

56. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022

ANTIOKSIDATIVNI IN ANTIMIKROBNI UČINEK EKSTRAKTOV OLUPKA GRANATNEGA JABOLKA

Raziskovalno področje: INTERDISCIPLINARNO (KEMIJA IN BIOLOGIJA)

Raziskovalna naloga

Šola: II. gimnazija Maribor

Avtor: Vid Bauman

Mentorici: Katja Andrina Kravanja, Darja Kravanja

Maribor, april 2022

KAZALO

KAZALO SLIK.....	III
KAZALO TABEL	IV
POVZETEK	1
ABSTRACT	1
ZAHVALA.....	2
1. UVOD	3
1.1 NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE	3
1.2. HIPOTEZE.....	4
2. TEORETIČNO OZADJE	5
2.1 O GRANATNEM JABOLKU.....	5
2.2 OKSIDATIVNI DEJAVNIKI	5
2.2.1 Prosti radikali	6
2.2.2 Antioksidanti	6
2.3. ZDRAVILNE UČINKOVINE V GRANATNEM JABOLKU	7
2.3.1 Fenolne spojine.....	8
2.3.2 Flavonoidi.....	8
2.3.3 Antocianidini	9
2.4 ORGANIZMI UPORABLJENI PRI MIKROBIOLOŠKIH RAZISKAVAH.....	9
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	9
2.4.2 <i>Bacillus cereus</i>	10
2.4.3 Pozitivnost/negativnost po Gramu.....	11
3. MATERIAL IN METODE	12
3.1 VZORCI.....	12
3.2 TOPILA	12
3.3 REAGENTI	12
3.4 APARATURE.....	13
3.5 EKSTRAKCJA.....	13
3.5.1 Soxhlet.....	14
3.5.3 Hladna maceracija.....	16
3.5.2 Ultrazvočna ekstrakcija.....	17
3.5.4 Uparjanje z rotavaporjem	18
3.5.5 Izračuni izkoristka ekstrakcije.....	20
3.6 ANALIZE EKSTRAKTOV	21
3.6.1 Preverjanje antioksidativnih lastnosti	21
3.6.2 Preverjanje protimikrobnih učinkov	26
4. REZULTATI.....	28
4.1 EKSTRAKCIE	28
4.1.1 Soxhlet.....	28
4.1.2 Hladna maceracija.....	29
4.1.3 Ultrazvočna ekstrakcija.....	30
4.2 ANALIZE	30
4.2.1 Določanje antioksidativne aktivnosti z radikalno metodo (DPPH)	30

4.2.2 Določanje vsebnosti totalnih fenolov	31
4.2.3 Določanje vsebnosti proantocianidinov.....	33
4.2.4 Določanje protimikrobnih lastnosti	34
5. INTERPRETACIJA REZULTATOV.....	35
6. ZAKLJUČEK	38
7. DRUŽBENA ODGOVORNOST	38
8. PRILOGE	39
8.1 PRILOGA 1	39
8.2 PRILOGA 2	40
8.3 PRILOGA 3	41
8.4 PRILOGA 4	42
9. BIBLIOGRAFIJA	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Reakcije antioksidanta z radikalom (<a).....<="" a="" href="https://www.researchgate.net/profile/Arobindo-Chatterjee/publication/287402598/figure/fig2/AS:318418801709057@1452928366361/React-ion-mechanism-for-antioxidant-activity.png">	7
Slika 2: Kemijska struktura fenola (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8b/Phenol2.svg/80px-Phenol2.svg.png).....	8
Slika 3: Z elektronskim mikroskopom slikane bakterije E. coli (https://media.nationalgeographic.org/assets/photos/250/947/bccaadcd-afa3-4e49-b208-40d78e8aad5b.jpg).	9
Slika 4: Z elektronskim mikroskopom slikane bakterije B. cereus (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/57/Bacillus_cereus_SEM-cr.jpg/220px-Bacillus_cereus_SEM-cr.jpg)	10
Slika 5: Soxhlet priprava (https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-B9780128137451000052-f05-15-9780128137451.jpg)	15
Slika 6: Celotna Soxhlet priprava (lastni vir)	15
Slika 7: Vodna kopel (lastni vir)	15
Slika 8: Hladna maceracija (lasten vir)	17
Slika 9: Ultrazvočna kopel (https://www.researchgate.net/publication/328641788/figure/fig1/AS:687864857763843@1541011170652/Schematic-diagram-of-ultrasonic-bath.jpg)	18
Slika 10: Shema rotavaporja (https://www.researchgate.net/profile/Anita-Schnyder/publication/238661273/figure/fig19/AS:669469709967398@1536625425779/Rotary-evaporator-apparatus-for-evaporating-off-organic-solvents-The-evaporator-consists.ppm)	19
Slika 11: Rotavapor (lastni vir)	20

Slika 12: Nevtralizacija prostega radikala DPPH ob prisotnosti antioksidanta (https://www.researchgate.net/profile/Kunal-Dhiman/publication/283377931/figure/fig1/AS:647104376614916@1531293114857/Structure-of-DPPH-and-its-reduction-by-an-antioxidant.png).....	22
Slika 13: Merilne bučke z ekstrakti (levo), vzorci z DPPH (desno) (lastni vir).....	23
Slika 14: Redukcija Folin-Ciocalteu reagenta (https://www.researchgate.net/profile/Lauren-Ford-4/publication/334084142/figure/fig1/AS:774696786227200@1561713515424/Diagram-showing-the-reduction-of-the-Folin-Ciocalteu-reagent-caused-by-the-oxidation-of.png).....	24
Slika 15: Viale z vzorci in reagenti za določanje totalnih fenolov (lastni vir)	24
Slika 16: Vzorci z železovim sulfatom v vodni kopeli (lastni vir)	25
Slika 17: Vzorci po ohlajanju (lastni vir)	26
Slika 18: Petrijevke s kulturami in z diskri z ekstrakti	27
Slika 19: Grafikon izkoristka Soxhlet ekstrakcije	29
Slika 20: Grafikon izkoristka hladne maceracije	29
Slika 21: Grafikon izkoristka ultrazvočne ekstrakcije	30
Slika 22: Umeritvena premica galne kisline	31
Slika 23: Inkubirana petrijevka kulture <i>B. cereus</i>	34
Slika 24: Inkubirana petrijevka kulture <i>E. coli</i>	34

KAZALO TABEL

Tabela 1: Znanstvena klasifikacija bakterije Escherichie coli.....	10
Tabela 2: Znanstvena klasifikacija bakterije <i>B. cereus</i>	10
Tabela 3: Izkoristki vseh ekstrakcij	28
Tabela 4: Absorbance in inhibicija radikalov za posamezne ekstrakcijske metode	31
Tabela 5: Izračunane vrednosti pri analizi TF	31
Tabela 6: Rezultati analize vsebnosti PAC v ekstraktih	34
Tabela 7: Podatki o ekstrakcijah.....	39
Tabela 8: Podatki o določanju vsebnosti TF v ekstraktih.....	40
Tabela 9: Podatki o vsebnosti PAC v ekstraktih.....	41
Tabela 10: Podatki o odstopanju robov inhibicijskih con od diskov pri mikrobioloških analizah	42

POVZETEK

Namen raziskovalne naloge je bil z različnimi konvencionalnimi in nekonvencionalnimi ekstrakcijskimi metodami iz olupka granatnega jabolka ekstrahirati snovi z antioksidativnimi in antimikrobnimi lastnostmi, jih analizirati in ugotoviti, ali bi pridobljeni ekstrakti zaradi vsebnosti fenolnih spojin lahko bili uporabni v medicini kot alternativa sintetičnim zdravilom. S tremi ekstrakcijskimi metodami (Soxhlet, ultrazvočna ekstrakcija in hladna maceracija) ter tremi različnimi topili smo pripravili devet ekstraktov in jih analizirali s spektrofotometričnimi metodami (DPPH, totalni fenoli in proantocianidini). Ugotovili smo visoko vsebnost proantocianidinov in močne antioksidativne učinke snovi v ekstraktih. Antimikrobni učinek smo merili z difuzijsko metodo z diskami. Analize so pokazale protimikrobnoučinkovitost proti Gram pozitivnim bakterijam (*Bacillus cereus*).

Ključne besede: granatno jabolko, ekstrakcije, polifenoli, antioksidanti, protimikrobnaučinkovitost

ABSTRACT

The aim of this research was to extract substances with antioxidant and antimicrobial properties from pomegranate peels using various conventional and unconventional extraction methods, analyse the extracts obtained, and determine whether they can be used as an alternative to synthetic drugs in medicine, as they are an excellent source of phenolic compounds. Nine extracts were prepared using three extraction methods (Soxhlet, ultrasonic extraction and cold maceration) and three different solvents and analysed by spectrophotometric methods (DPPH, determination of total phenols and proanthocyanidins). We found a high content of proanthocyanidins and a strong antioxidant effect of the substances in the extracts. The antimicrobial activity was measured by the disc diffusion method. The results show successful antimicrobial activity against Gram positive bacteria (*Bacillus cereus*).

Keywords: pomegranate, extractions, polyphenols, antioxidants, antimicrobial activity

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentoricama za strokovno vodstvo pri izvedbi ekstrakcij, antioksidativnih in protimikrobnih analiz ter pri pisanju naloge. Hvala tudi osebju v laboratorijih, da ste nam omogočili uporabo laboratorijske opreme. Hvala za ves vložen čas in trud.

1. UVOD

Radikali so snovi, ki imajo neparno število elektronov in so zato visoko reaktivni. Prosti radikali lahko v človeškem telesu v povišanih količinah z naključnimi reakcijami celicam škodijo in povzročijo mutacije ali trajne posledice za organizem. Prekomerno nastajanje prostih radikalov znižujemo z antioksidanti, ki jih zaužijemo. Izsledki dosedanjih raziskav kažejo, da ti zavirajo razvoj nekaterih bolezni in imajo zato velik potencial v zdravstvu (Kočevar Glavač., 2013, 512).

Granatno jabolko se uporablja v medicini, pigmentni industriji in kozmetični industriji. Večinoma se uporablja semena v plodu, olupek pa se zavrže kot stranski produkt, čeprav vsebuje znatno višje količine fenolnih spojin z antioksidativnimi in protimikrobnimi lastnostmi (npr. rutin, elagna kislina, galna kislina) kot ostali deli rastline, vključno s semenami. (Zalar, 2011) Kljub temu, da ga industrija vidi kot odpad, je olupek granatnega jabolka potencialni vir za pridobivanje bioaktivnih komponent, uporabnih v nutracevtiki in biomedicini. Iz teh razlogov smo se odločili določiti antioksidativni in protimikroben potencial snovi v olupku.

Pripravili smo devet različnih ekstraktov olupka granatnega jabolka s tremi različnimi ekstrakcijskimi metodami. Uporabili smo Soxhlet metodo, pri kateri ekstrakcija poteka pri najvišjih temperaturah. Temelji na uparjanju in kondenziranju topila ter večanju koncentracije topljencev v posodi s topilom. Hladna maceracija je postopek, pri katerem material prelijemo s topilom in zmes mešamo pri sobni temperaturi. Pri ultrazvočni ekstrakciji zmes materiala in topila izpostavimo konstantnim vibracijam v ultrazvočni kopeli. Vse tri metode so med drugim namenjene ekstrakciji iz trdnih vzorcev. Pri vsaki izmed omenjenih ekstrakcijskih metod smo opravili po tri ekstrakcije, vsakič z drugačno koncentracijo topila (čisti etanol, volumsko razmerje etanola in vode 80:20 ter volumsko razmerje etanola in vode 60:40). Posledično vsak ekstrakt vsebuje različne koncentracije in razmerja fenolnih spojin ter drugih snovi, topnih v uporabljenem topilu.

1.1 Namen raziskovalne naloge

Namen raziskovalnega dela je bila izolacija v vodi in/ali etanolu topnih naravnih spojin z antioksidativnimi in s protimikrobnimi lastnostmi. Antioksidativni potencial pridobljenih ekstraktov se je določal z različnimi spektrofotometričnimi analizami (DPPH, vsebnost totalnih fenolov in proantocianidinov), protimikroben učinek pa z difuzijsko metodo z diskami na sevih

mikroorganizmov *Escherichia coli* in *Bacillus cereus*. Na podlagi rezultatov smo želeli ugotoviti potencial komponent olupka granatnega jabolka za uporabo v medicini.

1.2. Hipoteze

I.: Večji ekstrakcijski izkoristki so pričakovani pri višji temperaturi ekstrakcije (Soxhlet).

II.: Večji ekstrakcijski izkoristki so pričakovani pri bolj polarnih topilih (volumsko razmerje etanola in vode 60:40).

III.: Izbera topila in ekstrakcijske metode vpliva na koncentracijo izoliranih fenolov, posledično pa na antioksidativnost in protimikrobnoučinkovitost.

IV.: Večja je antioksidativnost oz. vsebnost fenolov v ekstraktih, boljša je protimikrobnaučinkovitost.

V.: Ekstrakti imajo različen protimikroben učinek proti Gram pozitivnim ali Gram negativnim sevom bakterij.

2. TEORETIČNO OZADJE

2.1 O granatnem jabolku

Granatno jabolko (*Punica granatum*) je drevo, visoko do 5 m, ki izvira iz območja od Irana do Himalaje v Indiji, danes pa ga zaradi večjega priznavanja njegovih koristi za zdravje vzgajajo tudi v Severni Ameriki (Fuhrman, 2013, 82). Plodovi merijo v premer do 13 cm in so po obliku podobni jabolku. Zunanji del plodu je *suhokožnat* in neužiten, v notranjosti pa se nahajajo številna semena, obdana s sočnim, užitnim ovojem (Pahlow, 1987, 402).

Granatno jabolko je med drugim znano po antioksidativnih lastnostih snovi, prisotnih v semenih. Znano je, da sok iz semen vsebuje fenolne spojine, lubje grma granatnega jabolka pa alkaloide, čreslovine in druge zdravilne snovi (Pahlow, 1987, 402).

Od leta 2000 so bile objavljene številne raziskave o antioksidativnih, antikancerogenih in protivnetnih lastnostih granatnega jabolka. Študije so pokazale učinkovitost pri zaviranju rasti tumorjev in oviranju angiogeneze okoli rakave tvorbe. Kaže se tudi vloga pri preprečevanju bolezni, za katere naj bi bil glavni vzrok kronično vnetje (Fuhrman, 2013, 82).

