

58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024

Vpliv začimb na trajnost in kvaliteto tofuja

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje: BIOTEHNOLOGIJA

Avtorja: Matija Čelig
Jaka Kop

Mentorica: Katja Holnthaner Zorec



Maribor, april 2024

Vsebina

Povzetek	V
Zahvala	VI
1 Uvod.....	1
1.1 Raziskovalna vprašanja.....	2
1.2 Hipoteze	2
2 Teoretični del.....	3
2.1 Tofu	3
2.2 Hren	4
2.3 Kurkuma.....	5
2.4 Cimet	6
2.5 Ingver	6
2.6 Čili	7
2.7 Česen	8
2.8 Uporabljene raziskovalne metode	8
2.8.1 Metoda štetja na ploščah	8
2.8.2 Določanje optične gostote (optical density, OD).....	9
2.8.3 Barvanje po Gramu.....	9
3 Materiali in metode dela	10
3.1.1 Začimbe in tofu	10
3.1.2 Zaščitna oprema	10
3.1.3 Kemikalije	10
3.1.4 Laboratorijski pribor.....	11
3.1.5 Laboratorijske aparature.....	11
3.2 Metode dela.....	12
3.2.1 Priprava kock tofuja.....	12
3.2.2 Priprava gojišč in fiziološke raztopine	13

3.2.3	Priprava filtrata iz kock tofuja	13
3.2.4	Meritve optične gostote	14
3.2.5	Priprava redčitvene vrste in razmaz redčitev na gojišča	14
3.2.6	Barvanje po Gramu in mikroskopiranje	15
3.2.7	Ocenjevanje organoleptičnih lastnosti tofuja	15
3.2.8	Statistika	15
4	Rezultati	16
4.1	Metoda štetja bakterij na ploščah	16
4.2	Optična gostota bakterij	17
4.3	Določanje bakterij po Gramu.....	18
4.4	Metoda štetja gliv na ploščah	19
4.5	Optična gostota glivnih celic	21
4.6	Ocenjevanje organoleptičnih lastnosti tofuja.....	23
5	Razprava	26
6	Zaključek.....	30
7	Družbena odgovornost	31
8	Viri in literatura	32

Kazalo slik

Slika 1: Hren	4
Slika 2: Kurkuma	5
Slika 3: Cimet	6
Slika 4: Ingver.....	6
Slika 5: Čili	7
Slika 6: Česen	8
Slika 7: Potek dela	12
Slika 8: Filtrat kurkume.....	13
Slika 9: Redčitvena vrsta.....	14
Slika 10: 1 (Gram-pozitivni bacili, Česen 2), 2 (Gram-pozitivni koki, Kurkuma 1), 3 (Gram-negativni koki, Kontrola 1), 4 (Gram-pozitivni bacili, Cimet 1).	19

Kazalo grafov

Graf 1: Število bakterijskih kolonij (CFU), izoliranih iz tofuja pri kontroli in obdelanega z začimbami v 1 ml.....	17
Graf 2: Optična gostota (OD600) bakterij pri kontroli in tofuju, obdelanem z začimbami (+/- 1SD).....	17
Graf 3: Število glivnih CFU pri cimetu, kurkumi, ingverju, hrenu, česnu in kontroli v 1 ml.	20
Graf 4: Primerjava števila glivnih CFU med cimetom, kontrolo in čilijem v 1 ml.	20
Graf 5: Optična gostota (OD600) gliv pri kontroli in tofuju, obdelanem z začimbami (+/-1SD)	21
Graf 6: Primerjava vrednosti optične gostote v vzorcih gliv in bakterij.	22
Graf 7: Primerjava vrednosti štetja CFU v vzorcih gliv in bakterij.....	22
Graf 8: Povprečna vrednost ocen organoleptičnih lastnosti tofuja namočenega v suspenziji začimb in kontrole	23
Graf 9: Povprečna vrednost ocen organoleptičnih lastnosti tofuja namočenega v suspenzije začimb in kontrole moških.....	24
Graf 10: Povprečna vrednost ocen organoleptičnih lastnosti tofuja namočenega v suspenzije začimb in kontrole žensk.....	24
Graf 11: Združene povprečne vrednosti videza, vonja in okusa začimb ter kontrole.	25

Kazalo tabel

Tabela 1: Število bakterijskih kolonij in število bakterij vzorcev tofuja, obdelanega z različnimi.....	16
Tabela 2: Rezultati barvanja po Gramu in oblike bakterij, prisotnih v tofuju.	18
Tabela 3: Število glivnih kolonij in število glivnih celic vzorcev tofuja, obdelanega z različnimi.....	19

POVZETEK

Tofu je beljakovinsko bogata hrana, narejena iz sojinega mleka, ki se pogosto uporablja kot nadomestek mesa v vegetarijanskih ter veganskih jedeh. Zaradi visoke vsebnosti beljakovin in vode, se po odprtju embalaže hitro pokvari. V raziskovalni nalogi smo ugotavljali, kako različne začimbe kot so kurkuma, česen, hren, poper in čili paprika zavrejo razmnoževanje bakterij in gliv ter s tem podaljšajo trajnost izdelka, zanimalo nas je tudi, kako vplivajo na organoleptične lastnosti tofuja. Koščke tofuja smo namakali v vodi z dodanimi začimbami in po desetih dneh z metodo štetja kolonij na ploščah in merjenjem optične gostote (OD_{600}) primerjali količino bakterij in gliv, izoliranih iz koščkov. Ugotovili smo, da so vse začimbe, z izjemo čilija, zavrele razmnoževanje tako gliv kot bakterij. Za ugotavljanje vpliva začimb na organoleptične lastnosti je skupina dijakov ocenjevala vzorce tofuja, obdelane z različnimi začimbami. Najbolje so ocenili koščke, namočene v raztopino cimeta in česna. Tofu nima izrazitega okusa in se ga običajno pripravlja z začimbami, ki izboljšajo njegove organoleptične lastnosti, hkrati pa bi lahko služile kot naravni konzervansi, ki bi podaljšali njegov rok trajanja.

Ključne besede: tofu, hren, čili, kurkuma, česen, ingver, cimet, konzerviranje, protibakterijsko delovanje, protiglivno delovanje

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorici za vso pomoč in podporo pri izdelavi raziskovalne naloge. Za vse koristne napotke in ves čas, ki ga je namenila za najino raziskovalno nalogo. Zahvalila bi se tudi laborantki, ki nama je pomagala pri izvedbi naloge, ter pri pripravi in uporabi laboratorijskih pripomočkov.

1 UVOD

Konzervanse se v živilski industriji uporablja z namenom podaljšanja roka uporabe in ohranitve kakovosti živil. Zavirajo razvoj mikroorganizmov, predvsem bakterij in plesni, ki lahko hrano pokvarijo – spremenijo njene organoleptične lastnosti, povzročijo pa lahko tudi zastrupitev s hrano. Dandanes se uporabljajo tako sintetični kot tudi naravni konzervansi. Sintetične želimo v čim večji meri nadomestiti z naravnimi, saj lahko umetno pridobljeni konzervansi povzročajo nezaželene stranske učinke in bolezenska stanja (Gupta & Yadav, 2021).

Začimbe rastlinskega izvora so se že v preteklosti uporabljale kot naraven konzervans, njihovo uporabo pa so v zadnjem času podkrepile številne raziskave, ki potrjujejo njihovo protimikrobno delovanje, ki je ključnega pomena pri podaljšanju trajnosti živil in preprečevanju okužb s hrano (Chattopadhyay & Bhattacharyya, 2007).

Tofu je živilo, izdelano iz soje, ki izvira iz Azije, a se je tudi pri nas uveljavilo v veganski ter vegetarijanski prehrani. Predstavlja nadomestek mesu in ostalim živilom z visoko vsebnostjo beljakovin. Prav zaradi visoke vsebnosti beljakovin, vode in nevtralne pH vrednosti ima tofu kratek rok uporabnosti (1-2 dni pri sobni temperaturi) (Lim & Foo, 1993). Zato gre za primeren produkt za raziskovanje vpliva začimb na trajnost živil. Ob protimikrobnem delovanju lahko začimbe tudi oplemenitijo njegov sicer nevtralni okus.

Zaradi kratkega roka uporabe tofuja smo z raziskovalno nalogo želeli raziskati in predstaviti nove možnosti podaljšanja njegove trajnosti na naraven način. V raziskovalni nalogi smo uporabili šest začimb, ki se pogosto uporabljajo pri pripravljanju jedi iz tofuja: cimet, hren, čili, kurkuma, ingver in česen, saj je bilo za vse naštetе rastline potrjeno njihovo protimikrobno delovanje (Dhiman idr., 2016; Joe idr., 2009; Liu idr., 2017).

Preizkusiti smo želeli, katero začimbo bodo potrošniki izbrali kot tisto, ki najbolj izboljša okus, vonj in videz tofuja.

1.1 Raziskovalna vprašanja

Z nalogo smo želeli odgovoriti na naslednja vprašanja:

1. Ali bodo dodane začimbe cimet, hren, čili, kurkuma, ingver in česen zavrle razvoj bakterij in gliv na koščkih tofuja, namočenih v njihovo suspenzijo?
2. Ali bodo vse dodane začimbe cimet, hren, čili, kurkuma, ingver in česen bodo zavrla razvoj gliv na koščkih tofuja, namočenih v njihovo suspenzijo?
3. Katera začimba bo po mnenju udeležencev najbolj izboljšala organoleptične lastnosti tofuja (okus, izgled, vonj)?

1.2 Hipoteze

1. Vsa dodana zelišča, cimet, hren, čili, kurkuma, ingver in česen bodo zavrla razvoj bakterij na koščkih tofuja, namočenih v njihovo suspenzijo.
2. Vsa dodana zelišča cimet, hren, čili, kurkuma, ingver in česen bodo zavrla razvoj gliv na koščkih tofuja, namočenih v njihovo suspenzijo.

Številne dosedanje raziskave so dokazale protimikrobno (protiglivno in protibakterijsko) delovanje navedenih začimb (Liu idr., 2017; Pattaratanawadee idr., 2006; Sethi idr., 2013), zato lahko pričakujemo podobne rezultate tudi pri eksperimentu s tofujem.

3. Vse začimbe bodo imele po mnenju udeležencev enak učinek na vonj, okus in barvo koščkov tofuja.

V literaturi nismo našli podatkov o vplivu začimb na organoleptične lastnosti, zato smo postavili ničelno hipotezo.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 Tofu

Tofu, imenovan tudi sojin sir, izvira iz Kitajske, kjer so izvajali poskuse na sojinem mleku. Ko so mu dodali kisli reagent, se je mleko strdilo in nastal je tofu. Ta se je hitro razširil po vsej Aziji, nato pa tudi po vsem svetu. Tofu je v zadnjih letih postal popularen kot alternativen vir beljakovin v vegetarijanski in veganski prehrani. Gre za nefermentirano živilo z visoko vsebnostjo beljakovin (20%), vsebuje pa tudi maščobe (8%), ogljikove hidrate (15%) in ima nizko energijsko vrednost (Mustafa & Awad, 2020). Osnova za njegovo izdelavo je soja (*Glycine max*), enoletnica iz družine metuljnic, priljubljena zaradi visoke hranilne vrednosti, saj kar 38% njenih semen sestavljajo beljakovine, ki vsebujejo vse za človeka esencialne aminokislino (Petauer, 1993).

Tofu je lahko različne teksture, mehak, čvrst ali grudast. Ima nevtralen oziroma zelo blag okus. Izdeluje se ga iz sojinega mleka in sicer s koaguliranjem beljakovin, ki se nahajajo v njem. Ko beljakovine v sojinem mleku denaturirajo, se dobljena masa stisne. Tofu je zdrav, naraven, finančno dostopen vir beljakovin in je pogosto živilo tako v razvitih, kot tudi v državah v razvoju (Pal idr., 2019).

Zaradi visoke vsebnosti beljakovin, vode in nevtralnega pH je tofu dovzeten za hitro razrast mikroorganizmov, ki skrajšajo njegovo trajnost, predstavljajo pa lahko tudi nevarnost za naše zdravje. V številnih raziskavah so v vzorcih tofuja potrdili tudi prisotnost nevarnih bakterijskih vrst kot so *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii* in *Salmonella* spp. (Aulisio, 1983, Yamamura, 1992). Te lahko v našem organizmu povzročajo slabost, drisko, bruhanje... S konzerviranjem tofuja se lahko izognemo tovrstnim problemom. Poznamo različne metode, od zmrzovanje, vakumskega pakiranja, do uporabe različnih konzervansov kot so kalijev sorbat, citronska kislina, očetna kislina, kalcijev propionat (Lim, 1993), med njimi tudi konzervacijo z začimbami. Začimbe se v kulinariki pojavljajo že od antičnih časov. Čeprav so začimbe včasih služile predvsem dodajanju okusa hrani, pa jih danes uporabljamo tudi kot konzervanse (Gottardi idr., 2016).

