavju MATERIALI IN METODE.

4.1 PRIDOBIVANJE TIMIJANOVEGA IZVLEČKA (TE)

V našem poskusu smo postopek SFE izvedli pri dveh tlačnih režimih, in sicer pri 40 MPa in 30 MPa. V naši delovni hipotezi smo pričakovali, da bo izkoristek SFE pri višjem tlaku večji, protimikrobne lastnosti izvlečka pa bodo izrazitejšje pri izvlečku, pridobljenem s postopkom SFE pri nižjem tlaku. V spodnjih preglednicah so navedeni parametri SFE in podatki o lastnostih uporabljenega rastlinskega materiala pred in po postopku SFE.

Preglednica 4: Nastavitve parametrov postopka SFE za ekstrahiranje in frakcioniranje timijanovega izvlečka.

Parametri SFE	Ekstraktor C30		Separator S40		Separator S45	
Ekstrakcija	prva	druga	prva	druga	prva	druga
Temperatura (°C)	40	40	40	40	20	20
Čas (h)	4	4	4	4	4	4
Tlak (MPa)	30	40	10	10	5	5
Pretok CO ₂ (kg/h)	25	25	25	25	25	25

SFE – Superkritična tekočinska ekstrakcija

Preglednica 5: Lastnosti rastlinskega materiala timijana pred in po prvi ekstrakciji.

Parametri SFE	Šarža 1		Šarža 2		Šarža 3	
Ekstrakcija	prva	druga	prva	druga	prva	druga
Masa pred SFE (g)	397	314	388	310	366	312
Masa po SFE (g)	384	304	373	298	350	300
a _w pred SFE	0,403	0,340	0,410	0,348	0,394	0,356
a _w po SFE	0,206	0,205	0,224	0,214	0,234	0,225
Delež vode pred SFE (% ut/ut)	10,9	10,0	11,1	10,1	11,0	10,1
Delež vode po SFE (% ut/ut)	7,3	7,3	7,4	7,4	7,5	7,4

SFE – Superkritična tekočinska ekstrakcija

Preglednica 6: Količina pridobljenega izvlečka timijana pri prvi in drugi ekstrakciji.

Izvleček/Ekstrakcija	Prva (30 MPa)	Druga (40 MPa)
Masa S45(l) (g)	1,9102	2,680
Masa S40(l) (g)	1,8937	0,220
Masa S45(s) (g)	0,360	1,177
Masa S40(s) (g)	0,678	2,598
Skupna masa (g)	4,842	6,675
Izkoristek SFE (% ut/ut)	0,43	0,71

SFE – Superkritična tekočinska ekstrakcija

Superkritična ekstrakcija je kompleksen proces, pri katerem je vsak korak, od lastnosti in priprave rastlinskega materiala do tlačnih, temperaturnih in časovnih nastavitev procesa ekstrakcije, pomemben dejavnik, ki vpliva na končni rezultat ekstrakcije. Različni pogoji ter različna uporaba aparatur in opreme ne zagotavlja enakih pogojev SFE, kar nam velikokrat oteži primerjavo rezultatov. Kljub temu so bili rezultati naše študije primerljivi z rezultati drugih raziskav (Zeković in sod., 2000; Balachandran in sod., 2006; García-Risco in sod., 2011; Fornari in sod., 2012).

4.1.1 Masne bilance

Iz preglednice 5 je razvidno, da se je po izvedbi SFE pri 30 MPa zmanjšala masa rastlinskega materiala za 3,82 % ut/ut, od tega večji delež izgube mase smo pripisali izgubi vode, ki je v tem poskusu znašala 3,6 % ut/ut. Pri procesu SFE pri 40 MPa se je masa rastlinskega materiala zmanjšala za 3,63 % ut/ut, od tega večji delež izgube mase smo prav tako pripisali izgubi vode, ki je pri drugi ekstrakciji znašala 3,1 % ut/ut. Manjša izguba vode je lahko rezultat manjše vsebnosti vode v rastlinskem materialu, ki smo ga uporabili pri drugi ekstrakciji. Razlika med izgubo vode in zmanjšano skupno maso rastlinskega materiala predstavlja maso pridobljenega TE.

Vsebnost vode v rastlinskem materialu bistveno vpliva na potek SFE, saj lahko večja vsebnost vode zmanjša kontakt nepolarnega CO₂ med postopkom SFE, lahko pa deluje tudi kot samostojno topilo, ki v rastlinskem materialu zadrži polarne sestavine TE (Balachandran in sod., 2006).

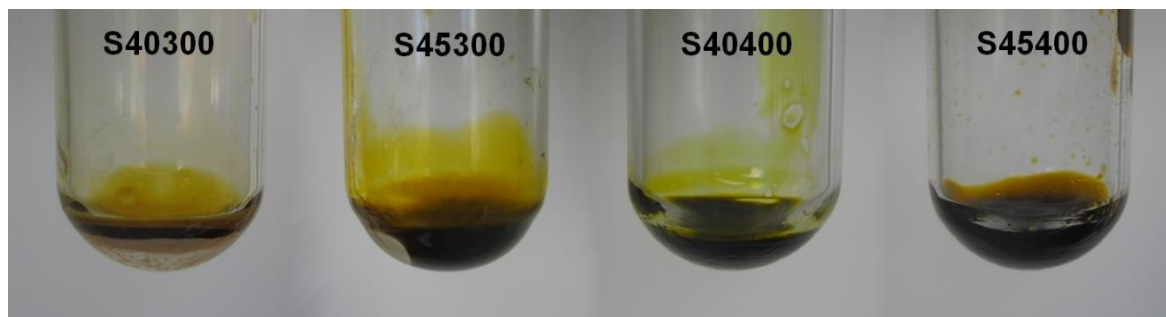
4.1.2 Fizikalne lastnosti pridobljenih izvlečkov

V našem poskusu smo s postopkom SFE v obeh tlačnih nastavitvah (30 in 40 MPa) pridobili različne frakcije TE, ki so se med seboj razlikovale v barvi, agregatnih stanjih in konsistenci. Pri obeh ekstrahiranjih (30 in 40 MPa) se je izvleček, pridobljen v prvem separatorju, pojavil v dveh različnih agregatnih stanjih. Pri prvi ekstrakciji (30 MPa) se je

večji del TE v prvem separatorju pojavil v obliki rjave oljnate tekočine, v manjši meri pa v obliki trdnega, olivno zelenega prahu, ki se je nabral okoli hladilne spirale prvega ekstraktorja S40. Pri drugi ekstrakciji (40 MPa) se je večji del TE v prvem separatorju pojavil v obliki olivno zelenega prahu in v manjši meri v obliki temno zelenega olja.

Pri drugi SFE, ki je potekala pri 40 MPa, je bilo tekočega izvlečka v prvem ekstraktorju bistveno manj. Ugotovili smo, da se s povečanjem tlaka pri postopku SFE poveča tudi ekstrakcija različnih voskov iz rastlinskega materiala, ki se v separatorjih izločijo v trdni obliki, v našem primeru v obliki olivno zelenega prahu (Simandi in sod., 1998; Zeković in sod., 2000). Do podobnih zaključkov so prišli tudi drugi raziskovalci. Fornari in sod. (2012) so opazili, da je bil v njihovem poskusu TE v prvem ekstraktorju prisoten v obliki goste paste, v manjši meri pa tudi v obliki tekočine.

Pri obeh ekstrakcijah (30 in 40 MPa) se je izvleček, pridobljen v drugem separatorju, prav tako pojavil v dveh različnih agregatnih stanjih. Večji del izvlečka je bil v drugem separatorju prisoten v obliki olja oranžnorjave barve, v manjši meri pa v obliki temno zelene, skoraj črne paste. To so v svoji raziskavi opazili tudi Fornari in sod. (2012). Delež tekočega TE v drugem separatorju se je s povečanjem tlaka SFE še povečal. Enaka opažanja so zabeležili tudi Simandi in sod. (1998), saj je bil tudi v njihovem poskusu TE v drugem ekstraktorju v večji meri prisoten v obliki rumenorjave oljnate tekočine.



Slika 8: Pridobljene frakcije timijanovega izvlečka (TE).

TE S40300 se je v tekoči obliki pojavil kot oranžnorjava oljna mešanica hidrofilne in hidrofobne faze. Pri tem je bila ena faza skoraj brezbarvna, medtem ko se je TE S45300 v tekočem stanju pojavil kot temno rjava, hidrofobna, oljnata tekočina z oranžnim odtenkom.

TE S40400 se je v tekočem stanju pojavil kot temno zelena, hidrofobna, oljnata tekočina, medtem ko se je TE S45400 v obliki tekočine pojavil kot temno rjava, hidrofobna, oljnata tekočina.

4.1.3 Masni donos TE v odvisnosti od ekstrahiranega rastlinskega materiala

Masni donos TE ali tako imenovani izkoristek SFE se razlikuje od raziskave do raziskave. Le-ta je odvisen od tlačnih nastavitev postopka SFE, kot so čas ekstrakcije, temperatura ekstrakcije in vrste rastlinskega materiala, ki ga uporabimo v postopku SFE. Pri SFE timijana se izkoristek ekstrakcije giblje med 0,3 in 6,3 % ut/ut (Zeković in sod., 2000).

Fornari in sod. (2012) so pri izvedbi SFE, kjer so ekstrahirali posušene dele timijana (*Thymus zygis*) pri 30 MPa in 40 °C, dobili 2,61 % ut/ut izkoristek SFE. Ivanović in sod. (2012) so pri izvedbi SFE timijana (*Thymus vulgaris*) pri 11,5 MPa in 40 °C dobili 1,23 % ut/ut izkoristek, medtem ko so García-Risco in sod. (2011) dobili 3,56 % ut/ut izkoristek.

V našem poskusu je bil izkoristek SFE veliko manjši, in sicer 0,43 % ut/ut pri SFE pri 30 MPa in 0,71 % ut/ut pri SFE pri 40 MPa. Čeprav smo dobili manjši izkoristek kot Fornari in sod. (2012) in García-Risco in sod. (2011), pa smo dobili podoben izkoristek, kot so ga dobili Zeković in sod. (2000). V njihovi raziskavi so izvedli SFE pri 40 MPa (40 °C), postopek ekstrakcije pa je trajal 2 uri in pol. Izkoristek SFE je v njihovem poskusu znašal 0,475 % ut/ut TE, kar je primerljivo z izkoristkom SFE, ki smo ga dobili v našem poskusu. Podobno kot Fornari in sod. (2012) in Zeković in sod. (2000) smo tudi mi ugotovili, da se s povečanjem tlaka SFE povečata izkoristek in skupna količina TE, kljub temu da se delež protimikrobnih snovi na račun povečanja vsebnosti voskov v TE zmanjša, kar lahko vpliva na protimikrobne lastnosti pridobljenih izvlečkov.

4.2 DOLOČANJE MIK IN MBK V GOJIŠČU BHI

Preglednica 7: Povprečja izmerjenih absorbanc posameznih frakcij TE pri metodi določanja MIK v BHI po 24 urah inkubacije.