2.2 Oksidativni dejavniki

Oksidanti so snovi, ki sprejemajo elektrone in se s tem reducirajo, medtem ko snovi, ki elektrone oddajajo, imenujemo reducenti in se s procesom oddajanja elektronov oksidirajo. V biologiji oksidacijo omenjamo že pri temeljnih procesih v živih bitjih (npr. poraba kisika med proizvodnjo ATP molekul med celičnim dihanjem), govorimo pa tudi o kompleksnem ravnotežju med oksidanti in antioksidanti.

Človeški organizem je ves čas izpostavljen oksidacijskim dejavnikom. Z njimi pridemo v stik po zraku, z vodo in s hrano, prisotni pa so tudi v neposrednem okolju celic, saj se porabljajo in nastajajo pri osnovnih biokemijskih procesih (Kočev Glavač, 2013, 512).

Najpomembnejši oksidanti v našem organizmu, ki smo jim vsakodnevno izpostavljeni, so kisik, kisikove reaktivne zvrsti (superoksidni, hidroksilni in hidroperoksilni radikali, vodikov peroksid in hipoklorit) ter reaktivne dušikove zvrsti (dušikov oksid in peroksinitrit) (Kočev Glavač, 2013, 512).

2.2.1 Prosti radikali

Prosti radikali so visoko reaktivne spojine ali ioni, ki imajo neparno število elektronov in so zato zelo reaktivni z velikim naborom molekul. V kemijski reakciji, znani kot oksidacija, prihaja do hitrega in nepredvidljivega spajanja prostih radikalov s katerim koli bližnjim proteinom, lipidom, ogljikovim hidratom ali nukleinsko kislino (Medić-Šarić et al., 2002, 295).

Radikali nastajajo kot stranski produkti metabolizma, tveganje za prekomerni nastanek pa povečujejo bolezenska stanja, ultravijolično sevanje, uživanje drog, kajenje, stres in neprimerna prehrana. Povečana količina radikalov predstavlja tveganje za nastanek akutnih in kroničnih bolezni, kot so rak debelega črevesa, bolezni srca in ožilja, ateroskleroza, vnetne bolezni, siva mrena in procesi staranja (ZPS, 2020).

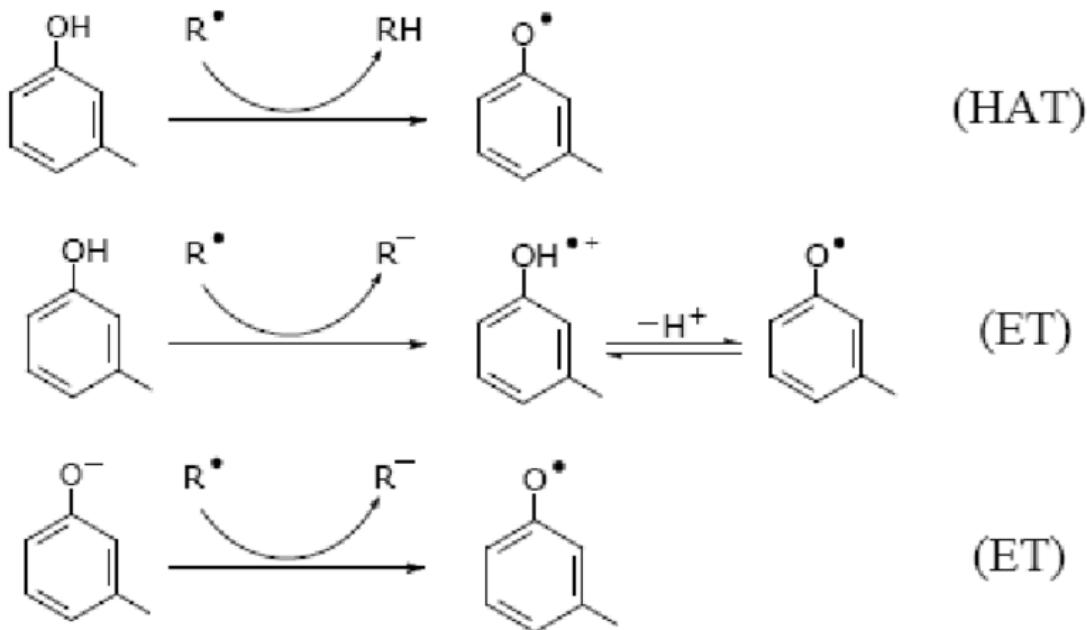
Radikali pri reakciji z naključno spojino tvorijo nov radikal, ki je sposoben sprožati nove neencimske verižne reakcije (Medić-Šarić et al., 2002, 295). Take procese zavirajo antioksidanti, ki z radikali reagirajo in onemogočijo njihovo nadaljnjo aktivnost. S tem zavarujejo substrate pred oksidacijo in preprečijo potencialni nastanek škode za celice.

Radikali niso samo škodljivi zdravju, pač pa so lahko orodje imunskega sistema za obrambo pred okužbami. Nekateri levkociti so sposobni izvesti t. i. respiratorni izbruh, pri katerem nastajajo kisikovi radikali z mikrobicidnimi lastnostmi (Zhao et al., 1990).

2.2.2 Antioksidanti

Antioksidanti so snovi, ki prekinejo verižne reakcije radikalov, tako da z njimi reagirajo in preprečijo nastanek novih radikalov (slika 1). Ker imajo prosti radikali neparno število elektronov, jim snovi z antioksidativnimi lastnostmi elektrone lahko podarijo in same postanejo stabilnejši radikali.

Antioksidanti so lahko endogenega ali eksogenega izvora. V prvo skupino uvrščamo encime (superoksid-dismutaze, katalaze in glutation-peroksidaze) in nizkomolekulske spojine (glutation, bilirubin, koencim Q in melatonin), ki so fiziološko prisotne v našem organizmu, v drugo pa molekule, ki jih v telo vnašamo s hrano (fenolne spojine, karotenoide ter vitamina C in E) (Kočevar Glavač, 2013, 512). Najboljši viri antioksidantov endogenega izvora so prav rastline. Večje količine antioksidantov so v sadju, zelenjavni in zeliščih, pa tudi v algah, dostopnih v trgovinah (ZPS, 2020).



Slika 1: Reakcije antioksidanta z radikalom (<https://www.researchgate.net/profile/Arobindo-Chatterjee/publication/287402598/figure/fig2/AS:318418801709057@1452928366361/Reaction-mechanism-for-antioxidant-activity.png>)

2.3. Zdravilne učinkovine v granatnem jabolku

Granatno jabolko je danes v uporabi predvsem zaradi soka in olj, pridobljenih iz plodu. Navadno so uporabljeni semena in sok, lupina pa se zavrže zaradi njene neužitnosti. S tem zavržemo potencialni vir antioksidantov. Pomembne komponente v olupku so kompleksni polisaharidi, minerali, flavonoidi in hidrolizabilni tanini (Ko et al., 2021).

Kompleksni polisaharidi, kot na primer škrob, imajo antimikrobnii potencial. Moj vir pravi, da lahko rastlinski polisaharidi preprečujejo adhezijo nekaterih patogenih bakterij na stene želodca. Nekateri polisaharidi lahko tudi napadajo zunano membrano bakterij, kar je posebej učinkovito pri zdravljenju okužb z Gram pozitivnimi bakterijami (Menchicchi et al., 2015).

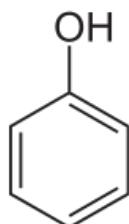
Minerali v človeškem telesu podpirajo delovanje srca in drugih mišic, možganov, prisotni pa so tudi v kosteh. V primerjavi z drugimi minerali potrebujemo večje količine fosforja, kalcija, magnezija, natrija, kalija, klora in žvepla. Ker jih ne moremo sintetizirati, moramo minerale v telo vnašati s hrano (MedlinePlus, 2015).

2.3.1 Fenolne spojine

Fenolne spojine so zelo velika skupina sekundarnih rastlinskih metabolitov, za katere je značilna vsaj ena hidroksilna skupina (-OH) vezana na ogljikov atom v aromatskem obroču. Fenole z več kot enim obročem imenujemo polifenoli. Zanje je značilna močna antioksidativnost, ki s številom obročev narašča. Zaradi teh lastnosti so predmet mnogih raziskav. Prisotni so v praktično vsem sadju in zelenjavni, v živalski hrani pa jih praviloma ni (Žontar, 2018).

Fenolne spojine glede na strukturne značilnosti delimo na fenolne kisline, flavonoide, kumarine, stilbene in tanine. V naši prehrani so pomembni predvsem flavonoidi, ki predstavljajo približno dve tretjini zaužitih fenolnih spojin, preostalo tretjino pa fenolne kisline (Kočevan Glavač et al., 2013, 514).

Izraz fenol služi kot skupno ime za celotno družino spojin, pa tudi kot ime za najenostavnnejšega člana, imenovanega mono hidroksibenzen (C_6H_5OH), poznanega tudi kot benzenol, karbolna kislina ali karbol (slika 2). Fenol je bela, kristalinična hlapna trdnina, ki je v večjih količinah strupena, v majhnih odmerkih pa se uporablja tudi v ustnih vodicah in ima nekaj terapevtskih lastnosti. Uporablja se tudi kot konzervans pri nekaterih cepivih in kot oralni analgetik za blaženje bolečin v ustih (Carter, 2018).



Slika 2: Kemijska struktura fenola (<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8b/Phenol2.svg/80px-Phenol2.svg.png>)

2.3.2 Flavonoidi

Flavonoidini so najbolj barvita skupina rastlinskih pigmentov, ki cvetovom, plodovom in listom dajejo rumeno, rdečo in modro barvo. Njihove vloge v rastlinah so zelo različne: privabljajo opaševalce, uravnavajo rast, zavirajo bakterijske in virusne encime ter ščitijo pred vplivi ultravijoličnih žarkov UVB (Kočevan Glavač et al., 2013, 514).

Flavonoidi imajo antioksidativne, protivnetne, antimutagene in antikancerogene lastnosti ter zmožnost prilaganja ključnih funkcij celičnih encimov. Število raziskav o flavonoidih se

je dodatno povečalo z ugotovljenim znižanjem smrtnosti oseb s srčno-žilnimi boleznimi in preprečevanjem razvoja koronarne srčne bolezni (Panche et al., 2016).

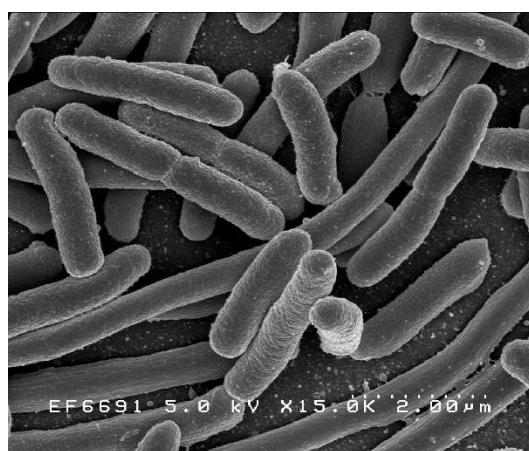
2.3.3 Antocianidini

Antocianidini so najobsežnejša skupina flavonoidov. Njihova vloga v naravi je obarvanje cvetov in plodov v rdečo barvo, jeseni se izrazijo tudi v listih. V naravi se nahajajo vezani na monosaharide in disaharide, s katerimi tvorijo antocianine. Na saharidni del se navadno vežejo še fenolne in sadne kisline, barvo pa določa razporejenost hidroksilnih skupin (-OH) po obročih (Vrtačnik et al., 2014).

2.4 Organizmi uporabljeni pri mikrobioloških raziskavah

2.4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je Gram negativna bakterija. Je fakultativno anaerobna, kar pomeni, da ob prisotnosti kisika izvaja aerobni tip dihanja, ko pa kisika primanjuje, opravlja fermentacijo. Bakterije so paličaste oblike (slika 3), 1,1 do 1,5 µm široke in od 2 do 6 µm dolge. Imajo fimbrije, s katerimi se lahko pritrdijo na površino. Gre za najbolj raziskan organizem na sploh in ima lastnosti, zaradi katerih je uporabno epidemiološko orodje. Sevi za laboratorijske raziskave so modificirani tako, da zunaj nadzorovanih pogojev ne preživijo (Desmarchelier, Fegan, 2002). Tabela 1 prikazuje znanstveno klasifikacijo bakterije *E. coli*.



Slika 3: Z elektronskim mikroskopom slikane bakterije *E. coli*
(<https://media.nationalgeographic.org/assets/photos/250/947/bccaaadcd-afa3-4e49-b208-40d78e8aad5b.jpg>)

Tabela 1: Znanstvena klasifikacija bakterije *Escherichie coli*

Domena	Bacteria
Kraljestvo	Eubacteria
Deblo	Proteobacteria
Razred	Gamma Proteobacteria
Red	Enterobacteriales
Družina	Enterobacteriaceae
Rod	<i>Escherichia</i>
Vrsta	<i>E. coli</i>

2.4.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus (*B. cereus*) (slika 4) je v zemlji prisotna Gram pozitivna bakterija. Je fakultativno anaerobna. Proizvajastrup in je pogost povzročitelj črevesnih bolezni. Lahko kontaminira hrano, saj jo lahko najdemo na mesu, ribah, rižu in zelenjavni. Na sobni temperaturi se intenzivno množi. Tvorjenje spor ji omogoča, da preživi tudi v zahtevnejših pogojih (McDowell et al., 2022). Tabela 2 prikazuje znanstveno klasifikacijo bakterije *B. cereus*.



Slika 4: Z elektronskim mikroskopom slikane bakterije *B. cereus*
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/57/Bacillus_cereus_SEM-cr.jpg/220px-Bacillus_cereus_SEM-cr.jpg)

Tabela 2: Znanstvena klasifikacija bakterije *B. cereus*

Domena	Bacteria
Kraljestvo	Eubacteria
Deblo	Firmicutes
Razred	Bacilli
Red	Bacillales
Družina	<i>Bacillaceae</i>
Rod	<i>Bacillus</i>
Vrsta	<i>B. cereus</i>

2.4.3 Pozitivnost/negativnost po Gramu

Leta 1884 je bakteriolog Christian Gram zasnoval test, s katerim je lahko določil, ali je imela bakterija debelo peptidoglikansko membrano ali ne. Če je peptidoglikanska stena tanka, ima bakterija še dodatno membrano in je Gram negativna, če pa je sloj debel, je gram pozitivna (Brennan, 2021). Gram pozitivne bakterije se po izpostavitevi metilvijoličnemu in jodovi raztopini po spiranju ne razbarvajo, saj kristali metilvijoličnega ostanejo ujeti v peptidoglikanskem sloju. Gram negativne bakterije se razbarvajo, zato dodamo safranin, da se obarvajo rdeče (Aryal, 2015).

