



OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

KVANTITATIVNA VSEBNOST TEOBROMINA V EKSTRAKTIH NAVADNE BODIKE (*Ilex aquifolium*) IN NJIHOVO DELOVANJE NA KVASOVKE (*Saccharomyces cerevisiae*)

RAZISKOVALNO DELO, PODROČJE: KEMIJA IN KEMIJSKA TEHNOLOGIJA

AVTORICI

Asja ZUPANC REZEC, učenka 9. razreda

Staša HOHKRAUT, učenka 9. razreda

Univerza v Ljubljani

MENTORJI

Marko JERAN, strok. sod., Zdravstvena fakulteta in



Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani

Milena ŽOHAR, prof., OŠ Primoža Trubarja Laško



KEMIJSKI INŠTITUT

dr. Urban NOVAK, univ. dipl. biokem., Kemijski inštitut Ljubljana

LAŠKO, 2019

Zahvala

Iskrena hvala mentorjem: gospodu **Marku Jeranu**, strok. sod. iz Zdravstvene fakultete in Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, gospe **Mileni Žohar**, učiteljici iz Osnovne šole Primoža Trubarja Laško, in gospodu dr. **Urbanu Novaku** iz Kemijskega inštituta Ljubljana.

Gospodu Jeranu se zahvaljujema za vso pomoč in vodenje skozi celoten proces raziskovanja ter mnoge diskusije, ki so obogatile najino prvo raziskovalno delo. Hvala gospe Žohar za vso ponujeno pomoč in ustvarjanje prijetne delovne klime in vzdušja. Gospodu Novaku sva hvaležni za prikaz osnov IR-spektroskopije in prikaz njene uporabe.

Hvaležni sva tudi **Lovrencu Zlodeju**, dijaku 4. letnika programa biotehniška gimnazija (BIC Ljubljana) za pomoč pri izvedbi difuzij učinkovin na trdno gojišče. Sodelovanje z njim in njegovim mentorjem, g. Jeranom je obogatilo naše skupno delo. Hvala tudi prof. **Alexeyju Fedotenkovu** za pomoč in pripravljenost v času sodelovanja.

Hvala gospe **Lidiji Toplišek**, prof. slovenščine v OŠ Primoža Trubarja Laško, za hiter in učinkovit lektorski pregled.

Hvala družinama, ki sta nama stali ob strani in naju podpirali ter motivirali.

Vsem skupaj še enkrat hvala.



*»Pravo modrost dobimo, ko ugotovimo,
kako malo poznamo življenje,
samega sebe in svet okoli nas.«
Sokrat*

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	4
1. UVOD	9
1.1 PRISTOP K RAZISKOVALNEMU DELU	9
2. TEORETIČNI DEL	11
2.1 TEOBROMIN V NARAVI	11
2.1.1 GUARANA, <i>Paullinia cupana</i>	11
2.1.2 KOLA, <i>Cola sp.</i>	13
2.1.3 KAKAVOVEC, <i>Theobroma cacao</i>	16
2.1.4 ČAJEVEC, <i>Camellia sinensis</i>	19
2.2 NAVADNA BODIKA, <i>Ilex aquifolium</i>	22
2.3 TEOBROMIN.....	25
2.4 MACERACIJA IN SORODNE TEHNIKE IZOLACIJE	26
2.5 IR-SPEKTROSKOPIJA.....	28
2.6 DIFUZIJA UČINKOVINE NA TRDNO GOJIŠČE – DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM..	31
2.7 KVASOVKA, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , KOT MODELNI ORGANIZEM.....	32
2.8 HIPOTEZA	34
3. EKSPERIMENTALNI DEL	35
3.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL	35
3.2 REAGENTI, RAZTOPINE IN VZORCI	35
3.3 APARATURE IN INVENTAR	36
3.4 PRIPRAVA VZORCEV NAVADNE BODIKE	38
3.5 POSTOPEK MACERACIJE TEOBROMINA IZ NARAVNEGA VIRA.....	39
3.6 KVANTITATIVNA DOLOČITEV TEOBROMINA V IZOLATIH NAVADNE BODIKE Z UPORABO FTIR-SPEKTROSKOPIJE	40
3.7 DIFUZIJA IZOLATOV NAVADNE BODIKE NA TRDNO GOJIŠČE.....	40
4. REZULTATI IN DISKUSIJA.....	42
4.1 REZULTATI MACERACIJE TEOBROMINA IZ NAVADNE BODIKE	42
4.2 REZULTATI KVANTITATIVNIH DOLOČITEV TEOBROMINA S FTIR- SPEKTROSKOPIJO	43
4.3 REZULTATI DIFUZIJSKIH TESTOV	46
5. ZAKLJUČEK.....	48

6. LITERATURA	51
7. DODATEK	55
7.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ	55
7.2 PRIPRAVA RAZTOPIN	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Plodovi guarane (Silva, 2018)	12
Slika 2: Guarana (Nurserylive, 2018).	12
Slika 3: Kola (Wikipedija, 2018).....	14
Slika 4: Kola (Naji.com, 2019)	16
Slika 5: Plod kakavovca (Radio Študent – Vižintin, 2018)	17
Slika 6: Reklama za prvo čokolado (Lunder, 2016)	18
Slika 7: Listi čajevca (Bioforma, ni letnice)	21
Slika 8: Cvet čajevca (Big plantnursery, ni letnice)	22
Slika 9: Navadna bodika (Spletna vrtnarija, ni letnice)	23
Slika 10: Navadna bodika – jagode (Jež, 2014)	23
Slika 11: Plodovi navadne bodike (Botanični vrt Univerze v Ljubljani, ni letnice)	24
Slika 12: Struktura teobromina (Wikipedija, ni letnice).....	25
Slika 13: Spekter elektromagnetnega valovanja (Ahtik, Užmah, 2018)	29
Slika 14: Saccharomyces cerevisiae (Wikipedija, ni letnice)	33
Slika 15: Refermentacija vina (Agro, 2017)	33
Slika 16: Priprava kvasovk (Jurana d. o. o., ni letnice).....	34
Slika 17: FTIR-spektrometer, Vertex 80 (Fotografija last avtoric)	37
Slika 18: Sveži listi in plodovi (jagode) navadne bodike (Fotografija last avtoric)	38
Slika 19: Sušilnik rastlinskega materiala; ECG sušilnik sadja, SO 570 (Fotografija last avtoric)	39
Slika 20: Primer nanosa vzorca izolata skupaj s standardom (Fotografija last avtoric)	41

Slika 21: Spekter čistega teobromina in spekter ekstrakta jagod z najvišjo vsebnostjo teobromina (Fotografija last avtoric)	43
Slika 22: Primerjava FTIR-spektra ekstrakta iz listov in plodov.....	44
Slika 23: Povečava nastanka znatne inhibicijske cone ob vzorcu z največjo vsebnostjo teobromina (Fotografija last avtoric)	46
Slika 24. Prikaz testa, kjer je po treh dneh modelni organizem prerastel diska. Levo vzorec maceriran na 21 °C, času 24 ur, v »absolutnem« alkoholu, z vsebnostjo teobromina 5,5 %, in desno standardni teobromin (Fotografija last avtoric).....	47

KAZALO TABEL

Tabela 1: Količina ekstrakta po maceraciji	42
Tabela 2: Vsebnost teobromina [%] v maceriranih vzorcih	45
Tabela 3: Varnostna opozorila kemikalij (Roth, 2016)	55

POVZETEK

Teobromin, sorodnik kofeina, je dobro poznana organska spojina, ki jo najdemo v zrnih kakavovca, kola oreščkih, v guaranini jagodi, Holly jagodičevju, rodu *Ilex guayusa*, rodu *Ilex paraguariensis* (Yerba mate) in čajevcu. V manjših količinah je prisoten tudi v navadni bodiki, *Ilex aquifolium*, ki je bila predmet naših raziskav. S pomočjo postopka maceracije, z uporabo različnih raztopin etanola, variacijo časa in temperature, smo iz listov in plodov navadne bodike pripravili izolate. Pripravljenim izolatom smo z uporabo FTIR-spektroskopije določili kvantitativno vsebnost teobromina. Največjo vsebnost teobromina je pokazal vzorec plodov, pripravljen z 1-urno maceracijo z »absolutnim« etanolom pri 41 °C. V zadnjem delu smo se posvečali difuziji izolatov na trdno gojišče z modelnim organizmom *Saccharomyces cerevisiae*. Omenjeni vzorec maceriranih jagod z največjo vsebnostjo teobromina je pokazal pojav minimalne inhibicijske cone, ki jo modelni organizem po določenem času tudi preraste. Ker je modelni organizem prerasel tudi vzorec standardnega teobromina, predvidevamo, da le-ta vsebuje še dodane komponente, ki ustvarjajo prispevek k aktivnosti. Preostali testirani vzorci niso kazali vidnega učinka.

KLJUČNE BESEDE: teobromin, maceracija, etanol, ekstrakt, FTIR-spektroskopija, Saccharomyces cerevisiae, difuzija, biološka aktivnost

ABSTRACT

Theobromine, a caffeine analogue, is a well-known organic compound found in Cocoa beans, nuts, Organic guarana, Holly berries, *Ilex guayusa*, *Ilex paraguariensis* (Yerba mate) and tea tree. In small quantities, it is also represented in the English holly, *Ilex aquifolium*, which was the main subject of our research study. By means of the maceration process, using different ethanol solutions, variation of time and temperature, we prepared isolates from the leaves and fruits of the English holly. Theobromine in the prepared isolates was quantitatively determined by FTIR-spectroscopy. The high amount

of theobromine was shown by a sample of the fruit, prepared for 1 hour maceration with »absolute« ethanol at 41 °C. In the latter part, we focused on the diffusion of isolates onto a agar-agar media, with the model organism *Saccharomyces cerevisiae*. The aforementioned sample of macerated fruits with the high theobromine content showed the occurrence of the minimal inhibition zone, which the model organism has overgrown after a certain period of time. Since the model organism has overgrown a standard theobromine too, it also contains additional components that generate inhibition zone. The remaining tested samples did not show any visible effect.