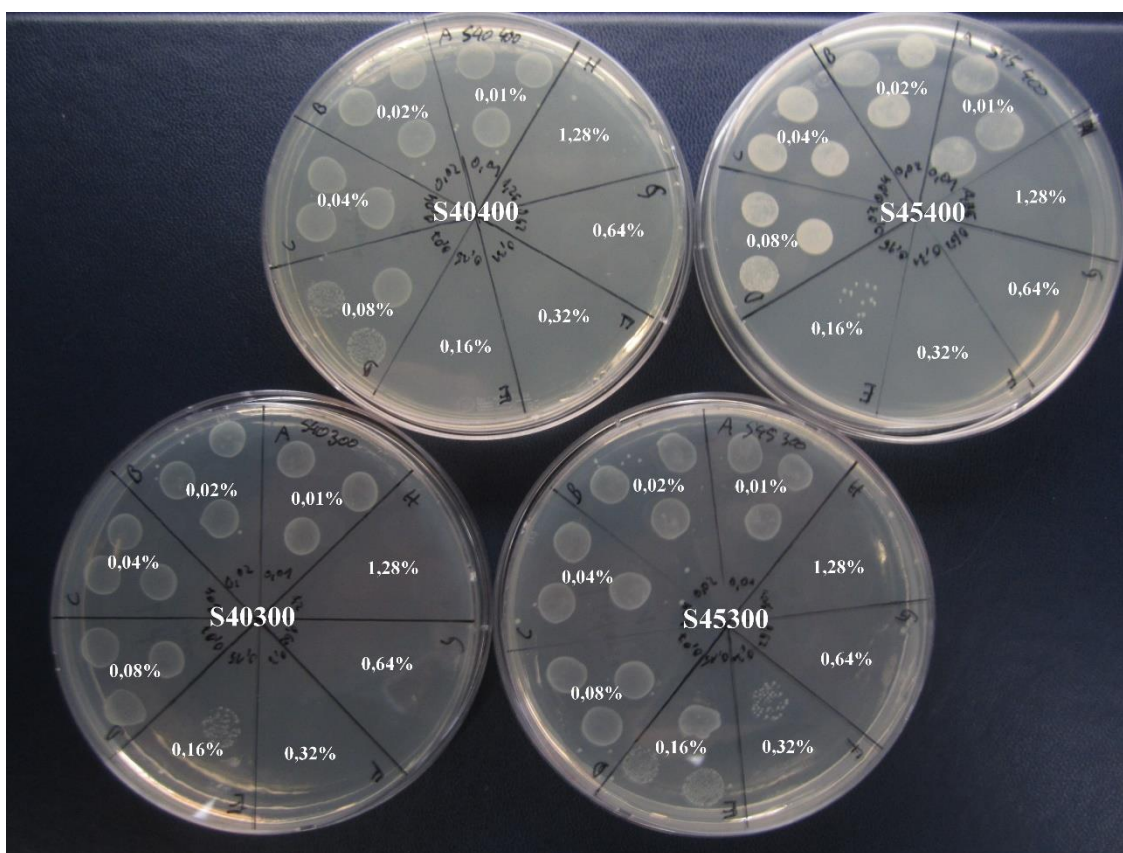
TE (% vol/vol)	A (S40300)		A (S45300)		A (S40400)		A (S45400)	
	TE	TE+List.	TE	TE+List.	TE	TE+List.	TE	TE+List.
0,00	0,1114	0,3035	0,1074	0,3278	0,1076	0,4248	0,1151	0,4535
σ	$\pm 0,0044$	$\pm 0,0407$	$\pm 0,0119$	$\pm 0,0443$	$\pm 0,0118$	$\pm 0,0815$	$\pm 0,0163$	$\pm 0,0905$
0,01	0,1052	0,2496	0,1008	0,3493	0,1004	0,5936	0,1109	0,5474
σ	$\pm 0,0021$	$\pm 0,0489$	$\pm 0,0026$	$\pm 0,0377$	$\pm 0,0029$	$\pm 0,0179$	$\pm 0,0060$	$\pm 0,0228$
0,02	0,1319	0,2693	0,1978	0,3007	0,1289	0,3603	0,1271	0,3317
σ	$\pm 0,0255$	$\pm 0,0046$	$\pm 0,0691$	$\pm 0,0060$	$\pm 0,0041$	$\pm 0,0246$	$\pm 0,0043$	$\pm 0,0279$
0,04	0,1429	0,3762	0,1424	0,3111	0,1457	0,5796	0,1548	0,4556
σ	$\pm 0,0008$	$\pm 0,0292$	$\pm 0,0157$	$\pm 0,0049$	$\pm 0,0110$	$\pm 0,1129$	$\pm 0,0029$	$\pm 0,0336$
0,08	*0,1834	*0,1854	0,1493	0,3299	*0,2093	*0,2394	*0,2134	*0,2121
σ	$\pm 0,0084$	$\pm 0,0173$	$\pm 0,0015$	$\pm 0,0244$	$\pm 0,0309$	$\pm 0,0088$	$\pm 0,0248$	$\pm 0,0030$
0,16	0,1774	0,1903	*0,1965	*0,2161	0,2704	0,3025	0,3497	0,3237
σ	$\pm 0,0089$	$\pm 0,0083$	$\pm 0,0207$	$\pm 0,0092$	$\pm 0,0108$	$\pm 0,0198$	$\pm 0,0443$	$\pm 0,0328$
0,32	0,2984	0,3257	0,3508	0,3398	0,5141	0,5467	0,7598	0,8483
σ	$\pm 0,0256$	$\pm 0,0447$	$\pm 0,0939$	$\pm 0,0713$	$\pm 0,0771$	$\pm 0,0794$	$\pm 0,0262$	$\pm 0,1132$
0,64	0,6516	0,5657	0,7828	0,9034	0,8296	0,9039	0,7813	0,8749
σ	$\pm 0,3318$	$\pm 0,2004$	$\pm 0,0701$	$\pm 0,1003$	$\pm 0,0409$	$\pm 0,0438$	$\pm 0,0248$	$\pm 0,0066$
1,28	1,0375	1,0935	0,3663	0,5447	0,5741	0,7237	1,1039	1,0894
σ	$\pm 0,1582$	$\pm 0,3155$	$\pm 0,0178$	$\pm 0,0318$	$\pm 0,0483$	$\pm 0,0404$	$\pm 0,2807$	$\pm 0,3196$

A – povprečje izmerjenih absorbanc različnih frakcij timijanovega izvlečka; TE – izvleček timijana; TE + List. – izvleček timijana z dodatkom inokuluma; σ – standardni odklon; * – odebeljene vrednosti prikazujejo najmanjše koncentracije posameznih frakcij TE, pri katerih je odsotna rast bakterij *L. monocytogenes*

Po inkubaciji mikrotitrskih plošč smo povprečne vrednosti absorbanc posameznih frakcij timijanovega izvlečka primerjali med seboj. Če primerjamo absorbanco negativne kontrole (TE) z absorbanco pozitivne kontrole (TE + List) (0,00 %), opazimo očitno razliko v izmerjenih absorbancah. Večja izmerjena absorbanca v pozitivni kontroli je bila posledica prisotnosti večje koncentracije bakterijskih celic po inkubaciji. Opazili smo, da se z naraščanjem koncentracije TE povečuje tudi absorbanca. Povišana absorbanca v vzorcih z večjo koncentracijo TE ni rezultat rasti bakterij, temveč najverjetneje tvorbe kompleksov med uporabljenim stabilizatorjem Tween 80 in polifenoli v TE (Carson in sod., 1995). MIK smo določili v območju med tisto koncentracijo TE, pri kateri je bila absorbanca vzorca (TE + List) primerljiva z absorbanco slepe probe (TE), ter predhodno koncentracijo

TE, v kateri je bila rast bakterij *L. monocytogenes* še prisotna. Izmerjena absorbanca najmanjše koncentracije TE, ki nakazuje na odsotnost rasti bakterij *L. monocytogenes*, torej minimalno inhibitorno koncentracijo TE, je v preglednici 7 označena z odebeljenimi vrednostmi izmerjenih absorbanc.

Iz preglednice 7 je razvidno, da je rast bakterij pri TE S40300, S40400 in S45400 prisotna do koncentracije 0,08 % vol/vol TE. Pri tej koncentraciji smo opazili nižjo absorbanco, ki je bila posledica odsotnosti rasti bakterij *L. monocytogenes*. MIK za omenjene tri izvlečke se torej giblje med 0,08 in 0,04 % vol/vol TE. Pri TE S45300 je bila rast bakterij prisotna do koncentracije 0,16 % vol/vol TE, zato se MIK omenjenih izvlečkov giblje med 0,16 in 0,08 % vol/vol TE.



Slika 9: Rezultati MBK različnih frakcij in različnih koncentracij TE, v gojišču MHA.

Rezultati pri določanju minimalne baktericidne koncentracije so bili v skladu z našimi pričakovanji. MBK je bila podobno kot v ostalih izvlečkih za eno razredčitev višja kot določena MIK. Najmanjša MBK je bila dosežena v TE S40400, ker pri koncentraciji 0,16 % vol/vol TE v nobeni od treh paralelk ni prišlo do rasti bakterij, medtem ko je pri koncentraciji 0,08 % prišlo do zmanjšane rasti bakterij v dveh od treh paralelk. Druga protimikrobno najučinkovitejša frakcija je bila TE S45400, kjer je pri koncentraciji 0,16 % vol/vol TE prišlo do inhibicije rasti v dveh od treh paralelk, v eni paralelki pa je

zraslo le nekaj bakterijskih kolonij. Pri koncentraciji 0,08 % vol/vol TE S45400 ni bilo opaziti spremembe v rasti bakterij v nobeni od treh paralelk. Zelo podoben rezultat MBK v primerjavi s TE S45400 smo dobili v TE S40300, kjer je pri koncentraciji 0,16 % vol/vol TE v eni od treh paralelk zraslo nekaj bakterijskih kolonij, v ostalih dveh paralelkah pa rast bakterij ni bila prisotna. Pri koncentraciji 0,08 % vol/vol TE v nobeni od treh paralelk ni prišlo do spremembe rasti bakterij. Največja MBK je bila opažena v izvlečku S45300, kjer je bila določena tudi največja MIK. V tem izvlečku smo pri koncentraciji 0,32 % vol/vol TE opazili odsotnost bakterij v dveh od treh paralelk, v eni paralelki pa je prišlo zgolj do njihove manjše rasti. Pri koncentraciji 0,16 % vol/vol TE smo opazili manj kolonij v dveh od treh paralelk, medtem ko v eni paralelki ni bilo opaznih sprememb v rasti bakterij.

Iz rezultatov določitve MIK in MBK v vseh frakcijah TE smo ugotovili, da se različne frakcije TE po svojih protimikrobnih lastnostih minimalno razlikujejo med seboj. MIK in MBK najbolj in najmanj antibakterijsko aktivne frakcije se razlikujeta le v dvakratni razredčitvi. Da sta MIK in MBK podobni, so v svoji raziskavi ugotovili tudi Santurio in sod. (2014).