3. MATERIAL IN METODE

3.1 Vzorci

Učinkovine smo pridobili iz trdnih vzorcev. To so bili biološko pridelani posušeni kosi olupka plodu granatnega jabolka (Alfred Galke GmbH). Pri vsaki ekstrakciji smo uporabili 20 g materiala.

3.2 Topila

Znane so splošne fizikalne in kemijske lastnosti želenih spojin (fenolnih spojin). Topilo je pomemben dejavnik, ki vpliva na koncentracijo različnih snovi v ekstraktih, zato smo se odločili uporabiti tri različna topila. S tem smo povečali raznolikost ekstraktov in izboljšali možnosti za izolacijo koristnih učinkovin v višjih koncentracijah. Topila smo pripravili sami z mešanjem čistega etanola (C_2H_5OH) (100 % etanol, CARLO ERBA Reagents)) in destilirane vode. Odločili smo se za tri volumska razmerja etanola in vode:

- čisti etanol,
- volumsko razmerje etanola in vode 80:20,
- volumsko razmerje etanola in vode 60:40.

Pri vsaki metodi smo uporabili 150 mL topila. Zmes smo pripravili tako, da smo z merilnim valjem odmerili posamezne prostornine etanola in vode ter jih prelili v označene čaše. Tako smo za pripravo prvega topila odmerili 150 mL etanola, za pripravo drugega smo v čašo nalili 120 mL etanola in 30 mL vode, za pripravo tretjega topila pa 90 mL etanola in 60 mL vode.

Znano je, da za zmesi etanola in vode ne velja aditivnost prostornin. Pri zmesi teh dveh snovi pride do tesnejšega razporejanja molekul, kar se odraža v manjši prostornini, ki bi jo pričakovali po Raoultovem zakonu (Petruševski, Najdoski, 2001). To pomeni, da prostornine topil različnih koncentracij niso popolnoma enake 150 mL in niso premo sorazmerne z deležem etanola. To sicer nima vpliva na ekstrakcije, dokler vsa topila pripravljamo na enak način.

3.3 Reagenti

Izvedli smo štiri analize ekstraktov, od teh je ena bila na mikrobiološkem področju. Pri ostalih smo potrebovali posebne kemikalije, ki so služile kot reagenti in osnova za primerjanje lastnosti.

Pri določanju antioksidativnih lastnosti ekstraktov smo uporabili stabilni prosti radikal DPPH (Sigma Aldrich, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Pri določanju vsebnosti totalnih fenolov smo uporabili Folin-Ciocalteu reagent (FCR) (Sigma Aldrich) ter vodno raztopino Na₂CO₃ (Sigma Aldrich, ≥ 99,0 %). FCR je zmes heteropolnih kislin, fosfomolibdenske kisline in fosfovolframove kisline, pri katerih imata molibden in volfram oksidacijski števili 6+ (Ikawa et al., 2003).

Pri določanju vsebnosti proantocianidinov smo uporabili 2:3 mešanci HCl (Merck KGaA, 32 %) in n-butanola (Merck KGaA, ≥ 99,5 %) ter raztopljen FeSO₄ x 7H₂O (Sigma Aldrich).

3.4 Aparature

Pri pridobivanju ekstraktov smo uporabljali rotavapor (BÜCHI R-114). Za zelo natančno tehtanje smo uporabljali analitsko tehniko (Mettler Toledo). Za izvajanje UV-Vis spektrofotometričnih analiz smo uporabili UV-Vis spektrofotometer (Varian, Cary 50 Probe).

3.5 Ekstrakcija

V kemiji pojem ekstrakcija predstavlja ločevalni postopek, pri katerem je naš namen pridobiti določene snovi, prisotne v vzorcu. Pri tem postopku se želene spojine, ki so v topilu mnogo bolj topne kot ostale snovi, prenesejo iz trdne ali tekoče faze v uporabljenou topilo. Za ekstrakcijo polarnih snovi se uporablja polarna topila, za ekstrakcijo nepolarnih snovi pa nepolarna topila. Glede na agregatno stanje ekstrakcijskega materiala ločimo ekstrakcijo tekoče-tekoče in trdno-tekoče. Za ločevanje trdno-tekoče poznamo veliko postopkov in različnih priprav (Nichols, 2017).

Naš cilj je bil iz posušenega olupka granatnega jabolka pridobiti ekstrakte s čim večjo vsebnostjo snovi z antioksidativnimi in antimikrobnimi učinki. Želeli smo pridobiti ekstrakte pri različnih ekstrakcijskih pogojih, zato da poiščemo optimalnega (z največjo antioksidativno in antimikrobnou učinkovitostjo). Zato smo uporabili tri metode ekstrakcije: ekstrakcijo po Soxhletu, hladno maceracijo in ultrazvočno ekstrakcijo.

3.5.1 Soxhlet

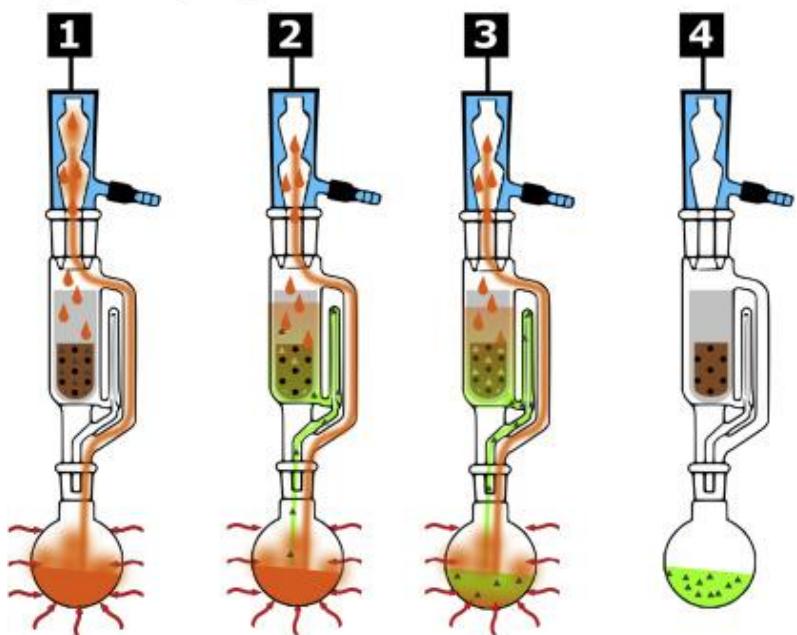
Soxhlet ekstrakcijsko aparaturo je leta 1879 prvi predlagal nemški agrikulturni kemik Franz Ritter von Soxhlet v skupini člankov o določanju vsebnosti maščobe v mleku (Jensen, 2007).

Soxhlet aparaturo sestavlja bučka s topilom, v katerem se kopiči ekstrakt, z vodo hlajen kondenzator in ekstraktor s celuloznim filtrom, v katerem se nahaja trd vzorec. Bučko segrevamo z grelnim plaščem ali greto vodno kopeljo, da topilo v bučki stalno izpareva.

Pri Soxhlet ekstrakciji smo uporabili navadno Soxhlet aparaturo, za gretje bučke pa vodno kopel in grelec. V filter smo zatehtali 20 g posušenih koščkov olupka granatnega jabolka, v bučko pa nalili 150 mL topila. Kondenzator smo priključili na konstanten vir hladne vode, kopel segreli na točko vrelišča topila in ekstrakcijo izvajali 4 ure. Postopek smo ponovili trikrat, vsakič z drugim topilom.

Ko segrevamo bučko, se pare topila skozi ozko cev dvigajo vse do kondenzatorja. V kondenzatorju pride vroč plin v stik s hlajenim stekлом in se kondenzira v kapljice. Topilo kaplja na trd vzorec in razaplja topne snovi. Ekstraktor se počasi polni, dvigajoča gladina pa se v tanki cevi, ki je vodi iz dna ekstraktorja, približuje zanki. Ko gladina v cevki to mejo prestopi, sproži odliv vsega topila iz ekstraktorja nazaj v bučko in cikel se ponovi. Analit se na ta način kopiči v bučki, saj za razliko od topila ne izpareva (slike 5, 6 in 7).

▲ : Analyte ● : Matrix



Slika 5: Soxhlet priprava (<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-B9780128137451000052-f05-15-9780128137451.jpg>)



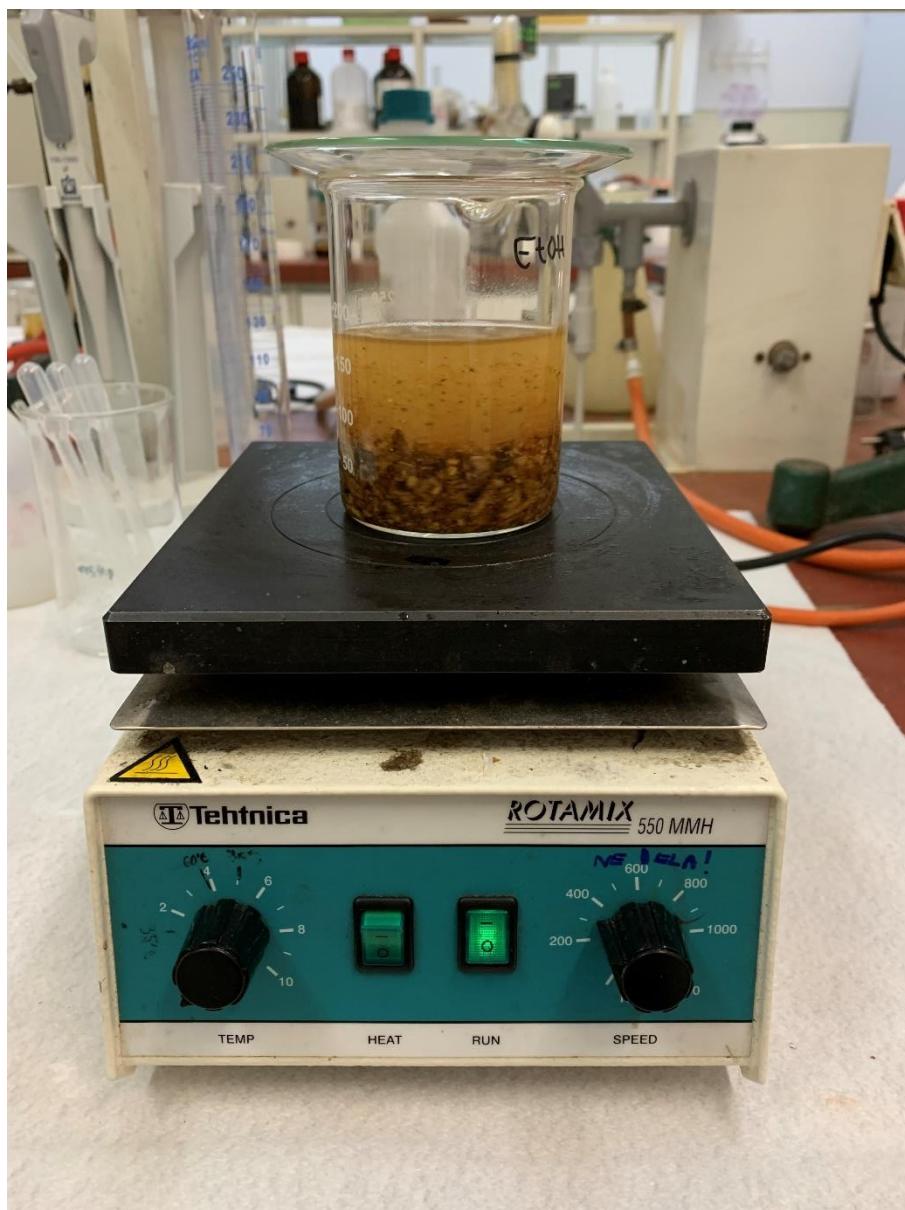
Slika 6: Celotna Soxhlet priprava (lastni vir)

Slika 7: Vodna kopel (lastni vir)

3.5.3 Hladna maceracija

Hladna maceracija je relativno enostaven proces izpostavljanja materiala topilu za dalj časa, medtem ko se izvaja mešanje. Namen je mehčanje in razdiranje materiala, da ta v topilo sprosti topne metabolite (Louie et al., 2020, 273). Ko je hladna maceracija oz. ekstrakcija s hladnim topilom končana, zmes materiala in topila filtriramo skozi filtrirni papir, da dobimo jasen filtrat, v katerem so topilo in raztopljeni spojini.

Na grelno ploščo smo postavili čašo s topilom in z vzorcem posušenega olupka granatnega jabolka. Vklopili smo magnetno mešalo, gretja pa nismo uporabili. Tako je ekstrakcija za razliko od drugih dveh metod potekala pri sobni temperaturi. Vsako izmed treh ponovitev (tri različna topila) smo izvajali 3 ure (slika 8).