KEY WORDS: theobromine, maceration, ethanol, extract, FTIR-spectroscopy, Saccharomyces cerevisiae, diffusion, biological activity

1. UVOD

V raziskovalnem delu smo preučevali vsebnost teobromina v listih in plodovih navadne bodike, *Ilex aquifolium*. Teobromin je grenak alkaloid v zrnih kakavovca. Njegova molekulska formula je $C_7H_8N_4O_2$. Ima podobno sestavo kot kofein, razlika je le v tem, da je v kofeinu namesto -NH skupine, skupina N-CH₃. Čeprav nosi ime teobromin, ne vsebuje broma. Njegovo ime izvira iz znanstvenega imena čokolade, ki ji ga je nadel švedski naravoslovec Linee: teobroma (teo – gr. bog in broma – gr. hrana), torej hrana bogov. Uporaben je za zdravljenje visokega pritiska. Različne vrste kakava v prahu se lahko razlikujejo po vsebnosti teobromina, od 2 do 10 % surova kakavova zrna vsebujejo 1,4 % teobromina. V majhnih količinah ga najdemo tudi v kola oreščkih (1,0–2,5 %), v guaranini jagodi, Holly jagodičevju, rodu *Ilex guayusa*, rodu *Ilex paraguariensis* (Yerba mate), kakavovcu, čajevcu in navadni bodiki.

S pomočjo maceracije smo najprej iz listov in plodov navadne bodike izločili teobromin. Pri tem smo uporabili »absolutnik«, 90 in 80 % etanol. Čas izolacije je trajal eno uro, 24 ur in en teden. Nekatere vzorce smo izolirali pri sobni (delovni) temperaturi (21 °C), nekatere izmed njih pa smo segrevali na temperaturi 41 oz. 61 °C. V nadaljevanju smo s pomočjo IR-spektroskopije določili vsebnost teobromina v odstotkih. V zadnjem delu smo s pomočjo metode difuzije na trdno gojišče izvajali difuzijski antibiogram z diski. Za modelno kulturo difuzije izolatov na trdno gojišče smo izbrali kvasovke, *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1 PRISTOP K RAZISKOVALNEMU DELU

Večino praktičnega dela naloge smo opravili v šolskih prostorih. Del eksperimentalnega sklopa smo zaradi uporabe posebne opreme in

tehnologije opravili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (Laboratorij za strukturo biomolekul) in v raziskovalnem laboratoriju gimnazije in veterinarske šole Biotehniškega izobraževalnega centra (BIC) Ljubljana. Tamkajšnje delo je nadzorovalo tehnično usposobljeno osebje v sodelovanju z mentorji. Vso potrebno opremo nam je zagotovila šola, prav tako je bilo za varnost poskrbljeno tudi v zunanjih inštitucijah. Ker so bile kemikalije opremljene z oznakami za nevarne snovi, smo z njimi ravnali v skladu s predpisi o tovrstnih snoveh. Pri delu smo imeli na voljo vsa zaščitna sredstva (rokavice, zaščitna očala, masko in haljo). Pri delu smo dosledno upoštevali pravila za varno delo.

2. TEORETIČNI DEL

2.1 TEOBROMIN V NARAVI

Teobromin je mogoče zaslediti v različnih naravnih virih, kot so guarana, (*Paullinia cupana*), kola (*Cola sp.*), kakavovec (*Theobroma cacao*), čajevец (*Camellia sinensis*) in navadna bodika (*Ilex aquifolium*).

2.1.1 GUARANA, *Paullinia cupana*

Kraljestvo: *Plantae* (rastline)

Red: *Sapindales* (javorovci)

Družina: *Sapindaceae* (sapindovke)

Rod: *Paullinia*

Vrsta: *Paullinia cupana* L.

Guarana (*Paullinia cupana*) je zimzelena rastlina, ki raste v Venezueli in na severu Brazilije. Rastlina uspeva le v predelih deževnega pragozda na področju Amazonke, kjer so pogoji za njeno rast, to so tropske temperature in močno deževje, najboljši. Guarana je plazeč gram, ki zraste do višine 12 metrov. Plodovi guarane so rdečkaste barve in vsebujejo črna semena, ovita v bel plašček, da izgleda kot nekakšno oko (Bodi eko, 2013).

Pravo brazilsko guarano lahko uživamo v majhnih odmerkih. Guarano povezujejo tudi z življenjsko dobo, močjo in odpornostjo, ženskam menda daje žametno kožo brez gubic in celulita, zato ima pri domačinih ime tudi eliksir za dolgo življenje. Semena in smola se uporabljajo v obliki prahu, alkoholnih izvlečkov, kapsul, sirupov in čajev, ki imajo pozitivne učinke na zdravje.

Guarana je priljubljena prav zaradi poživljajočih lastnosti. Pogosto se uporablja v energijskih pijačah, vitaminskih napitkih in sredstvih za izgubo odvečnih kilogramov. Kot naravni stimulans je guarana priporočljiva za ljudi, ki so pod velikim stresom, in tiste, ki bi radi iz svojega telesa izkoristili kar največjo produktivnost takrat, ko jo najbolj potrebujejo. Izboljša tudi kognitivne funkcije in zmogljivost pri športnikih. Učinek guarane je v prvi vrsti povezan z delovanjem kofeina. Guarana vsebuje med 3 in 7 % kofeina, kar je precej več od kave, ki vsebuje 1–2 % kofeina.

Kofein iz guarane deluje stimulatивно na naš centralni živčni sistem, zmanjšuje apetit ter zmanjšuje duševno in telesno utrujenost, vendar za razliko od kofeina iz kave ali čaja guarana ne povzroča nobenih stranskih učinkov, kot je pospešeno bitje srca. Kofein iz guarane se sprošča veliko počasneje in njegov stimulacijski učinek traja približno 6 ur (Bodi eko, 2013).



Slika 1: Plodovi guarane (Silva, 2018)



Slika 2: Guarana (Nurserylive, 2018).

Hranilne vrednosti guarane nam razkrijejo, s kako zdravo in bogato rastlino imamo opravka. Guarana vsebuje fitokemikalije, kot so teobromini, saponini, tanini in katehini. Fitokemikalije so močni antioksidanti, ki pomagajo preprečevati, upočasniti ali celo ustaviti številne bolezni. Teobromin iz guarane je sestavina, ki pomaga pri izgorevanju maščob. Najdemo ga v marsikaterem pripravku za hujšanje in proti celulitu (Bodi eko, 2013).

Guarana deluje blagodejno na debelo črevo, kjer lahko zmanjša simptome vnetnih bolezni in procesov črevesja. Je tudi diuretik, ki pomaga pri zdravljenju okužb sečil, driske, boleče menstruacije in glavobola. Guarana med drugim tudi sprošča gladke in bronhialne mišice, zmanjšuje tesnobo, ščiti nevrone in pozitivno vpliva na spolno poželenje pri moških in ženskah. Pripravke iz guarane priporočajo tudi za preprečevanje nastajanja krvnih strdkov, uporablja se tudi kot stimulant srca in pomaga ljudem z nizkim krvnim tlakom; strokovnjaki rastlini pripisujejo tudi preprečevanje raka (Bodi eko, 2013).

Pozitivni učinki guarane:

- poživiti telo,
- poveča budnost in koncentracijo,
- zmanjšuje utrujenost in napetost,
- zvišuje energijo,
- spodbuja hujšanje,
- lajša glavobole in migrene,
- pomaga pri nizkem tlaku,
- poveča libido,
- čisti črevesje,
- ščiti telo pred številnimi boleznimi,
- močan stimulan (Bodi eko, 2013).

2.1.2 KOLA, *Cola sp.*

Kraljestvo: *Plantae* (rastline)

Red: *Malvales* (slezenovci)

Družina: *Malvaceae* (slezenovke)

Rod: *Cola sp.*

Vrsta: *Cola acuminata*

Drevesa kole so visoka 10–20 metrov. Imajo usnjate liste, ki so po steblu razvrščeni izmenjujoče in so eliptični ali podolgasti. Listi so dolgi do 20 cm in široki do 10 cm. Drevo vse leto cveti. Cvetovi so beli do rumenkasti. Poženejo iz poganjka neposredno iz debla. Iz njih po oploditvi nastanejo ovalni petkraki plodovi, ki tehtajo tudi več kot 15 kg. Znotraj drevesnih zvezdastih plodov so bele lupine, ki vsebujejo semena. V plodu se skupaj nahaja do 10 semen (Wikipedija, 2018).

Izvečki iz semen kole so se uporabljali pri izdelavi kokakole, kar je dalo pijači tudi ime. Danes se uporabljajo umetne arome, nekateri proizvajalci osvežilnih pijač še vedno uporabljajo naravne izvlečke (Wikipedija, 2018).

Kofein, ki ga plodovi vsebujejo, deluje tudi bronhodilatatorno, zato se rastlina uporablja tudi pri blaženju kašlja in simptomov astme. V farmaciji oluščeno seme predstavlja drogo (Wikipedija, 2018).

Plodovi imajo grenak okus in vsebujejo kofein. Plemena zahodne Afrike zato že od nekdaj uporabljajo semena kole, imenujejo jih *guru-guru*, za žvečenje, pogosto v obredih. Žvečenje semen zmanjša lakoto, nadomešča alkohol, daje jim moč ob telesnih naporih, služi jim kot denar, poročno darilo, amulet in kot daritveni prispevek bogovom (Wikipedija, 2018).



Slika 3: Kola (Wikipedija, 2018)

Kar zadeva koristi za zdravje, so kola matice podobne kavi.

Prednosti kola matice:

- Povečanje metabolizma

Izdelki iz kolinega oreščka vsebujejo kofein, kar lahko poveča metabolizem osebe.

- Pomoč za prebavo

Kola oreščki v prahu in ekstraktu lahko pomagajo pri prebavi. Menijo, da spodbujajo proizvodnjo želodčne kisline, ki povečuje učinkovitost prebavnega encima v želodcu.

- Pospeševanje krvnega obtoka

Kofein in teobromin v kola matici lahko pospešita srčni utrip, kar poveča kroženje krvi.

- Povečanje na ravni energije

Kola matica naravno stimulira centralni živčni sistem, kar lahko poveča pozornost in raven energije.

- Antibakterijske koristi

Študija, objavljena v mednarodni reviji *Journal of Biosciences and Medicines*, kaže, da bi uporaba ekstrakta kola lahko preprečila rast škodljivih bakterij (De Pietro, 2017). Obstaja več zdravstvenih pogojev, ki bi se lahko izboljšali z uporabo kola matice (De Pietro, 2017).