Vse različne frakcije TE, ki smo jih pridobili s postopkom SFE, se torej nahajajo v rangu med 0,04 in 0,16 % vol/vol TE za MIK ter med 0,08 in 0,32 % vol/vol TE za MBK, kar je primerljiv oziroma celo boljši rezultat od rezultatov nekaterih drugih raziskovalnih del. Mazzarrino in sod. (2015) so v svoji raziskavi določili MIK za izvleček timijana (*Thymus vulgaris*) za več sevov bakterij *L. monocytogenes* med 0,25 in 0,5 % vol/vol TE. De Carvalho in sod. (2015) so v svoji raziskavi določili MIK pri 0,125 % vol/vol TE na rast bakterij *L. monocytogenes* v bujonu, pripravljenem na osnovi sira, medtem ko so Oussalah in sod. (2007) določili MIK med 0,05 in 0,1 % vol/vol TE na rast bakterij *L. monocytogenes* v bujonu BHI. Podobne rezultate so dobili tudi Friedman in sod. (2002), ki so ugotovili, da različno protimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov ni odvisno le od kemijske sestave izvlečkov, temveč tudi od različnih postopkov priprave oziroma postopkov razredčevanja.

4.2.1 Vpliv topil na MIK in MBK

Pri razredčevanju izvlečkov se uporablja predvsem topila, kot so etanol, metanol, Tween 20, Tween 80, polietilen glikol, polipropilen glikol, heksan, dimetil žveplov oksid in PBS. Najbolj uporabljana topila in stabilizatorji so etanol, metanol in Tween 80, ki lahko v prevelikih koncentracijah vplivajo na inhibicijo rasti bakterij (Burt, 2004).

Remmal in sod. (1993) so v svoji raziskavi ugotovili, da je z dodatkom 0,2 % vol/vol agarja mogoče pripraviti stabilno emulzijo rastlinskih izvlečkov. Izvleček, katerega emulzija je bila pripravljena z dodatkom agarja, je pokazala boljše lastnosti na zaviranje rasti bakterij v primerjavi z izvlečkom, katerega emulzija je bila pripravljena z dodatkom etanola in stabilizatorja Tween 80, iz česar je razvidno, da lahko topila in stabilizatorji na

rast bakterij vplivajo negativno ali celo pozitivno. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Juven in sod. (1994).

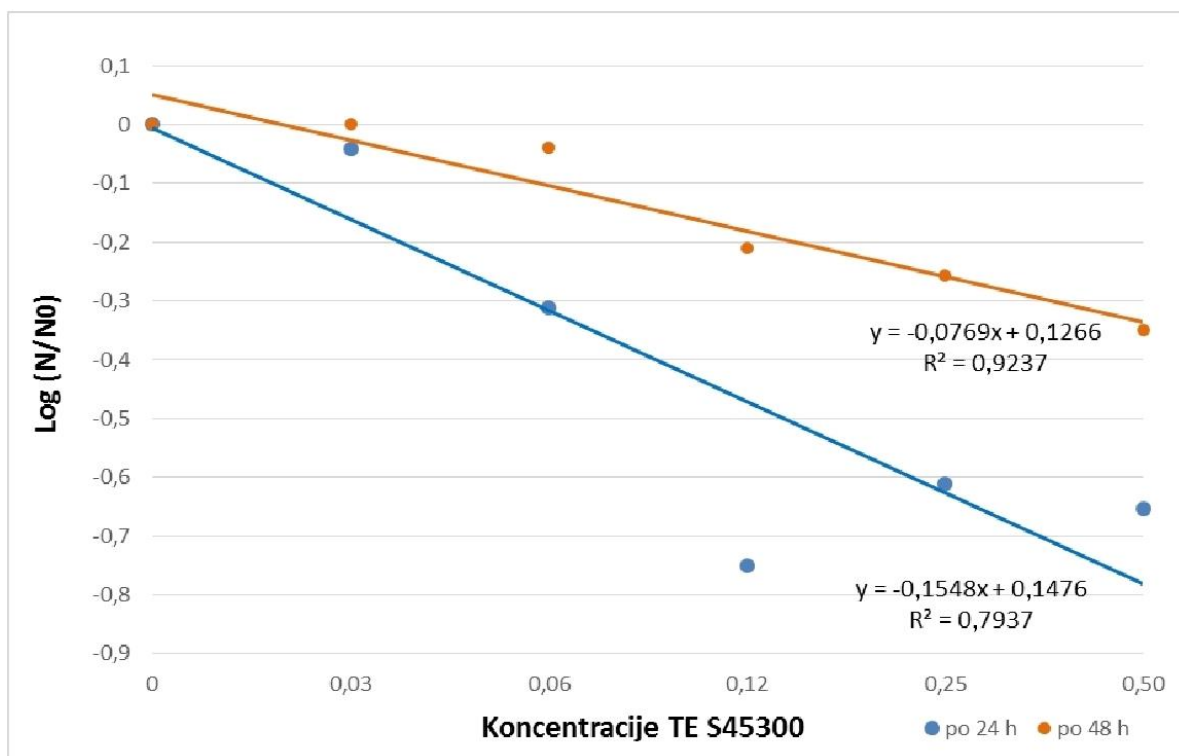
4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK TIMIJANOVEGA IZVLEČKA V SVEŽEM SIRU

Protimikrobni učinek različnih koncentracij timijanovega izvlečka S45300 in S45400 na bakterije *L. monocytogenes* v svežem siru smo določali z metodo razredčevanja v fosfatnem pufru (PBS). Po 24 in 48 urah inkubacije petrijevk s PALCAM agarjem pri 37 °C, na katere so bile nanese razredčitve vzorcev (10 µL) z različno vsebnostjo TE (od 0,5 do 0,03 % vol/ut), smo prešteli kolonije, katerih število smo primerjali s številom kolonij v pozitivni kontroli. Rezultati v preglednici 8 predstavljajo povprečno število kolonij na 1 g vzorca svežega sira. Izvedba poskusa določitve preživelosti bakterij *L. monocytogenes* v siru z dodatkom TE ni bila potrebna, saj inhibicija bakterij *L. monocytogenes* pri določitvi protimikrobne učinkovitosti TE v siru ni bila nikoli pod mejo zaznavnosti.

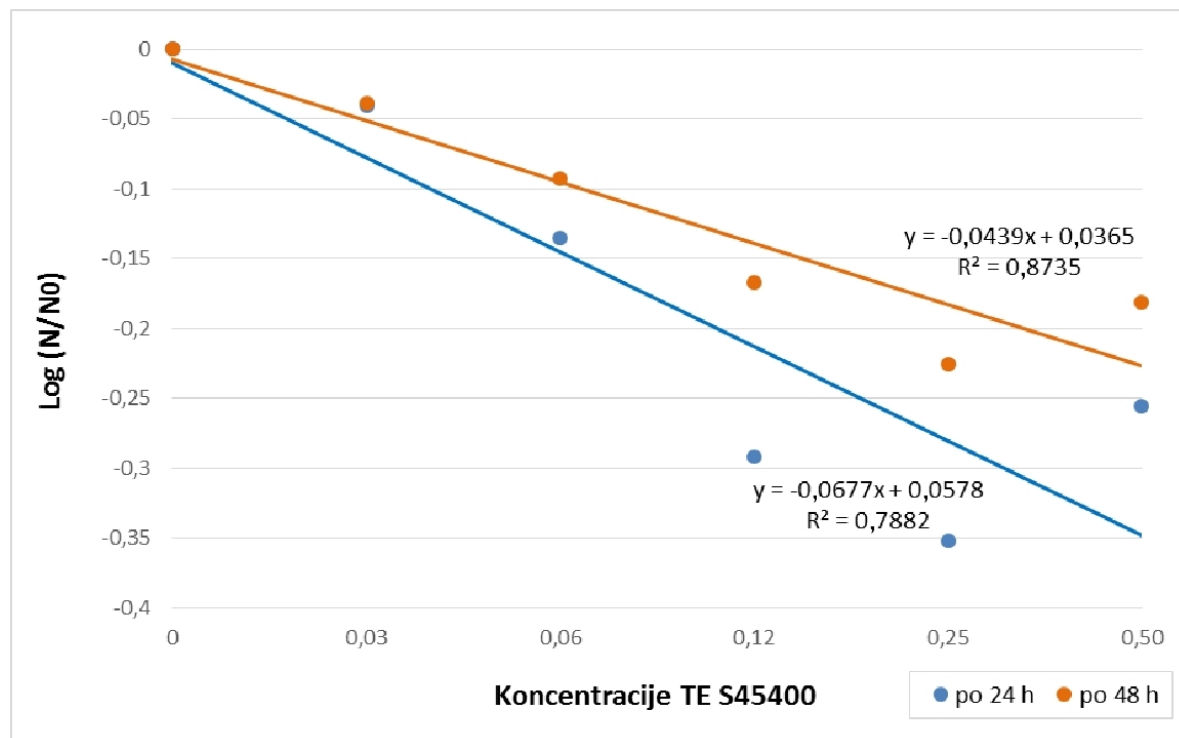
Preglednica 8: Koncentracija (CFU/mL) bakterij *L. monocytogenes* v vzorcih sira po 24 in 48 urah inkubacije na PALCAM agarju pri 37 °C pri različnih koncentracijah TE.

Koncentracija bakterij <i>L. monocytogenes</i> (CFU/mL)				
TE	S45300		S45400	
C_v siru (% vol/ut)	t: 24 h	t: 48 h	t: 24 h	t: 48 h
0 σ	$2,25 \times 10^6$ $\pm 4,95 \times 10^5$	$2,35 \times 10^6$ $\pm 3,53 \times 10^5$	$2,25 \times 10^6$ $\pm 4,95 \times 10^5$	$2,35 \times 10^6$ $\pm 3,53 \times 10^5$
0,03 σ	$2,05 \times 10^6$ $\pm 2,12 \times 10^5$	$2,35 \times 10^6$ $\pm 2,83 \times 10^5$	$2,15 \times 10^6$ $\pm 7,07 \times 10^4$	$2,15 \times 10^6$ $\pm 7,07 \times 10^4$
0,06 σ	$1,10 \times 10^6$ $\pm 2,83 \times 10^5$	$2,15 \times 10^6$ $\pm 1,06 \times 10^6$	$1,65 \times 10^6$ $\pm 6,36 \times 10^5$	$1,90 \times 10^6$ $\pm 5,66 \times 10^5$
0,12 σ	$4,00 \times 10^5$ $\pm 1,41 \times 10^5$	$1,45 \times 10^6$ $\pm 2,12 \times 10^5$	$1,15 \times 10^6$ $\pm 7,07 \times 10^4$	$1,60 \times 10^6$ $\pm 2,82 \times 10^5$
0,25 σ	$5,50 \times 10^5$ $\pm 7,07 \times 10^4$	$1,30 \times 10^6$ $\pm 4,24 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$ $\pm 1,41 \times 10^5$	$1,40 \times 10^6$ $\pm 2,82 \times 10^5$
0,50 σ	$5,00 \times 10^5$ $\pm 1,41 \times 10^5$	$1,05 \times 10^6$ $\pm 2,12 \times 10^5$	$1,25 \times 10^6$ $\pm 7,07 \times 10^4$	$1,55 \times 10^6$ $\pm 2,12 \times 10^5$

TE –izvleček timijana; σ – standardni odklon



Slika 10: Inhibicija bakterij *L. monocytogenes* v odvisnosti od koncentracije TE S45300 v siru po 24 in 48 urah inkubacije na PALCAM agarju pri 37 °C.