Različne začimbe vsebujejo mnogo aktivnih spojin, ki delujejo antimikrobno, in hrani podaljšajo rok uporabe. Predvsem je pomembno, da začimbe hrano zaščitijo pred patogenimi

bakterijami. Te lahko najdemo tudi v tofuju. S protimikrobnim delovanjem začimb, lahko ne samo podaljšamo rok uporabe, vendar tudi zaščitimo naše telo pred okužbo z patogenimi bakterijami (Bari, 2012).

2.2 Hren

Hren (*Armoracia rusticana* P.) spada v družino križnic (*Brassicaceae*) ter izvira iz jugovzhodne Evrope. Ima bele debelejšje korenine, iz katerih se pripravi začimba. Je trajnica z velikimi listi s celimi robovi. Ima dolga cvetna stebela z majhnimi belimi cvetovi, ki tvorijo socvetje. V kulinariki se večinoma uporablja hrenova korenina, ki ima po pripravi značilen oster, pekoč okus. Hren so uporabljali v tradicionalni medicini že pred več kot 3000 leti. Uporabljali so ga za zdravljenje bronhitisa, okužb sečnega mehurja, revmatizma, anemije ter za lajšanje bolečin (Stillo idr., 2018).

Glukozinolati ali njihovi razgradni produkti so odgovorni za večino zdravilnih učinkov hrena in mu dajejo značilen pekoč okus. Med drugim delujejo protivnetno, protimikrobno in protirakavo (Walters, 2021). Glukozinolati so molekule, ki jih skoraj izključno najdemo v rastlinah rastlinske družine križnic (*Brassicaceae*). Številne raziskave nakazujejo na kemoprotektivni učinek razpadnih produktov glukozinolatov proti nastanku tumorjev (Cartea & Velasco, 2008; Traka & Mithen, 2009; Vig idr., 2009). Razpadni produkti glukozinolatov imajo obrambno vlogo in so lahko za rastlinojedce toksični. Delujejo tudi antimikrobno in spadajo med najmočnejše naravne antibiotike (Li idr., 2021).



Slika 1: Hren

(<https://www.melissas.com/products/horseradish-root>)

2.3 Kurkuma

Kurkuma (*Curcuma longa*) spada v družino ingverjevok (*Zingiberaceae*). Izvira iz jugovzhodne Azije (Hewlings & Kalman, 2017). Njen zunanji del rastline sestavljajo dolgi pecljati listi in cvetovi, ki so lahko različnih barv (rumeni, beli, roza, rdeči, vijolični). V kulinariki pa se uporabljajo kurkumini gomolji korenike, ki so valjaste in grbaste oblike, ponavadi oranžne ali rumene barve (Govindarajan & Stahl, 1980).



Slika 2: Kurkuma

(<https://www.tovarnazdravehrane.si/zdrav-koticcek/kurkuma-okusni-recepti-z-najbolj-zdravo-zacimbo-svetu-69301/>)

Kurkuma se v kulinariki uporablja že mnogo let. Najpogosteje se pojavlja v prahu, ki je narejen iz njenega gomolja. Kurkuma vsebuje mnogo mulekulskih snovi, za katere je bilo dokazano, da delujejo antibiotično, protirakavo, protivnetno in delujejo proti nastajanju tumorjev (Orellana-Paucar & Machado-Orellana, 2022). Glavna bioaktivna snov kurkume pa je kurkumin (Pulido-Moran idr., 2016).

Kurkumin je glavni polifenol, ki ga najdemo v koreniki kurkume. Je kristalična spojina svetlo rumene barve, zato se uporablja tudi kot živilsko barvilo. Večina zdravilnih učinkov kurkume je posledica kurkumina, ki deluje proti sladkorni bolezni, alergijam, artritisu, Alzheimerjevi bolezni in drugim kroničnim boleznim (Aggarwal idr., 2013; Hewlings & Kalman, 2017; Pulido-Moran idr., 2016). Deluje tudi antimikrobno. Zavira rast bakterij in gliv, prav tako pa deluje protivirusno (Trigo-Gutierrez idr., 2021).

2.4 Cimet

Cimet (*Cinnamomum zeylanicum*) je začimba, ki se pridobiva predvsem iz lubja in listov zimzelenih cimetovih dreves iz družine *Lauraceae* (Błaszczyk idr., 2021). Cimet izvira iz Šrilanke (nekdanji Cejlon). Cimet je znan predvsem po svoji značilni aromi. Uporablja se ga za izdelavo parfumov, zdravil, ter v živilski industriji (Rao & Gan, 2014). Zaradi svojih kemijskih lastnosti se uporablja kot protivnetno (Hong idr., 2012) ter protirakavo sredstvo (Lu idr., 2010). Deluje tudi antimikrobno (Liesel idr., 2008), antioksidativno (Mancini-Filho idr., 1998) in antidiabetično (Prabuseenivasan idr., 2006).



Slika 3: Cimet

(<https://www.dominvrt.si/eko/cimet.html>)

Cinamaldehyd je naravna spojina, ki jo najdemo v lubju dreves iz družine *Cinnamomum*. Že dolgo se ga uporablja kot aromatično sredstvo v žvečilnih bombonih, pijačah in sladkarijah. Poleg tega je aktiven zaviralec rasti bakterij in številnih gliv. Uspešno deluje antimikrobno zaradi svoje zmožnosti zaviranja biosinteze celične stene pri številnih mikroorganizmih (Shreaz idr., 2016).

2.5 Ingver

Ingver (*Zingiber officinale Roscoe*) je rod rastlin iz družine ingverjevok (*Zingiberaceae*). Rod Ingver ima približno 20 vrst. Izvira iz jugovzhodne Azije. Listnata stebila zrastejo do 1 metra. Listi so temno zelene barve dolgi od 15 do 30 cm. Ingver ima podzemno steblo, imenovano tudi korenika, iz katere se pridobiva začimba ingver (Adiele & Ezeokwelum, 2022; Souza idr., 2005).



Slika 4: Ingver

(<https://www.lantophianursery.com.au/online-shop/p/ginger-edible-plant-100mm>)

Ingver se uporablja v številnih oblikah, vključno s svežim, posušenim, vloženim, kandiranim ter kot začimba v prahu. Ima pekoč in rahlo sladek okus. Vonj je močan in pikanten. Uporablja se ga kot protivnetno sredstvo, antioksidant, protirakavo sredstvo ter proti slabosti (Anh idr., 2020).

Gingeroli so glavne spojine v koreninah ingverja in so znani po svojih zdravilnih lastnostih. Gingeroli povzročajo pekoč okus ingverja. Ima obrambno vlogo, saj je za mnoge rastlinojedce toksičen. Najdemo ga v obliki rumenega olja v ingverjevem korenu, lahko pa je tudi v obliki kristalaste trdne snovi. Zdravilne lastnosti ingverja, kot so lajšanje slabosti in bolečin, antioksidantnost ter njegova protivnetna lastnost se pripisujejo prav gingerolom (Bode & Dong, 2011). Prav tako izkazujejo številne druge biološke aktivnosti, kot so protirakave in antimikrobne (Semwal idr., 2015).

2.6 Čili

Čili (*Capsicum annuum* L.) je vrsta paprike (*Capsicum* L.) iz družine razhudnikovk (*Solanaceae*). Čili izvira iz Južne in Srednje Amerike in je enoletna rastlina. Ima plitev koreninski sistem. Zeleni listi, jajčastih oblik, so razporejeni po do 60 cm visokem stebelu. Cvetovi so lahko različnih barv, od belih, rumenih in rahlo vijoličastih. Plodovi čilija so večinoma rdeče barve. Barvila se nahajajo v zunanjih stenah plodov. Kapsantin in kapsorubin sta najpogostejša pigmenta. Čili je bogat vir vitaminov (E, C, A, B), mineralov (magnezij, kalcij, železo, kalij) in aminokislin. Čili pa je znan po svojem ostrem in pekočem okusu. Le tega mu daje molekula kapsaicin (Idrees idr., 2020; Saleh idr., 2018).



Slika 5: Čili

(<https://www.harighotra.co.uk/cooking-guides/indian-cooking-ingredients/chillies-facts>)

Kapsaicin je alkaloid, ki je glavna aktivna komponenta v čiliju. Je dražilo vseh sesalcev, ki povzroča občutek pekočnosti ob vsakem stiku s katerikoli tkivom. Skupaj s preostalimi petimi kapsaicinoidi v čiliju, delujejo antimikrobno, antioksidativno in protirakavo (Xiang idr., 2021). Čili-kapsaicin pa je treba uživati v zmernih količinah, saj le takrat učinkuje v dobro organizma. Pri prekomernem doziranju lahko pride tudi do obratnega učinka (Saleh idr., 2018).

2.7 Česen

Česen (*Allium sativum*) je začimba iz roda *Allium*, ki spada v družino *Alliaceae*. Dandanes ga je največ pridelanega na kitajskem. Rastline česna zrastejo približno 60 cm visoko. Dolgi tanki suličasti listi običajno rastejo iz kratkega trdega stebela nad čebulico. Na vrhu stebela so beli ali rdečkasti cvetovi. Čebulica česna je sestavljena iz več strokov, ki so v kulinariki tudi najpogosteje uporabljen del rastline (Londhe idr., 2011; Shang idr., 2019).



Slika 6: Česen
(<https://www.eatrightbasket.com/item/garlic-100g-allicin/>)

Česen vsebuje vsaj 33 žvepljenih spojin in te so odgovorne za njegov značilen vonj in številne zdravilne učinke. Česen vsebuje molekulo alliin. Pri poškodbi česnove čebulice se aktivira encim allinaza, ki presnavlja alliin v allicin.

Allicin je naravna spojina, ki vsebuje žveplo in je odgovorna za značilen vonj in okus sveže narezanega ali zdrobljenega česna. V osnovi gre za obrambno molekulo, saj je za rastlinojedce toksična. V zmernih količinah ima allicin mnoge zdravilju koristne lastnosti, na primer znižuje holesterol in krvni tlak, kar zmanjšuje možnost nastanka srčno-žilnih bolezni. Pomembne so tudi njegove antimikrobne lastnosti, saj zavira razmnoževanje bakterij in gliv ali pa celice popolnoma uniči, vključno z nekaterimi sevi, ki so odporni na antibiotike (Borlinghaus idr., 2014).

2.8 Uporabljene raziskovalne metode

2.8.1 Metoda štetja na ploščah

Metoda štetja celic na ploščah je najpogosteje uporabljena metoda za določanje velikosti bakterijske in glivne populacije. Zaradi prevelikega števila celic v preiskovani kulturi, je kulturo potrebno najprej redčiti ter primerne redčitve cepiti na hranilne plošče. Bakterijska gojišča inkubiramo od 24 do 48 ur pri 37°C. Gojišča z glivami pustimo vsaj 48 ur na sobni temperaturi. Na ploščah štejemo enote, ki tvorijo kolonije (colony forming units, CFU). Števna plošča je plošča, ki ima od 25 do 300 kolonij (Habulin, 2008)

2.8.2 Določanje optične gostote (optical density, OD)

Merjenje optične gostote je metoda, ki se uporablja za oceno gostote celic v tekoči kulturi (Beal idr., 2020). Optično gostoto merimo pri 600 nm (OD_{600}) (Myers idr., 2013). Metoda temelji na detekciji svetlobne absorbance oziroma razpršenosti svetlobe in kateri del svetlobnega spektra prehaja skozi vzorec. Večje kot je število mikroorganizmov v vzorcu, večja je svetlobna absorbanca oziroma razpršenost svetlobe (Beal idr., 2020).

2.8.3 Barvanje po Gramu

Barvanje po Gramu je prvi opisal danski patolog Christian Gram leta 1884. Z barvanjem lahko bakterije glede na podlagi njihovih sten in prepustnosti celične membrane razdelimo v dve skupini, po Gramu pozitivne in po Gramu negativne. Pri barvanju z metilvijolično se stene po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij obarvajo vijolično. Po Gramu negativne bakterije imajo tanjšo plast peptidoglikana (10% celične stene), zato pride ob uporabi 3% acetonskega alkohola do razbarvanja metil vijoličnega barvila. Pri kasnejšem barvanju s fuksinom se zato po Gramu negativne celice obarvajo roza-rdeče. Po Gramu pozitivne bakterije imajo debelejšo plast peptidoglikana (50-90% celične stene), zato ne pride do popolnega razbarvanja metilvijoličnega barvila in bakterije ostanejo modro-vijolične (Thairu, 2014).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1.1 Začimbe in tofu

- Hren, sveža korenina, posušen v pečici, zmlet,
- kurkuma, mleta (Kotanyi),
- cimet, mleti (Maestro),
- ingver, mleti (Kotanyi),
- čili, mleti (Mestro),
- česen, mleti (Maestro),
- BIO sojin tofu (Spar Natur*pur, 250 g).