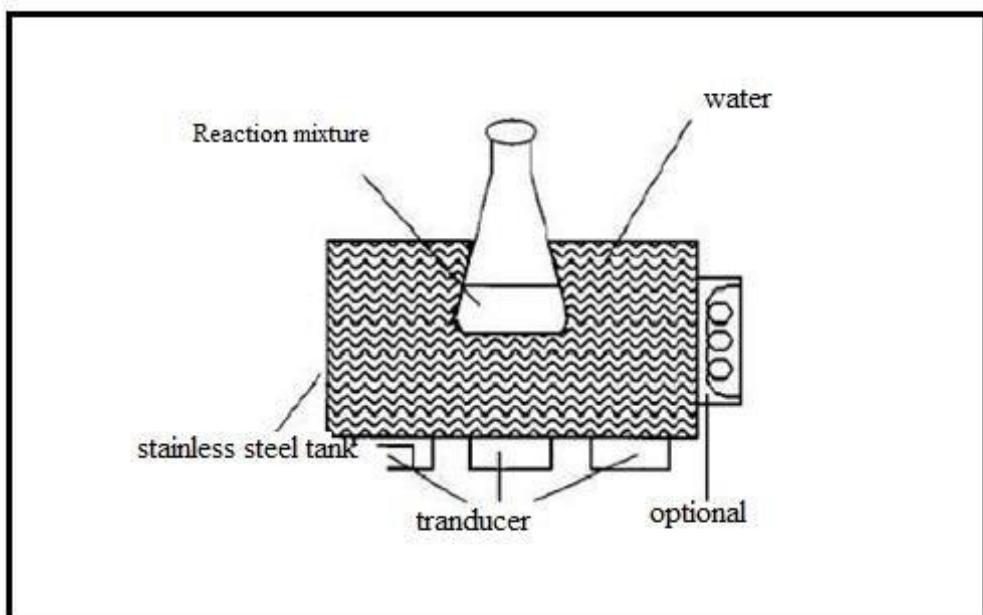


Slika 8: Hladna maceracija (lasten vir)

3.5.2 Ultrazvočna ekstrakcija

Ultrazvočna ekstrakcija je nekonvencionalni oz. napredni postopek, pri katerem topilo in vzorec izpostavimo ultrazvočnemu valovanju s frekvenco od 20 kHz do 100 MHz. Ultrazvok povzroča hitro spremjanje tlaka v raztopini in s tem mehansko razbijanje sten celic in drugih ovir, ki preprečujejo ekstrakcijo ujetih topil. Za izvedbo lahko uporabimo ultrazvočno kopel ali potopno napravo v primeru potrebe po ekstrakciji iz večjih količin materiala.

Ultrazvočna ekstrakcijska metoda (slika 9) je za izvedbo ena izmed enostavnnejših. Potrebujemo ultrazvočno kopel in čašo. V čašo smo zatehtali 20 g zdrobljenega posušenega olupka granatnega jabolka in dolili pripravljeno topilo. Čašo smo vstavili v vzemne opore v kopeli. Pri stalni temperaturi 50 °C smo vklopili ultrazvočno kopel in postopek izvajali 2 uri.



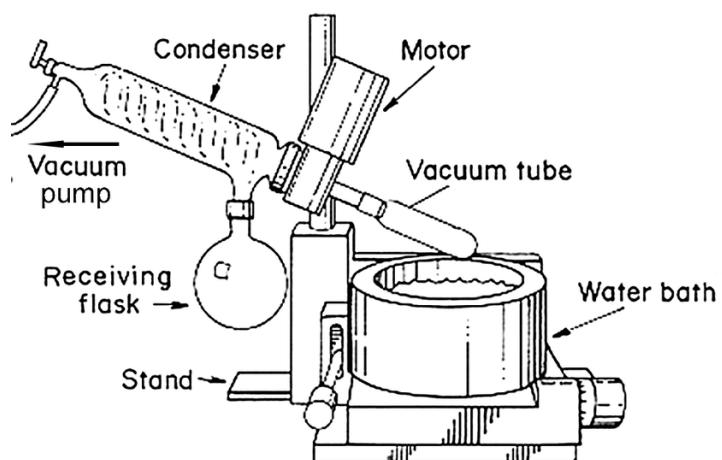
Slika 9: Ultrazvočna kopel
[\(<https://www.researchgate.net/publication/328641788/figure/fig1/AS:687864857763843@1541011170652/Schematic-diagram-of-ultrasonic-bath.jpg>\)](https://www.researchgate.net/publication/328641788/figure/fig1/AS:687864857763843@1541011170652/Schematic-diagram-of-ultrasonic-bath.jpg)

3.5.4 Uparjanje z rotavaporjem

Rotavapor (angl. rotary evaporator) (slika 10) je naprava, namenjena koncentriranju tudi izjemno razredčenih raztopin. Izumil ga je Lyman C. Craig leta 1950. Prva objavljena shema je vključevala greto vodno kopel, bučko z razredčeno raztopino, stojalo s kolesci za vrtečo se pripravo, z vodo hlajeno bučko za zbiranje in kondenziranje izparelega topila, izhodno cev, ki povezuje bučko z raztopino in bučko s topilom, motor za vrtenje priprave ter cevko, povezano na vakuumsko črpalko (Craig et al., 1950). Takratna naprava je bila postavljena horizontalno, v čemer se razlikuje od sodobnih. Novejši rotavaporji imajo motorje z nastavljivo hitrostjo vrtenja, rotira pa le bučka z raztopino, ki je potopljena v greto vodno kopel. Kondenzator je ločen od bučke za zbiranje topila in je v obliki spiralne cevi, skozi katero teče hladna voda. Tudi tlak, ki ga nadzira vakuumska črpalka, je nastavljiv.

Postopek koncentriranja ekstraktov z rotavaporjem (slika 11) smo izvajali po vsaki ekstrakciji. Raztopino ekstrakta in topila smo prelili v primerno veliko stehtano bučko s premerom vrata, ki se je ujemal z rotavaporjem. Z ročico smo spustili aparaturo in tako bučko z raztopino potopili v kopel. Temperaturo kopeli smo nastavili na 40°C , nastavili konstantno rotacijo bučke z raztopino ekstrakta in vklopili vakuumsko črpalko. Tlak smo zniževali počasi. Z zniževanjem tlaka v aparaturi smo znižali parni tlak vode in etanola v plinasti fazi ter posledično znižali vrelišče topila. Pomembno je bilo, da smo tlak zniževali počasi, saj bi lahko v nasprotnem primeru vsebina ogrevane bučke nenadno zavrela in divje planila v druge dele aparature. Ko smo dosegli tlak 60 mbar (0,060 bar), smo počakali, da se je topilo postopoma odstranilo, na stenah bučke pa se je v krogu nabral gost in lepljiv ekstrakt.

Po opravljenem postopku smo bučko s koncentriranim ekstraktom stehtali in od tega odsteli prej izmerjeno maso bučke. Vsak ekstrakt smo s spatulo čim bolj temeljito prenesli v steklene viale. Te smo označili z načinom pridobitve ekstrakta: Soxhlet (SOX), hladna maceracija (Hl) in ultrazvočna ekstrakcija (UZ) ter s koncentracijo etanola v topilu, uporabljenem za ekstrakcijo: čisti etanol (EtOH), volumsko razmerje etanola in vode 80:20 (80:20) ter volumsko razmerje etanola in vode 60:40 (60:40). Vsebino teh devetih vial smo uporabljali pri vseh analizah, razen pri mikrobiološkem delu, kjer smo analizirali vsebino štirih. Do izvedbe analiz smo jih shranili v zamrzovalniku za preprečitev degradacije aktivnih učinkovin v ekstraktih.



Slika 10: Shema rotavaporja (<https://www.researchgate.net/profile/Anita-Schnyder/publication/238661273/figure/fig19/AS:669469709967398@1536625425779/Rotary-evaporator-apparatus-for-evaporating-off-organic-solvents-The-evaporator-consists.ppm>)



Slika 11: Rotavapor (lastni vir)

3.5.5 Izračuni izkoristka ekstrakcije

Z izračunanimi vrednostmi izkoristkov ekstrakcij smo lahko primerjali učinkovitost posameznih ekstrakcijskih metod pri ekstrakciji čim večje količine v posameznem topilu topnih snovi iz olupka granatnega jabolka. Mase smo merili v gramih. Pridobili smo jih s prej opisanim postopkom in po enačbi 1:

$$m_{\text{ekstrakt}} = m_{\text{bučka+ekstrakt}} - m_{\text{bučka}} \quad (1)$$

kjer je: $- m_{\text{bučka+ekstrakt}}$ masa na tehtnici po opravljenem uparjanju [g]

$- m_{\text{bučka}}$ masa prazne bučke [g]

Izkoristek ekstrakcije $\eta_{\text{ekstrakcije}}$ smo podali v odstotkih [%] po enačbi 2:

$$\eta_{\text{ekstrakcije}} = \frac{m_{\text{ekstrakt}}}{m_{\text{material}}} \cdot 100 \quad (2)$$

kjer je: - m_{ekstrakt} masa pri ekstrakciji pridobljenih snovi [g]

- m_{material} začetna masa kosov posušenega olupka [g] (20 g)

3.6 Analize ekstraktov

Antioksidativne in protimikrobne učinke ekstraktov smo preučevali s štirimi analiznimi metodami, ki so podrobno opisane v naslednjih podpoglavljih.

3.6.1 Preverjanje antioksidativnih lastnosti

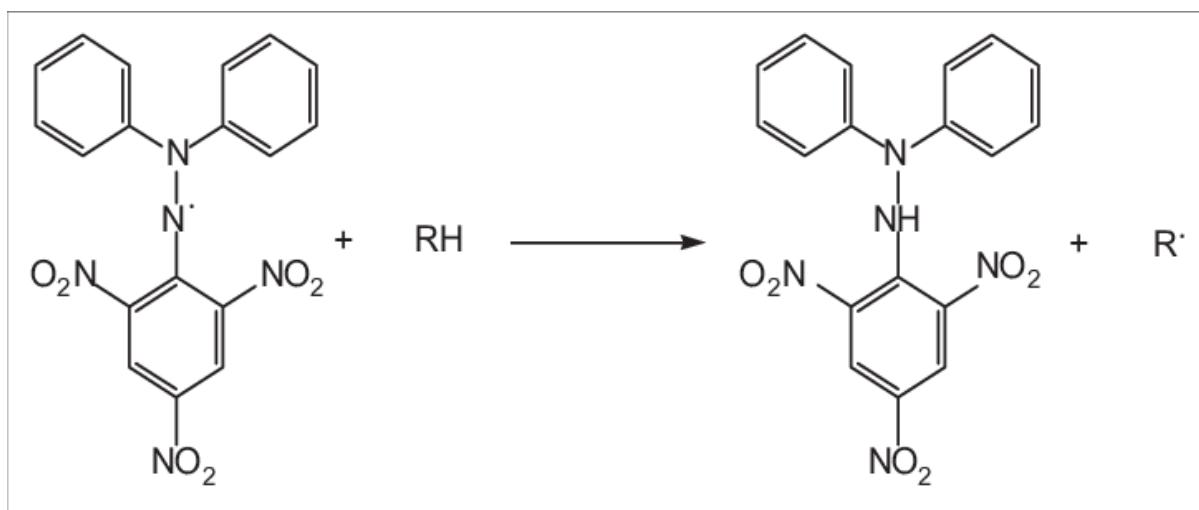
Antioksidativno aktivnost smo določali s tremi spektrofotometričnimi metodami: določanjem antioksidativne aktivnosti z radikalno metodo DPPH, določanjem vsebnosti totalnih fenolov in določanjem vsebnosti proantocianidinov v ekstraktih.

3.6.1.1 Določanje antioksidativne aktivnosti z radikalno metodo (DPPH)

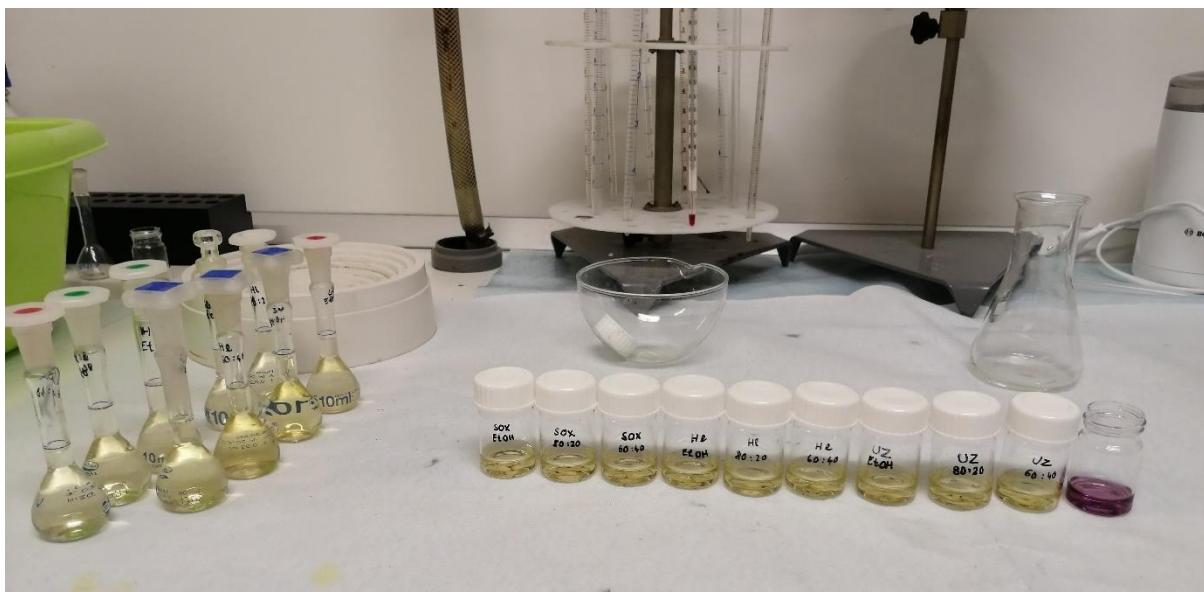
Metoda, pri kateri se uporablja stabilni prosti DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal, je namenjena analizi antioksidativnih lastnosti snovi v nekem vzorcu (slika 12). DPPH je občutljiv na svetlobo, zato ga hranimo v viali z zatemnjениm stekлом. Je temno vijolične barve in v obliki radikala vpije največ svetlobe z valovno dolžino 515 nm (maksimalna absorbanca). V prisotnosti antioksidanta dušikov atom z neparnim številom elektronov prejme vodikov proton in elektron. Takšna molekula DPPH_2 ima maksimalno absorbanco svetlobe pri 320 nm

(v ultravijoličnem območju). Ker se rumen spekter vidne svetlobe skoraj ne absorbira več, je takšna raztopina rumene barve.