Slika 11: Inhibicija bakterij *L. monocytogenes* v odvisnosti od koncentracije TE S45400 v siru po 24 in 48 urah inkubacije na PALCAM agarju pri 37 °C.

Rezultati so pokazali, da je prisotnost obeh izvlečkov timijana v svežem siru negativno vplivala na rast bakterij *L. monocytogenes* po 24-urni inkubaciji pri 37 °C, vendar v manjši meri, kot smo pričakovali, saj je bila inhibicija bakterij *L. monocytogenes* ob uporabi obeh izvlečkov manjša od 1 log. Zaviranje rasti *L. monocytogenes* se je bolj kot v manjšem številu kolonij kazalo v počasnejši rasti kolonij, saj so bile le-te v vzorcih svežega sira, v katerih je prisoten TE, veliko manjše, manjša pa je bila tudi razgradnja eskulin glukoze v PALCAM agarju, saj je bila površina črnih con v vzorcih svežega sira, v katerih je bil prisoten TE, bistveno manjša. Podobne rezultate so dobili tudi Juven in sod. (1994), Mendoza-Yepes in sod. (1997), Smith-Palmer in sod. (2001) ter de Carvalho in sod. (2015). Ugotovili so, da bi bilo v sirih potrebno povečati koncentracijo izvlečkov za nekaj desetkrat, da bi dobili podobne rezultate, kot so jih dobili pri ugotavljanju protimikrobne lastnosti izvlečkov v mikrobioloških medijih.

Po 48-urni inkubaciji na PALCAM agarju so se pojavile nove kolonije bakterij *L. monocytogenes*, katerim je odsotnost stresnega dejavnika (tj. TE) omogočila njihovo ponovno rast. Po 48-urni inkubaciji ni bilo več mogoče opaziti razlik v velikosti kolonij *L. monocytogenes* iz vzorcev sira z vsebnostjo TE ter pozitivno kontrolo.

4.3.1 Vpliv maščob na protimikrobne lastnosti TE

Po obsegu protimikrobnega učinka na bakterije *L. monocytogenes* v siru se je najbolje izkazala frakcija S45300, kar je ravno v nasprotju z rezultati, dobljenimi pri določanju MIK in MBK v BHI, saj je imela ta frakcija najmanjšo protimikrobno učinkovitost v mikrobiološkem mediju. Razlog zato se verjetno skriva prav v fizikalnih lastnostih te frakcije, predvsem v njeni manjši hidrofobnosti. Med homogenizacijo izvlečkov v vzorcih svežega sira smo predvsem pri koncentracijah TE, večjih od 0,12 % vol/ut, opazili, da se je izločena mlečna maščoba, ki je plavala na vrhu prve razredčitve, obarvala v barvo uporabljenega izvlečka, kar nakazuje na absorpcijo izvlečka v maščobo, prisotno v svežem siru. Ker je bil TE S45300 v primerjavi z ostalimi TE najmanj hidrofoben, se ga je tudi najmanj raztopilo v maščobi, njegova razpoložljivost v preostalem matriksu svežega sira in posledično tudi protimikrobna učinkovitost na rast *L. monocytogenes* pa je bila večja.

Po rezultatih in opazovanjih sodeč predpostavljamo, da bi bili uporabljeni izvlečki bistveno bolj učinkoviti v siru z manjšo vsebnostjo maščob. Smith-Palmer in sod. (2001) so ugotovili, da ima izvleček timijana v svežem siru z zmanjšano vsebnostjo maščob veliko večji protimikrobni učinek na bakterije *L. monocytogenes* v primerjavi s svežimi siri z večjo vsebnostjo maščob. Ugotovili so tudi, da TE zavira rast bakterij *L. monocytogenes* v svežih sirih le v koncentraciji, večji od 0,5 % vol/vol, čeprav je TE deloval zaviralno na rast bakterij *L. monocytogenes* pri veliko manjših koncentracijah v mikrobiološkem mediju. Prav tako so v tej raziskavi ugotovili, da je izvleček timijana izmed vseh rastlinskih izvlečkov, ki so jih uporabili, v smislu protimikrobne aktivnosti najbolj občutljiv na prisotnost maščob v siru.

Določanje zaviralnega učinka na rast bakterij v hrani je zelo kompleksen proces, saj ima matriks hrane velik vpliv na to, kako se bo bodisi uporabljeni izvleček bodisi bakterije obnašale v njuni medsebojni interakciji in interakciji s sestavinami hrane. Maščobe, prisotne v hrani, tvorijo zaščitni plašč okoli bakterijske celice, ki omogoča, da protimikrobne sestavine timijanovega izvlečka pridejo v stik z bakterijsko celico, po drugi strani pa lahko maščoba v hrani absorbira izvleček in zmanjša tako njegovo prisotnost v vodni fazi hrane ter posledično vpliv izvlečka na bakterijske celice (Burt, 2004), kar so pokazali tudi rezultati naše raziskave.

4.3.2 Vpliv pH na protimikrobne lastnosti TE

Larson in sod. (1996) so poročali, da so bile bakterije *L. monocytogenes* manj občutljive na izvleček hmelja v mleku in siru v primerjavi z uporabljenim mikrobiološkim medijem. Kot glavni razlog navajajo vsebnost maščob in razliko v vrednosti pH. Hidrofobnost izvlečka ni odvisna le od njegove kemijske sestave, temveč tudi od pH medija. Pri nižjem pH se hidrofobnost izvlečkov poveča, kar pomeni, da se pri nižjem pH izvleček lažje raztopi v maščobi, kar prispeva tako k boljši topnosti izvlečka v membrani bakterije, kot tudi boljši topnosti izvlečka v maščobi, prisotni v hrani (Juven in sod., 1994).

4.3.3 Vpliv vsebnosti vode na protimikrobne lastnosti TE

Manjša vsebnost vode v hrani zmanjša dostopnost izvlečka do bakterijskih celic. Tudi proteini v hrani imajo velik vpliv na protimikrobno učinkovitost izvlečkov. Juven in sod. (1994) so ugotovili, da goveji serumski albumin nevtralizira protimikrobno učinkovitost timola, ki naj bi bila ena od glavnih protimikrobnih sestavin timijanovega izvlečka. Vzrok je tvorba kompleksov med fenoli, prisotnimi v izvlečku, ter proteini, prisotnimi v hrani. Tvorba takšnih kompleksov s proteini v hrani bi zmanjšala tvorbo kompleksov s proteini v membrani bakterijskih celic, ki je eden ključnih mehanizmov zaviranja rasti bakterij nasploh (Ultee in sod., 2002).

4.4 KOMBINIRANO DELOVANJE HHP IN TE NA ZAVIRANJE RASTI

BAKTERIJE *L. monocytogenes* V SVEŽEM SIRU

Kombinirano delovanje HHP in TE pri različnem tlaku in njegovem času izpostavitve na zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes* smo določali z metodo razredčevanja v fosfatnem pufru (PBS), katerega 50 µL smo prenesli na PALCAM agar in ga inkubirali 48 ur pri temperaturi 37 °C.

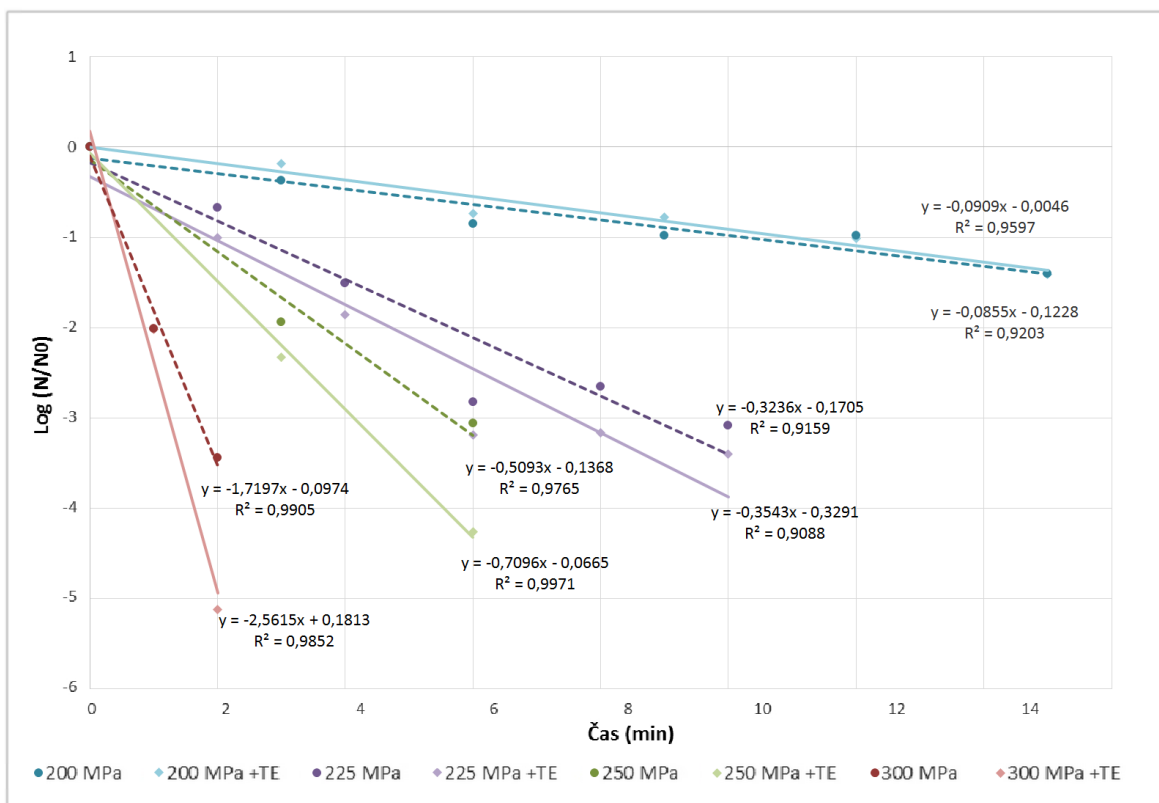
Po 48 urah inkubacije smo prešteli kolonije, ki smo jih primerjali s pozitivno kontrolo. Rezultati v preglednici 9 so podani kot povprečno število bakterij obeh paralelk, na 1 g vzorca svežega sira.

Pozitivna kontrola (PK) ni bila izpostavljena visokemu tlaku, medtem ko je bil vzorec pri času 0 izpostavljen tlaku do vzpostavitve delovnega tlaka. HHP sistem namreč potrebuje približno eno minuto, da kompresor vzpostavi želeni tlak. Med tem časom lahko pride do inhibicije bakterij *L. monocytogenes* v preiskovanih vzorcih, še zlasti pri višjih tlačnih režimih. Da bi izključili morebiten pojav inhibicije bakterij *L. monocytogenes* v tem času, smo postopek HHP v eni visokotlačni komori ustavili takoj ob vzpostavitvi želenega tlaka. Ta vzorec je predstavljal vzorec ob času 0, ki smo ga uporabili kot izhodišče za izračun vrednosti D.