3.1.2 Zaščitna oprema

- zaščitna halja
- zaščitne rokavice za enkratno uporabo.

3.1.3 Kemikalije

- destilirana voda,
- kuhinjska sol (NaCl),
- nystatin (Sigma-Aldrich),
- agar (bioMerieux),
- hranilni medij za heterotrofne bakterije (BHI - Brain heart infusion broth – AppliChem Panreac),
- metil vijolično,
- lugova raztopina joda,
- fuksin,
- metilensko modrilo,
- penicilin (NLZOH),
- streptomycin (NLZOH),
- etanol,

- 3% acetonski alkohol.

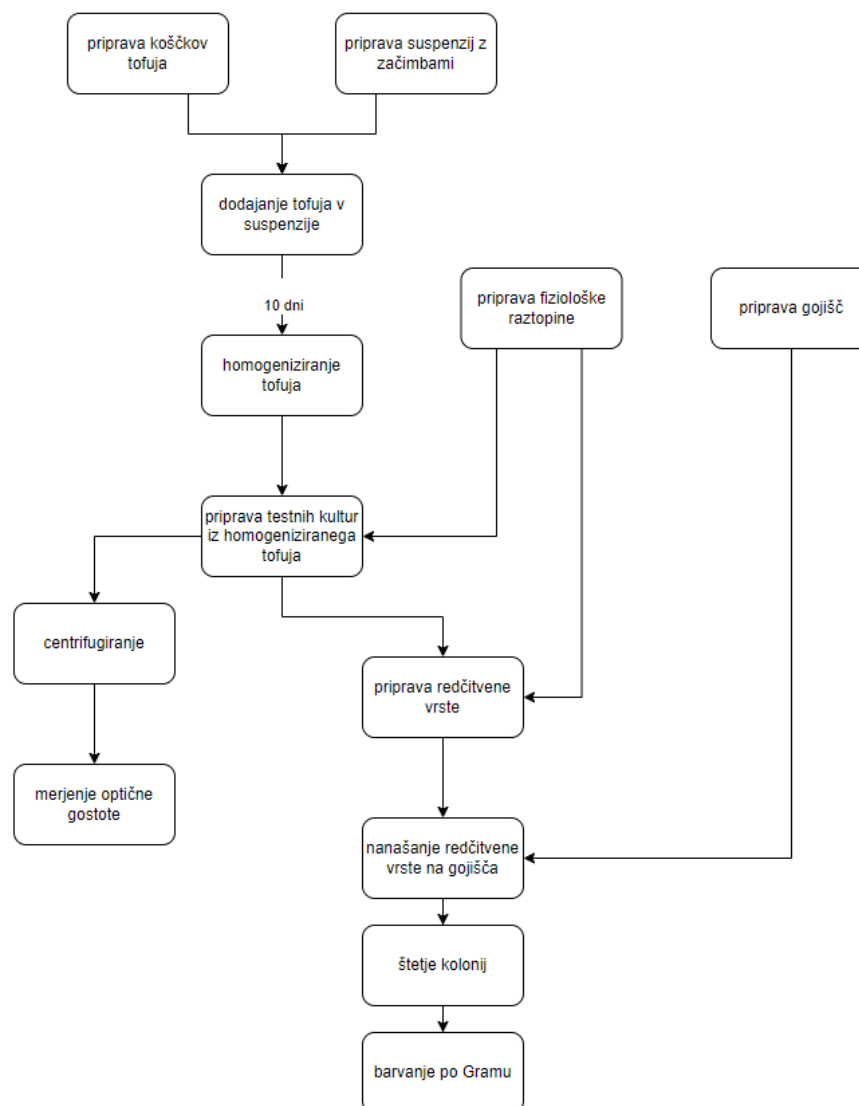
3.1.4 Laboratorijski pribor

- čaše (1000 ml, 500 ml, 250 ml, 200 ml, 100 ml),
- epruvete (12x100mm),
- sterilna gaza,
- avtomatska pipeta Transferpette S (1-10 mL, 100-1000 µL, 10-100 µL) in sterilni nastavki za pipeto (1-10 mL, 100-1000 µL, 10-100 µL),
- spatula drigalski,
- cepilna zanka,
- plastične petrijevke (premer 9 cm),
- centrifugirke,
- pinceta,
- kivete.

3.1.5 Laboratorijske aparature

- vibracijski mešalnik (RS-VA10, Phoenix Instrument),
- prenosni računalnik z računalniškim programom Logger Pro,
- inkubator (Binder),
- laminarij (Iskra PIO MC 12-1),
- avtoklav (Laboklav 25B),
- mikroskop (Leica DM500),
- centrifuga (Rotofix 32A),
- elektronska tehtnica (Kern, do 1000g, natančnost na 0,01g),
- spektrofotometer (Vernier SpectroVis Plus),
- prenosni plinski gorilnik (Campingaz),
- hladilnik (+4°C, Gorenje).

3.2 Metode dela



Slika 7: Potek dela (lasten vir)

3.2.1 Priprava kock tofuja

V sterilne lončke smo odmerili 12 g začimbe v prahu. Nato smo dolili 100 ml destilirane vode in s stekleno palčko premešali. Kot kontrolo smo v lonček nalili le 100 ml destilirane vode. V lončke, namenjene za dokazovanje rasti bakterij smo za zaviranje rasti gliv dodali nystatin (0,1 ml na 100 ml). V lončke, namenjene dokazovanju rasti gliv pa smo za zaviranje rasti bakterij smo uporabili mešanico penicilina (1,1 μ l na 100 ml) in streptomicina (4 ml na 100 ml). Tofu smo razrezali na koščke velikosti 2x1x1 cm. V vsak lonček s suspenzijo začimb smo dodali 6 koščkov tofuja in lončke zaprli s pokrovčkom ter jih hranili v hladilniku pri +4°C.

3.2.2 Priprava gojišč in fiziološke raztopine

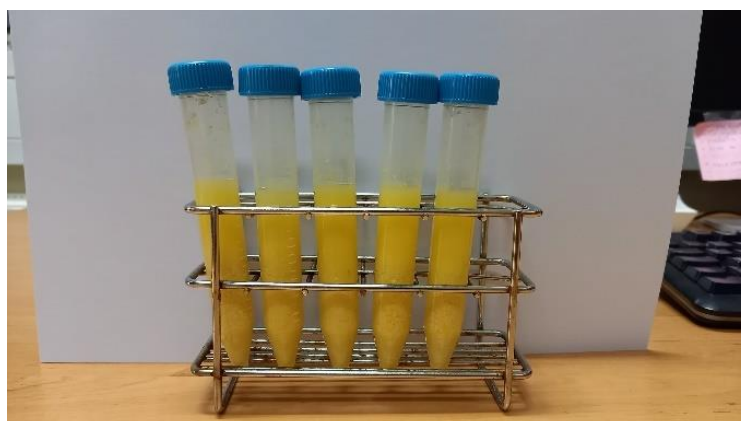
Za rast bakterij smo pripravili gojišče BHI (brain heart infusion) po postopku zapisanem na embalaži hranilnega medija BHI. Za pripravo gojišč smo uporabili 37 g/l hranilnega medija BHI, 15 g/l agarja in dolili destilirano vodo do 1000 ml. Za rast gliv smo sami pripravili gojišče YPD (yeast peptone dextrose). Uporabili smo 10 g/l kvasnega ekstrakta, 20 g/l peptona, 20 g/l D-glukoze, 15 g/l agarja in dolili destilirano vodo do 1000 ml.

Odmerjene količine smo v steklenici avtoklavirali 15 minut pri 121°C. Po avtoklaviranju smo še toplo gojišče prelili v sterilne petrijevke ter počakali, da se gojišča pri sobni temperaturi ohladijo in strdijo. Gojišča smo nato hranili v hladilniku pri 4°C do uporabe.

Za pripravo fiziološke raztopine (0,9% NaCl) smo v čašo odmerili sol, jo odpipetirali v epruvete za pripravo redčitvene vrste in nato avtoklavirali 15 minut pri 121°C.

3.2.3 Priprava filtrata iz kock tofuja

Kocke tofuja smo vzeli iz lončkov s suspenzijo začimbe in jih sprali v sterilni fiziološki raztopini. Koščke smo nato vsakega posebej dali v sterilne centrifugirke, napolnjene z 8 ml fiziološke raztopine. Nato smo s stekleno palčko 30 sekund drobili (homogenizirali) košček tofuja. Dobljeno suspenzijo smo premešali in prefiltrirali čez 4-slojno sterilno gazo. Celoten postopek smo izvedli v laminariju.



Slika 8: Filtrat kurkume (lastni vir)

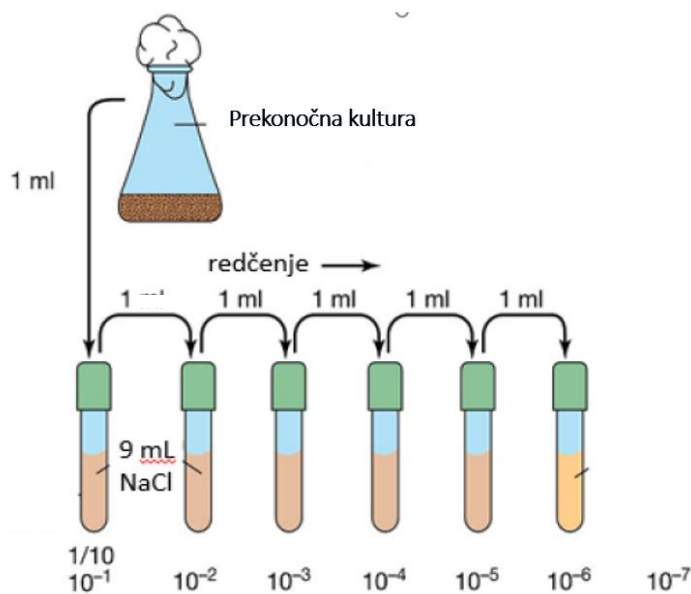
3.2.4 Meritve optične gostote

Iz prej pripravljenih filtratov smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 4 ml v sterilne centrifugirke. Filtrate smo centrifugirali 30 sekund pri 2000 obratih na minuto. S tem smo dosegli, da so se manjši koščki tofuja posedli in bomo pri merjenju z optično gostoto merili v večji meri bakterijske in glivne celice. Nato smo filtrate iz centrifugirk previdno prelili v kivete in s spektrofotometrom izmerili optično gostoto pri 600 nm.

3.2.5 Priprava redčitvene vrste in razmaz redčitev na gojišča

Ker smo želeli koncentracijo bakterij in gliv razredčiti smo morali pripraviti redčitveno vrsto. V epruveto sterilno fiziološko raztopino smo odpipetirali 1 mL kulture. Epruveto smo nato premešali in iz nje po istem postopku odvzeli 1 mL razredčene kulture. Postopek smo ponavljali, dokler nismo dobili želene končne koncentracije mikroorganizmov.

Na pripravljena gojišča smo dodali 0,1 ml redčitve, ki smo jo predhodno premešali. S spatulo drigalski smo redčitve enakomerno razmazali po gojiščih. Gojišča bakterij smo po razmazu za 24 ur dali v inkubator pri 37 °C. Gojišča gliv pa smo pustili 48 ur pri sobni temperaturi. Nato smo na števni ploščah (30 – 300 kolonij) prešteli število kolonij (CFU enote). Ves postopek je bil izveden aseptično v laminariju.



Slika 9: Redčitvena vrsta (<http://loretocollegebiology.weebly.com/measuring-bacterial-growth.html>)

3.2.6 Barvanje po Gramu in mikroskopiranje

Po štetju CFU-jev smo glede na morfološke značilnosti določili še število različnih vrst bakterij na gojiščih posamezne začimbe. Bakterije iz različnih kolonij smo s standardnim postopkom pobarvali po Gramu in nato pod mikroskopom (povečava 1000x) določili barvo in obliko bakterijskih celic.

3.2.7 Ocenjevanje organoleptičnih lastnosti tofuja

V ocenjevanje organoleptičnih lastnosti tofuja smo vključili skupino 23 ljudi, sestavljeno iz moških in žensk, ki so že bili seznanjeni s tofujem. S hedonsko lestvico od 1, ki pomeni sploh mi ni všeč, do 5, ki pomeni zelo mi je všeč, so ocenjevali vzorce glede na videz, vonj in okus. Ocenjevalci so dobili naključen vrstni red koščkov tofuja. Med vsakim poskusom novega koščka, namočenega v drugi začimbi, so ocenjevalci zaužili kos kruha in spili požirek vode, da bi se okus prejšnjega koščka nevtraliziral.