Najprej smo pripravili 100 mL raztopine DPPH v metanolu. Zatehtali smo 2,36 mg DPPH v 100 mL merilno bučko, ovito z aluminijasto folijo za preprečitev razpada DPPH, in ga z metanolom razredčili do oznake ter premešali. Nato smo na analitski tehnici v 10 mL merilne bučke odtehtali po 10 mg vsakega ekstrakta. Dodali smo metanol do oznake in premešali, da so se ekstrakti popolnoma raztopili. V steklene viale (slika 13) smo z avtomatsko pipeto dodali 3 mL raztopine DPPH in 77 μ L raztopine vsakega izmed ekstraktov ter jih 15 minut termostatirali v temnem prostoru. V eno vialo smo dodali 3 mL raztopine DPPH in 77 μ L metanola ter absorbanco izmerili takoj. Raztopina DPPH in metanola je služila kot referenčna raztopina, njena izmerjena absorbanca pa referenčna absorbanca. Za merjenje absorbanc smo uporabili UV-Vis spektrofotometer pri valovni dolžini svetlobe 515 nm.



Slika 12: Nevratalacija prostega radikala DPPH ob prisotnosti antioksidanta (<https://www.researchgate.net/profile/Kunal-Dhiman/publication/283377931/figure/fig1/AS:647104376614916@1531293114857/Structure-of-DPPH-and-its-reduction-by-an-antioxidant.png>)



Slika 13: Merilne bučke z ekstrakti (levo), vzorci z DPPH (desno) (lastni vir)

3.6.1.2 Vsebnost totalnih fenolov

Metoda določanja vsebnosti totalnih fenolov je tesno povezana z antioksidativnimi oz. reducentnimi lastnostmi. Glavni reagent (Folin-Ciocalteu reagent) namreč reagira z vsemi snovmi v raztopini ekstrakta, ki so nagnjene k redukciji (slika 14). Absorbanco merimo z UV-Vis spektrofotometrom pri valovni dolžini 760 nm. Za standard uporabljamo galno kislino (GA).

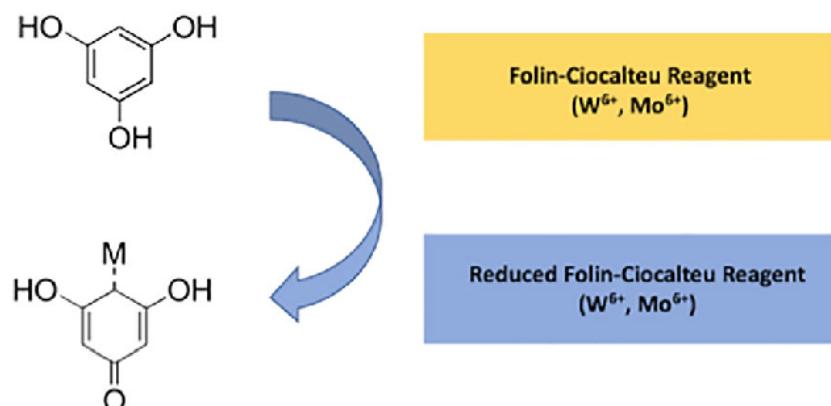
Najprej smo si pripravili umeritveno premico. V 25 mL bučko smo zatehtali 10 mg GA in jo z destilirano vodo dopolnili do oznake. Nato smo v 10 mL bučke odpipetirali prostornine raztopine GA: 5,0 mL, 2,5 mL, 2,0 mL, 1,5 mL, 1,0 mL, 0,75 mL, 0,5 mL, 0,25 mL in 0,1 mL ter razredčili do oznake. V viale smo odpipetirali 0,5 mL raztopin v bučkah (z GA), 2,5 mL FC reagenta in 2,0 mL Na₂CO₃. Viale smo nato termostatirali v vodni kopeli na 50 °C za 5 min. Pripravili smo tudi slepi vzorec, tako da smo namesto GA v vialo odpipetirali 0,5 mL destilirane vode. Vzorcem smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 760 nm, narisali smo graf odvisnosti absorbance od koncentracije GA in vrisali trendno črto, iz katere smo pridobili enačbo premice (enačba 3), ki je služila kot umeritvena premica za preračun masnih koncentracij totalnih fenolov v naših vzorcih ekstraktov:

$$A_{\text{vzorca z GA}} = 5,6672 \cdot \gamma_{\text{GA}} + 0,0194 \quad (3)$$

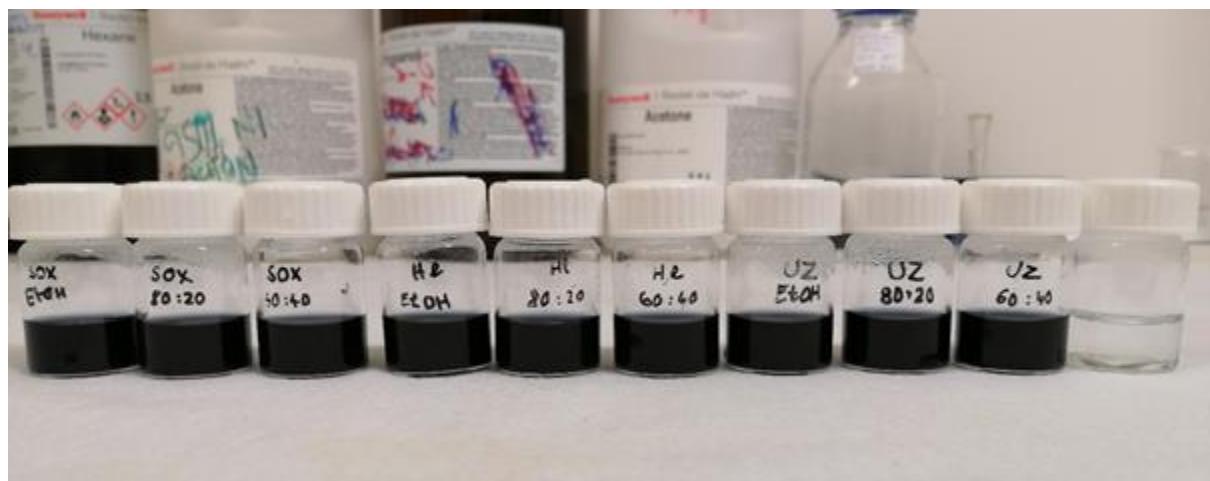
kjer je γ_{GA} masna koncentracija GA

$A_{\text{vzorca z GA}}$ absorbanca vzorca z GA

Nato smo si pripravili reagent. Folin-Ciocelteu (FC) smo razredčili z destilirano vodo v razmerju 1:10. Potem smo v 10 mL bučke zatehtali 20 mg posameznega vzorca in jih z vodo razredčili do oznake. V viale smo odpipetirali po 0,5 mL raztopin ekstraktov, 2,5 mL raztopine FC in 2 mL raztopine Na_2CO_3 s koncentracijo 75 g/L. Postopke je bilo potrebno izvesti čim hitreje. Kontrolo smo pripravili tako, da smo namesto raztopine vzorca v vialo odpipetirali 0,5 mL destilirane vode. Viale smo potem za 5 min postavili v vodno kopel na 50 °C. S kontrolo smo umerili UV-Vis spektrofotometer in izmerili absorbanco vsebin ostalih vial. Slika 15 prikazuje končno vsebnost vial pred pomerjanjem z UV-Vis spektrofotometrom.



Slika 14: Redukcija Folin-Ciocalteu reagenta (<https://www.researchgate.net/profile/Lauren-Ford-4/publication/334084142/figure/fig1/AS:774696786227200@1561713515424/Diagram-showing-the-reduction-of-the-Folin-Ciocalteu-reagent-caused-by-the-oxidation-of.png>)



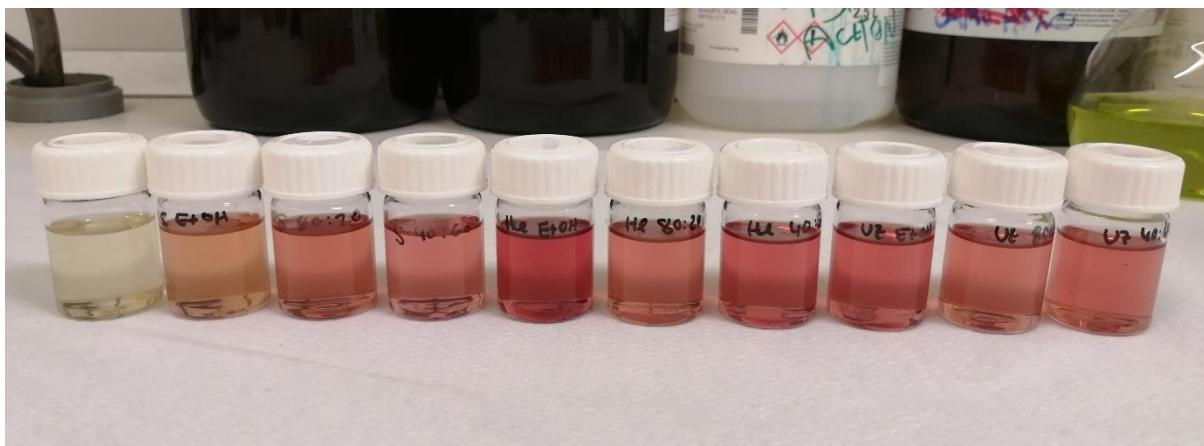
Slika 15: Viale z vzorci in reagenti za določanje totalnih fenolov (lastni vir)

3.6.1.3 Vsebnost proantocianidinov

Pri merjenju vsebnosti proantocianidinov v vzorcih smo uporabili 10 mL osnovne raztopine $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (77 mg $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ raztopljen v 500 mL raztopini HCl in n-butanola v razmerju 2:3). V 10 mL merilne bučke smo odmerili 50 mg ekstrakta in premešali. Z avtomatsko pipeto smo v viale odpipetirali po 1 mL raztopine vzorcev, za kontrolno vialo pa 1 mL destilirane vode. V vsako smo dodali 10 mL $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ in viale termostatirali v vodni kopeli na 95 °C za 15 min. Medtem smo lahko opazovali rdeče obarvanje vsebine vseh vial, razen kontrolne (slika 16). Po preteklem času smo viale vzeli iz vode in jih pustili, da so se ohladile (slika 17). Absorbanco smo izmerili z UV-Vis spektrofotometrom pri valovni dolžini 540 nm.



Slika 16: Vzorci z železovim sulfatom v vodni kopeli (lastni vir)



Slika 17: Vzorci po ohlajanju (lastni vir)

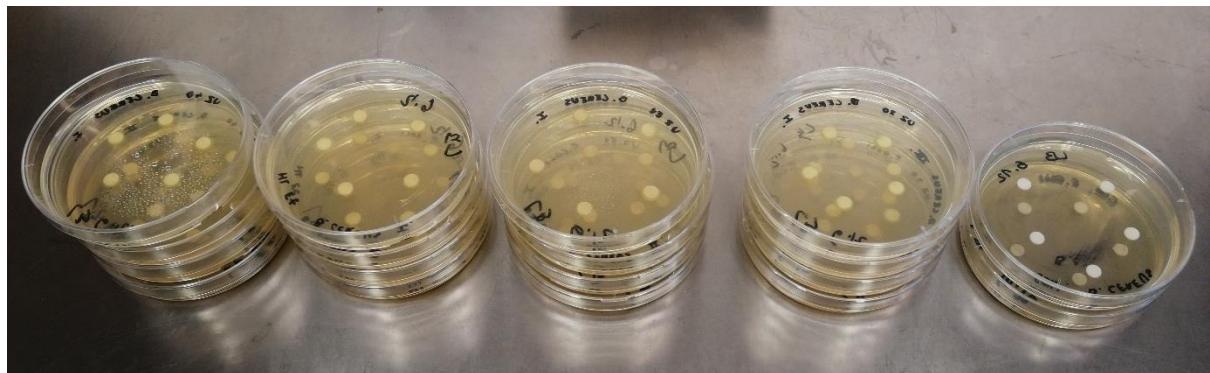
3.6.2 Preverjanje protimikrobnih učinkov

Analizirali smo protimikrobne učinke le štirih ekstraktov, in sicer: vseh treh ekstraktov ultrazvočne ekstrakcije in ekstrakta hladne maceracije v čistem etanolu. Ekstrakte ultrazvočne ekstrakcije smo izbrali zaradi večjih vsebnosti fenolov v primerjavi z drugimi metodami, ekstrakt hladne maceracije EtOH pa zato, ker je imel najboljše rezultate proantocianidinov. Njihovo najboljšo učinkovitost v primerjavi z ostalimi smo predvideli s hipotezo III. Vsako analizo smo opravili dvakrat. Pripravili smo si raztopine štirih ekstraktov koncentracije 100 mg/mL v 30 % etanolu (ta koncentracija etanola še ne vpliva na mikroorganizme).

Za ugotavljanje protimikrobnih vplivov ekstraktov iz olupka granatnega jabolka smo izvajali difuzijsko metodo z diskami. Je učinkovita metoda za ugotavljanje vpliva antibiotikov na različne mikroorganizme. Mi smo izbrali *E. coli* in *B. cereus*.

Vsi omenjeni postopki so bili izvedeni aseptično z namenom minimaliziranja kontaminacije. Najprej smo 18 petrijevk z agarjem označili na spodnji strani in na agar enakomerno nanesli bakterijske kulture. Z avtomatsko pipeto smo nanašali enake količine medija z bakterijami in jih enakomerno razporedili po površini. Vsako kulturo smo nanesli devetkrat (4 ekstrakti, 2 ponovitvi pri vsakem + kontrola). Nato smo v vsako petrijevko z nacepljeno bakterijo dali po 5 diskov z zadostnim medsebojnim razmikom, da smo preprečili morebitna prekrivanja inhibicijskih kon. V naslednjem koraku smo na vsak disk z avtomatsko pipeto nanesli 1 mL raztopine ekstraktov. Petrijevke (slika 18) smo zaprli s pokrovi in jih postavili v inkubator na 37 °C za 20 ur.

Podatke o protimikrobní aktivnosti smo pridobili tako, da smo po inkubaciji izmerili inhibicijske cone okoli diskov z ekstrakti. Inhibicijska cona je območje okoli diska, v kateri ni prisotnih raziskovanih kultur.



Slika 18: Petrijevke s kulturami in z diskimi z ekstrakti

4. REZULTATI

Naslednja podpoglavlja prikazujejo pridobljene podatke in rezultate izračunov o ekstraktih in njihovih analizah. Podrobnejši rezultati iz programa Excel so prikazani v prilogah.