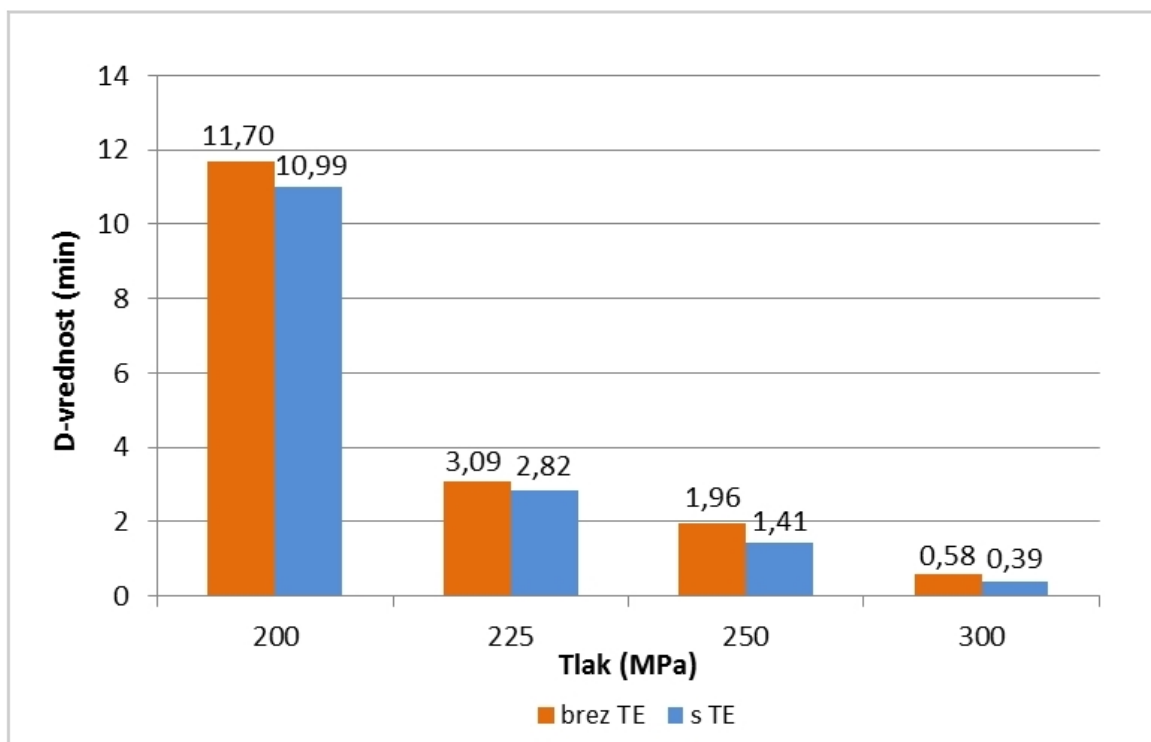
Preglednica 9: Koncentracija bakterij *L. monocytogenes* v odvisnosti od uporabe postopka HHP pri različnih tlakih, časovnih intervalih in koncentracijah TE.

200 MPa		225 MPa		250 MPa		300 MPa	
Brez TE	s TE	Brez TE	s TE	Brez TE	s TE	Brez TE	s TE
PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK	PK
$5,60 \times 10^6$ $\pm 7,07 \times 10^5$	$6,00 \times 10^6$ $\pm 3,54 \times 10^5$	$5,52 \times 10^6$ $\pm 9,90 \times 10^5$	$7,12 \times 10^6$ $\pm 1,41 \times 10^5$	$5,28 \times 10^6$ $\pm 7,07 \times 10^5$	$5,26 \times 10^6$ $\pm 4,24 \times 10^5$	$5,20 \times 10^6$ $\pm 2,54 \times 10^5$	$5,10 \times 10^6$ $\pm 1,41 \times 10^5$
0 min	0 min	0 min	0 min	0 min	0 min	0 min	0 min
$5,92 \times 10^6$ $\pm 2,83 \times 10^5$	$5,92 \times 10^6$ $\pm 4,24 \times 10^5$	$4,32 \times 10^6$ $\pm 2,83 \times 10^5$	$6,40 \times 10^6$ $\pm 4,24 \times 10^5$	$4,32 \times 10^6$ $\pm 5,94 \times 10^5$	$3,62 \times 10^6$ $\pm 3,39 \times 10^5$	$5,50 \times 10^5$ $\pm 1,55 \times 10^5$	$2,65 \times 10^5$ $\pm 9,43 \times 10^4$
3 min	3 min	2 min	2 min	3 min	3 min	1 min	1 min
$2,54 \times 10^6$ $\pm 1,63 \times 10^5$	$3,86 \times 10^6$ $\pm 2,69 \times 10^5$	$9,20 \times 10^5$ $\pm 7,07 \times 10^4$	$6,36 \times 10^5$ $\pm 7,07 \times 10^3$	$4,98 \times 10^4$ $\pm 2,82 \times 10^2$	$1,70 \times 10^4$ $\pm 4,24 \times 10^3$	$5,35 \times 10^3$ $\pm 1,44 \times 10^3$	$2,55 \times 10^3$ $\pm 7,54 \times 10^2$
6 min	6 min	4 min	4 min	6 min	6 min	2 min	2 min
$8,32 \times 10^5$ $\pm 1,13 \times 10^5$	$1,08 \times 10^6$ $\pm 1,06 \times 10^5$	$1,34 \times 10^5$ $\pm 1,13 \times 10^4$	$8,96 \times 10^4$ $\pm 1,13 \times 10^4$	$3,80 \times 10^3$ $\pm 2,82 \times 10^2$	$2,00 \times 10^2$ ± 0	$2,00 \times 10^2$ ± 0	$2,00$ ± 0
9 min	9 min	6 min	6 min	9 min	9 min	3 min	3 min
$6,16 \times 10^5$ $\pm 1,20 \times 10^5$	$9,92 \times 10^5$ $\pm 1,70 \times 10^5$	$6,52 \times 10^3$ $\pm 2,62 \times 10^3$	$4,16 \times 10^3$ $\pm 8,48 \times 10^2$	/	/	/	/
12 min	12 min	8 min	8 min	12 min	12 min	4 min	4 min
$6,24 \times 10^5$ $\pm 1,56 \times 10^5$	$5,76 \times 10^5$ $\pm 5,66 \times 10^4$	$9,60 \times 10^3$ ± 0	$5,40 \times 10^3$ $\pm 7,07 \times 10^2$	/	/	/	/
15 min	15 min	10 min	10 min	15 min	15 min	5 min	5 min
$2,34 \times 10^5 \pm$ $5,66 \times 10^4$	$2,32 \times 10^5 \pm$ $2,12 \times 10^4$	$3,60 \times 10^3$ $\pm 7,07 \times 10^2$	$2,56 \times 10^3$ $\pm 2,83 \times 10^2$	/	/	/	/

PK – pozitivna kontrola; TE –izvleček timijana



Slika 12: Inhibicija bakterij *L. monocytogenes* v kombiniranem postopku HHP in TE v odvisnosti od tlaka, koncentracije TE in časa obdelave.



Slika 13: Primerjava vrednosti D pri različnih tlakih postopka HHP v vzorcih svežega sira s in brez TE.

Vrednost D, ki smo jo izračunali za vsak poskus inaktivacije bakterij s postopkom HHP, je bila odvisna od jakosti uporabljenega tlaka in prisotnosti ali odsotnosti TE v vzorcih svežega sira. Večji kot je bil tlak pri postopku HHP, krajši čas smo potrebovali, da smo zmanjšali prisotnost bakterij za 1 log. Enako je veljalo za vzorce sira, katerim je bil dodan TE.

Iz slik 12 in 13, ki prikazujeta zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes* in vrednosti D uporabljenih kombiniranih postopkov obdelave vzorcev svežega sira, je razvidno, da sta kombinirana uporaba visokih hidrostatskih tlakov in timijanovega izvlečka vzajemno vplivala na inaktivacijo bakterij *L. monocytogenes* v svežem siru. Učinek se je povečeval s povečanjem tlakov, kar je bilo v skladu z našimi pričakovanji, čeprav smo pričakovali večji kombinirani učinek inhibicije na bakterije *L. monocytogenes*.

Številne študije inhibicije bakterij *L. monocytogenes* s postopkom HHP so pokazale, da na občutljivost bakterij *L. monocytogenes* vpliva sestava in lastnosti uporabljenega živila (Patterson, 2005; Smelt, 1998; Martínez-Rodríguez in sod., 2012).

V našem poskusu so se bakterije *L. monocytogenes* v primerjavi z drugimi študijami (Karatzas in sod., 2000; Carminati in sod., 2004; Evert-Arriagada in sod., 2012; Hnosko in sod., 2012; Martínez-Rodríguez in sod., 2012; Tomasula in sod., 2014) izkazale kot zelo občutljive na visok hidrostatski tlak, zaradi česar smo v fazi predposkusov imeli kar nekaj težav, da smo ugotovili, v katerem tlačnem območju in časovnem intervalu je mogoče opazovati protimikrobni učinek uporabe HHP na bakterije *L. monocytogenes* v vzorcih svežega sira. V predposkusih, kjer smo inokulirane vzorce sira za 5 minut izpostavili tlakom 100, 200, 300, 400, 500 in 600 MPa (20 °C), smo opazili, da HHP do vključno 200 MPa ni imel bistvenega vpliva na inhibicijo bakterij *L. monocytogenes*; pri tlakih, višjih od 300 MPa, pa je prišlo do inhibicije bakterij *L. monocytogenes*, večje od 5 log. Podobna opažanja so zabeležili tudi Tholozan in sod. (2000), ki so preučevali kako HHP vpliva na zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes* v različnih pufrnih raztopinah. Kljub veliki občutljivosti bakterij *L. monocytogenes* na HHP je bila bakterija popolnoma inaktivirana šele, ko smo vzorce sira izpostavili HHP pri 600 MPa. To smo potrdili s poskusom revitalizacije bakterij *L. monocytogenes* v primarni obogatitvi gojišča Half-Fraser in nato v sekundarni obogatitvi gojišča Full-Fraser (ISO 11290-1, 2004). Do enake ugotovitve so prišli Tomasula in sod. (2014), ki so opazili popolno inhibicijo bakterij *L. monocytogenes* pri enakih pogojih (600 MPa, 5 min, 20 °C) v svežem siru Queso Fresco.

Učinek HHP je na bakterije *L. monocytogenes* v območju nizkih in srednje visokih tlakov večinoma bakteriostatičen, le redko baktericiden. To so ugotovili tudi Ritz in sod. (2001), López-Pedemonte in sod. (2003), Evert-Arriagada in sod. (2012) ter Hnosko in sod. (2012), ki so v svojih študijah opazili predvsem upočasnjeno rast bakterij *L. monocytogenes* po izpostavitvi HHP, kar ima velik pomen za podaljšanje mikrobiološke obstojnosti živil.