Koščke tofuja, uporabljene pri ocenjevanju organoleptičnih lastnosti tofuja smo en dan namakali v suspenzije začimb cimeta, hrena, kurkume, ingverja, čilija in česna. Uporabljali smo pripomočke, ki niso bili uporabljeni v laboratoriju, da bi se izognili možnim kontaminacijam vzorcev s patogenimi bakterijami.

3.2.8 Statistika

Podatke, pridobljene pri vsakem izmed eksperimentov, smo statistično obdelali in grafično prikazali s programom Excel. Za izračun pomembnosti razlik v vrednosti optične gostote smo uporabili program SPSS 23 z analizo variance za neodvisne skupine.

4 REZULTATI

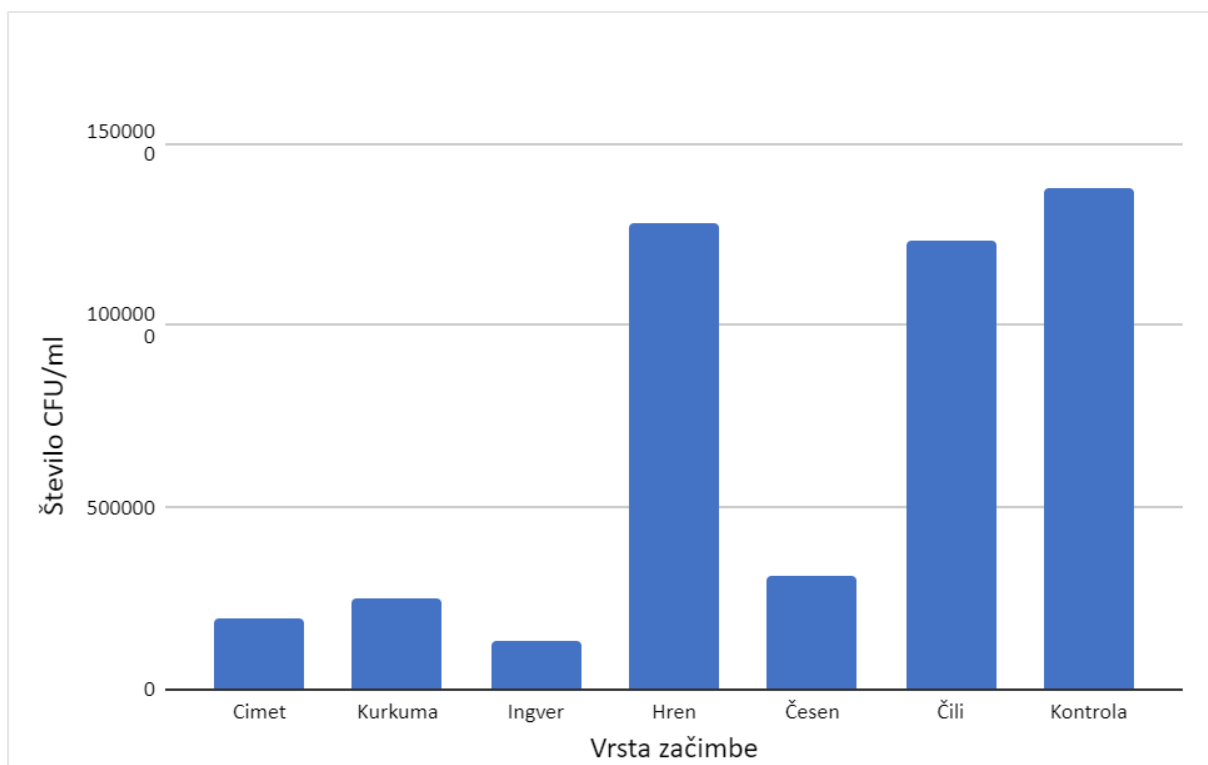
Z metodo štetja kolonij na ploščah, optično gostoto in barvanjem po Gramu smo ugotavljali vpliv začimb na velikost in lastnosti bakterijske in glivne populacije v tofuju. Spodnji rezultati prikazujejo različne podatke o učinkih posamezne začimbe in njihovo delovanje.

4.1 Metoda štetja bakterij na ploščah

Tabela 1: Število bakterijskih kolonij in število bakterij vzorcev tofuja, obdelanega z različnimi

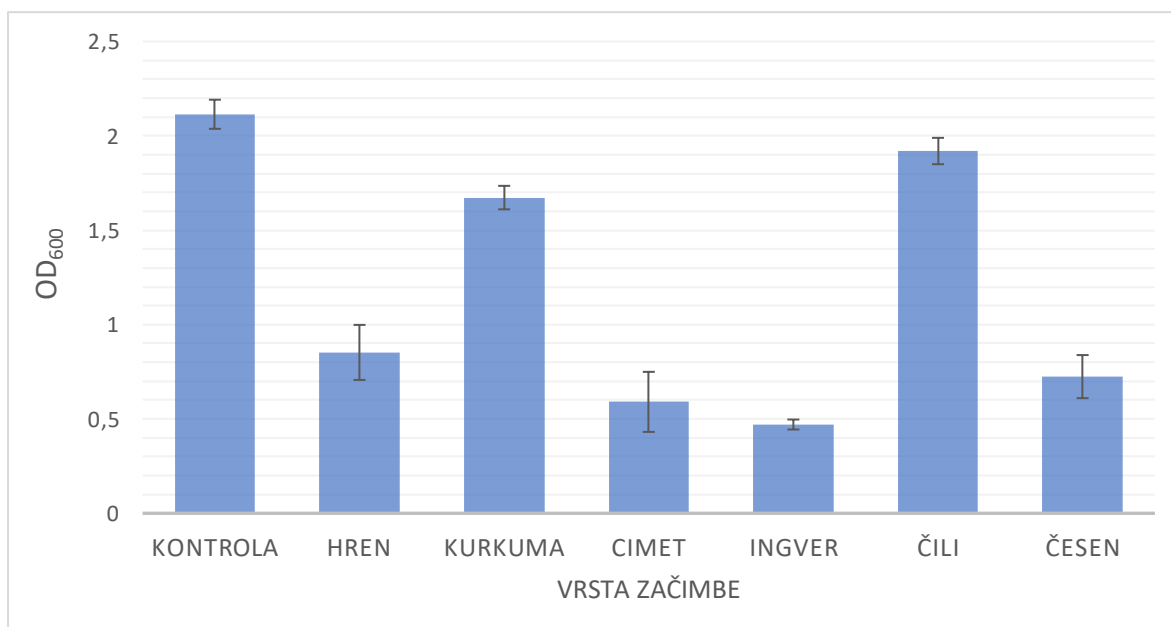
Vrsta dodanega rastlinskega materiala	Število bakterijskih kolonij	Redčitev, pri kateri se je izvedlo štetje	Število bakterij v vzorcu (CFU/ml)
Cimet	192	10^{-3}	$192 \cdot 10^3$
Kurkuma	252	10^{-3}	$252 \cdot 10^3$
Ingver	136	10^{-3}	$136 \cdot 10^3$
Hren	128	10^{-4}	$1280 \cdot 10^3$
Česen	312	10^{-3}	$312 \cdot 10^3$
Čili	123	10^{-4}	$1230 \cdot 10^3$
Brez dodatka (kontrola)	138	10^{-4}	$1380 \cdot 10^3$

Iz podatkov, prikazanih v tabeli in spodnjem grafu obeh je razvideno, da se je število bakterij v vzorcih tofuja, obdelanega z začimbami, zmanjšalo. Največji zaviralni učinek je pokazal ingver, najmanjšega pa hren.



Graf 1: Število bakterijskih kolonij (CFU/ ml), izoliranih iz tofuja, obdelanega z začimbami in pri kontroli.

4.2 Optična gostota bakterij



Graf 2: Optična gostota (OD600) bakterij pri kontroli in tofuju, obdelanem z začimbami (+/-1SD).

Pri kontroli smo izmerili največjo vrednost optične gostote, pri tofuju z dodatkom začimb pa manj. Razlika med vrednostmi optične gostote kontrole in tofuja z začimbami je statistično

pomembna pri hrenu, cimetu, ingverju in česnu v primerjavi s kontrolo ($p < 0,05$). Razlika med kurkumo in čilijem v primerjavi s kontrolo pa ni statistično pomembna ($p > 0,05$).

4.3 Določanje bakterij po Gramu

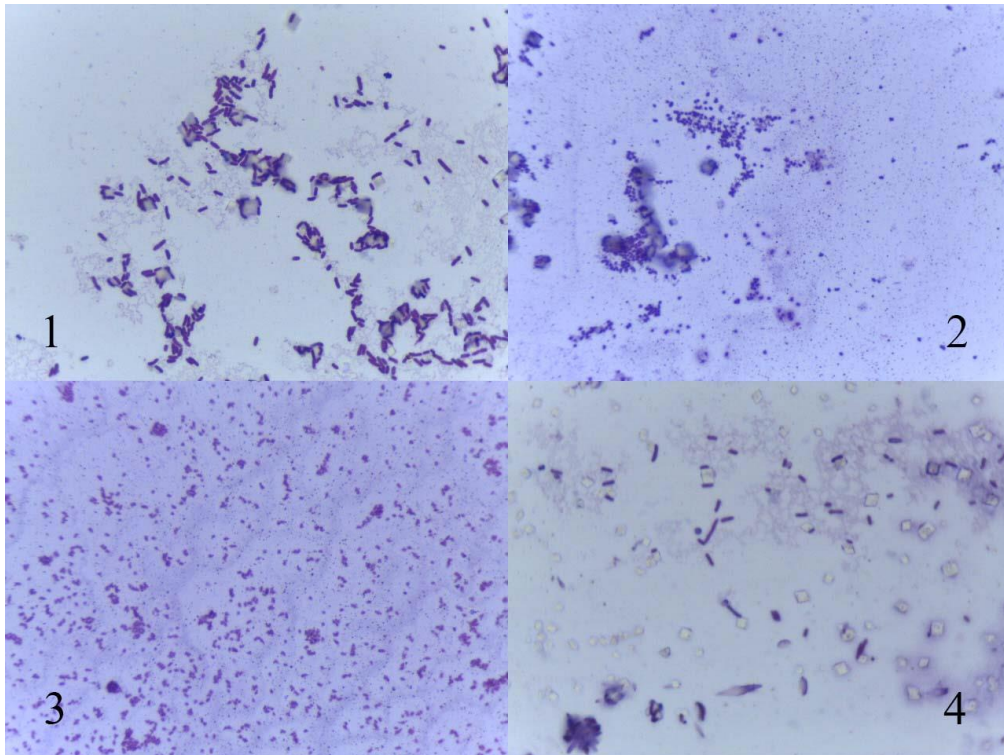
Po preštetju CFU bakterij smo prešteli tudi število različnih vrst bakterij. Te vrste smo nato s pomočjo barvanja opredelili kot po Gramu pozitivne ali po Gramu negativne.

Tabela 2: Rezultati barvanja po Gramu in oblike bakterij, prisotnih v tofuju.

Začimba	Število različnih bakterijskih kolonij	Oznaka bakterijske kolonije	Barvanje po Gramu*	Oblika bakterijske celice
Kontrola	3	1	-	koki
		2	-	koki
		3	-	bacili
Hren	2	1	+	bacili
		2	+	koki
Čili	2	1	+	koki
		2	+	koki
Kurkuma	1	1	+	koki
Cimet	2	1	+	bacili
		2	+	bacili
Česen	4	1	+	bacili
		2	+	bacili
		3	+	bacili
		4	-	bacili
Ingver	3	1	+	koki
		2	+	bacili
		3	+	koki

* - po Gramu negativna bakterija

+ po Gramu pozitivna bakterija

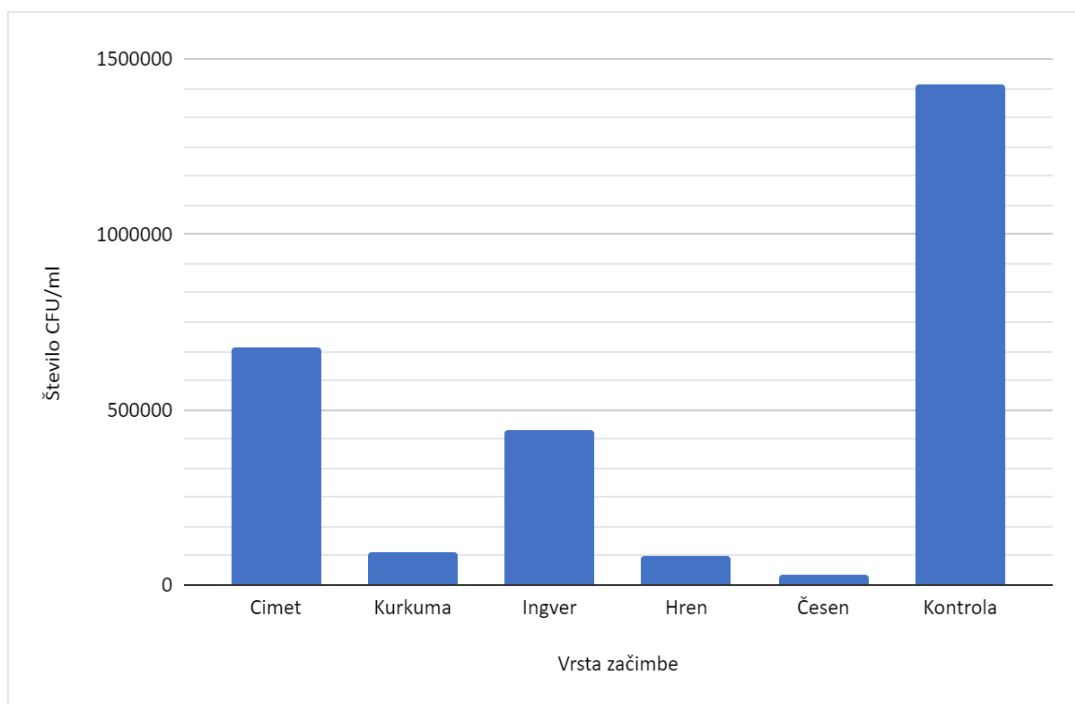


Slika 10: 1 (Gram-pozitivni bacili, Česen 2), 2 (Gram-pozitivni koki, Kurkuma 1), 3 (Gram-negativni koki, Kontrola 1), 4 (Gram-pozitivni bacili, Cimet 1).