- Rak na prostati

Čeprav obsežne študije niso bile izvedene, zgodnje raziskave kažejo, da lahko nekatere spojine, ki jih najdemo v kola matici, zmanjšajo tveganje za raka prostate. Raziskave še vedno potekajo, vendar menijo, da lahko fitoestrogeni v kola maticah okužijo rakave celice in preprečijo rast tumorjev (De Pietro, 2017).

- Počasen metabolizem

Ljudem s počasno presnovo bi lahko koristila uporaba izdelkov, ki vsebujejo kola matice. Pogoji, ki lahko vplivajo na metabolizem osebe, so nizka stopnja testosterona, Gravesova bolezen in Cushingov sindrom (De Pietro, 2017).

- Migrena

Kola matica je lahko koristna za ljudi z migrenskimi glavoboli. Migrena pogosto prizadene krvne žile v glavi in kofein se uporablja proti bolečinam pri glavobolu (De Pietro, 2017).

Teobromin in kofein, ki jih vsebuje kola, lahko v možganih razširita krvne žile, kar bi lahko zmanjšalo bolečino v mišicah (De Pietro, 2017).

- Astma

Čeprav se morda ne priporoča za zdravljenje, so kola matice lahko koristne za ljudi z določenimi težavami pri dihanju, kot je astma.

Kofein v koli lahko deluje kot bronhodilatator, kar pomeni, da odpre dihalne poti, da olajša dihanje (De Pietro, 2017).

Kola matice in izdelki, ki vsebujejo kola matico, morda ne ustrezajo vsem.

Kdor koli, ki je alergičen na oreščke, se mora izogibati tudi koli. Alergijska reakcija na kolo lahko vključuje simptome, kot so:

- koprivnica,
- razdražen želodec,
- težave z dihanjem (De Pietro, 2017).



Slika 4: Kola (Naji.com, 2019)

2.1.3 KAKAVOVEC, *Theobroma cacao*

Kraljestvo: *Plantae* (rastline)

Red: *Malvales* (slezenovci)

Družina: *Sterculiaceae* (kakavovčevke)

Rod: *Theobroma* (kakavovec)

Vrsta: *Theobroma Cacao*

Je zimzelen grm oz. drevo z rožnatimi in belimi cvetovi, ki povprečno obrodi 40 plodov. Nedozelel plod je zelene barve. Med zorenjem se barva spremeni v rumeno ali oranžnordečo. V vsakem plodu je do 40 rjavih semen, ki vsebujejo od 40 do 50 % maščob in alkaloid teobromin (Lunder, 2016).

Rastlina izvira iz Amazonije, od koder so jo prenesli v Srednjo Ameriko. Cele plodove so že 1400 let pred našim štetjem uporabljali za pridobivanje fermentiranih alkoholnih napitkov; semena so Maji in Azteki uporabljali pri verskih obredih, zdravljenju in v kulinarčne namene. Kakavovec je bil včasih visoko cenjen, kar so dokazovali Maji z vsakoletnim žrtvovanjem živali, s čimer so počastili boga kakavovca Ek Chzaha. Verjeli so, da je bil kakavovec ljudem poslan od boga, zato so ga poimenovali hrana bogov (theo – bog in brom – hrana). Semena kakavovca so uporabljali tudi kot plačilno sredstvo. Žrtvovanje ljudi je doseglo tak vrh, da so očetje svoje hčere pošiljali v suženjstvo, saj so zanje dobili od 500 do 700 semen (Lunder, 2016).



Slika 5: Plod kakavovca (Radio Študent – Vižintin, 2018)

Napitek, ki so ga pripravljali iz kakavovih semen, so Azteki imenovali xocolatl, kar pomeni grenka voda. Kdor je že kdaj ugriznil v čokolado za kuhanje z večjo vsebnostjo kakava, razume, zakaj. Iz te besede izhaja tudi ime, ki ga je

kasneje dobil priljubljen izdelek iz kakava, čokolada. Napitek je bil mrzel in grenek zvarek, pripravljen iz praženih kakavovih zrn, zdrobljenih v pasto in namočenih v vodi, ki so jo nato zgostili s koruznim škrobom in oplemenitili z dodatkom začimb, vanilijo, čilijem in medom. Pijača je bila namenjena samo moškim, predvsem vladarjem in vojakom. Verjeli so, da je za ženske in otroke strupena.

Prva kakavova zrna je v Španijo prinesel Krištof Kolumb leta 1502, po svojem četrtem in zadnjem potovanju v Ameriko. Španci so njihovo vrednost dojeli šele po letu 1522, ko je na osvajalni pohod v Novi svet odšel španski konkvistador Hernan Cortez. Zadnji azteški vladar Montezuma II. ga je gostoljubno sprejel v svoji palači v azteškem glavnem mestu Tenochtitlan (današnji Mexico City) in mu ponudil *xocolatl* v zlati skodelici. Montezuma II. naj bi se krepčal s to pijačo, preden je odšel v svoj harem. Morda se čokolade zaradi tega še zmeraj drži sloves, da deluje kot afrodiziak (Lunder, 2016).



Slika 6: Reklama za prvo čokolado (Lunder, 2016)

Zakaj psi ne smejo jesti čokolade?

Zrna kakavovca vsebujejo približno 20 mg/g metilksantinskega teobromina. Prisotnost v čokoladi je večinoma manjša, vse je odvisno od tega, koliko kakava vsebuje čokolada. Ljudje teobromin iz čokolade uspešno in hitro

razgradimo in izločimo. Pri živalih, na primer pri psih, razgradnja poteka počasneje, kar povzroča močno izražanje učinkov teobromina. Najprej bruhamo, pogosto urinirajo, pojavi se tudi diareja. V primeru resnejše zastrupitve pride do neenakomernega bitja srca, epileptičnih napadov, notranjih krvavitev, srčne kapi in posledične smrti (Lunder, 2016).

2.1.4 ČAJEVEC, *Camellia sinensis*

Kraljestvo: *Plantae* (rastline)

Red: *Ericales* (vresovci)

Družina: *Theaceae* (čajevke)

Rod: *Camellia* (kamelije)

Vrsta: *Camellia Sinensis*

Čajavec se v naravnem okolju lahko razvije v drevo, ki meri v višino tudi 15 m. Takšna drevesa lahko najdemo še danes v pradomovini čaja, ki se razteza od jugovzhoda današnje Kitajske do zgornjega toka reke Brahmaputre v današnji Indiji. Vendar čajavec že tisočletja kultivirajo kot nizek grm. Raste počasi in že v drugem letu bujno cveti. Nič več ga ne razmnožujejo s semeni, temveč vegetativno s sajenjem potaknjencev. Tri do pet let po zasaditvi lahko čajavec prvič oberejo. Rastlina ima močno zasadno korenino, ki drevesu omogoča trdnost in s svojimi stranskimi koreninami srka vodo in hranilne snovi. Čajavec ne prenaša stoječe vode, zato se njegove stranske korenine razvijejo nad gladino podtalnice. Občutljiv je na nizke temperature in potrebuje izdatne padavine in visoko zračno vlažnost (Teekanne, 2018). Zelene liste obirajo ročno, pri čemer so vršički – dva najmlajša zgornja poganjka in listni popek – še posebej cenjeni, ker iz njih nastanejo izjemno kakovostni čaji. Od predelave listov je odvisno, ali bo iz njih nastal zeleni ali črni čaj (Teekanne, 2018). Kot nizek grm se najdlje goji na Kitajskem, kjer so čaj pili kot zdravilo že v 6. stoletju, čeprav bi Kitajci želeli, da bi se to zgodilo že z začetkom taoizma več kot tisoč let prej. V Evropo je prodrl v 17. stoletju po zaslugi holandskih zdravnikov, ki so ga priporočili, ker »krepi duševne zmožnosti«. Danes ga pridelujejo tudi v drugih deželah z milo in deževno višinsko klimo, v tropskem in

subtropskem pasu, od koder se tudi uvaža. Za drogo so najprimernejši čim mlajši listi. Za zeleni čaj jih takoj posušijo in je brez vonja, za črni čaj jih prej fermentirajo in blago diši. K nam prihaja kot kitajski, indijski, ruski in asamski čaj. Spodbujevalno deluje vsebujoči kofein (imenovan tudi tein), manj v manjši količini navzoča sorodna teobromin in teofilin. Čreslovine imajo krčilne (adstringentne) lastnosti, notranje ustavijo drisko, zunanje blažijo vnetja na koži in sluznicah. Zapira tudi teofilin, ker žene na vodo, zaradi česar se odtegne voda iz črevesja in se izsuši blato. Čaju pripisujejo še mnoge druge biološke lastnosti. Fenolne spojine naj bi ščitile žilje, lovile pri presnovi nastale nevarne proste radikale in preprečile za dedno zasnovano škodljive in rakotvorne učinke različnih snovi. Predvideva se tudi, da zavre vsrkanje holesterola iz prebavil v kri. Omenjeni učinki klinično niso ovrednoteni, zato niso znane možne koristi ob vsakodnevnem pitju čaja. Tu velja opozoriti, da obstaja zveza med čezmernim pitjem čajev, ki vsebujejo dosti čreslovin, in rakom na požiralniku, čemur se da izogniti s pravilno pripravo napitka. Kofeinski napitki niso primerni za ljudi z zvečanim krvnim tlakom in drugimi srčno-žilnimi težavami; nosečnice in doječe matere se morajo zavedati, da kofein prispe v plod in materino mleko in da ga dojenčki zelo počasi izločajo iz telesa. Nahaja se tudi v drugih drogah: kavi, koli in mateju. Silovitost njegovega učinka je odvisna od snovi, na katere je vezan, ker odločajo o tem, kako hitro bo prišel v kri in kako dolgo bo v telesu deloval, na primer na utrujeno srce. Zato je čaj pijača ceremonialnih Kitajcev, kava ognjevitih Arabcev. Poleg prvih ga imajo radi tudi mirni in uravnoteženi Angleži in Japonci; kavo pa imajo radi tudi temperamentni romanski in sredozemski ter vročekrvni balkanski narodi. Slovenci segamo po kavi, ker zaradi poživiljajočega učinka krepi družabno življenje; enako bi rekli, če bi pili čaj. Kaj je primernejše za zdravje ljudi, najbolje ponazori klinični poskus na zahtevo švedskega kralja Gustava III. (1746–1792), ki je rešil življenji na smrt obsojenih dvojčkov; v zameno za kazen sta morala vsak dan piti kavo oziroma čaj: preživela sta sodnike, zdravnike in kralja, saj sta oba dočakala visoko starost 83 let (Špringer, ni letnice).