4.4.1 Vpliv pH na hitrost inhibicije HHP

Kljub podobnim rezultatom med našo in prej omenjenimi študijami pa je bila opazna razlika v hitrosti inhibicije bakterij *L. monocytogenes* pri podobnih pogojih HHP. Inaktivacija bakterij *L. monocytogenes* je bila v naši študiji bistveno hitrejša v primerjavi z rezultati študije, ki so jo izvedli Tomasula in sod. (2014), saj smo enake učinke dobili že pri uporabi 2-krat nižjih tlakov. Večjo učinkovitost HHP v naši študiji bi lahko pripisali nizkemu pH (4,67) svežega sira, ki se v primerjavi s študijo na siru Queso Fresco (pH 5,0) nahaja na spodnji meji rastnega območja bakterij *L. monocytogenes*. Če temu dodamo še morebitno znižanje pH svežega sira zaradi učinkovanja visokih tlakov (FDA, 2014), je lahko nizek pH v kombinaciji z visokimi tlaki glavni vzrok za povečano protimikrobno delovanje HHP na bakterije *L. monocytogenes* v našem poskusu. Martínez-Rodríguez in sod. (2012) so v svoji študiji opazovali protimikrobni učinek uporabe visokih hidrostatskih tlakov na bakterijah *L. monocytogenes* v siru Sainte Maure de Touraine (pH 4,7) in skorji sira Gorgonzola (pH 7,0), pri čemer so ugotovili, da je bila protimikrobna učinkovitost HHP na rast bakterij *L. monocytogenes* bistveno večja v siru z nižjim pH. Do podobnih dognanj so prišli tudi Gallot-Lavallee (1998) ter Tholozan in sod. (2000).

4.4.2 Vpliv a_w na hitrost inhibicije HHP

K učinkovitosti HHP na inaktivacijo bakterij *L. monocytogenes* v svežem siru je lahko prispevala tudi visoka vodna aktivnost, ki je v našem poskusu znašala 0,970. Vpliv HHP in vodne aktivnosti v siru na inaktivacijo bakterij *L. monocytogenes* so preučevali Morales in sod. (2006), ki so ugotovili, da so bile bakterije *L. monocytogenes* bistveno bolj dovzetne za tlačne spremembe v siru z višjo vodno aktivnostjo (a_w 0,983) kot v siru z nižjo vodno aktivnostjo (a_w 0,922). Pri nižji vodni aktivnosti se bakterijska celica skrči. Zaradi zmanjšanja njene površine je odpornejša na visok tlak, poveča pa se tudi debelina celične membrane, ki dodatno vpliva na zaščito bakterijskih celic (Smelt, 1998; Martínez-Rodríguez in sod., 2012).

4.4.3 Vpliv matriksa živila na hitrost inhibicije HHP

Možnosti uporabe kombinacije HHP in rastlinskih izvlečkov v modelnem živilu je novo in še ne povsem raziskano področje zagotavljanja varnosti hrane. Espina in sod. (2013) so preučevali delovanje HHP in različnih rastlinskih izvlečkov na različne mikroorganizme v sadnem soku. Pri tem so ugotovili, da ima uporaba visokih tlakov ob dodatku rastlinskih izvlečkov pri koncentraciji 0,02 % vol/vol v sadnem soku sinergijski učinek na protimikrobno delovanje proti številnim bakterijam, tudi proti *L. monocytogenes*. Ugotovili so, da je ob dodatku 0,02 % vol/vol izvlečka v sadnem soku mogoče uporabiti skoraj dvakrat nižji tlak, za doseganje enakega učinka inhibicije kot v vzorcih brez izvlečka, ki so bili obdelani s HHP. Razlog za izrazitejši sinergijski učinek protimikrobnega delovanja v

njihovi študiji se verjetno skriva v preprostejšem matriksu sadnega soka, saj ta praktično ne vsebuje proteinov in maščob, ki bi omejevali protimikrobno delovanje rastlinskih izvlečkov. V isti študiji so poročali tudi o vplivu nizkega pH na povečano inhibicijo rasti bakterij *L. monocytogenes* v soku, ko je bil ta obdelan s HHP, kar je skladno z ugotovitvami naše študije.

Karatzas in sod. (2000) so poročali o sinergijskem protimikrobnem delovanju uporabe HHP in dodatka karvakrola na bakterije vrste *L. monocytogenes* v bujonu BHI in pol posnetem mleku. Pri tem so ugotovili, da pride do opaznejšega sinergijskega učinka inhibicije ob uporabi višjih tlakov, kar je skladno z našimi ugotovitvami. V tej študiji so izpostavili bakterije *L. monocytogenes* v pol posnetem mleku tlakom od 50 do 300 MPa za 20 minut pri treh temperaturnih režimih (1, 8 in 20 °C), pri čemer je bila inhibicija bakterij *L. monocytogenes* v primerjavi z našo študijo bistveno manjša, po vsej verjetnosti zaradi višjega pH medija. V omenjeni študiji so opazili večji sinergijski učinek protimikrobnega delovanja po dodatku karvakrola v mleko, ki je bilo že obdelano s HHP. Razlog za večji protimikrobni učinek si lahko razlagamo kot posledico večje občutljivosti bakterijskih celic na TE zaradi poškodb povzročenih s HHP.

Čeprav se kombinacija dodatka TE in uporaba HHP v siru ni izkazala za tako uporabno metodo kot v študiji, ki so jo izvedli Karatzas in sod. (2000) na mleku ter Espina in sod. (2013) na sadnem soku, ta še vedno predstavlja alternativo klasičnim tehnologijam konzerviranja hrane, saj lahko ob pravem razmerju uporabe ene in druge metode dosežemo inaktivacijo bakterij *L. monocytogenes* brez poslabšanja kakovosti hrane.

4.5 VPLIV TE IN HHP NA SENZORIČNO KAKOVOST SIRA

Eden izmed ključnih ciljev v proizvodnji hrane je poleg zagotavljanja varnosti hrane tudi zagotavljanje njene senzorične kakovosti. Ker različne metode podaljšanja obstojnosti in zagotavljanja varnosti hrane različno vplivajo na njene senzorične lastnosti, je pomembno, da sprejemamo kompromise, ki ne bodo ogrozili ne varnostnih ne kakovostnih parametrov hrane.

4.5.1 Vpliv HHP na teksturo in barvo sira

Uporaba visokih hidrostatskih tlakov za zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes* se je v našem poskusu izkazala kot zelo učinkovita metoda za zagotavljanje mikrobiološke varnosti svežega sira, vendar je obdelava hkrati negativno vplivala na njegovo senzorično kakovost, ko je bil sveži sir izpostavljen tlaku, višjemu od 200 MPa. Najbolj opazni spremembi sta bili predvsem povečano odpuščanje sirotke in pojav grudičaste strukture sira, kot posledica denaturacije proteinov. S povečanjem tlaka se je obseg strukturnih sprememb sira le še stopnjeval. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Van Hekken in sod. (2013), ki so opazili denaturacijo proteinov in povečano izločanje sirotke pri tlakih, višjih

od 200 MPa, pri čemer je bilo odpuščanje sirotke izrazitejše pri višjih temperaturah obdelave s HHP.

Pojav prvih strukturnih sprememb v svežem siru je sovpadal s prvo zaznavo inhibicije rasti bakterij *L. monocytogenes*. Tlak, ki povzroči denaturacijo proteinov v siru, povzroči tudi denaturacijo proteinov v membrani bakterijske celice, kar vpliva na moteno delovanje bakterij in upočasni njihovo rast (Abe, 2007).

Sprememba strukture sira zaradi uporabe HHP se je v primerjavi z drugimi študijami pojavila pri uporabi nekoliko nižjih tlakov verjetno zaradi relativno nizkega pH, ki je pospešil denaturacijo proteinov v samem siru. Iz naših opazovanj sklepamo, da je kombinacija uporabe HHP in dodatkov, ki na rast mikroorganizmov vplivajo zaviralno, nujna, da bi zagotovili varnost in hkratno senzorično sprejemljivost hrane. Tega mnenja so bili tudi Sofos in sod. (1998).

Pri vzorcih, ki so bili obdelani s tlaki, višjimi od 400 MPa, smo opazili tudi spremembo barve sira iz bele v rahlo rumenkasto. Podobne spremembe so bile opažene tudi v drugih študijah (Sandra in sod., 2004; Evert-Arriagada in sod., 2012; Van Hekken in sod., 2013). Pojav spremembe barve sira ima več teorij. Saldo in sod. (2001) so rumenkasto barvo sira, ki je bil obdelan s HHP, pripisali mikrostrukturnim spremembam sira, medtem ko so Juan in sod. (2008) pojav pripisali spremembi strukture proteinov, Johnston in Darcy (2000) pa sta v svojem poskusu spremembo barve sira pripisala spremembi porazdelitve vode v siru, ki jo je povzročil visok tlak.

4.5.2 Vpliv TE na okus sira

Na senzorično kakovost sira je vplivala tudi količina dodanega timijanovega izvlečka. V preglednici 10 so podani rezultati senzoričnega ocenjevanja vpliva različnih frakcij TE in njihovih koncentracij v svežem siru.

Preglednica 10: Ocene senzoričnega ocenjevanja sira po dodatku različnih frakcij TE.

0,20 % vol/ut TE	S40300	S45300	S40400	S45400
Okus	2,2 ± 0,4	4,7 ± 0,5	4,3 ± 0,7	3,9 ± 0,7
Barva	3,8 ± 0,6	4,9 ± 0,3	4,4 ± 0,5	4,1 ± 0,6
Grenak pookus	Rahlo prisoten	Odsoten	Šibek	Odsoten
Pekoč pookus	Rahlo prisoten	Odsoten	Šibek	Odsoten
Sprejemljivost	3,0 ± 0,4	4,8 ± 0,5	4,3 ± 0,6	4,0 ± 0,8
0,30 % vol/ut TE	S40300	S45300	S40400	S45400
Okus	1,9 ± 0,2	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,2	1,9 ± 1,0
Barva	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,5 ± 0,6
Grenak pookus	Prisoten	Rahlo prisoten	Šibek	Rahlo prisoten
Pekoč pookus	Rahlo prisoten	Šibek	Rahlo prisoten	Šibek
Sprejemljivost	2,5 ± 0,4	3,1 ± 0,6	2,9 ± 0,6	2,7 ± 0,8
0,45 % vol/ut TE	S40300	S45300	S40400	S45400
Okus	1,1 ± 0,2	2,1 ± 0,4	2,0 ± 0,2	1,5 ± 0,6
Barva	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,4	3,1 ± 0,4	3,5 ± 0,2
Grenak pookus	Zelo grenek	Grenek	Zelo grenek	Grenek
Pekoč pookus	Močan	Prisoten	Močan	Prisoten
Sprejemljivost	2,1 ± 0,3	3,0 ± 0,5	2,5 ± 0,2	2,4 ± 0,4

S40300 – frakcija izvlečka timijana pridobljenega v separatorju S40 pri 300 MPa;

S45300 – frakcija izvlečka timijana pridobljenega v separatorju S44 pri 300 MPa;

S40400 – frakcija izvlečka timijana pridobljenega v separatorju S40 pri 400 MPa;

S45400 – frakcija izvlečka timijana pridobljenega v separatorju S45 pri 400 MPa;

TE – izvleček timijana

Rezultati senzoričnega ocenjevanja so pokazali, da sta bili frakciji izvlečka timijana S40300 in S40400 senzorično manj sprejemljivi kot frakciji S45300 in S45400 pri enaki koncentraciji izvlečka v vzorcih svežega sira. Splošna ocena zgornje meje sprejemljivosti izvlečka v svežem siru, ki jo je podal panel, je bila 0,2 % vol/vol TE. Ker je ta koncentracija izvlečka pokazala tudi rahel zaviralni učinek na rast bakterij *L. monocytogenes* v vzorcih sira, smo to koncentracijo izvlečka uporabili v kombinaciji s HHP.