4.4 Metoda štetja gliv na ploščah

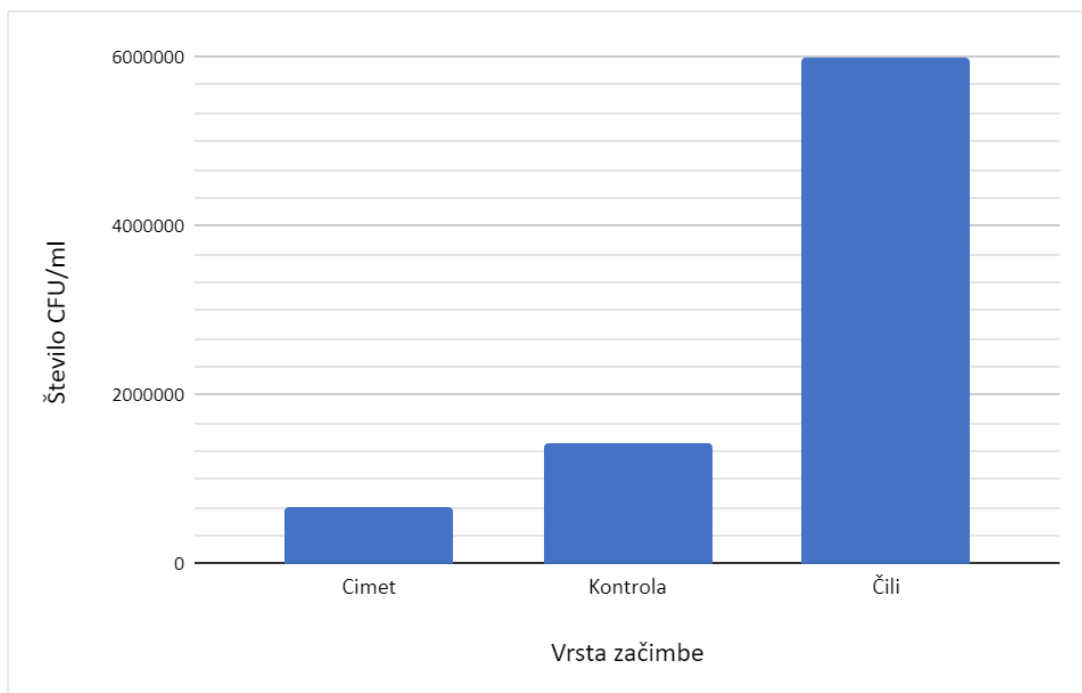
Tabela 3: Število glivnih kolonij in število glivnih celic vzorcev tofuja, obdelanega z različnimi.

Vrsta dodanega rastlinskega materiala	Število glivnih kolonij	Redčitev, pri kateri se je izvedlo štetje	Število gliv v vzorcu (CFU/ml)
Cimet	68	10^{-4}	$680 \cdot 10^{-3}$
Kurkuma	96	10^{-3}	$96 \cdot 10^{-3}$
Ingver	444	10^{-3}	$444 \cdot 10^{-3}$
Hren	83	10^{-3}	$83 \cdot 10^{-3}$
Česen	31	10^{-3}	$31 \cdot 10^{-3}$
Čili	60	10^{-5}	$6000 \cdot 10^{-3}$
Brez dodatka (kontrola)	143	10^{-4}	$1420 \cdot 10^{-3}$



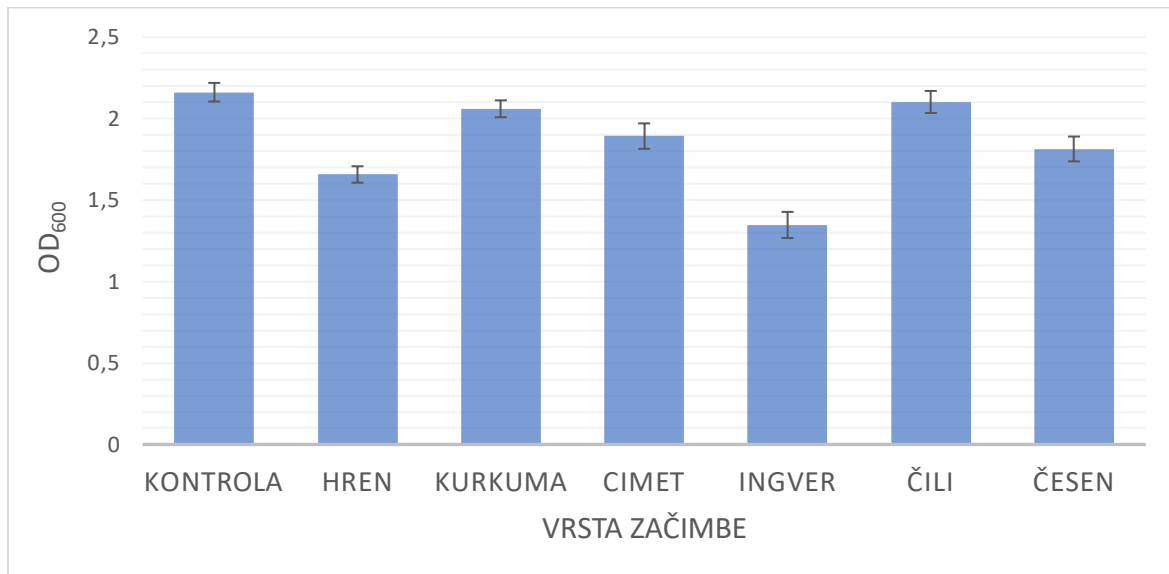
Graf 3: Število glivnih celic (CFU/ml) pri cimetu, kurkumi, ingverju, hrenu, česnu in kontroli.

Ker je bilo število glivnih celic v vzorcu tofuja, obdelanega s čilijem, bistveno večje kot pri vseh ostalih vzorcih in bi bila grafična predstavitev zaradi tega manj pregledna, smo rezultate čilija v primerjavi s kontrolo in cimetom predstavili v posebnem grafu.



Graf 4: Primerjava števila vrednosti glivnih CFU/ml med cimetom, kontrolo in čilijem.

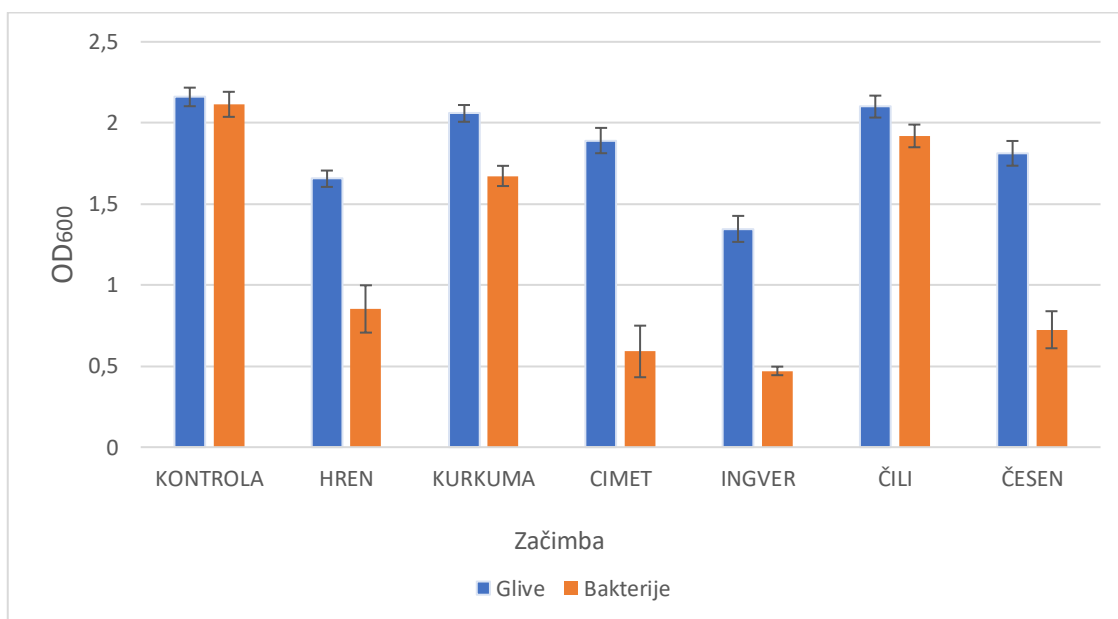
4.5 Optična gostota glivnih celic



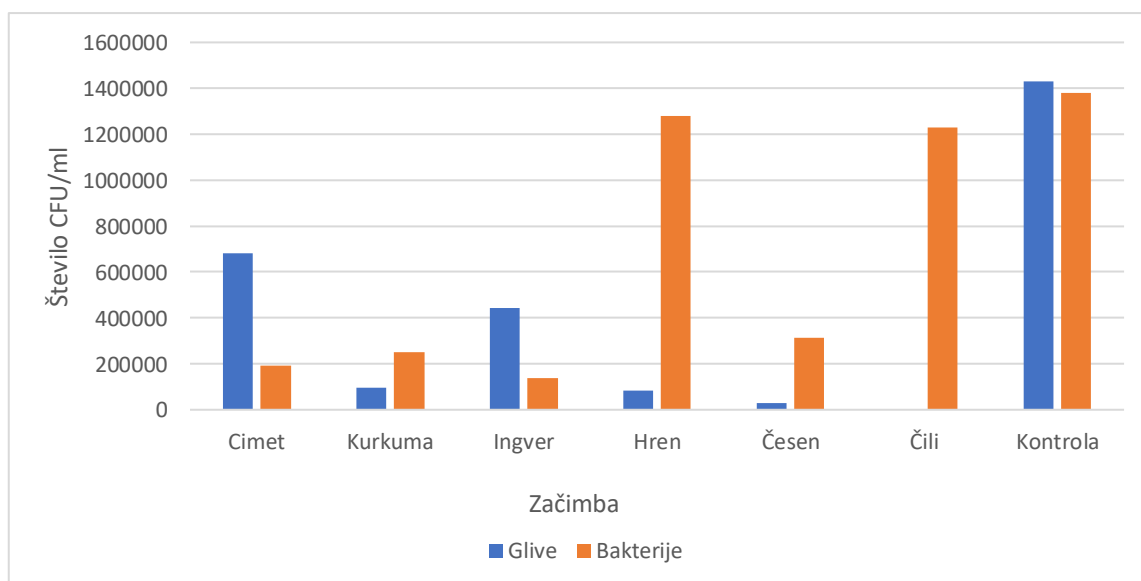
Graf 5: Optična gostota (OD₆₀₀) gliv pri kontroli in tofuju, obdelanem z začimbami (+/-1SD).

Največjo vrednost optične gostote smo izmerili pri kontroli, na podlagi česar lahko sklepamo na največjo gostoto glivnih celic v vzorcu. Pri tofuju z dodatkom začimb so vrednosti optične gostote v vseh primerih manjše. Razlika med vrednostmi optične gostote kontrole in tofuja z začimbami je statistično pomembna pri vseh vzorcih tofuja z začimbami ($p < 0,05$) razen pri čiliju ($p > 0,05$).

V spodnjih dveh grafih je prikazana primerjava ocen velikosti bakterijske in glivne populacije.