Tradicionalno list čajevca notranje zdravi nespecifično drisko, odpravlja telesno in duševno utrujenost, žene na vodo in je v pomoč pri hujšanju; zunanje blaži vneto in srbečo sluznico in kožo. Krop naj se prelije čez zvrhano žličko čaja in se poparek, odvisno od namena, pusti stati pokrit od 2 do 10 minut, preden se precedi. Za osvežilni napitek sta dovolj 2 minuti, posreba se lahko več skodelic na dan; za zdravljenje driske naj stoji 10 minut, popijejo se lahko po požirkih od 2 do 3 skodelice na dan. Priprava vpliva na učinek zaradi različnih fizikalnih lastnosti sestavin v čaju. Kofein se hitro raztopi v vroči vodi, zato so osvežilnejši hitri poparki, v dolgotrajnejših se veže na čreslovine in njegova osvežilna moč splahni. Nasprotno se čreslovine raztapljajo počasi in je krčilni učinek proti driski in vnetjem večji pri poparkih, ki stojijo dalj časa (Špringer, ni letnice).



Slika 7: Listi čajevca (Bioforma, ni letnice)



Slika 8: Cvet čajevca (Big plantnursery, ni letnice)

2.2 NAVADNA BODIKA, *Ilex aquifolium*

Kraljestvo: *Plantae* (rastline)

Red: *Aquifoliales* (/)

Družina: *Aquifoliaceae* (bodikovke)

Rod: *Ilex* (navadna bodika)

Vrsta: *Ilex aquifolium*

Navadna bodika (*Ilex aquifolium*) je grm, ki pogosto zraste v nizko drevo. Ima bleščeče zimzelene liste, ki so na otip usnjati. Večina listov ima valovit rob s trnastimi zobci. Le listi, ki rastejo na dobro osvetljenem vrhu krošnje, imajo gladek, netrnast rob.

V Sloveniji najdemo ponekod po hribovskih gozdovih divje rastočo bodiko. Bolj pogosto kot v naravi jo vidimo po vrtovih in parkih, saj je zaradi somerne in počasne rasti in ker je zelena tudi pozimi, priljubljena okrasna rastlina. Drevesničarji vzgajajo številne okrasne sorte navadne bodike. Plodovi dozorejo jeseni. So živo rdeče okrogle jagode. Ker večina ptic bodikinih plodov ne je, ostanejo čez zimo na rastlini in predstavljajo za oko lep okras. Skorja, listi

in plodovi vsebujejo dva strupa. Če ju zaužijemo, povzročajo bruhanje in drisko, v najhujših primerih preneha biti srce. Zaradi žive barve zbudajo plodovi pozornost otrok in ravno pri njih so znane zastrupitve s smrtnim izidom. Dejstvo, da so plodovi neprijetnega okusa, otrok ne odvrne od tega, da bi jih ne nosili v usta. Zato je priporočljivo, da bodike ne sadimo po vrtovih in tistih delih parkov, kjer se zadržujejo majhni otroci (Mastnak, 1992).



Slika 9: Navadna bodika (Spletna vrtnarija, ni letnice)



Slika 10: Navadna bodika – jagode (Jež, 2014)

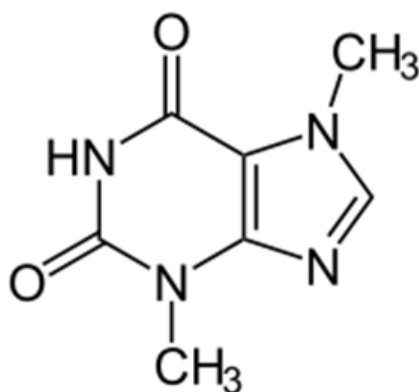
Grm ali manjše drevo prepoznamo po usnjatih, jajčasto oblikovanih listih. Na robovih listov so pogosto trnasti zobci. Cvetovi so drobni beli in enospolni. Cvetijo od aprila do maja. Na ženskih rastlinah se jeseni razvijejo okrogli

koščičasti plodovi. Ko dozori, so rdeče barve. Rastlina izvira iz južnih predelov Evrope. Pri nas raste posamično v gozdovih in na grmovnatih pobočjih od nižine do gorskih predelov. V zdravilne namene so v ljudskem zdravilstvu uporabljali liste, plodove in redkeje tudi skorjo bodike. Listi odvajajo vodo, so blago odvajalo in znižujejo povišano temperaturo. Plodovi so močno odvajalo in so jih nekdanj uporabljali pri zdravljenju epilepsije. Nepravilna uporaba ima lahko za posledico močno zastrupitev. Bodika zato ni primerna za samozdravljenje. Bodiko so v svoje obredje in verovanja vključila mnoga staroevropska ljudstva. Z vejicami so krasili bivališča ob zimskem sončnem obratu. V Rimu so si podarjali vejice ob decembrskih praznovanjih in tudi v krščanstvu je vejica bodike z rdečimi jagodami simbol praznikov. Kot druga zimzelena zelišča potrjuje kontinuiteto življenja in upanje za prihodnost. Navadna bodika je bila od nekdanj priljubljena okrasna rastlina in jo danes najdemo tudi na območjih opuščeni kmetij, kjer o nekdanjem življenju pričajo le še grmi bodike, pušpana in kakšna stara jablana. Pri nas so v naravi rastoče bodike zaščitene že od leta 1922 (Rode, ni letnice).



Slika 11: Plodovi navadne bodike (Botanični vrt Univerze v Ljubljani, ni letnice)

2.3 TEOBROMIN



Slika 12: Struktura teobromina (Wikipedija, ni letnice)

Osnovni podatki

PubChem CID: 5429

Kemijsko ime: teobromin; 3,7-dimetilksantin; diurobromin

Molekularna formula: $C_7H_8N_4O_2$

Molekulska masa: 180,167 g/mol

Fizični opis: bel kristalni prah brez vonja, ki ima grenak okus

pH (nasičena vodna raztopina): 5,5–7 (PubChem. Open Chemistry Database, ni letnice)

Omenjeni ksantinski alkaloid se uporablja kot bronhodilatator in kot vazodilatator. Teobromin ima šibkejšo diuretično aktivnost kot teofilin in je tudi manj močan stimulans gladkih mišic. Praktično nima stimulativnega učinka na centralni živčni sistem. Pred časom je bil uporabljen kot diuretik ter pri zdravljenju angine pectoris in hipertenzije (PubChem. Open Chemistry Database, ni letnice).

Teobromin je grenak alkaloid iz družine metilksantina, ki vključuje tudi podobne spojine teofilin in kofein. Kljub svojemu imenu spojina ne vsebuje

broma. Teobromin izhaja iz *Theobroma*, rodu kakava, katerega ime sestavljajo grške korenine *theo* (»bog«) in *broma* (»hrana«), kar pomeni »hrana bogov«. Je primarni alkaloid, ki ga najdemo v kakavu in čokoladi, in je eden od vzrokov za čokoladne učinke, ki izboljšujejo razpoloženje. Količina, ki jo najdemo v čokoladi, je dovolj majhna, da jo lahko človek varno uživa v velikih odmerkih. Toda živali, ki teobromin počasneje presnavljajo, na primer mačke in psi, zlahka zaužijejo dovolj čokolade, da povzroči zastrupitev. Teobromin je stimulans, ki se pogosto zamenjuje s kofeinom (PubChem. Open Chemistry Database, ni letnice).

V primerjavi s kofeinom ima različne učinke na človeško telo: je blag, trajen stimulans z učinkom na izboljšanje razpoloženja, medtem ko ima kofein močan, takojšen učinek in povečuje stres. V medicini se uporablja kot diuretik, vazodilatator in miokardni stimulans. Obstaja možnost povezave med rakom prostate in teobrominom. Teobromin je dejavnik, ki prispeva k refluksu kisline, ker sprosti mišice požiralnika sfinkterja, kar omogoča dostop želodčne kisline do požiralnika (PubChem. Open Chemistry Database, ni letnice).

2.4 MACERACIJA IN SORODNE TEHNIKE IZOLACIJE

Pogosto učinkovine iz naravnih materialov izoliramo s pomočjo ekstrakcije. Ekstrakcija je metoda, s katero izločamo komponente iz trdne snovi oz. tekoče faze v drugo tekočo fazo s pomočjo topila. Ekstrakcija »trdno–tekoče« oz. maceracija temelji na topnosti spojin v ekstrakcijskem topilu, ekstrakcija »tekoče–tekoče« na osnovi topnosti spojine v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata. Topnost neke spojine je odvisna od tega, v kolikšni meri so njene molekule sposobne tvoriti vezi s topilom. Polarne spojine so praviloma dobro topne v polarnih topilih, nepolarne spojine v nepolarnih topilih. Ekstrakcijo »tekoče–tekoče« uporabljamo, kadar ni mogoča destilacija oz. rektifikacija zaradi premajhne razlike v temperaturah vrelišča, tvorbe azeotropnih snovi in pri ločevanju temperaturno neobstoje snovi (vitamini, antibiotiki, aromatske snovi in drugo). Navadna ekstrakcija oz. maceracija poteka v treh stopnjah (Ahtik, Užmah, 2018):

- 1) mešanje topila in snovi, ki jo ekstrahiramo; zmes pustimo v stiku dalj časa
- 2) mehansko ločevanje ekstrakta in izluženega ekstrakcijskega ostanka (s centrifugiranjem, filtracijo)
- 3) termična ločitev ekstraktne faze v ekstrakt in topilo (z uparjanjem).

Ekstrakcijo z organskimi topili uporabljamo pri rastlinskih snoveh, ki so termolabilne in pri destilaciji z vodno paro ne dajejo eteričnega olja. Pri omenjeni tehniki lahko uporabljamo čista organska topila ali njihove mešanice. Rastlinski material namočimo v organskem topilu in odstranimo topilo pri znižanem tlaku. Dobimo preostanek, ki vsebuje poleg izluženih komponent tudi naš produkt (Ahtik, Užmah, 2018).