4.1 Ekstrakcije

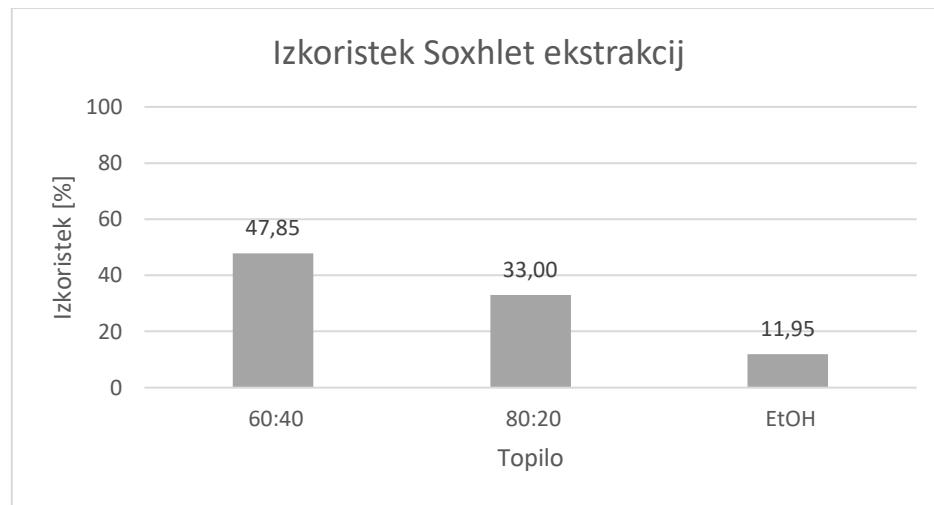
Tabela 3 prikazuje izkoristke vsake izmed devetih kombinacij topila in ekstrakcijske metode.

Tabela 3: Izkoristki vseh ekstrakcij

Metoda	Topilo	m(materiala) [g]	m(ekstrakta) [g]	Izkoristek [%]
Soxhlet	60:40	20	9,57	47,85
	80:20	20	6,60	33,00
	EtOH	20	2,39	11,95
Hladna maceracija	60:40	20	6,46	32,30
	80:20	20	3,79	18,95
	EtOH	20	1,49	7,45
Ultrazvočna ekstrakcija	60:40	20	0,73	3,65
	80:20	20	2,16	10,80
	EtOH	20	1,08	6,45

4.1.1 Soxhlet

Slika 19 prikazuje ekstrakcijski izkoristek [%] v odvisnosti od uporabljenega topila pri Soxhlet ekstrakciji.

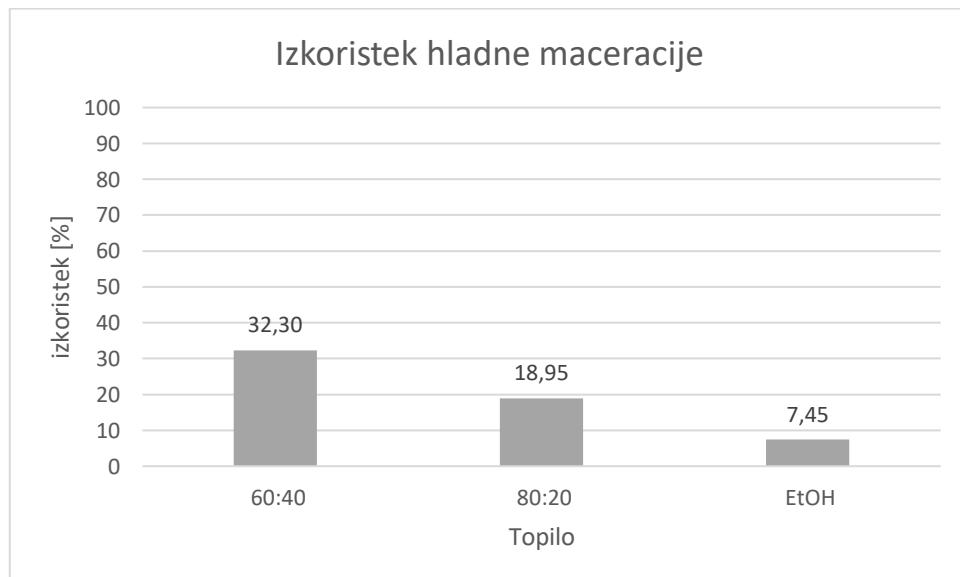


Slika 19: Grafikon izkoristka Soxhlet ekstrakcije

Soxhlet ekstrakcijska metoda z najnižjo koncentracijo etanola za topilo (60:40) se je izkazala za najbolj učinkovito metodo z daleč najboljšim izkoristkom, najslabši izkoristek je bil pri uporabi topila EtOH. Sklepamo lahko, da je velika večina topljencev polarnih.

4.1.2 Hladna maceracija

Na grafikonu (slika 20) so podani izkoristki ekstrakcij hladne maceracije v odvisnosti od uporabljenega topila.

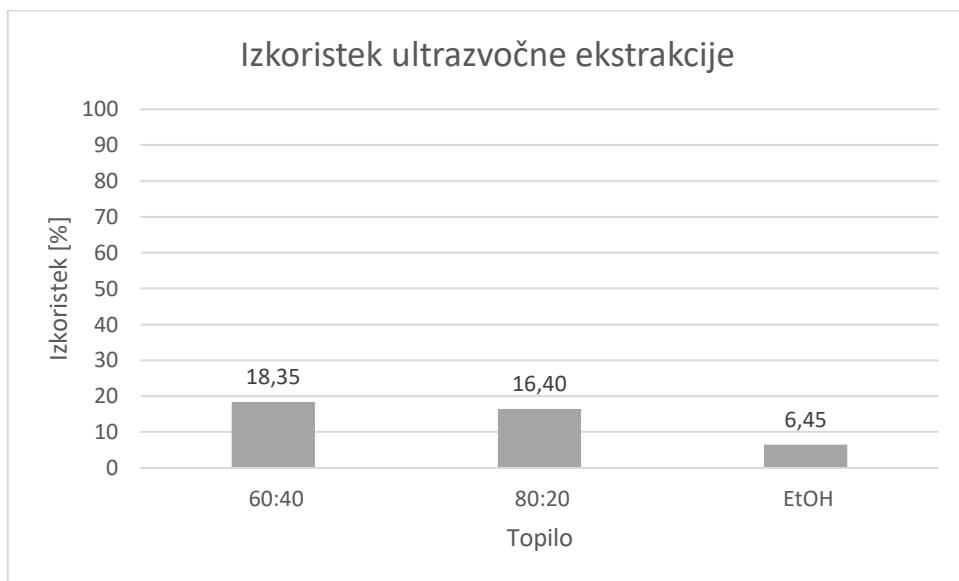


Slika 20: Grafikon izkoristka hladne maceracije

Iz grafikona je ponovno razvidno, da smo dobili najboljši izkoristek pri topilu 60:40, najslabši pa pri topilu EtOH.

4.1.3 Ultrazvočna ekstrakcija

Na grafikonu (slika 21) so prikazani izkoristki ultrazvočnih ekstrakcij.



Slika 21: Grafikon izkoristka ultrazvočne ekstrakcije

Kot pri Soxhlet ekstrakciji in hladni maceraciji smo tudi v tem primeru dobili najboljši izkoristek pri topilu 60:40, najslabši pa pri EtOH. V splošnem smo z ultrazvočno ekstrakcijo pri vsakem topilu pridobili najnižje izkoristke, pri Soxhlet ekstrakciji pa najvišje.

4.2 Analize

Naslednja podpoglavlja vključujejo rezultate antioksidativne in protimikrobne analize ekstraktov.

4.2.1 Določanje antioksidativne aktivnosti z radikalско metodo (DPPH)

Antioksidativno aktivnost snovi v vzorcu predstavlja inhibicija v odstotkih, izračunana po enačbi 4:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_s^{15}}{A_0} \cdot 100 \quad (4)$$

kjer je:
- A_0 referenčna absorbanca po času 0 min
- A_s^{15} absorbanca vzorca po času 15 min

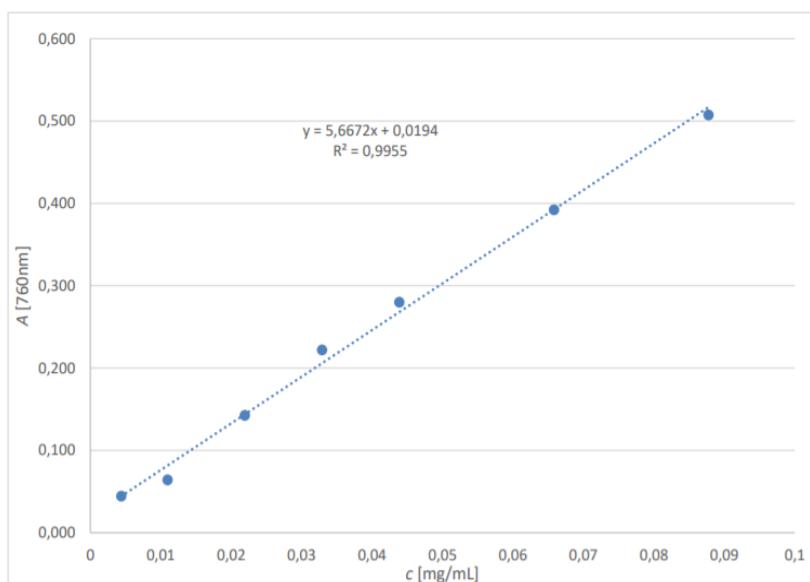
Absorbance in izračunane inhibicije so podane v tabeli 4.

Tabela 4: Absorbance in inhibicija radikalov za posamezne ekstrakcijske metode

DPPH	Sox 60:40	Sox 80:20	Sox EtOH	Hl 60:40	Hl 80:20	Hl EtOH	UZ 60:40	UZ 80:20	UZ EtOH
A_s^{15}	0,0555	0,0498	0,0471	0,0477	0,0487	0,0491	0,0482	0,0448	0,0503
% inhibicije	91,81	92,65	92,96	92,96	92,82	92,76	92,89	93,39	92,58

4.2.2 Določanje vsebnosti totalnih fenolov

Slika 22 prikazuje umeritveno premico. Enačbo umeritvene premice smo uporabili za preračun masne koncentracije totalnih fenolov (TF), pridobljenih ekstraktov.



Slika 22: Umeritvena premica galne kisline

Tabela 5 prikazuje absorbanco raztopin ekstraktov, masno koncentracijo TF v vzorcu, masni delež TF v mg na g ekstrakta ($w_{TF,ekstrakt}$) in masni delež TF v mg na g materiala ($w_{TF,material}$).

Tabela 5: Izračunane vrednosti pri analizi TF

TF	Sox 60:40	Sox 80:20	Sox EtOH	Hl 60:40	Hl 80:20	Hl EtOH	UZ 60:40	UZ 80:20	UZ EtOH
A_{vzorec}	2,274	2,188	2,252	2,278	2,190	2,137	2,303	2,313	2,375
$\gamma_{TF,vzorec}$ [mg/mL]	0,40	0,38	0,39	0,40	0,38	0,37	0,40	0,40	0,42
$w_{TF,ekstrakt}$	197,89	190,97	197,64	198,05	190,96	185,59	201,95	201,66	207,81
$w_{TF,material}$	94,69	63,02	23,64	63,97	36,19	13,83	37,06	33,07	13,40

Masno koncentracijo TF v vzorcu smo izračunali z uporabo izmerjene absorbance vzorca in empirično določeno enačbo za odvisnost absorbance od masne koncentracije galne kisline (enačba 5).

$$A_{\text{vzorec}} = a \cdot \gamma_{\text{TF,vzorec}} + b$$

$$\gamma_{\text{TF,vzorec}} = \frac{A_{\text{vzorec}} - b}{a} \quad (5)$$

kjer je:	- A_{vzorec}	absorbanca vzorca pri valovni dolžini 760 nm
	- a	naklon umeritvene premice
	- b	odsek premice na ordinatni osi
	- $\gamma_{\text{TF,vzorec}}$	masna koncentracija totalnih fenolov v vzorcu [mg/mL]

Masni delež TF [mg/g] v ekstraktu izračunamo po enačbi 6:

$$w_{\text{TF,ekstrakt}} = \frac{V_{(\text{raztopine ekstr.})} \cdot \gamma_{\text{TF,vzorec}}}{m_{\text{ekstrakt}}} \quad (6)$$

kjer je.	- $V_{(\text{raztopine ekstr.})}$	prostornina raztopine ekstrakta (10 mL)
	- m_{ekstrakt}	masa raztopljenega ekstrakta

Največji masni delež FT v ekstraktu smo pridobili z ultrazvočnimi ekstrakcijami, ki so bile v tem pogledu najučinkovitejše pri vseh treh topilih.

Masni delež TF v materialu izračunamo z enačbo 7:

$$w_{\text{TF,material}} = \frac{\%_{\text{izkoristek}} \cdot (A_{\text{vzorec}} - 0,0194) \cdot V_{\text{raztopine}}}{100 \times 5,6672 \cdot m_{\text{ekstrakt}}} \quad (7)$$

kjer je:	- $\%_{\text{izkoristek}}$	izkoristek ekstrakcije v %
	- $V_{\text{raztopine}}$	prostornina raztopine vzorca (20 mL)
	- m_{ekstrakt}	masa vzorca v raztopini

4.2.3 Določanje vsebnosti proantocianidinov

Molsko koncentracijo proantocianidinov (PAC) izračunamo po enačbi 8:

$$c_{\text{PAC}} = \frac{A_{\text{vzorec}}}{l \cdot \epsilon} \quad (8)$$

kjer je:	- A_{vzorec}	absorbanca vzorca pri valovni dolžini 540 nm
	- 1	premer kivete (1 cm) oz. razdalja, na kateri se meri A
	- ϵ	absorpcijski koeficient (34700 L/cm mol)

Masno koncentracijo PAC izračunamo po enačbi 9:

$$\gamma_{\text{PAC}} = \frac{A_{\text{vzorec}} \cdot M_{\text{PAC}} \cdot V_{\text{k,razt.}}}{l \cdot \epsilon \cdot V_{\text{ekstr.}}} \quad (9)$$

kjer je:	- M_{PAC}	molska masa PAC (277,9 g/mol)
	- $V_{\text{k,razt.}}$	končna prostornine raztopine za analizo (11 mL)
	- $V_{\text{ekstr.}}$	prostornina raztopine ekstrakta v končni raztopini (1 mL)

Rezultate vsebnosti PAC smo izrazili v mg PAC na g suhega ekstrakta ($w_{\text{PAC,ekstrakt}}$), kar smo izračunali po enačbi 10 ali v mg PAC na g materiala ($w_{\text{PAC,material}}$), kar smo izračunali po enačbi 12:

$$w_{\text{PAC,ekstrakt}} = \frac{\gamma_{\text{PAC}}}{\gamma_{\text{ekstrakt}}} \cdot 1000 \quad (10)$$

$$\gamma_{\text{ekstrakt}} = \frac{m_{\text{zatehte}}}{V_{\text{razt.ekstr.}}} \quad (11)$$

$$w_{\text{PAC,material}} = w_{\text{PAC,ekstrakt}} \cdot \frac{\eta_{\text{ekstrakcije}}}{100} \quad (12)$$

kjer je:

m_{zatehte} – masa ekstrakta, ki smo ga zatehtali za pripravo osnovne raztopine ekstrakta (mg),

$V_{\text{razt.ekstr.}}$ – prostornina raztopine ekstrakta (10 mL).