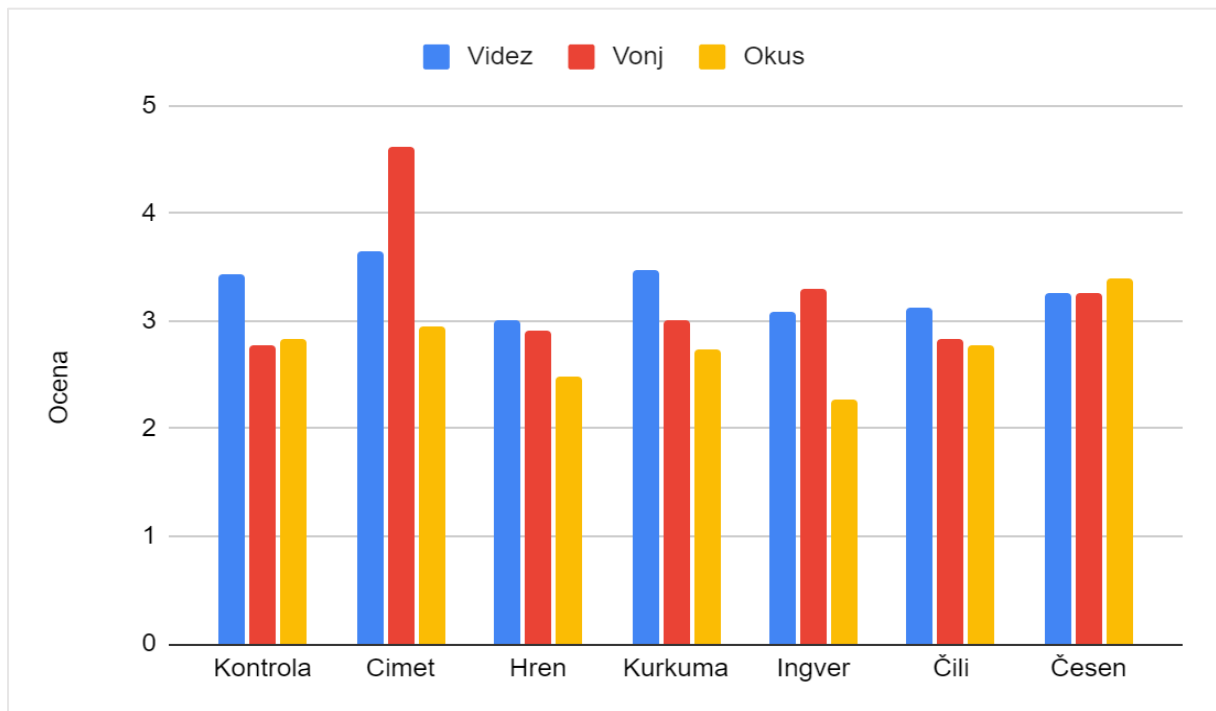
Graf 6: Primerjava vrednosti optične gostote v vzorcih gliv in bakterij.



Graf 7: Primerjava vrednosti štetja CFU v vzorcih gliv in bakterij.

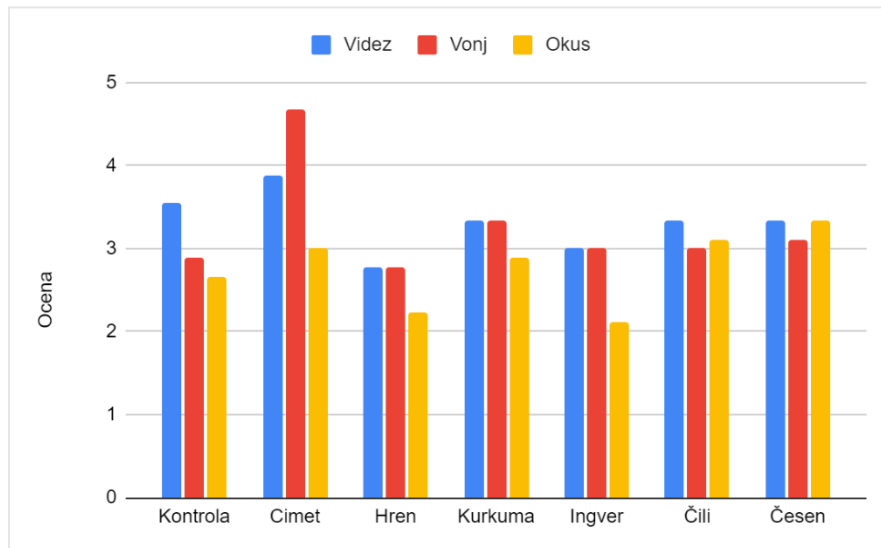
Opomba: V grafu 7 smo izpustili vrednost štetja CFU gliv iz vzorca čilija, saj bi se zaradi visoke vrednosti izgubila nazornost grafa.

4.6 Ocenjevanje organoleptičnih lastnosti tofuja

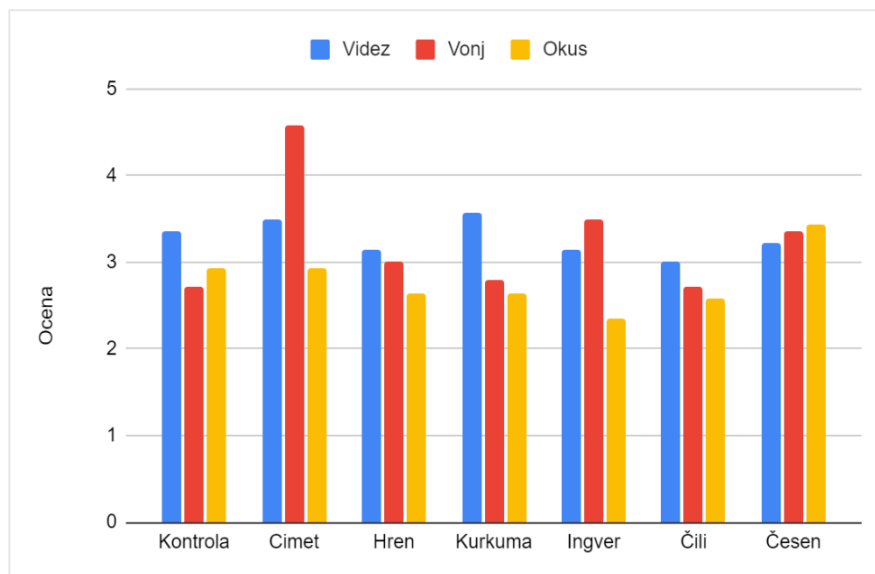


Graf 8: Povprečna vrednost ocen organoleptičnih lastnosti tofuja namočenega v suspenziji začimb in kontrole.

Graf prikazuje povprečne ocene organoleptičnih lastnosti tofuja. Prikazane so združene ocene ženskih in moških udeležencev. Vse začimbe so imele podobne povprečne ocene, pri ocenjevanju vonja pa je izstopal cimet.

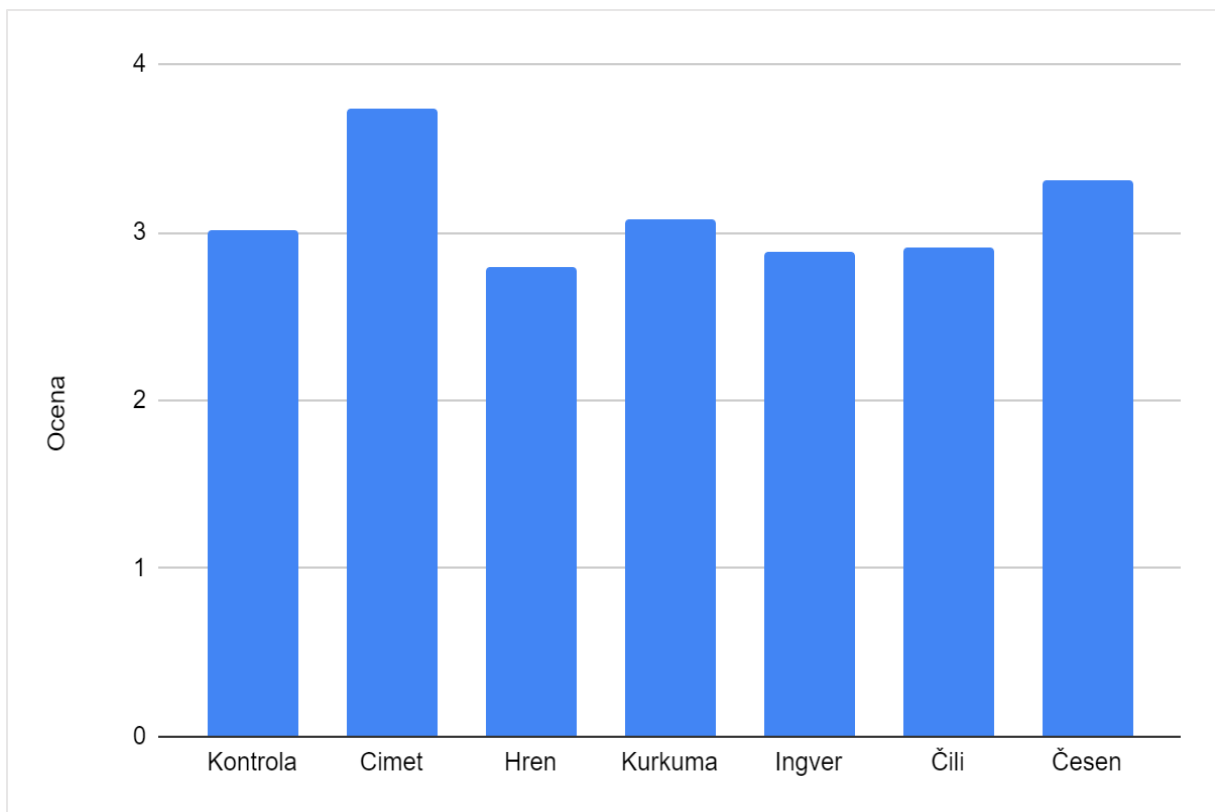


Graf 9: Povprečna vrednost ocen organoleptičnih lastnosti tofuja namočenega v suspenzije začimb in kontrole moških.



Graf 10: Povprečna vrednost ocen organoleptičnih lastnosti tofuja namočenega v suspenzije začimb in kontrole žensk.

V primerjavi med grafoma 9 in 10 med udeleženci moškega in udeleženci ženskega spola ni prišlo do večjih sprememb. Pri vseh začimbah so se rezultati skladali, opazili smo le, da so moški udeleženci nekoliko bolje ocenjevali tofu čilijeve suspenzije. To smo pripisali ostremu in pekočemu okusu.



Graf 11: Združene povprečne vrednosti videza, vonja in okusa začimb ter kontrole.

Opomba: Pri grafu 10 gre za povprečje izmerjenih vrednosti videza, vonja in okusa skupaj. Tako smo želeli prikazati vse združene organoleptične lastnosti koščkov tofuja namočenih v začimbe z enim grafom. S tem smo dobili lažji pregled za izbor najljubšega koščka tofuja.

5 RAZPRAVA

Vsa dodana zelišča, cimet, hren, čili, kurkuma, ingver in česen so zavrla razvoj bakterij na koščkih tofuja, namočenih v njihovo suspenzijo. Rezultati štetja kolonij na ploščah (graf 1) so pokazali manjšo prisotnost bakterij pri koščkih tofuja, namočenih v suspenzije začimb v primerjavi s kontrolo (destilirana voda). Rezultati se skladajo z meritvami optične gostote (graf 2), kjer smo pri vseh vzorcih tofuja, obdelanega z začimbami, izmerili manjšo optično gostoto kot pri kontroli, razlike so pri uporabi česna, cimeta, hrena in ingverja tudi statistično pomembne ($p < 0,05$). Na podlagi tega lahko sklepamo na protibakterijsko delovanje uporabljenih začimb na bakterije, ki se nahajajo na tofuju. Rezultati potrjujejo našo prvo hipotezo.

Naše rezultate potrjujejo številne raziskave. Protibakterijsko delovanje hrena lahko povežemo z glukozinolati, prisotnimi v korenini hrena. Njihovi razpadni produkti (izotiocijanati) delujejo protibakterijsko, kar je dokazano v različnih raziskavah (Melrose, 2019; Park idr., 2013).

Iz rezultatov obeh eksperimentov lahko sklepamo, da česen vsebuje snovi, ki dobro zavirajo rast bakterij. V česnu bi lahko bila dejavna spojina allicin, ki mu pripisujejo protibakterijsko delovanje (Borlinghaus idr., 2014). To so potrdili tudi članki (Ankri & Mirelman, 1999; Fujisawa idr., 2009; Marchese idr., 2016), ki podpirajo naš sklep, da česen uspešno zavira rast bakterij.

Cimet vsebuje cinamaldehyd, naravno spojino, ki deluje kot naravni zaviralec rasti bakterij. Zavira biosintezo celične stene pri številnih mikroorganizmih (Doyle & Stephens, 2019) in s tem upočasnjuje razvoj celic. Njegovo protibakterijsko delovanje so dokazali tudi v naslednjih člankih (J. Cox idr., 2021; Liesel idr., 2008), ki potrjujejo naš sklep o zaviranju rasti bakterij ob njegovi prisotnosti.