V svetu kemijske tehnologije razvijajo postopke s pomočjo superkritičnih medijev. Ekstrakcija s superkritičnimi plini je sodobna metoda, ki je zaradi nizke temperature ekstrakcije primerna za termolabilne snovi. Izvedemo jo z utekočinjenimi plini (npr. ogljikovim dioksidom). V superkritičnem stanju imajo odlične lastnosti topila za organske molekule. Prednost te tehnike je, da dobimo produkte, ki so visoke kakovosti, saj ne vsebujejo zaostalih topil (Ahtik, Užmah, 2018).

Metoda, podobna destilaciji z vodno paro, se imenuje *hidrodifuzija* in je hitrejša in preprostejša. Para pronica navzdol skozi rastlinski material in ekstrahirano eterično olje, para kondenzira na enak način kot pri parni destilaciji. Ekstrakcija sestoji iz dveh zaporednih operacij. V prvi spravimo zmes v intenziven stik s topilom, v drugi obe fazi ločimo. Ekstrakcijo večinoma uporabljamo za pridobivanje olj iz plodov semen in za pridobivanje arom, farmacevtskih substanc rastlin in sadežev ter začimb. Kot topilo uporabljamo hlapna organska topila, v določenem primeru tudi vodo. Izbira opreme za ekstrakcijo in obratovalni pogoji so odvisni od deleža in porazdelitve topne komponente v materialu, narave trdne snovi in velikosti delcev. Če je topljenec enakomerno dispergirani v trdni snovi, poteka raztapljanje najprej na površini, potem mora topilo penetrirati skozi zunanji sloj v notranjost delca, preden doseže topljenec. Hitrost ekstrakcije se zaradi opisanega zmanjša. Če

je delež topljenca v trdnem materialu velik, lahko zaradi prevelike poroznosti pride do zdrobitve strukture v fino nasutje netopnega preostanka, ki postane neprepusten za topilo (Ahtik, Užmah, 2018).

Splošno lahko proces razdelimo na tri stopnje. Prva je fazna sprememba pri raztapljanju topljenca, sledi difuzija topljenca v topilo, ki se nahaja v porah trdnega materiala, na površino delca. V zadnjem delu se vrši prenos topljenca skozi tekočinski film na površini delca v glavni tok topila. Katerakoli izmed teh stopenj lahko omejuje ekstrakcijsko hitrost, ponavadi prvi proces poteče tako hitro, da je njegov vpliv na ekstrakcijsko hitrost zanemarljiv (Ahtik, Užmah, 2018).

Za dobro ločitev faz po ekstrakciji je pomembna razlika v gostotah osnovnega in ekstrakcijskega topila in netopnost enega v drugem. Uspešnost ekstrakcije ugotovimo iz izračuna suhe snovi ali iz porazdelitvenega koeficienta k . Nernstov porazdelitveni koeficient k je razmerje ravnotežnih koncentracij komponente v *topilu 1* in v *topilu 2*. Velja zakonitost, da večji kot je k , uspešnejša je ekstrakcija (Ahtik, Užmah, 2018).

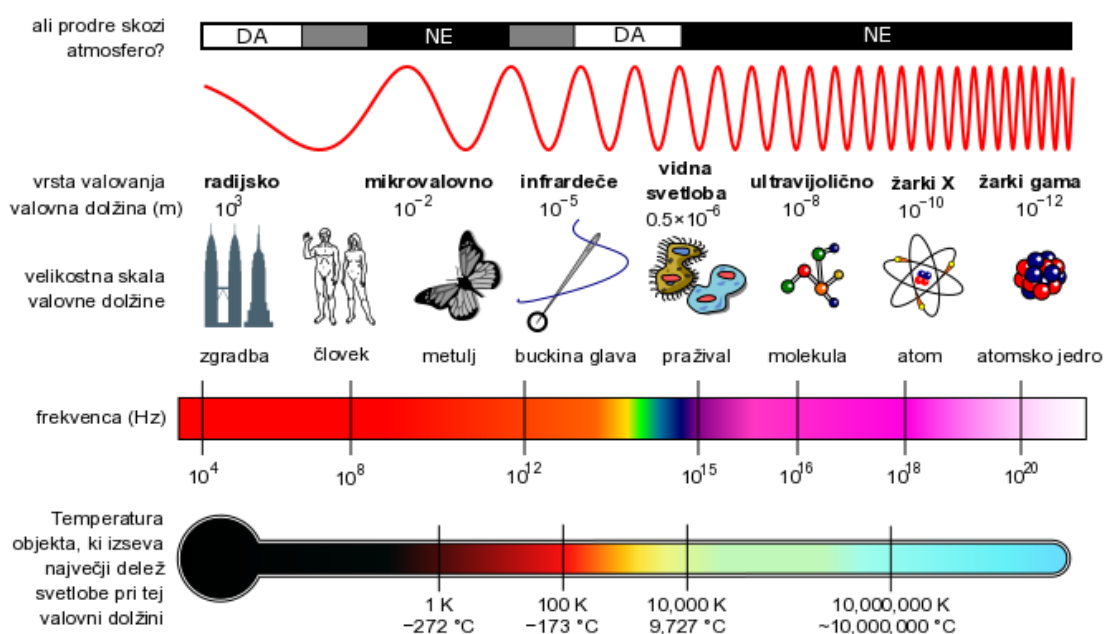
$$k = \frac{c_1}{c_2}$$

2.5 IR-SPEKTROSKOPIJA

Infrardeča spektroskopija (IR-spektroskopija ali vibracijska spektroskopija) je spektroskopska metoda, pri kateri opazujemo interakcijo infrardeče svetlobe s snovjo. Del spektra resonančno vzbudi nihanja atomov v molekuli, s čimer pride do absorpcije svetlobe (Ahtik, Užmah, 2018).

IR-absorpcijska spektroskopija temelji na analizi spektra, ki ga dobimo, če vzorec presvetlimo z elektromagnetnim valovanjem z valovnimi dolžinami IR-območja. Absorpcija IR-svetlobe vzpodbudi vibracijska stanja absorbirajočih molekul. Na dobljenem spektru opazimo, da se po prehodu skozi vzorec intenziteta dela originalnega sevanja zmanjša. Knjižnice IR-spektrov številnih

spojin nam služijo kot orodje pri določevanju spojin neznanih vzorcev. Vsak trak v posnetem IR-spektru je posledica določenega nihanja molekulskih skupin. Znano je, da imata dva polimera z enako strukturo enak IR-spekter. Dobljene IR-spektre neznanih vzorcev zato primerjamo z IR-spektri znanih spojin. Fotoni infrardečega sevanja z valovnimi dolžinami od 700 nm do 1 mm imajo dovolj veliko energijo, da vzbudijo nihanja atomov v molekulah. Atomi v molekulah lahko nihajo na več načinov: vzdolžno, simetrično, asimetrično in prečno (Ahtik, Užmah, 2018).



Slika 13: Spekter elektromagnetnega valovanja (Ahtik, Užmah, 2018)

Število možnih nihanj narašča z velikostjo molekule, zato so lahko IR-spektri velikih molekul zelo zapleteni in je tako skoraj nemogoče določiti, kateremu nihanju ustreza določen absorpcijski trak. V IR-spektrih se največkrat uporablja namesto valovne dolžine valovno število (ν), ki je recipročna vrednost valovne dolžine, izražena v cm^{-1} (Ahtik, Užmah, 2018).

Pri najvišjih frekvencah (visokih valovnih številih) bodo absorbirale skupine z lahkiimi atomi, ki so povezane z močnimi vezmi. Najlažji atom je vodik, ki je v organskih spojinah vezan na ogljik, kisik ali dušik, redkeje na žveplo. S temi

atomi tvori močne vezi, ki imajo absorpcijske trakove pri visokih valovnih številih. Vezi C-C, C-O, C-N, C-halogen in druge imajo nižje lastne frekvence, nekoliko višje dvojne in trojne vezi (C=O, CC, CN), saj so te vezi tudi močnejše. Posamezni tipi vezi oziroma funkcionalnih skupin imajo absorpcijske trakove v točno določenih območjih spektra, kar nam omogoča, da lahko z IR-spektra sklepamo na prisotnost ustrezne funkcionalne skupine oziroma strukturnega elementa v molekuli. Območje v spektru, v katerem ugotavljamo prisotnost funkcionalnih skupin, sega od 4000 do 1600 cm^{-1} ; območje pod 1600 cm^{-1} imenujemo območje prstnega odtisa, ki je uporabno predvsem za identifikacijo spojin. Samo identični spojinata namreč tudi ta del spektra povsem enak, seveda če sta bila spektra posneta v enakih okoliščinah (Ahtik, Užmah, 2018).

Vezi ogljik-vodik so prisotne v skoraj vseh organskih molekulah. Osnovne frekvence imajo v dveh območjih, in sicer med 2500 in 3300 cm^{-1} ter med 650 in 1550 cm^{-1} . Atomi vodika, vezani na sp^3 -hibridizirane ogljikove atome (alkani), imajo absorpcijske trakove med 2800 in 3000 cm^{-1} ter med 1200 in 1500 cm^{-1} . Metilne skupine (-CH₃) imajo navadno dva močna absorpcijska vrhova pri 2872 in 2962 cm^{-1} ter enega nekoliko šibkejšega pri 1380 cm^{-1} . Metilenske skupine (-CH₂-) kažejo močne absorpcijske signale pri 2853, 2926 in 1460 cm^{-1} . Metinska skupina (-CH-) ima en sam šibek absorpcijski signal pri 2890 cm^{-1} (Ahtik, Užmah, 2018).

Prisotnost določenih funkcionalnih skupin v molekuli ne določimo samo iz položaja traku, ampak tudi iz oblike in intenzitete signala. Tehnika IR-spektroskopije se uporablja tudi v farmaciji, medicini (npr. za določanje količine telesne maščobe, BMI), kriminalistiki (npr. za analizo vlaken), prehrani (npr. za določanje vsebnosti vode v mlevskih izdelkih), agrikulturi, okoljevarstvu in podobno. Med drugim z IR-spektroskopijo določajo tudi starost lesenih umetniških predmetov (Ahtik, Užmah, 2018).

S pomočjo IR-spektrov dobimo informacijo o vrsti materiala. Velika uporabna prednost IR-spektroskopije kot analizne metode je, da metoda sama ni

destruktivna (neporušna), omogoča delo z vzorci vseh agregatnih stanj, je hitra in enostavna (Ahtik, Užmah, 2018).