Senzorična sprejemljivost rastlinskih izvlečkov in njihovih koncentracij je odvisna od vrste izvlečka, načina njihovega pridobivanja in predvsem samega živila, kateremu dodamo rastlinske izvlečke. Poslabšanje senzorične kakovosti sira ob dodatku timijanovega izvlečka so v svoji raziskavi opazili tudi Smith-Palmer in sod. (2001).

Študije so pokazale, da lahko mesu dodamo večjo količino rastlinskega izvlečka kot siru. Tsigarida in sod. (2000) so ugotovili, da dodatek 0,8 % vol/vol TE ne poslabša senzorične

sprejemljivosti govejega mesa, medtem ko sta Skandamis in Nychas (2001) ugotovila, da dodatek 1 % vol/vol izvlečka origana ne poslabša senzorične kakovosti mletega govejega mesa po hladnem skladiščenju.

Uporaba rastlinskih izvlečkov je v primerjavi z rdečim mesom precej bolj omejena, ko jih želimo uporabiti v mesu rib. Mejlholm in Dalgaard (2002) sta ugotovila, da je meso polenovk senzorično sprejemljivo ob dodatku timijanovega izvlečka do koncentracije 0,05 % vol/ut TE. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Harpaz in sod. (2003). Senzorična sprejemljivost rib z dodatkom rastlinskih izvlečkov se je po skladiščenju pri temperaturah hladilnika poslabšala, kar je v nasprotju s študijo, ki sta jo Skandamis in Nychas (2001) izvedla na mletem govejem mesu.

Da bi se izognili negativnim senzoričnim učinkom rastlinskih izvlečkov, so nam na voljo različne alternative. Ena od možnosti je uporaba rastlinskih izvlečkov ne le kot konzervansov, temveč tudi kot sestavine okusa, zlasti v sirih, v katere so vključene začimbe za izboljšanje arome sirov. Po drugi strani bi bili lahko rastlinski izvlečki vključeni v živilske izdelke, ki imajo že sami po sebi močan okus, ki lahko prekrije okus dodanega izvlečka. Tretja možnost bi bila uporaba samo protimikrobno najučinkovitejših spojin, kar lahko predstavlja določene omejitve predvsem glede zakonodaje, povečala pa bi se tudi možnost razvoja rezistence bakterij na posamezno protimikrobno učinkovino. Da bi se izognili neželenim senzoričnim spremembam, lahko kombiniramo uporabo rastlinskih dodatkov z drugimi protimikrobnimi učinkovinami ali fizikalnimi metodami zaviranja rasti mikroorganizmov, kot je uporaba visokih hidrostatskih tlakov (Smith-Palmer in sod., 2001; Burt, 2004).

Uporaba HHP se je izkazala kot zelo uspešna metoda konzerviranja, ki pa je imela v višjih tlačnih območjih negativen vpliv na senzorične lastnosti svežega sira. Kljub temu metoda obljublja dobre rezultate na številnih vrstah zorjenih sirov, katerim lahko pospeši proces zorenja, izboljša njihovo strukturo in senzorično kakovost (Huang in sod., 2014).

Druga smer iskanja večje uporabnosti takšnega načina konzerviranja so živila z manjšo vsebnostjo maščob, saj le-te močno zmanjšajo antibakterijsko učinkovitost rastlinskih izvlečkov.

5 SKLEPI

- Spremembe tlačnih parametrov pri pridobivanju timijanovega izvlečka s superkritično tekočinsko ekstrakcijo z ogljikovim dioksidom, so imele rahel vpliv na protimikrobno učinkovitost frakcij TE. Večje razlike so bile v izkoristku pridobivanja TE, in sicer 0,43 % ut/ut pri SFE pri 30 MPa in 0,71 % ut/ut pri SFE pri 40 MPa. Razlike smo opazili tudi v fizikalnih lastnosti različnih frakcij TE, vključno z njihovo hidrofbnostjo. Ta ima pomemben vpliv na protimikrobno delovanje TE, zlasti v živilih z veliko vsebnostjo maščob.
- Učinek timijanovega izvlečka na zaviranje rasti bakterij vrste *L. monocytogenes* je bil v modelnem živilu bistveno slabši kot v mikrobiološkem mediju (bujonu BHI), kar je bilo v skladu z našimi pričakovanji.
- Kombinirana uporaba hidrostatskega tlaka in dodatka timijanovega izvlečka je imela na bakterije vrste *L. monocytogenes* v svežem siru močnejši protimikrobni učinek kot uporaba posamezne metode. Protimikrobni učinek kombinirane uporabe obeh metod se je povečal pri uporabi višjih tlakov, kljub temu pa bistvenega sinergijskega učinka inhibicije bakterij vrste *L. monocytogenes* v primerjavi z ostalimi študijami nismo opazili.
- Kombinirana uporaba hidrostatskega tlaka in dodatka timijanovega izvlečka se je izkazala kot protimikrobno učinkovita metoda, ki pa je imela ob pretirani uporabi negativen vpliv na senzorično kakovost svežega sira.

6 POVZETEK

Zagotavljanje mikrobiološke neoporečnosti hrane je eden najpomembnejših varnostnih parametrov v živilski industriji. Zaradi črevesnih bolezni letno zboli več milijonov ljudi po vsem svetu. Listerioza je bolezen, ki jo povzroča bakterija *Listeria monocytogenes* in je zaradi njene visoke umrljivosti ena izmed najresnejših, s hrano prenosljivih bolezni.

Čeprav živilska industrija poskuša s pomočjo dodatnih postopkov predelave izboljšati mikrobiološko varnost hrane, si potrošniki želijo vse manj predelane hrane z manjšo vsebnostjo konzervansov, kar povečuje razhajanje med zagotavljanjem varnosti hrane in željami potrošnikov. Da bi ustregli potrošnikovim željam in hkrati zagotovili varnost hrane, nam uvedba "zelenih" tehnologij, kot sta uporaba rastlinskih izvlečkov in visokih hidrostatskih tlakov (HHP), omogočata alternativno rešitev za obstoječo problematiko.

V naši študiji smo s pomočjo superkritične tekočinske ekstrakcije (SFE) iz posušenih delov timijana (*Thymus vulgaris* L.) pridobili različne frakcije izvlečka timijana (TE), katerih protimikrobno učinkovitost na bakterije vrste *L. monocytogenes* smo medsebojno primerjali v bujonu BHI. Najprimernejšo frakcijo, ki smo jo izbrali na podlagi njene protimikrobne učinkovitosti in topnosti, smo kasneje uporabili v vzorcih svežega sira.

Ugotovili smo, da so frakcije TE, pridobljene pri višjih tlakih, v bujonu BHI protimikrobno učinkovitejše, prav tako pa uporaba višjih tlakov prispeva k boljšemu izkoristku same ekstrakcije. Opazili smo tudi, da se protimikrobna učinkovitost frakcij TE v bujonu BHI povečuje z naraščanjem njihove hidrofobnosti, med tem ko je v svežem siru, zaradi prisotnosti mlečne maščobe, protimikrobna učinkovitost frakcij TE obratno sorazmerna z naraščanjem njihove hidrofobnosti.

Vzorcem sira, ki smo jim dodali različne koncentracije frakcij TE, smo določili senzorično sprejemljivost. Za senzorično najsprejemljivejšo frakcijo TE smo določili S45300 do koncentracije 0,2 % vol/vol. Sveži sir z dodatkom S45300 pri koncentraciji 0,2 % vol/vol smo izpostavili različno visokim tlakom, pri čemer smo opazovali skupen protimikrobni učinek TE in HHP na rast bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Ugotovili smo, da TE in HHP vzajemno delujeta na zaviranje rasti bakterij *L. monocytogenes*, vendar se kmalu po opaženem protimikrobnem učinku v siru pojavijo senzorične spremembe. Pri tlaku, večjem od 200 MPa, sta se vzorcem sira spremenili tekstura in barva. Spremembe so se kazale v večji sinerezi, pojavu grudičaste strukture in rumenkaste obarvanosti sira. Omenjene spremembe so se stopnjevale z višanjem tlaka.

Ker imata obe metodi s senzoričnega vidika svoje omejitve glede njune uporabe, je potrebno, da se kombinacijo obeh tehnologij uporabi v tolikšnem obsegu, da bo skupni protimikrobni učinek obeh tehnologij večji od vsote njunih posameznih učinkov in da ta ne bo poslabšal senzorične kakovosti svežega sira.

7 VIRI

- Abe F. 2007. Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology, and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71, 10: 2347-2357
- Balachandran S., Kentish S. E., Mawson R. 2006. The effects of both preparation method and season on the supercritical extraction of ginger. *Separation and Purification Technology*, 48, 2: 94–105
- Bartlett, D. H. 2002. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595, (1/2): 367–381
- Bem Z., Žlender B., Savić I. 2003. Podaljšanje obstojnosti živil. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 255–288
- Block S. S. 2000. Disinfection, sterilization and preservation. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: 1504 str.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 3: 223–253
- Carminati D., Gatti M., Bonvini B., Neviani E., Muchetti G. 2004. High-pressure processing of Gorgonzola cheese: influence on *Listeria monocytogenes* inactivation and on sensory characteristics. *Journal of Food Protection*, 67, 8: 1671–1675
- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. 1995. Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82: 181–185
- CLSI M07-A9. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 9th ed. Vol. 32, no. 2. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute: 69 str.
- Coelho M. C., Silva C. C. G., Ribeiro S. C., Dapkevicius M. L. N. E., Rosa H. J. D. 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 191: 53–59
- Council Directive 92/46/EEC of 16 June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk and milk-based products. 1992. Official Journal of European Union, L268: 1–31

- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4: 567–582
- da Silva R P.F.F., Rocha-Santos T A.P., Duarte A. C. 2016. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 76: 40–51
- de Carvalho R. J., de Souza G. T., Honório V. G., de Sousa J. P., da Conceição M. L., Maganan, M., de Souza E. L. 2015. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology*, 52: 59–65
- EFSA. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2010. *EFSA Journal*, 10, 3: 2597, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2597: 442 str.
- Espina L., García-Gonzalo D., Laglaoui A., Mackey B.M., Pagán R. 2013. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 1: 23–30
- Evert-Arriagada K., Hernández-Herrero M. M., Juan B., Guamis B., Trujillo A. J. 2012. Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. *Journal of Food Engineering*, 110, 2: 248–253
- FDA. 2014. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies - High pressure processing. Silver Spring, U.S. Food and Drug Administration: 20 str. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm101456.htm> (Oktober, 2015)
- Fornari T., Ruiz-Rodriguez A., Vicente G., Vázquez E., García-Risco M. R., Reglero G. 2012. Kinetic study of the supercritical CO₂ extraction of different plants from *Lamiaceae* family. *Journal of Supercritical Fluids*, 64: 1–8
- Friedman M., Henika P. R., Mandrell R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65, 10: 1545–1560
- Gadotti C., Nelson L., Diez-Gonzalez F. 2014. Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. *Food Microbiology*, 39: 1–6
- Gallot-Lavalée T. 1998. Efficiency of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in goat cheese from raw milk. *Sciences des Aliments*, 18, 6: 647–655