Najboljše rezultate proti zaviranju bakterij pa je prikazal ingver. Rezultate lahko povežemo z gingeroli, ki so prisotni v ingverju. Tem pripisujejo antibakterijske učinke ingverja (Liesel idr., 2008), s katerimi lahko potrdimo rezultate naših eksperimentov.

Pri optičnih gostotah vzorcev tofuja, namočenega v suspenzijah čilija in kurkume, je prišlo do razlike v primerjavi z kontrolo, vendar je bila ta statistično nepomembna ($p > 0,05$).

Čili se tudi pri eksperimentu s štetjem kolonij ni izkazal, vendar je vidno vsaj majhno zaviranje rast bakterij. Glede na druge članke (Füchtbauer idr., 2021; Periferakis idr., 2023) lahko to pripisujemo kapsaicinu. Kot navaja članek, pa je protibakterijsko delovanje odvisno od koncentracije, kar lahko pojasni slabše delovanje v primerjavi z drugimi začimbami, zaradi manjše koncentracije kapsaicina v dodanem čiliju.

Kurkuma pa se je, v nasprotju s čilijem, pri eksperimentu štetja kolonij izkazala za eno izmed bolj učinkovitih začimb. Kurkuma vsebuje kurkumin, za katerega so mnoge raziskave pokazale protibakterijsko delovanje (Dai idr., 2022; Parvathy idr., 2009; Zorofchian Moghadamtousi idr., 2014). Iz tega smo sklepali, da bi pri merjenju optične gostote na rezultate lahko vplivala izrazito oranžno-rumena barva kurkuminega vzorca, ki je morda vplivala na rezultat merjenja. To bi lahko pojasnilo neskladanje rezultatov obeh eksperimentov.

Rezultati obeh eksperimentov za dokazovanje protiglivnega učinka kažejo, da vsa dodana zelišča, z izjemo čilija izkazujejo protiglivno delovanje (graf 3, 4 in 5). Pri meritvah optične gostote so razlike med kontrolo in vzorci, obdelanimi s hrenom, kurkumo, česnom ingverjem in čilijem statistično pomembne ($p < 0,05$). Na podlagi tega lahko sklepamo, da imajo omenjena zelišča protiglivni učinek na vrste gliv, ki se nahajajo v tofuju. Našo drugo hipotezo lahko le delno potrdimo, čili ni pokazal zaviralnega učinka na razmnoževanje gliv.

Kljub raziskavam, ki dokazujejo protiglivno delovanje čilija (Singh & Chittenden, 2008) v našem poskusu čili ni pokazal tovrstnega delovanja. Na plošči z vzorcem tofuja, obdelanega s čilijem, je zrastle znatno več kolonij gliv kot na kontrolni plošči (graf 4). Možnih razlag je več, možna je napaka v izvedbi eksperimenta (na primer pri pripravi redčitvene vrste), lahko pa je vzrok za razhajanje z podatki iz literature tudi v tem, da so se v raziskavah večinoma ukvarjali z vplivom čilija na drugačne vrste gliv, kot so bile prisotne v našem poskusu.

Protiglivno delovanje hrena pripisujemo glukozinolatom prisotnim v hrenovi korenini. Sklepamo, da so ti glavna aktivna spojina, saj so v člankih (Choi idr., 2017; Popović idr., 2020)

prišli do podobnih zaključkov. Česnu pripisujejo njegovo protiglavno delovanje predvsem zaradi allicina. Delovanje Allicina proti rasti gliv so dokazali tudi v člankih (Khodavandi idr., 2010; Marchese idr., 2016), ki so podprli našo teorijo o njegovem protiglavnem delovanju. Sklepamo, da protiglavno delovanje cimeta povzroča cinamaldehyd, ki je prisoten v stenah debela cimetovih dreves (Kowalska idr., 2020; Xing idr., 2010). Glavni razlog za protiglavno delovanje ingverja pa je prisotnost gingerolov v njegovem gomolju (Agarwal idr., 2001; Xi idr., 2022). Kurkuma vsebuje molekulo kurkumin, za katero je znano, da zavira rast gliv (Raduly idr., 2021; Zorofchian Moghadamtousi idr., 2014), kar potrjujejo tudi omenjeni članki. Podpirajo tudi našo teorijo o delovanju kurkume proti rasti gliv in se skladajo z rezultati.

V raziskovalni nalogi smo želeli tudi ugotoviti, kako začimbe vplivajo na organoleptične lastnosti tofuja (izgled, vonj in okus), ki bi jih lahko praktično uporabili v vsakdanjem življenju. Rezultate ankete smo razdelili na moške, ženske in vsi skupaj. Pri skupnih rezultatih, vonja, okusa in izgleda, ni prišlo do velikih razlik. Ocenjevalci so najbolje ocenili tofu, obdelan s cimetom in česnom. Cimet je izstopal pri ocenjevanju izgleda in vonja, vendar se njegov okus ni izkazal za najboljšega. Pri okusu je izstopal česen, ki ga je večina ocenila kot najboljšega. Presenetljivo nizke ocene je za okus dobival ingver, ki je bil ocenjevalcem najmanj všeč. V primerjavi med ocenjevanjem moških in žensk pri eksperimentu ni bilo večjih razlik. Edina opazna razlika je bila pri čiliju. Tega so v povprečju moški ocenjevali boljše kot ženske. Sklepamo, da se ženske ocenjevalke za čili niso odločale predvsem zaradi njegovega pekočega okusa.

Razmislili smo tudi o možnih izboljšavah naše metode, s katerimi bi povečali zanesljivost rezultatov. Sklepamo, da antibiotik, dodan v medij z začimbami, ni uničil vseh bakterij, ki so se že predhodno nahajale v notranjosti koščka tofuja, zato so se ob glivnih pojavile tudi bakterijske kolonije. Zato bi bilo potrebno pri poskusu štetja glivnih kolonij, antibiotike primešati tudi v trdna gojišča za glive (YPD), vendar zaradi omejenega dostopa do njih in priporočil za njihovo omejeno uporabo tega nismo izvedli. Zanesljivost rezultatov bi lahko povečali tudi z večjim številom razmazov istih redčitev, česar pa zaradi materialnih omejitev ni bilo možno izvesti.

Naslednja izboljšava bi bila, da bi pri filtriranju vzorcev tofuja namesto sterilne štiri slojne medicinske gaze uporabili sterilni filtrirni papir in na ta način dobili bolj čist vzorec, z manj drobnimi koščki tofuja.

Predlagamo tudi, da bi namesto suspenzije uporabili prefiltriran vodni ekstrat začimb. Tofu je bilo namreč treba pred homogeniziranjem vzorca spirati s fiziološko raztopino in s tem odstraniti delce rastlinskega materiala.

Metodo optične gostote bi lahko izboljšali tako, da bi uporabili vzorce višjih rešitev. Tako bi bile meritve še bolj natančne, saj je pri merjenju optična gostota bolj natančna pri nižjih koncentracijah.

6 ZAKLJUČEK

Tofu je živilo, izdelano iz soje, ki se je dobro uveljavilo v veganski ter vegetarijanski prehrani. Predstavlja nadomestek mesu in ostalim živilom z visoko vsebnostjo beljakovin. Zaradi visoke vsebnosti beljakovin, vode in nevtralnega pH je tofu dovzeten za hitro razrast mikroorganizmov, ki skrajšajo njegovo trajnost, predstavljajo pa lahko tudi nevarnost za naše zdravje.

V raziskovalni nalogi smo ugotavljali, kako začimbe hren, kurkuma, cimet, ingver, čili in česen z protimikrobnim delovanjem vplivajo na njegovo trajnost in kvaliteto. Tofu že sam po sebi vsebuje veliko število mikroorganizmov, med katerimi lahko najdemo tudi patogene. Naš glavni cilj je bil ugotoviti, ali so začimbe primerne za takšen način konzerviranja in ali bodo uporabne v vsakdanjem življenju.

V raziskovalni nalogi so vse začimbe, z izjemo čilija, izkazale protimikrobno delovanje, pokazale so zaviralni učinek tako na razrast bakterij kot gliv in bi bila njihova uporaba primerna za podaljšanje trajnosti tofuja. Med vsemi začimbami izstopa česen, ki je pokazal uspešno protimikrobno delovanje, hkrati pa je bil dobro ocenjen s strani udeležencev ocenjevanja.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Tema in rezultati naše raziskovalne naloge se navezujejo na družbeno odgovornost. Z raziskovalno nalogo smo želeli predstaviti nove načine konzerviranja tofuja, saj se tofu v veganski in vegetarijanski kuhinji vedno več uporablja.

Z ugotavljanjem protimikrobnega delovanja začimb, smo želeli dokazati njihovo protibakterijsko in protiglivično delovanje ter predstaviti začimbe kot uspešne naravne konzervanse, ki se jih lahko uporablja za konzerviranje tako tofuja, kot tudi drugih živil in lahko nadomestijo umetne konzervanse, ki so lahko problematični za naše zdravje. Naš cilj pa ni bil le ugotoviti in predstaviti antimikrobnega učinka začimb, ampak smo želeli predstaviti tudi začimbo, ki tofuj najbolj izboljša njegov drugače nevtralen okus.

8 VIRI IN LITERATURA

- Adiele, J. G., & Ezeokwelum, R. C. (2022). Physiology and Agronomy of Ginger (*Zingiber officinale*): An Empirical review. *Nigeria Agricultural Journal*, 53(1), Article 1. <https://www.ajol.info/index.php/naj/article/view/227628>
- Agarwal, M., Walia, S., Dhingra, S., & Khambay, B. P. S. (2001). Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. *Pest Management Science*, 57(3), 289–300. <https://doi.org/10.1002/ps.263>
- Aggarwal, B. B., Yuan, W., Li, S., & Gupta, S. C. (2013). Curcumin-free turmeric exhibits anti-inflammatory and anticancer activities: Identification of novel components of turmeric. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(9), 1529–1542. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200838>
- Anh, N. H., Kim, S. J., Long, N. P., Min, J. E., Yoon, Y. C., Lee, E. G., Kim, M., Kim, T. J., Yang, Y. Y., Son, E. Y., Yoon, S. J., Diem, N. C., Kim, H. M., & Kwon, S. W. (2020). Ginger on Human Health: A Comprehensive Systematic Review of 109 Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/nu12010157>
- Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 1(2), 125–129. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80003-3)
- Aulisio, C. C. G., Stanfield, J. T., Weagant, S. D., & Hill, W. E. (1983). Yersiniosis Associated with Tofu Consumption: Serological, Biochemical and Pathogenicity Studies of *Yersinia enterocolitica* Isolates. *Journal of Food Protection*, 46(3), 226–230. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.3.226>
- Bari, D. M. L. (2012). Bacterial Contamination of Soybean Curd (Tofu) Sold in Thailand. *Food Science and Technology Research*.

https://www.academia.edu/50381081/Bacterial_Contamination_of_Soybean_Curd_Tofu_Sold_in_Thailand

- Beal, J., Farny, N. G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G. S., Buckley-Taylor, R., Gershater, M., Kiga, D., Marken, J., Sanchania, V., Sison, A., & Workman, C. T. (2020). Robust estimation of bacterial cell count from optical density. *Communications Biology*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01127-5>
- Błaszczyk, N., Rosiak, A., & Kałużna-Czaplińska, J. (2021). The Potential Role of Cinnamon in Human Health. *Forests*, 12(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/f12050648>
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2011). The Amazing and Mighty Ginger. V I. F. F. Benzie & S. Wachtel-Galor (Ur.), *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects* (2nd izd.). CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92775/>
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C. H., Nwachukwu, I. D., & Slusarenko, A. J. (2014). Allicin: Chemistry and Biological Properties. *Molecules*, 19(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/molecules190812591>
- Cartea, M. E., & Velasco, P. (2008). Glucosinolates in Brassica foods: Bioavailability in food and significance for human health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 213–229. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9072-2>
- Chattopadhyay, R. R., & Bhattacharyya, S. K. (2007). Phcog Rev.: Review Article Herbal spices as alternative antimicrobial food preservatives: An update. *Pharmacognosy Reviews*, 1(2). <https://phcogrev.com/sites/default/files/PhcogRev-1-2-239.pdf>
- Choi, K.-D., Kim, H.-Y., & Shin, I.-S. (2017). Antifungal activity of isothiocyanates extracted from horseradish (*Armoracia rusticana*) root against pathogenic dermal fungi. *Food Science and Biotechnology*, 26(3), 847–852. [https://doi.org/10.1007/s10068-017-0104-](https://doi.org/10.1007/s10068-017-0104-4)