2.6 DIFUZIJA UČINKOVINE NA TRDNO GOJIŠČE – DIFUZIJSKI ANTIBIOGRAM

Za izvedbo določanja delovanja ekstraktov oz. maceratov navadne bodike na kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo uporabili metodo difuzijskega antibiograma z diski. Kot gojišča smo uporabljali agarozno hranilno podlago. Agar je polisaharid, ki ga pridobivajo iz določene vrste rdečih morskih alg. Pri 100 °C preide v koloidno tekoče ali trdno stanje. Ker postane tekoč, ga lahko v tanki plasti vlivamo v petrijeve posode. Ko se le-ta ohladi, preide v stanje gela in postane trden. Le redki mikroorganizmi lahko hidrolizirajo agar in ga uporabijo kot vir ogljika. Agarozna gojišča ostanejo, kljub temu da na njih rastejo mikroorganizemske kulture, nedotaknjena. Zato gojišča iz agarja uporabljamo v mikrobioloških analizah in za gojenje mikroorganizmov (Hohkraut, 2015).

Pri omenjeni metodi diske iz poroznega in vpojnega materiala omočimo z raztopino, ki ji želimo določiti aktivnost. Raztopina iz diskov difundira v gojišče oz. v njegovo okolico. Diske z raztopino oz. trdnim materialom položimo na gojišče, na katerega je nacepljena mikroorganizemska kultura. Če je aktivnost raztopine (oz. trdne snovi), ki je difundirala v gojišče, dovolj velika, v okolici diska prepreči rast nacepljene kulture. Okrog diska se pojavi prazen prostor, na katerem ni rasti mikroorganizemske kulture. Prazen prostor imenujemo inhibicijska cona ali kolobar sterilnega območja. Večji kot je premer inhibicijske cone, večja je (antibakterijska, antimikotična) aktivnost raztopine na disku oz. dodane trdne snovi (Hohkraut, 2015).

2.7 KVASOVKA, *Saccharomyces cerevisiae*, KOT MODELNI ORGANIZEM

Znanstvena klasifikacija

Kraljestvo: *Fungi* (glive)

Deblo: *Ascomycota* (zaprtotrosnice)

Poddeblo: *Saccharomycotina* (/)

Razred: *Saccharomycetes* (kvasovke)

Red: *Saccharomycatales* (/)

Družina: *Saccharomycetaceae* (/)

Rod: *Saccharomyces* (/)

Vrsta: *Saccharomyces cerevisiae*

Znanstveno ime: *Saccharomyces cerevisiae*

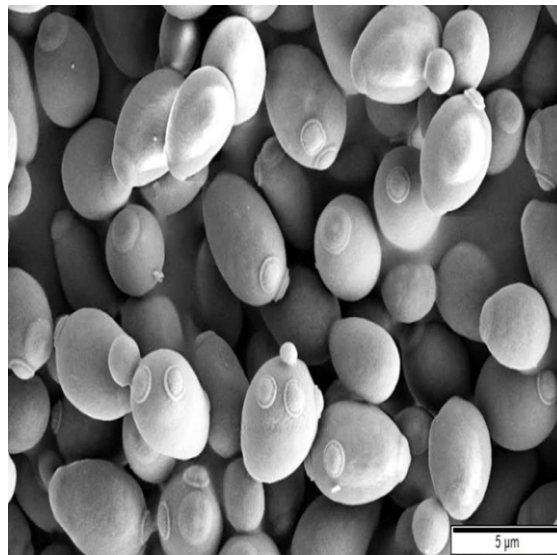
Kvasovke so enocelične glive, ki se razmnožujejo nespolno oz. se razmnožujejo z brstenjem ali s cepitvijo. Spadajo v skupino pravih gliv (*Fungi*) in v debli *Ascomycota* ter *Basidimycota*. V sodobni literaturi je opisanih preko 800 vrst kvasovk, od katerih $\frac{1}{4}$ najdemo v hrani, le nekaj jih uvrščamo med pomembne kvarljivce. Prvi in najpomembnejši kvarljivec je *Saccharomyces cerevisiae* (Lukan, 2012).

Saccharomyces cerevisiae

Enocelične glive, ki se razmnožujejo z multilateralnim brstenjem (nespolno) in s pomočjo askopore (spolno). Aski so odporni in imajo do štiri askospore kroglaste oblike. Ta kvasovka je najbolj znana po vlogi pri proizvodnji kruha in alkoholnih pijač. Heksoze (ogljikov dioksid in različne spojine) pretvori v etanol. Vloga in korist *Saccharomyces cerevisiae* je prevladujoča pri fermentaciji vina. Refermentacija spreminja razmerje etanol/sladkor, kar vpliva na aromo vina. V primeru, da kvasovka ni pravočasno odstranjena, lahko povzroči tudi kvar vina (Lukan, 2012).

Vinske kvasovke

Najdemo jih v vinogradih, v moštu, vinu in vinarških poslopijih. To so mikroskopski enocelični organizmi, ki brez kisika med procesom alkoholnega vrenja (oz. fermentacije) ogljikove hidrate (sladkor) pretvarjajo v etanol in ogljikov dioksid. Vinske kvasovke so naravno prisotne na kožicah grozdnih jagod. Pri spontani fermentaciji sodelujejo različne vrste avtohtonih kvasovk, vendar ob koncu fermentacije postanejo prevladujoče kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* zaradi njihove odpornosti na visoko koncentracijo etanola (Alič, 2017).



Slika 14: *Saccharomyces cerevisiae* (Wikipedija, ni letnice)



Slika 15: Refermentacija vina (Agro, 2017)



Slika 16: Priprava kvasovk (Jurana d. o. o., ni letnice)

2.8 HIPOTEZA

Po prebrani literaturi smo si postavili naslednji hipotezi, ki sta nas vodili skozi celotno raziskovanje in nam dajali smernice.

Predvidevamo, da bomo v navadni bodiki, s pomočjo IR-spektroskopije, kvantitativno določili teobromin v vseh izoliranih vzorcih plodov (jagod), nekoliko manj pa bomo upešni pri določitvi le-tega v listih. Kot izolacijsko oz. maceracijsko topilo bomo uporabili alkohol etanol. Predvidevamo, da bodo izolati bogatejši s teobrominom tam, kjer bo uporabljeno bolj koncentrirano topilo. Predvidevamo tudi, da bomo uspeh izolacije teobromina dosegli ob časovno dlje trajajoči maceraciji (1 teden v primerjavi z 1 uro in 24 urami). K tej hipotezi še dodajamo, da bo optimalna temperaturna učinkovitost maceracije znotraj 1 ure pri 41 °C (v primerjavi z 21 in 61 °C).

Ob izvedbi difuzije ekstraktov na trdno gojišče bomo pri delu uporabili difuzijski antibiogram. Predvidevamo, da bo vzorec izolata z najvišjo vsebnostjo teobromina na gojišču s *Saccharomyces cerevisiae* ustvarjal znatno oz. minimalno inhibicijsko cono. Ker bo opisani »surovi« ekstrakt vseboval še druge komponente, predvidevamo, da glede na standardni teobromin ne bo predstavljal vidnega učinka.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL

Pri izvajanju eksperimentov je pomembno, da pazimo na čistost reagentov in aparaturo ter celotnega delovnega prostora. Zaščititi moramo tudi sebe, zato moramo imeti primerno zaščitno opremo (rokavice, očala, haljo). V laboratoriju potrebujemo poleg steklenih posod in aparaturo tudi droben stekleni inventar: palčko za mešanje, kapalko za dodajanje tekočin, žličko za tehtanje in podobno. Nekateri reagenti so zdravju škodljivi in nevarni, zato je potrebno z njimi ravnati v skladu z varnostnimi predpisi.

Vse podrobnosti o kemikalijah so predstavljene v dodatku.

Vse mikrobiološke preiskave smo opravljali aseptično. To pomeni, da smo onemogočili dostop nezaželenim mikroorganizmom, ki bi kontaminirali kulturo in zaradi katerih bi bili rezultati poskusov napačni. Med delom smo imeli ves čas prižgan Bunsenov gorilnik, ki je na razdalji 30 cm omogočal aseptično okolje. Delovno površino smo razkužili z razkužilom za mize. Skuhali smo agarozna gojišča in jih ob plamenu v aseptičnem okolju razlili v petrijevke. Za pripravo gojišča smo uporabili destilirano vodo in t. i. *plate count agar* za mikrobiologijo, v katerem so glukoza, glive kvasovke in agar. Med delom smo uporabljali zaščitno haljo in zaščitna očala.

3.2 REAGENTI, RAZTOPINE IN VZORCI

- Absolutni etanol ($\geq 99,8\%$) (Sigma-Aldrich), C_2H_5OH ,
- 90 % etanol, C_2H_5OH ,

- 80 % etanol, C₂H₅OH,
- destilirana voda,
- teobromin,
- *plate count agar* za mikrobiologijo (Sigma-Aldrich),
- suh rastlinski material – listi in plodovi navadne bodike, predhodno sušeni v sušilniku za sadje na 40 °C

3.3 APARATURE IN INVENTAR

APARATURE

- palični mešalnik Bosch, MSM 67160, z močjo 750 W
- precizna laboratorijska tehtnica Kern, 440-47
- laboratorijski stresalnik Ika, KS250 basic
- hladilnik Gorenje, RB4061AW367180
- enodelni štedilnik Clatronic, EKP 2419
- inkubator Kambič, I-50
- sušilnik sadja ECG, SO 570
- mikrovalovna pečica Midea, tip MG7017NP-BM
- FTIR-spektrometer Vertex 80, Bruker



Slika 17: FTIR-spektrometer, Vertex 80 (Fotografija last avtoric)

INVENTAR

- erlenmajerica, 150 mL, 30 kosov
- bučka, 100 mL, 2 kosa
- čaša, 100 mL, 30 kosov
- merilni valj, 100 mL, 16 kosov
- merilni valj, 10 mL, 16 kosov
- steklena palčka, 16 kosov
- kvalitativni lij, 16 kosov
- spatula, 2 kosa
- plutasti zamaški, 30 kosov
- laboratorijski nož, 1 kos
- steklena kapalka, 2 kosa
- kovinski lonec, 2 kosa
- kladivo, 2 kosa
- lesena deska
- termometer, 2 kosa

- laboratorijsko stojalo, 10 kosov
- kovinski obroč, 16 kosov
- mufa in prižema, 16 kosov
- plinski gorilnik
- vžigalice
- vatirane palčke
- petrijevke, 8 kosov
- pinceta, 1 kos

3.4 PRIPRAVA VZORCEV NAVADNE BODIKE

Liste in plodove navadne bodike smo nabirali na območju Zgornjega Rifengozda v občini Laško. Nabirali smo jih 15. 10. 2018 od 18.57 do 20.45 ure. Na ta dan je bilo zelo oblačno, prisotne so bile tudi občasne padavine, kar je v nadaljevanju precej podaljšalo čas sušenja. Liste in plodove smo sušili naenkrat, ločeno v različnih pladnjih. Najprej smo material dve uri sušili pri temperaturi 35 °C, nato smo temperaturo v 5 °C-intervalih na dve uri višali do 50 °C. Pri 50 °C smo vsebino sušili nadaljnjih 52 ur. Suh rastlinski material smo do uporabe hranili na suhem v neprodušno zaprti posodi. Pred izvedbo maceracije smo vsebino rastlinskega materiala zmelili v mlinčku, da smo mu povečali površino.