- García-Risco M.R., Hernández E.J., Vicente G., Fornari T., Senoráns F.J., Reglero G. 2011. Kinetic study of pilot-scale supercritical CO extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, 55, 3: 971–976
- Graves L. M., Swaminathan B., Hunter S.B. 1999. Subtyping *Listeria monocytogenes*. V: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 2nd ed. Ryser E. T., Marth E.H. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 280–292
- Harpaz S., Glatman L., Drabkin V., Gelman A. 2003. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater- reared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). *Journal of Food Protection*, 66, 3: 410–417
- Hnosko J., San Martin-Gonzalez M. F., Clark S. 2012. High pressure processing inactivated *Listeria innocua* yet compromises Queso Fresco crumbling properties. *Journal of Dairy Science*, 95, 9: 4851–4862
- Huang H. W., Lung H. M., Yang B. B., Wang C. Y. 2014. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40, 1: 250–259
- Hugas M., Garriga M., Monfort J. M. 2002. New mild technologies in meat processing: High pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 3: 359–371
- ISO 11290-1. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*; Part 1: Detection method. Amendment 1, Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data: 13 str.
- ISO 11290-2. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method: 20 str.
- ISO 6887-1.1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions: 5 str.
- Ivanović J., Mišić D., Zizović I., Ristić M. 2012. In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control*, 25, 1: 110–116
- Johnston D.E., Darcy P.C. 2005. The effects of high pressure treatment on immature mozzarella cheese. *Milchwissenschaft*, 55: 617–620

- Jordan S. L., Pascual C., Bracey E., Mackey B. M. 2001. Inactivation and injury of pressure-resistant strains of *Escherichia coli* 0157 and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 3: 463–469
- Juan B., Ferragut V., Guamis B., Trujillo A. 2008. The effect of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 18, 2: 129–138
- Juven B. J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 6: 626–631
- Karatzas A.K., Kets E.P.W., Smid E.J., Bennik M.H.J. 2001. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 3: 463–469
- Lake R., Hudson A., Cressey P., Gilbert S. 2005. Risk profile: *Listeria monocytogenes* in soft cheeses. Christchurch, Institute of Environmental Science & Research Limited, Christchurch Science Centre: 95 str.
http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risk_Profile_Listeria_Monocytogenes_Soft-Science_Research.pdf (November, 2005)
- Larson A.E., Lee O. A., Schunn P. 1996. Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 2/3: 195–207
- Lis-Balchin M., Deans S. G. 1997. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 6: 759–762
- López-Pedemonte T. J., Roig-Sagués A. X., Trujillo A. J., Capellas M., and Guamis B. 2003. Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science*, 86, 10: 3075–3081
- Martínez-Rodríguez Y., Acosta-Muñiz C., Olivas G.I., Guerrero-Beltrán J., Rodrigo-Aliaga D., Sepúlveda D.R. 2012. High hydrostatic pressure processing of cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 4: 399–416
- Mazzarrino G., Paparella A., Chaves-Lopez C., Sergi M., Sigismondi C., Compagnone D., Faberi A., Serio A. 2015. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50: 794–803
- Mejlholm O., Dalgaard P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 1: 27–31

- Mendoza-Yepes M.J., Sanchez-Hidalgo L.E., Maertens G., Marin-Iniesta F. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*, 17, 1: 47–55
- Mihalcea L. 2009. Supercritical fluids and supercritical fluid extraction: CO₂ extraction laboratory plant from university Dunarea de Jos din Galați. Galați, Faculty of Food Science and Engineering, Dunarea de Jos University of Galați: 3 str. (osebno gradivo)
- Morales P., Calzada J., Rodriguez B., de Paz M., Gaya P., Nunez M. 2006. Effect of cheese water activity and carbohydrate content on the barotolerance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 69, 6: 1328–1333
- Mújica-Paz H., Valdez-Fragoso A., Samson C. T., Welti-Chanes J., Torres J. A. 2011. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food Bioprocess and Technology*, 4: 969–985
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 5: 414–420
- Patterson M. F. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 6: 1400–1409
- Pokeržnik N. 2013. Porozni zamreženi polistireni iz emulzij in miniemulzij. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru: 74 str.
- Rasanayagam V., Balasubramaniam V.M., Ting E., Sizer C.E., Bush C., Anderson C. 2003. Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science*, 68, 1: 254–259
- Remmal A., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A., Ettayebi M. 1993. Inhibition of antibacterial activity of essential oils by Tween 80 and ethanol in liquid medium. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 48, 5: 352–356
- Reverchon E., De Marco I. 2006. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 2: 146–166
- Ritz M., Tholozan J. L., Federighi M., Pilet M.F. 2001. Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5: 2240–2247

- Rocourt J. 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. V: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 2nd ed. Ryser E. T., Marth E. H. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 1–20
- Ryser E. T. 1999. Foodborne listeriosis. V: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 2nd ed. Ryser E. T. and Marth E.H. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 299–303
- Saldo J., Sendra E., Guamis B. 2001. Hard cheese structure after a high hydrostatic pressure treatment at 50 MPa for 72 h applied to cheese after brining. *Lait*, 81, 5: 625–635
- Sandra S., Stanford M. A., Meunier Goddik L. 2004. The use of high-pressure processing in the production of Queso Fresco cheese. *Journal of Food Science*, 69, 4: 153–158
- Santurio D. F., Kunz de Jesus F.P., Zanette R.A., Bizzi Schlemmer K., Fraton A., Martins Fries L.L. 2014. Antimicrobial activity of the essential oil of thyme and of thymol against *Escherichia coli* strains. *Acta Scientiae Veterinariae*, 42, 1234: 4 str: <http://www.ufrgs.br/actavet/42/PUB%201234.pdf> (Marec, 2015)
- Simandi B., Oszagyan M., Lemberkovics E., Kery A., Kaszacs J., Thyron F., Matyas T. 1998. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. *Food Research International*, 31, 10: 723–728
- Skandamis P.N., Nychas G.-J.E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 6: 1011–1022
- Smelt J. P. P. M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 4: 152–158
- Smid E.J., Gorris L.G.M. 1999. Natural antimicrobials for food preservation. V: *Handbook of Food Preservation*. Rahman M.S. (ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 285–308
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 18, 4: 463–470
- Sofos, J. N., L. R. Beuchat, P. M. Davidson, and E. A. Johnson. 1998. Naturally occurring antimicrobials in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28, 2: 71–72
- Tajkarimi M.M., Ibrahim S. A., Cliver D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 9: 1199–1218

- Tholozan J. L., Ritz M., Jugiau F., Federighi M., Tissier J. P. 2000. Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 2: 202–212
- Tomasula P. M., Renye J. A., Van Hekken D. L., Tunick M. H., Kwoczak R., Toht M., Leggett L. N., Luchansky J.B., Porto-Fett A. C., Phillips, J. G. 2014. Effect of high-pressure processing on reduction of *Listeria monocytogenes* in packaged Queso Fresco. *Journal of Dairy Science*, 97, 3: 1281–95
- Tsigarida E., Skandamis P., Nychas G. J.E., 2000. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 6: 901–909
- Ultee A., Bennink M.H.J., Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 1561–1568
- Van Hekken D. L., Tunick M. H., Farkye N. Y., Tomasula P. M. 2013. Impact of hydrostatic high-pressure processing on the chemical, functional, and rheological properties of starter-free Queso Fresco. *Journal of Dairy Science*, 96, 10: 6147–6160
- Weinsetel N. A. 2006. Antimicrobial action of selected plant-derived compounds against *Listeria monocytogenes*. Retrospective Theses and Dissertations. Ames, Department of Food Science and Human Nutrition, Iowa State University: 129 str.
- Zeković Z., Lepojevid Z., Vujić Dj. 2000. Supercritical extraction of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Chromatographia*, 51, 3: 175–179

ZAHVALA

*"Izobraževanje ni
priprava na življenje;
Izobraževanje je
življenje samo"*

(John Dewey)

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Sonji Smole Možina, ter svoji delovni mentorici na univerzi gostiteljici, gospe prof. dr. Danieli Borda, za strokovno vodenje, pomoč in nasvete pri pripravi magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Lei Demšar za natančen in strokoven pregled magistrskega dela.

Posebna zahvala gre tudi doktorandki Eleni-Alexandri Oniciuc za njen pozitivizem in nesebično pomoč pri izvedbi poskusov.

Iskreno se bi rad zahvalil vsem članom naše delovne ekipe, ki so jo sestavljali dr. Iulia Bleoancă, dr. Liliana Mihalcea in prof. dr. Anca Ioana Nicolau ter vsem, ki so kakorkoli prispevali k našemu delu in nastajanju znanstvene objave v reviji IFSET. Bilo mi je v užitek sodelovati z vami in hvala vam, da ste me tako lepo sprejeli medse.

Hvala tudi vam, dragi prijatelji in sošolci, za moralno podporo in vse dragocene trenutke, ki smo jih preživeli izza in izven klopi. Če bi lahko, bi šel čez vse še enkrat.

Rad bi se zahvalil tudi svoji družini za vzpodbudo in finančno pomoč v času mojega študija, ter prijateljici Miruni za vso pomoč in podporo.

In nenazadnje, hvala programu mobilnosti Erasmus+ za omogočeno štirimesečno študijsko izmenjavo na Univerzi Dunărea de Jos din Galați v Romuniji.

ACKNOWLEDGEMENTS

*"Education is not
preparation for life;
Education is
life itself"*

(John Dewey)

My sincere thanks go to my thesis coordinator, prof. dr. Sonja Smole Možina, as well as to my working mentor at the host university, prof. dr. Daniela Borda, for professional guidance, help and the pieces of advice for the work on my thesis.

I would like to thank the reviewer, prof. dr. Lea Demšar, for the precise and professional review of my thesis.

Special thanks to PhD student Elena-Alexandra Oniciuc for her positivism and unselfish assistance at laboratory trials.

I would like to express my sincere thanks and deep appreciation to our whole team, to dr. Iulia Bleoancă, dr. Liliana Mihalcea, prof. dr. Anca Ioana Nicolau, as well as to anyone whose contribution has finally lead to the consolidation of the scientific publication in IFSET journal. It was a pleasure to cooperate with you and thank you for the warm and open welcome in your midst.

Thank you, my dear friends and schoolmates for your moral support and for all the precious moments we spent behind and out of the student desks. If I could, I would go through everything again.

I would like to thank my family for the encouragement and for the financial help provided during my study and my friend Miruna for all her help and support.

Last but not least, thanks to the Erasmus+ Mobility Programme for the opportunity of pursuing the four-month student exchange within the host University Dunărea de Jos din Galați in Romania.