- Dai, C., Lin, J., Li, H., Shen, Z., Wang, Y., Velkov, T., & Shen, J. (2022). The Natural Product Curcumin as an Antibacterial Agent: Current Achievements and Problems. *Antioxidants*, *11*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/antiox11030459>
- Dhiman, R., Aggarwal, N., Aneja, K. R., & Kaur, M. (2016). *In Vitro* Antimicrobial Activity of Spices and Medicinal Herbs against Selected Microbes Associated with Juices. *International Journal of Microbiology*, *2016*, e9015802. <https://doi.org/10.1155/2016/9015802>
- Doyle, A. A., & Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, *139*, 104405. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Füchtbauer, S., Mousavi, S., Bereswill, S., & Heimesaat, M. M. (2021). Antibacterial properties of capsaicin and its derivatives and their potential to fight antibiotic resistance – A literature survey. *European Journal of Microbiology and Immunology*, *11*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1556/1886.2021.00003>
- Fujisawa, H., Watanabe, K., Suma, K., Origuchi, K., Matsufuji, H., Seki, T., & Ariga, T. (2009). Antibacterial Potential of Garlic-Derived Allicin and Its Cancellation by Sulfhydryl Compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*(9), 1948–1955. <https://doi.org/10.1271/bbb.90096>
- Gottardi, D., Bukvicki, D., Prasad, S., & Tyagi, A. K. (2016). Beneficial Effects of Spices in Food Preservation and Safety. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.01394>
- Govindarajan, V. S., & Stahl, W. H. (1980). Turmeric—Chemistry, technology, and quality. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *12*(3), 199–301. <https://doi.org/10.1080/10408398009527278>

- Gupta, R., & Yadav, D. R. K. (2021). Impact Of Chemical Food Preservatives On Human Health. *PalArch's Journal of Archaeology of Egypt / Egyptology*, 18(15), Article 15. <https://archives.palarch.nl/index.php/jae/article/view/9009>
- Habulin M., & Primožič M. (2008). Biokemijska tehnika. *Navodila za laboratorijske vaje* (zbrano gradivo). https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/Biokemijska_tehnika_navodila.pdf
- Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods*, 6(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/foods6100092>
- Hong, J.-W., Yang, G.-E., Kim, Y. B., Eom, S. H., Lew, J.-H., & Kang, H. (2012). Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 237. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-237>
- Idrees, S., Hanif, M. A., Ayub, M. A., Hanif, A., & Ansari, T. M. (2020). Chapter 9—Chili Pepper. V M. A. Hanif, H. Nawaz, M. M. Khan, & H. J. Byrne (Ur.), *Medicinal Plants of South Asia* (str. 113–124). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00009-4>
- J. Cox, H., Li, J., Saini, P., R. Paterson, J., J. Sharples, G., & S. Badyal, J. P. (2021). Bioinspired and eco-friendly high efficacy cinnamaldehyde antibacterial surfaces. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(12), 2918–2930. <https://doi.org/10.1039/D0TB02379E>
- Joe, M. M., Jayachitra, J., & Vijayapriya, M. (2009). *Antimicrobial activity of some common spices against certain human pathogens*. <https://shorturl.at/CS278>
- Khodavandi, A., Alizadeh, F., Aala, F., Sekawi, Z., & Chong, P. P. (2010). In Vitro Investigation of Antifungal Activity of Allicin Alone and in Combination with Azoles

- Against *Candida* Species. *Mycopathologia*, 169(4), 287–295.
<https://doi.org/10.1007/s11046-009-9251-3>
- Kowalska, J., Tyburski, J., Krzywińska, J., & Jakubowska, M. (2020). Cinnamon powder: An in vitro and in vivo evaluation of antifungal and plant growth promoting activity. *European Journal of Plant Pathology*, 156(1), 237–243.
<https://doi.org/10.1007/s10658-019-01882-0>
- Li, Y., Yu, Y., Xu, L., Guo, E., Zang, Y., He, Y., & Zhu, Z. (2021). Transcriptome Profiling Reveals Candidate Key Genes Involved in Sinigrin Biosynthesis in *Brassica nigra*. *Horticulturae*, 7(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7070173>
- Liesel, B., Gende, L., Floris, I., Fritz, R., & Eguaras, M. (2008). Antimicrobial activity of cinnamon(*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus* larvae from Argentina. *Bulletin of Insectology*, 61.
https://www.researchgate.net/profile/Ignazio-Floris/publication/228712418_Antimicrobial_activity_of_cinnamonCinnamomum_zeilanicum_essential_oil_and_its_main_components_against_Paenibacillus_larvae_from_Argentine/links/00b4951a37f7c6fdcb000000
- Lim, B. T., & Foo, M. K. (1993). *A simple preservation system for extending the shelf-life of tofu*. <http://jtafs.mardi.gov.my/jtafs/21-2/Tofu.pdf>
- Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C.-N., Tang, G.-Y., & Li, H.-B. (2017). Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms18061283>
- Londhe, V., Gavasane, A., Nipate, S., D.D, B., & P.D, C. (2011). Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases: An overview. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH AND OPINION*, 1, 129–134. <https://www.researchgate.net/profile/Vikas->

Londhe/publication/233379240_Role_of_garlic_Allium_sativum_in_various_diseases
_An_overview/links/09e41509d3c3b34809000000

Lu, J., Zhang, K., Nam, S., Anderson, R. A., Jove, R., & Wen, W. (2010). Novel angiogenesis inhibitory activity in cinnamon extract blocks VEGFR2 kinase and downstream signaling. *Carcinogenesis*, *31*(3), 481–488. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp292>

Mancini-Filho, J., Van-Koijj, A., Mancini, D. A., Cozzolino, F. F., & Torres, R. P. (1998). Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*, Breyne) extracts. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, *137*(11), 443–447. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10077878/>

Marchese, A., Barbieri, R., Sanches-Silva, A., Daglia, M., Nabavi, S. F., Jafari, N. J., Izadi, M., Ajami, M., & Nabavi, S. M. (2016). Antifungal and antibacterial activities of allicin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *52*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.03.010>

Melrose, J. (2019). The Glucosinolates: A Sulphur Glucoside Family of Mustard Anti-Tumour and Antimicrobial Phytochemicals of Potential Therapeutic Application. *Biomedicines*, *7*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7030062>

Mustafa, Y. A., & Awad, A. R. K. (2020). *Chemical Composition and Sensory Quality of Tofu Prepared From Sudanese Soymilk*. *4*(7). <http://ijeais.org/wp-content/uploads/2020/7/IJAAR200710.pdf>

Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, *6*(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-6-4>

Orellana-Paucar, A. M., & Machado-Orellana, M. G. (2022). Pharmacological Profile, Bioactivities, and Safety of Turmeric Oil. *Molecules*, *27*(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/molecules27165055>

- Pal, M., Devrani, M., & Ayele, Y. (2019). *Tofu: A Popular Food with High Nutritional and Health Benefits*. *5*, 54–55.
https://www.academia.edu/38770932/Tofu_A_Popular_Food_with_High_Nutritional_and_Health_Benefits
- Park, H.-W., Choi, K.-D., & Shin, I.-S. (2013). Antimicrobial Activity of Isothiocyanates (ITCs) Extracted from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Root against Oral Microorganisms. *Biocontrol Science*, *18*(3), 163–168.
<https://doi.org/10.4265/bio.18.163>
- Parvathy, K. S., Negi, P. S., & Srinivas, P. (2009). Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin- β -diglucoside. *Food Chemistry*, *115*(1), 265–271.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.036>
- Pattaratanawadee, E., Rachtanapun, C., Wanchaitanawong, P., & Mahakarnchanakul, W. (2006). Antimicrobial Activity of Spice Extracts against Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Agriculture and Natural Resources*, *40*(5), Article 5.
https://www.researchgate.net/publication/267549234_Antimicrobial_Activity_of_Spice_Extracts_against_Pathogenic_and_Spoilage_Microorganisms
- Periferakis, A.-T., Periferakis, A., Periferakis, K., Caruntu, A., Badarau, I. A., Savulescu-Fiedler, I., Scheau, C., & Caruntu, C. (2023). Antimicrobial Properties of Capsaicin: Available Data and Future Research Perspectives. *Nutrients*, *15*(19), Article 19.
<https://doi.org/10.3390/nu15194097>
- Petauer T., Leksikon rastlinskih bogastev, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana 1993
- Popović, M., Maravić, A., Čikeš Čulić, V., Đulović, A., Burčul, F., & Blažević, I. (2020). Biological Effects of Glucosinolate Degradation Products from Horseradish: A Horse that Wins the Race. *Biomolecules*, *10*(2), Article 2.
<https://doi.org/10.3390/biom10020343>

- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>
- Pulido-Moran, M., Moreno-Fernandez, J., Ramirez-Tortosa, C., & Ramirez-Tortosa, Mc. (2016). Curcumin and Health. *Molecules*, 21(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/molecules21030264>
- Raduly, F. M., Raditoiu, V., Raditoiu, A., & Purcar, V. (2021). Curcumin: Modern Applications for a Versatile Additive. *Coatings*, 11(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/coatings11050519>
- Rao, P. V., & Gan, S. H. (2014). Cinnamon: A Multifaceted Medicinal Plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, e642942. <https://doi.org/10.1155/2014/642942>
- Saleh, B., Omer, A., & Teweldemedhin Keleta, B. (2018). Medicinal uses and health benefits of chili pepper (*Capsicum* spp.): A review. *MOJ Food Processing & Technology*, 6. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2018.06.00183>
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., & Viljoen, A. M. (2015). Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*, 117, 554–568. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.07.012>
- Sethi, S., Dutta, A., Gupta, B., & Gupta, S. (2013). Antimicrobial activity of spices against isolated food borne pathogens. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 260–262. https://www.researchgate.net/profile/Sonia-Sethi-3/publication/281941350_Antimicrobial_activity_of_spices_against_isolated_food_borne_pathogens/links/64748171a25e543829dbfc6c

- Shang, A., Cao, S.-Y., Xu, X.-Y., Gan, R.-Y., Tang, G.-Y., Corke, H., Mavumengwana, V., & Li, H.-B. (2019). Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). *Foods*, 8(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/foods8070246>
- Shreaz, S., Wani, W. A., Behbehani, J. M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., Ali, I., Siddiqi, W. A., & Hun, L. T. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016>
- Singh, T. & Chittenden, C. (2008). In-vitro antifungal activity of chilli extracts in combination with *Lactobacillus casei* against common sapstain fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(4), 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.10.009>
- Souza, E. L. de, Stamford, T. L. M., Lima, E. de O., Trajano, V. N., & Barbosa Filho, J. M. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: An approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48, 549–558. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000500007>
- Stillo, P., Icka, P., & Robert, D. (2018). *ARMORACIA RUSTICANA GAERTN., MEY. & SCHERB. A NEGLECTED MULTIUSEFUL SPECIES*. 26/2018, 312–322. https://jns.edu.al/wp-content/uploads/2023/08/15_Review_P_STILLO_P_Icka_R_Damo_Perf_b9157857bf-1.pdf
- Thairu. (2014). *Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases*. Pridobljeno 11. februar 2024, s <https://ssajm.org/article.asp?issn=2384-5147;year=2014;volume=1;issue=4;spage=168;epage=174;aulast=Thairu>

- Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 269–282. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9103-7>
- Trigo-Gutierrez, J. K., Vega-Chacón, Y., Soares, A. B., & Mima, E. G. de O. (2021). Antimicrobial Activity of Curcumin in Nanoformulations: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms22137130>
- Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., & Arora, S. (2009). Bio-protective effects of glucosinolates – A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1561–1572. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.023>
- Walters, S. A. (2021). Horseradish: A Neglected and Underutilized Plant Species for Improving Human Health. *Horticulturae*, 7(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7070167>
- Xi, K.-Y., Xiong, S.-J., Li, G., Guo, C.-Q., Zhou, J., Ma, J.-W., Yin, J.-L., Liu, Y.-Q., & Zhu, Y.-X. (2022). Antifungal Activity of Ginger Rhizome Extract against *Fusarium solani*. *Horticulturae*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8110983>
- Xiang, Q., Guo, W., Tang, X., Cui, S., Zhang, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., Mao, B., & Chen, W. (2021). Capsaicin—the spicy ingredient of chili peppers: A review of the gastrointestinal effects and mechanisms. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 755–765. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.034>
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., & Lu, Y. (2010). Original article: Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(9), 1837–1842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02342.x>
- Yamamura, K., Sumi, N., Egashira, Y., Fukuoka, I., Motomura, S., & Tsuchida, R. (1992). [Food poisoning caused by enteroinvasive *Escherichia coli* (O164:H-)—A case in

which the causative agent was identified]. *Kansenshogaku Zasshi*. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, 66(6), 761–768.

<https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi1970.66.761>

Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International*, 2014, e186864.
<https://doi.org/10.1155/2014/186864>