Slika 18: Sveži listi in plodovi (jagode) navadne bodike (Fotografija last avtoric)



Slika 19: Sušilnik rastlinskega materiala; ECG sušilnik sadja, SO 570 (Fotografija last avtoric)

3.5 POSTOPEK MACERACIJE TEOBROMINA IZ NARAVNEGA VIRA

V 500 mL erlenmajerice zatehtamo 10,0 g posušenih in zmletih listov oz. posušenih in zdrobljenih jagod navadne bodike. Zatehti dodamo 100 mL absolutnega, 90 in 80 % etanola, in vsebino stresamo na stresalniku pri 250 obratih na minuto: v prvi paralelki eno uro, v drugi 24 ur in v tretji točno 7 dni. Po pretečenem času vsebino filtriramo. Filtrat prelijemo s 3×10 mL topila in kvantitativno prenesemo v stehtano bučko. Topilo odparimo pod nižanim pritiskom in preostanek stehtamo. Količino izoliranega materiala določimo z odštevanjem. Izolirani material do izvedbe analize hranimo v neprodušno zaprti bučki v laboratorijskem hladilniku na 5 °C.

Maceracija pri višji temperaturi – variacija osnovnega postopka: ob konstantnem mešanju in termostatiranju (pri višjih temperaturah) na vodni kopeli eno uro maceriramo rastlinski material še pri 41 in 61 °C. Predhodne maceracije so potekale na »sobni temperaturi« oz. temperaturi prostora, ki je znašala 21 °C.

Podatke vnesemo v tabelo.

3.6 KVANTITATIVNA DOLOČITEV TEOBROMINA V IZOLATIH NAVADNE BODIKE Z UPORABO FTIR-SPEKTROSKOPIJE

FTIR spektre smo posneli na Brukerjevem FTIR vibracijskem spektrometru *Vertex 80* in *Specacovi Silver gate ATR* (angl. Attenuated total reflection, Slo. metoda oslabljenega popolnega odboja) celici z germanijevim kristalom in enim odbojem.

Spektri so bili posneti v območju med 4000 in 600 cm^{-1} . Vsak končni spekter je bil povprečen iz 64 spektrov, s čimer smo izboljšali spektralno razmerje med signalom in šumom. Od vsakega končnega spektra je bil samodejno odštet spekter ozadja, za katerega smo uporabili enake meritvene parametre.

Kvantitativna ocena deleža teobromina v izolatih je bila določena z odštevalnim faktorjem, pridobljenim z odštevanjem spektra čistega teobromina od spektra posameznega izolata. Pri odštevanju smo kot indikator uporabili trak pri 1690 cm^{-1} , saj je predstavljal najintenzivnejši trak v spektru teobromina. Trak pripada t. i. valenčnemu nihanju C=O skupin.

3.7 DIFUZIJA IZOLATOV NAVADNE BODIKE NA TRDNO GOJIŠČE

Za pripravo gojišča smo porabili 1 L destilirane vode in 22,5 g *plate count* agara za mikrobiologijo. Vsebino smo ob intenzivnem mešanju segrevali do točke, kjer se agar ni popolnoma raztopil. Vsebino smo v nadaljevanju avtoklavirali pri 121 °C 15 min in v aseptičnem okolju z njo pripravili petrijeve plošče.

Pri nanašanju modelnega organizma na petrijeve plošče smo v posodico za nanos nalili 2,0 mL prekuhane in sterilizirane fiziološke raztopine (0,9 % NaCl v destilirani vodi) in ji dodali 100 mg modelnega organizma *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* smo s palčko za razmaz vijugasto nanašali na agar, nato smo v posamezno pasažo petrijeve plošče nanegli izolate. Sterilizirane trdne izolate smo v gojišče vstavili direktno (zatehta: 20 mg), oljnate pa v identični masi nanegli na disk, ki je bil predhodno steriliziran v mikrovalovni pečici.

Pred nanosom vzorcev smo prižgali Bunsenov gorilnik, da smo zagotovili 30 cm okoli gorilnika sterilno območje. Pinceto za nanašanje vzorcev smo najprej razžarili nad gorilnikom in jo šele nato uporabili za nadaljnje delo. Za lažji pregled in kontrolo dela smo vsak vzorec nanašali v treh paralelkah (tj. treh ploščah). Na posamezni petrijevi plošči je bil poleg testiranega vzorca tudi standard – čisti teobromin.



Slika 20: Primer nanosa vzorca izolata skupaj s standardom (Fotografija last avtoric)

Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* za hitro rast potrebujejo optimalno temperaturo okolja, katero jim zagotovimo v inkubatorju. Nacepljeno mikroorganizemsko kulturo smo inkubirali 14 dni pri 37 °C. Vzorce smo pregledovali vsakih 24 ur.

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 REZULTATI MACERACIJE TEOBROMINA IZ NAVADNE BODIKE

Rezultate maceracij oz. ekstrakcij »trdno-tekoče« teobromina iz navadne bodike prikazuje spodnja tabela.

RASTLINSKI MATERIAL	TOPILO, ETANOL (VOL. %)	MASA EKSTRAKTA [mg] PRI 21 °C, 1 URA	MASA EKSTRAKTA [mg] PRI 21 °C, 24 UR	MASA EKSTRAKTA [mg] PRI 21 °C, 1 TEDEN	MASA EKSTRAKTA [mg] PRI 41 °C, 1 URA	MASA EKSTRAKTA [mg] PRI 61 °C, 1 URA
LISTI	»Absolutni«	310	501	552	512	1201
	90	314	526	702	411	1016
	80	509	810	1311	700	896
PLODOVI	»Absolutni«	519	801	1209	639	1215
	90	633	1173	1559	742	1202
	80	834	1436	1942	967	859

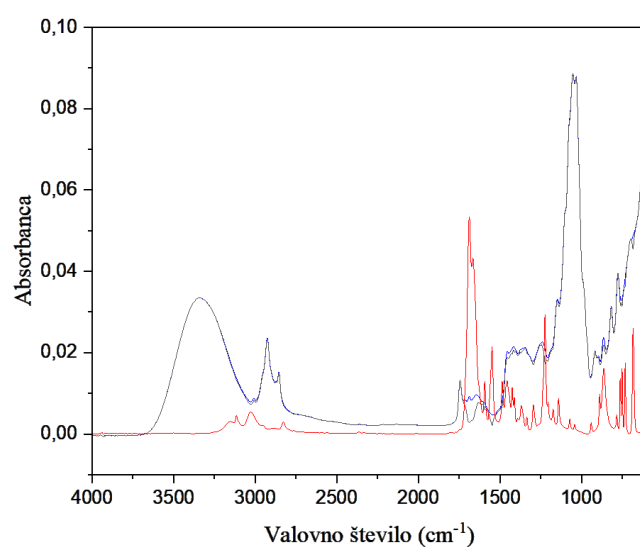
Tabela 1: Količina ekstrakta po maceraciji

Iz tabele je moč razbrati, da z redčenjem etanola (kot maceracijskega topila) povečamo količino izoliranega materiala. Dejstvo pripisujemo topnosti substanc, ki jih vsebuje heterogen vzorec. Vsi pridobljeni izolati so bili obarvani, kar pripisujemo dejstvu, da so v vzorcu prisotne še druge komponente, ki smo jih s topilom izlužili. Material, ki smo ga pridobili, je »surov« in ni kemijsko čist. Če bi želeli pridobiti popolnoma čist vzorec, bi morali izvesti še separacijske postopke.

Z vsebnostjo vode v etanolu narašča tudi masa izolata. Omenjeno ne velja za temperaturo 61 °C. Dejstvo pripisujemo temu, da pri višji temperaturi najverjetneje nekaj alkoholne komponente upari in zapusti sistem v obliki pare. V tekoči fazi (ekstrakcijsko topilo) nastane vsebina z drugačno sestavo (sprememba % alkohola in vode) in v njej topne komponente rastlinskega materiala. Iz omenjenega velja, da ima temperatura pomembno vlogo pri izluževanju komponent iz realnih vzorcev. Veliko vlogo igra tudi čas izluževanja. Iz tabele je mogoče opaziti, da znotraj izvedbe postopka pri 21 °C pri različnih časih izvedbe opazimo naraščanje mase. Dlje časa kot poteka maceracija, več snovi se izloči. Omenjeno velja, dokler ekstrakcijsko topilo ni popolnoma nasičeno z ekstrahiranimi komponentami vzorca.