Tabela 6 prikazuje absorbanco raztopin ekstraktov (A_{vzorec}), masno koncentracijo PAC v vzorcu (γ_{PAC}), masni delež PAC v mg na g ekstrakta ($w_{\text{PAC,ekstrakt}}$) in masni delež PAC v mg na g materiala ($w_{\text{PAC,material}}$).

Tabela 6: Rezultati analize vsebnosti PAC v ekstraktih

PAC	Sox 60:40	Sox 80:20	Sox EtOH	Hl 60:40	Hl 80:20	Hl EtOH	UZ 60:40	UZ 80:20	UZ EtOH
A_{vzorec}	0,2219	0,2347	0,1424	0,3453	0,2429	0,4914	0,2870	0,2455	0,3288
γ_{PAC}	0,02	0,02	0,01	0,03	0,02	0,04	0,03	0,02	0,03
$w_{PAC,ekstrakt}$	3,91	4,14	2,50	6,08	0,24	8,66	5,07	4,31	5,78
$w_{PAC,material}$	1,87	1,37	0,30	1,97	0,81	0,65	0,93	0,71	0,37

4.2.4 Določanje protimikrobnih lastnosti

Po inkubaciji smo z digitalnim kljunastim merilom izmerili premere inhibicijskih konokoli diskov z ekstrahiranimi učinkovinami. Meja inhibicijske cone je jasno vidna kot prekinitve biofilma. Podatke smo zbirali na dve decimalki milimetra natančno in pod tremi koti (okoli diska smo kljunasto merilo za vsako novo merjenje zasukali za 60°), ki smo jih le ocenili in jih nismo določali s kotomerom. Naša absoluta merska napaka je torej znašala $\pm 0,01$ mm.

Najboljši protimikrobni učinek so imeli ekstrakti ultrazvočne ekstrakcije na Gram pozitivne bakterije *B. cereus* (slika 23). V prvi petrijevki je bila meja inhibicijske cone od diska v povprečju oddaljena $2,90 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$, v drugi petrijevki z enakimi ekstrakti in s kulturami pa $2,40 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$. Ekstrakti rasti Gram negativnih bakterij *E. coli* (slika 24) niso zavirali. V vseh primerih se je biofilm razširil vse do robov diskov.



*Slika 23: Inkubirana petrijevka kulture *B. cereus**



*Slika 24: Inkubirana petrijevka kulture *E. coli**

5. INTERPRETACIJA REZULTATOV

Namen raziskovalne naloge je bil z različnimi ekstrakcijskimi metodami in topili iz olupka granatnega jabolka (*Punica granatum*) pridobiti različne ekstrakte. Iz podatkov (priloga 1), ki smo jih zbrali po ekstrakcijah, so razvidne razlike v učinkovitosti ekstrakcijskih metod. S primerjanjem izračunanih ekstrakcijskih izkoristkov lahko ugotovimo, katera ekstrakcijska metoda je iz trdnega materiala ekstrahirala največ v topilu dobro topnih snovi in kolikšna je razlika med učinkovitostjo ekstrakcijskih metod. Soxhlet ekstrakcije so se v primerjavi s hladno maceracijo in z ultrazvočno ekstrakcijo pri uporabi enakih topil v vseh treh izvedbah izkazale za najučinkovitejše. Izkoristek Soxhlet ekstrakcije s topilom EtOH (11,95 %) je skoraj dvakrat višji od izkoristka UZ ekstrakcije (6,45 %) in višji od izkoristka hladne maceracije za 4,5 % pri uporabi enakih topil. Pri topilu 80:20 je ponovno najučinkovitejša metoda Soxhlet ekstrakcija (33 %), ki je kar dvakrat bolj učinkovita kot ultrazvočna ekstrakcija (16,4 %). Izkoristek hladne maceracije je bil 18,95 %. Najvišji izkoristek smo pridelali s Soxhlet ekstrakcijo in z volumskim razmerjem etanola in vode 60:40. Pridobili smo 9,57 g ekstrakta, kar je znašalo 47,85 % mase materiala. Moj vir je z uporabo Soxhlet ekstrakcijske metode iz 400 g posušenega olupka granatnega jabolka v prahu v 16 urah izvajanja uspel pridobiti približno 20 g ekstrakta, torej z izkoristkom 5 %. Kot topilo je bil uporabljen čisti etanol (Al-Bahadili, 2019). Razlika v rezultatih je nekaj več kot 6 %.

Potrdili smo prvo hipotezo:

I. Večji ekstrakcijski izkoristki so pričakovani pri višji temperaturi ekstrakcije (Soxhlet).

Soxhlet ekstrakcija poteka v primerjavi s hladno maceracijo in z ultrazvočno ekstrakcijo pri višjih temperaturah. Znano je, da se v splošnem topnost trdnih in tekočih snovi v topilu viša s temperaturo.

Soxhlet ekstrakcijska metoda se od preostalih dveh metod razlikuje tudi v tem, da v ekstraktor Soxhlet aparatu ves čas kaplja čisto topilo, ki lahko v že opisanem ciklu vedno znova raztopi enake količine topnih snovi, dokler so te prisotne v materialu. Pri izvajanju hladne maceracije in ultrazvočne ekstrakcije, koncentracija topila, ki aktivno ekstrahira snovi iz materiala, ves čas narašča, zato je postopek ekstrakcije topnih snovi vedno počasnejši. Z razumevanjem teh dejavnikov lahko razložimo boljše izkoristke Soxhlet ekstrakcije v primerjavi z ostalima dvema metodama.

Potrdili smo drugo hipotezo:

II. Večji ekstrakcijski izkoristki so pričakovani pri bolj polarnih topilih (volumsko razmerje etanola in vode 60:40).

Izkoristki so bili največji z uporabo topila 60:40 pri vseh ekstrakcijskih metodah. Ker je voda bolj polarna od etanola, se polarne (fenolne) spojine v materialu lažje topijo v topilu 60:40 kot v čistem EtOH.

Čeprav so ekstrakcijski izkoristki uporabni za določanje učinkovitosti ekstrakcije in so sploh v industriji zelo zaželeni za večjo produktivnost in izkupiček, pa iz njih ne moremo razbrati vsebnosti snovi z antioksidativnimi in s protimikrobnimi lastnostmi. V prilogi 2 so vidni rezultati analize vsebnosti TF v ekstraktih. Masne deleže TF v ekstraktih smo podali z enoto mg TF/g ekstrakta. Razlike v rezultatih med ekstrakti so majhne. Najvišje masne deleže so vsebovali ekstrakti, pridobljeni z ultrazvočno ekstrakcijsko metodo. Ugotovili smo, da je ultrazvočna ekstrakcija kljub majhnim izkoristkom izjemno učinkovita metoda za pripravljanje ekstraktov, bogatih z aktivnimi učinkovinami. Kot nekonvencionalna ekstrakcijska metoda prekaša konvencionalne metode v izolaciji fenolov, kljub krajšemu času izvajanja in nižjim temperaturam. Bolj se razlikujejo izračunani masni deleži TF v materialu [mg TF/g materiala]. Pri izračunu masnega deleža smo uporabili izkoristek ekstrakcije. Čeprav so bili izkoristki ultrazvočne ekstrakcije nizki, to očitno ni povzročilo manjše vsebnosti TF v ekstraktih. Nasprotno, masne koncentracije so bile pri vseh topilih najvišje prav pri ekstraktih ultrazvočne ekstrakcije.

Tretja hipoteza pravi:

III. Izbira topila in ekstrakcijske metode vpliva na koncentracijo izoliranih fenolov, posledično pa na antioksidativnost in protimikrobnoučinkovitost.

Čeprav so se izkoristki močno razlikovali med seboj, se antioksidativni potenciali, pridobljeni z radikalno metodo DPPH, in vsebnost TF v ekstraktih niso znatno razlikovali. Na podlagi tega lahko zaključimo, da ekstrakcijska metoda na splošno antioksidativnost in koncentracijo TF vpliva zelo blago. V mojem viru so ugotovili nižanje vsebnosti TF in flavonoidov v ekstraktih z zviševanjem temperature, pri kateri poteka ekstrakcija (Šušteršič, 2021). V našem primeru je ekstrakcijska metoda z višjo temperaturo Soxhlet. Tega z našimi podatki ne moremo zanesljivo potrditi. Predvidevamo, da je omenjena ekstrakcijska metoda potekala pri temperaturah, ki še niso vplivale na termično degradacijo fenolnih komponent.

Najvišji masni delež PAC v vzorcu smo ugotovili pri hladni maceraciji z EtOH (8,66 mg PAC/g ekstrakta) (priloga 3), izstopata pa še hladna maceracija s 60:40 (6,08 mg PAC/g ekstrakta) in ultrazvočna ekstrakcija z EtOH (5,80 mg PAC/g ekstrakta). Vsebnost PAC v ostalih ekstraktih je pod vrednostjo 5 mg PAC/g ekstrakta.

Splošno antioksidativno aktivnost smo merili z metodo inhibicije prostih radikalov z DPPH. Rezultati so prikazani v tabeli 4. Nižja absorbanca vzorca po 15 min pomeni višjo inhibicijo oz. antioksidativno aktivnost snovi v vzorcu. Rezultati kažejo na odlično antioksidativnost. Inhibicija prostih radikalov se pri ekstraktih ni močno razlikovala in je v vseh primerih presegala 90 %. Najvišjo inhibicijo (93,39 %) smo izračunali pri ultrazvočni ekstrakciji s topilom 80:20. Ugotovili smo povezano med visokimi količinami vsebnosti TF v ekstraktih in visoko inhibicijo prostih radikalov raztopin vzorcev. Tretja hipoteza omenja vpliv izbire ekstrakcijske metode in topila na antioksidativnost in protimikrobnno delovanje ekstraktov. Premeri inhibicijskih konokoli diskov so se razlikovali v odvisnosti od nanešenega ekstrakta. Ekstrakt, ki je najmanj vplival na rast bakterij, smo pridobili z ultrazvočno ekstrakcijo in EtOH topilom (1,83 mm in 1,95 mm), največji premer inhibicijske cone pa je povzročil ekstrakt ultrazvočne ekstrakcije s topilom 80:20 (2,9 mm in 2,4 mm). Hipotezo lahko potrdimo, saj lahko opazimo razlike v rezultatih antioksidativnih in protimikrobnih učinkov glede na izbor topila in ekstrakcijske metode.

Pred izvajanjem mikrobioloških analiz smo si postavili četrto in peto hipotezo:

IV. Večja je antioksidativnost oz. vsebnost fenolov v ekstraktih, boljša je protimikrobnna učinkovitost.

V. Ekstrakti imajo različen protimikroben učinek proti Gram pozitivnim ali Gram negativnim sevom bakterij.

V prilogi 4 so zbrane meritve premerov inhibicijskih konokoli diskov in povprečne vrednosti razdalje med robovi inhibicijskih konokoli in robovi diskov. Vsak disk ima premer 6,3 mm. V razpredelnicah hitro opazimo, da znaša pri kulturi *E. coli* povprečna vrednost širine inhibicijskega območja 0. Sklepamo, da dodatna celična membrana Gram negativnih bakterij onemogoči protimikrobnno aktivnost spojin v ekstraktih. Gram pozitivne bakterije so na te učinke bolj občutljive. Največjo povprečno širino inhibicijske cone (gojišče I- 2,9 mm, gojišče II- 2,4 mm) smo izmerili pri obeh gojiščih *B. cereusa* z ekstrakti ultrazvočne ekstrakcije in topila 80:20. S temi podatki lahko potrdimo četrto hipotezo, saj so rezultati ultrazvočne ekstrakcije najboljši tako pri merjenju antioksidativnih lastnosti kot pri merjenju protimikrobnne

učinkovitosti. Ker ekstrakti na Gram negativne bakterije niso imeli vpliva, rast gram pozitivnih bakterij pa so uspešno zavirali, lahko potrdimo tudi peto hipotezo.

6. ZAKLJUČEK

Za ekstrakcijsko metodo, s katero smo proizvedli največji izkoristek, se je izkazala Soxhlet metoda s topilom 60:40. Kljub dobremu izkoristku pa ekstrakti, pridobljeni s Soxhlet metodo, niso dosegali najboljših rezultatov pri analizah antioksidativne učinkovitosti. Njihov odstotek inhibicije prostih radikalov je bil nekoliko nižji v primerjavi z ostalimi. Prav tako tudi vsebnosti PAC in TF niso znatno presegali rezultatov ostalih ekstraktov. Izjemno nizke izkoristke smo opazili pri ultrazvočni ekstrakciji, kljub temu pa so ti ekstrakti pokazali v povprečju najvišjo antioksidativno aktivnost in dobre protimikrobnne učinke. Mikrobiološke analize so pokazale odlično učinkovitost preučevanih ekstraktov pri inhibiciji širjenja Gram pozitivnih bakterij *B. cereus* in neučinkovitost pri Gram negativnih bakterijah *E. coli*.

Ugotovili smo, da se snovi v ekstraktih olupka granatnega jabolka *ponašajo* z visoko antioksidativno učinkovitostjo. Ker je ultrazvočna ekstrakcija hkrati enostavna za izvedbo in dokazano najprimernejša za izolacijo aktivnih učinkov in antioksidativnimi ter protimikrobnimi lastnostmi, bi se ekstrakcija učinkov in odpadnih materialov z uporabo te ekstrakcijske metode lahko tudi industrializirala. Poleg zagotavljanja antioksidativnega učinka bi bili pridobljeni ekstrakti uporabni tudi za zatiranje razmnoževanja Gram pozitivnih bakterij bodisi v medicini, farmacevtski ali nutracevtski industriji. Z nalogo smo ovrednotili hipoteze in dosegli zastavljene cilje. Odprli smo tudi možnost za nadaljnje raziskave z namenom določanja optimalnega razmerja etanola in vode v topilu ter vplivu velikosti delcev materiala na učinkovitost ekstrakcij.

7. DRUŽBENA ODGOVORNOST

Z objavo te raziskovalne naloge smo družbeno odgovorni, saj družbi doprinesemo s tem, da delimo ugotovitve o preučevanih ekstraktih in vplivu različnih ekstrakcijskih metodah na raznolikost ekstraktov. S svojimi raziskavami nismo posegali v okolje. Rezultatov nismo pripredali, prav tako smo si prizadevali za natančnost in transparentnost. Izsledki raziskovalne naloge so uporabni in se lahko prenesejo v farmacevtsko industrijo ter tako prispevajo k razvoju zdravil ali prehranskih dopolnil.

8. PRILOGE

8.1 Priloga 1

Tabela 7: Podatki o ekstrakcijah

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
3 Soxhlet 40:60 (H₂O:EtOH) - 4h												
4 m (materiala) (v g)	20	m (topila) (v mL)	V (topila) (v mL)	m (materijala)	20	V (topila) (v mL)	m (topila) (v mL)	m (materiala)	20	V (topila) (v mL)	m (materiala)	20
5 V (topila) (v mL)	150	m (bučke)	136,05	m (bučke)	125,26	m (bučke)	125,26	m (bučke)	125,26	m (bučke)	125,26	150
6 m (bučke)	136,05	m(bučke+ekstrakta)	145,62	m(bučke+ekstrakta)	131,72	m(bučke+ekstrakta)	131,72	m(bučke+ekstrakta)	131,72	m(bučke+ekstrakta)	131,72	130,67
7 m(bučke+ekstrakta)	145,62	m(ekstrakta)	9,57	m(ekstrakta)	6,46	m(ekstrakta)	6,46	m(ekstrakta)	6,46	m(ekstrakta)	6,46	134,34
8 m(ekstrakta)	9,57	izkoristek (%)	32,3	izkoristek (%)	32,3	izkoristek (%)	32,3	izkoristek (%)	32,3	izkoristek (%)	32,3	3,67
9 izkoristek (%)	47,85											18,35
10												
11 Soxhlet 20:80												
12 m (materiala) (v g)	20	m (topila) (v mL)	150	m (materijala)	20	V (topila) (v mL)	150	m (topila) (v mL)	20	V (topila) (v mL)	150	20
13 V (topila) (v mL)		m (bučke)	136,04	m (bučke)	130,64	m(bučke+ekstrakta)	142,64	m(bučke+ekstrakta)	134,43	m(bučke+ekstrakta)	134,43	150
14 m (bučke)	136,04	m(ekstrakta)	6,6	m(ekstrakta)	3,79	m(ekstrakta)	6,6	m(ekstrakta)	3,79	m(ekstrakta)	3,79	130,67
15 m(bučke+ekstrakta)	142,64	izkoristek (%)	33	izkoristek (%)	18,95	izkoristek (%)	33	izkoristek (%)	18,95	izkoristek (%)	18,95	133,95
16 m(ekstrakta)	6,6											3,28
17 izkoristek (%)	33											
18												
19 Soxhlet EtOH												
20 m (materiala) (v g)	20	m (topila) (v mL)	150	m (materijala)	20	V (topila) (v mL)	150	V (topila) (v mL)	20	V (topila) (v mL)	150	20
21 V (topila) (v mL)		m (bučke)	129,94	m (bučke)	125,11	m(bučke+ekstrakta)	132,33	m(bučke+ekstrakta)	126,6	m(bučke+ekstrakta)	126,6	150
22 m (bučke)	129,94	m(ekstrakta)	2,39	m(ekstrakta)	1,49	m(ekstrakta)	2,39	m(ekstrakta)	1,49	m(ekstrakta)	1,49	130,67
23 m(bučke+ekstrakta)	132,33	izkoristek (%)	11,95	izkoristek (%)	7,45	izkoristek (%)	11,95	izkoristek (%)	7,45	izkoristek (%)	7,45	131,96
24 m(ekstrakta)	2,39											1,29
25 izkoristek (%)	11,95											6,45
26												

8.2 Priloga 2

Tabela 8: Podatki o določanju vsebnosti TF v ekstraktih

J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
Soxhlet 40:60 (H₂O:EtOH)											
Hladna maceracija 40:60											
Abs	2,2736				Abs	2,2776					
γ(fenoli)	0,39776				γ(fenoli)	0,39847					
m(ekstrakt)	20,1				m(ekstrakt)	20,12					
V(razt.)	10				V(razt.)	10					
Wekstrakt)	2,01				Wekstrakt)	2,012					
w(ekstrakt)	197,892				w(ekstrakt)	198,046					
w(material)	94,6912				w(material)	63,9688					
Ultrazvočna kopel 40:60											
Abs					Abs						
γ(fenoli)					γ(fenoli)						
m(ekstrakt)					m(ekstrakt)						
V(razt.)					V(razt.)						
Wekstrakt)					Wekstrakt)						
w(ekstrakt)					w(ekstrakt)						
w(material)					w(material)						
Soxhlet 20:80 (H₂O:EtOH)											
Hladna maceracija 20:80											
Abs	2,1883				Abs	2,1903					
γ(fenoli)	0,38271				γ(fenoli)	0,38306					
m(ekstrakt)	20,04				m(ekstrakt)	20,06					
V(razt.)	10				V(razt.)	10					
Wekstrakt)	2,004				Wekstrakt)	2,006					
w(ekstrakt)	190,974				w(ekstrakt)	190,959					
w(material)	63,0213				w(material)	36,1867					
Ultrazvočna kopel 20:80											
Abs					Abs						
γ(fenoli)					γ(fenoli)						
m(ekstrakt)					m(ekstrakt)						
V(razt.)					V(razt.)						
Wekstrakt)					Wekstrakt)						
w(ekstrakt)					w(ekstrakt)						
w(material)					w(material)						
Soxhlet EtOH											
Hladna maceracija EtOH											
Abs	2,2523				Abs	2,1366					
γ(fenoli)	0,394				γ(fenoli)	0,37359					
m(ekstrakt)	19,92				m(ekstrakt)	20,13					
V(razt.)	10				V(razt.)	10					
Wekstrakt)	1,992				Wekstrakt)	2,013					
w(ekstrakt)	197,793				w(ekstrakt)	185,588					
w(material)	23,6363				w(material)	13,8263					
Ultrazvočna kopel EtOH											
Abs					Abs						
γ(fenoli)					γ(fenoli)						
m(ekstrakt)					m(ekstrakt)						
V(razt.)					V(razt.)						
Wekstrakt)					Wekstrakt)						
w(ekstrakt)					w(ekstrakt)						
w(material)					w(material)						

8.3 Priloga 3

Tabela 9: Podatki o vsebnosti PAC v ekstraktih

PROANTOCIANIDINI		Soxhlet 40:60 (H2O:EtOH)						Hladna maceracija 40:60						Ultrazvočna kopel 40:60					
		Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs		
		γ(pac)	γ(pac)	γ(pac)	γ(pac)	m (zatehte)	m (zatehte)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	m (zatehte)	m (zatehte)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	γ(pac)	γ(pac)		
		0,2219	0,019548	50,04	10	5,004	3,906535	1,869277								0,287	0,025283		
																49,83	49,83		
																10	10		
																4,983	4,983		
																5,07391	5,07391		
																0,931063	0,931063		
Soxhlet 20:80		Hladna maceracija 20:80						Ultrazvočna kopel 20:80						Hladna maceracija 20:80					
		Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs		
		γ(pac)	γ(pac)	γ(pac)	γ(pac)	m (zatehte)	m (zatehte)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	m (zatehte)	m (zatehte)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	γ(pac)	γ(pac)		
		0,2347	0,020676	49,93	10	4,993	4,140981	1,366524								0,2455	0,021627		
																50,2	50,2		
																10	10		
																5,02	5,02		
																4,308237	4,308237		
																0,706551	0,706551		
Soxhlet EtOH		Hladna maceracija EtOH						Ultrazvočna kopel EtOH						Hladna maceracija EtOH					
		Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs		
		γ(pac)	γ(pac)	γ(pac)	γ(pac)	m (zatehte)	m (zatehte)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	m (zatehte)	m (zatehte)	V razt.ekstr. (mL)	V razt.ekstr. (mL)	γ(pac)	γ(pac)		
		0,1424	0,012545	50,16	10	5,016	2,500945	0,298863								0,3288	0,028966		
																50,12	50,12		
																10	10		
																5,012	5,012		
																5,779264	5,779264		
																0,372163	0,372163		
PODATKI:																			
I (cm)		1																	
Mr(pac) (g/mol)		277,9																	
ε (L/cm mol)		34700																	
Vekstr. (mL)		1																	
Vk, razt (mL)		11																	

8.4 Priloga 4

Tabela 10: Podatki o odstopanju robov inhibičijskih con od diskov pri mikrobioloških analizah

9. BIBLIOGRAFIJA

Al-Bahadili HNK (2019): Antimicrobial Activity of the Compound 2-Piperidinone, N-[4-Bromo-n-butyl]- Extracted from Pomegranate Peels. Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm, 13, doi:10.22377/ajp.v13i01.3008.

Aryal S (2015): Gram Staining: Principle, Procedure, Interpretation, Examples and Animation.

Brennan (2021): Difference Between Gram-Positive and Gram-Negative Bacillus.
<https://www.webmd.com/a-to-z-guides/difference-between-gram-positive-bacillus-gram-negative-bacillus> (accessed: 06/03/2022).

CARLO ERBA Reagents <https://www.carloerbareagents.com/cerstorefront/cer-exp/> (accessed: 07/03/2022).

Carter J (2018): What is Phenol? Medical Uses, Health Benefits, and Risks.
<https://www.healthline.com/health/what-is-phenol> (accessed: 06/03/2022).

Craig LC, Gregory JD, Hausmann Werner (1950): Versatile Laboratory Concentration Device. Analytical Chemistry, 22, 1462–1462. doi:10.1021/ac60047a601.

Desmarchelier, Fegan (2002): Escherichia coli - an overview | ScienceDirect Topics.
<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/escherichia-coli> (accessed: 06/03/2022).

Fuhrman J (2013): Superimunost: temeljni vodnik po prehrani za obrambo in krepitev zdravja. Mladinska knjiga Založba, Ljubljana.

Ikawa M, Schaper TD, Dollard CA, Sasner JJ (2003): Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1811–1815. doi:10.1021/jf021099r.

Jensen WB (2007): The Origin of the Soxhlet Extractor. Journal of Chemical Education, 84, 1913. doi:10.1021/ed084p1913.

Ko K, Dadmohammadi Y, Abbaspourrad A (2021): Nutritional and Bioactive Components of Pomegranate Waste Used in Food and Cosmetic Applications: A Review. Foods, 10, 657. doi:10.3390/foods10030657.

Kreft S, Kočevar Glavač N, Stojilkovski K, Mlinarič A, Injac R, Novak A, Doljak B (2013): Sodobna fitoterapija: z dokazi podpora uporaba zdravilnih rastlin. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana.

Louie KB, Kosina SM, Hu Y, Otani H, de Raad M, Kuftin AN, Mouncey NJ, Bowen BP, Northen TR (2020): Mass Spectrometry for Natural Product Discovery In: Comprehensive Natural Products III. Elsevier, , pp. 263–306.

McDowell RH, Sands EM, Friedman H (2022): Bacillus Cereus In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), p.

Medić-Šarić M, Buhač I, Bradamante V (2002): Vitamini in minerali. In obs medicus, Ptuj.

MedlinePlus (2015): Minerals. National Library of Medicine, <https://medlineplus.gov/minerals.html> (accessed: 06/03/2022).

Menchicchi B, Hensel A, Goycoolea FM (2015): Polysaccharides as Bacterial Antiadhesive Agents and ‘Smart’ Constituents for Improved Drug Delivery Systems Against Helicobacter pylori Infection. Current Pharmaceutical Design, 21, 4888–4906. doi:10.2174/1381612821666150820104028.

Nichols (2017): 4: Extraction.

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_\(Nichols\)/04%3A_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/04%3A_Extraction) (accessed: 05/03/2022).

Pahlow M (1987): Velika knjiga o zdravilnih rastlinah. Cankarjeva založba, Ljubljana.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016): Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science, 5, e47. doi:10.1017/jns.2016.41.

Petruševski VM, Najdoski MZ (2001): Volume Nonadditivity of Liquid Mixtures: Modifications to Classical Demonstrations. The Chemical Educator, 6, 161–163. doi:10.1007/s00897010478a.

Šušteršič E (2021): Separacija vrednih spojin iz lupin granatnega jabolka : diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje. [E. Šušteršič], <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=80168>.

Vrtačnik, Zmazek, Boh (2014): Derivati pirana. <https://eucbeniki.sio.si/kemija3/1284/index4.html>.

Zalar U (2011): Vsebnost fenolnih spojin v granatnem jabolku (*Punica granatum*) : diplomsko delo, univerzitetni študij. [U. Zalar], <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=1390> (accessed: 20/02/2022).

Zhao B-L, Duan S-J, Xin W-J (1990): Lymphocytes can produce respiratory burst and oxygen radicals as polymorphonuclear leukocytes. Cell Biophysics, 17, 205–211. doi:10.1007/BF02990717.

Žontar (2018): Kaj so antioksidanti in kje jih najdemo? <https://www.super-hrana.si/kaj-so-antioksidanti-in-kje-jih-najdemo> (accessed: 20/02/2022).

ZPS (2020): Antioksidanti v živilih. <https://www.zps.si/hrana-in-pijaa-topmenu-327/nasveti-za-zdravo-prehranjevanje/10538-antioksidanti-v-zivilih> (accessed: 20/02/2022).