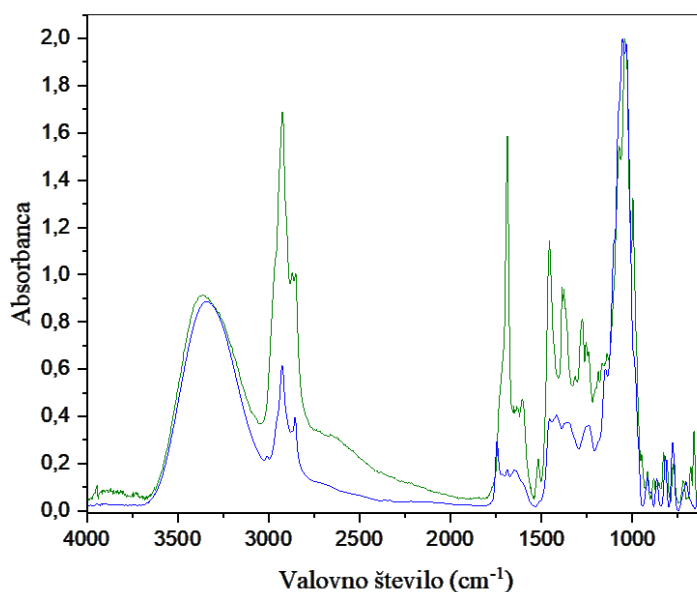
Preučevanje uporabe različnih ekstrakcijskih topil, temperature in časa izluževanja ima v kemijski industriji pomembno vlogo. S kombinacijo ustreznega medija oz. topila, temperature in časa lahko pripomoremo h kvaliteti pridobljene učinkovine in celo pocenimo delovni proces.

4.2 REZULTATI KVANTITATIVNIH DOLOČITEV TEOBROMINA S FTIR-SPEKTROSKOPIJO



Slika 21: Spektar čistega teobromina in spektar ekstrakta jagod z najvišjo vsebnostjo teobromina

Rdeč spekter predstavlja spekter čistega teobromina. Moder je spekter ekstrakta jagod, maceriranih 1 uro v »absolutnem« etanolu pri 41 °C. Siv spekter je diferenčni spekter, kjer smo od spektra ekstrakta odšteli spekter teobromina. Razlika nam poda kvantitativno oceno vsebnosti teobromina v analiziranem ekstraktu. Pri odštevanju smo kot indikator uporabili trak pri 1690 cm^{-1} , saj je to najintenzivnejši trak v spektru teobromina. Trak pripada valenčnemu nihanju C=O skupin. Kvantitativna ocena je zgolj informativna, saj se trakovi teobromina v spektru ekstrakta prekrivajo s preostalimi komponentami v ekstraktu. Natančnejša kvantitativna ocena bi bila možna z vpeljavo t. i. metode dekompozicije modelnih trakov, kar je na tem mestu že višja raven.



Slika 22: Primerjava FTIR-spektra ekstrakta iz listov in plodov

Na Sliki 22 opazimo primerjavo dveh vzorcev. Zeleni spekter predstavlja primer ekstrakta listov in modri ekstrakt jagod. Zaradi lažje preglednosti sta bila spektra normalizirana na najintenzivnejšem traku, t. j. pri 1050 cm^{-1} .

Vsem, z maceracijo pridobljenim vzorcem smo (v %) s pomočjo FTIR-spektroskopije določili vsebnost teobromina.

RASTLINSKI MATERIAL	TOPILO, ETANOL (VOL. %)	VSEBNOST TEOBROMINA [%] PRI 21 °C, 1 URA	VSEBNOST TEOBROMINA [%] PRI 21 °C, 24 UR	VSEBNOST TEOBROMINA [%] PRI 21 °C, 1 TEDEN	VSEBNOST TEOBROMINA [%] PRI 41 °C, 1 URA	VSEBNOST TEOBROMINA [%] PRI 61 °C, 1 URA
LISTI	»Absolutni«	/	5,4	7,2	9,1	5,1
	90	/	3,8	6,9	/	4,5
	80	/	/	6,5	/	1,1
PLODOVI	»Absolutni«	2,5	5,5	6,5	12,8	1,1
	90	0,7	1,1	2,1	5,3	1,0
	80	0,2	1,0	1,9	2,7	0,6

Tabela 2: Vsebnost teobromina [%] v maceriranih vzorcih

Tabela podaja vlogo ekstrakcijskega topila, časovne in temperaturne skale na količino izoliranega teobromina. Skladno s hipotezo opazimo, da smo v vseh vzorcih plodov izolirali in s kvantitativno vrednostjo potrdili vsebnost teobromina. V maceriranih vzorcih listov v nekaterih primerih nismo opazili ustreznega traku, ki bi nakazoval na teobromin, iz česar lahko trenutno sklepamo, da ga omenjeni vzorci ne vsebujejo. S pomočjo pridobljenih rezultatov lahko pojasnimo vpliv topila, časa in temperature maceracije na vsebnost teobromina. V vrsti treh raztopin etanola kot maceracijskega topila velja, da je večja vsebnost teobromina v vzorcih, kjer je uporabljeno bolj koncentrirano topilo, v našem primeru »absolutni« etanol. Z omenjenim topilom pokažemo, da je v vzorcu plodov (jagod) vsebnost teobromina največja in znaša 12,8 % (pri 41 °C). S pod enakimi pogoji izolacije iz listov pa pridobimo 9,1 % teobromina. Skladno s hipotezo velja tudi, da je med testiranimi parametri optimalna temperatura izolacije pri 41 °C in čas 1 ure. Naraščajoči trend izolirane učinkovine opazimo tudi znotraj temperature 21 °C ob spremembi različnih časov izolacije. Podobno kot v razdelku 4.1 pokažemo, da dlje časa kot poteka postopek izluževanja, več aktivne substance izoliramo, kar velja, dokler ekstrakcijsko topilo ni popolnoma nasičeno z izoliranim materialom.

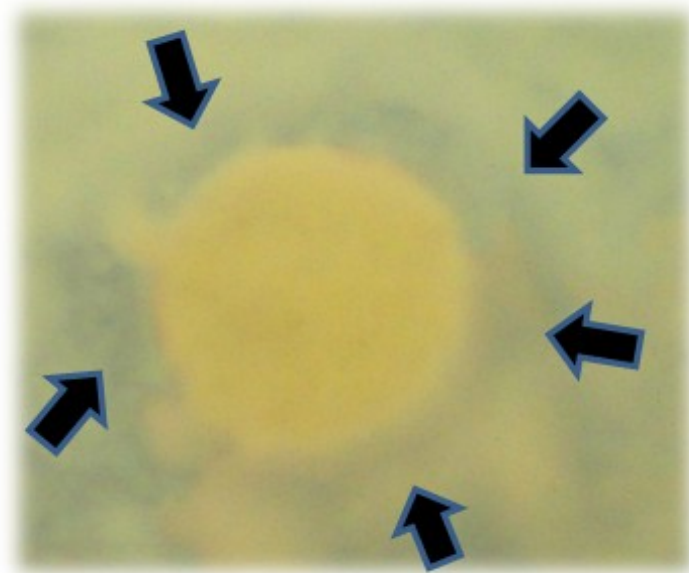
4.3 REZULTATI DIFUZIJSKIH TESTOV

Na agarozni podlagi, z nacepljenim modelnim organizmom *Saccharomyces cerevisiae* smo z dodatki izolatov navadne bodike preučevali učinek njihovega delovanja. Opazovanje eksperimenta je potekalo 14 dni.

Dva dni po nanosu so se kvasovke že začele počasi razraščati po gojiščih. Pri vzorcu plodov, ki so bili macerirani z »absolutnim« etanolom 1 uro pri 41 °C, se je začela pojavljati znatna inhibicijska cona. Znatna inhibicijska cona pri omenjenem vzorcu je bila opazna še nadaljnje 4 dni, nato pa je postopoma izginila, saj je modelni organizem začel preraščati disk.

Na plošči je bil skupaj z opisanim vzorcem še vzorec standardnega teobromina. Vzorec standardnega teobromina so kvasovke začele preraščati že tretji dan. Iz omenjenega velja, da je testirani »surovi« ekstrakt vseboval še druge komponente, ki kažejo minimalen vpliv na modelni organizem.

Preostali vzorci v tem in niti v kasnejšem obdobju niso kazali učinka.



Slika 23: Povečava nastanka znatne inhibicijske cone ob vzorcu z največjo vsebnostjo teobromina (Fotografija last avtoric)



Slika 24. Prikaz testa, kjer je po treh dneh modelni organizem prerastel diska. Levo vzorec maceriran na 21 °C, času 24 ur, v »absolutnem« alkoholu, z vsebnostjo teobromina 5,5 %, in desno standardni teobromin (Fotografija last avtoric)

5. ZAKLJUČEK

Pred začetkom eksperimentiranja smo si zastavili dve glavni hipotezi, ki sta nas spremljali skozi celotno delo. Predvidevali smo, da bomo v vzorcih navadne bodike kvantitativno, s pomočjo IR-spektroskopije, določili teobromin. V ta namen smo v raziskovalno delo vključili njene plodove (jagode) in liste. Kot topilo za izolacijo (maceracijo) smo uporabili alkohol etanol. V preučevanje izolacije aktivne učinkovine smo vključili tri različne vodne raztopine etanola (»absolutnik«, 90 in 80 %) in opazovali vpliv redčenja topila z destilirano vodo na vsebnost izoliranega produkta. Preučevali smo tudi čas izolacije aktivne učinkovine, saj smo bili mnenja, da na tem mestu obstaja povezava med časom poteka maceracije in vsebnostjo aktivnega teobromina. Ker je temperatura eden izmed pomembnih faktorjev pri procesih v kemijski industriji, smo v delovni sistem vključili poleg sobne (delovne) temperature še dve dodatni temperaturi in preučevali vpliv le-teh na količino izoliranega teobromina. Rezultati prvega dela kažejo, da nam je uspelo s pomočjo maceracije oz. ekstrakcije »trdno-tekoče« pridobiti teobromin iz vseh vzorcev plodov (jagod). V vzorcih listov nismo uspeli določiti vsebnosti teobromina v vseh pripravljenih vzorcih, kar delno pripisujemo kratkemu času ekstrakcije oz. razredčeni raztopini topila, delno pa tudi metodi, saj imamo opravka z nizkimi vsebnostmi analita. IR-spektroskopija je hitra, enostavna in razumljiva metoda za rokovanje. Količinsko je nezahtevna, saj potrebujemo malo vzorca za analizo; pri trdnih snoveh je dovolj en kristal, pri oljnatih oz. tekočih vzorcih pa zadostuje kapljica. Morebitno slabost na tem mestu opazimo pri prekrivanju trakov posameznih signalov ali prenizki vsebnosti iskanega analita (meja zaznave). Kvantitativna ocena je zgolj informativna, saj se nekateri trakovi teobromina v spektru ekstrakta prekrivajo s komponentami v ekstraktu

(nečistoče). Natančnejša kvantitativna ocena bi bila možna z vpeljavo metode t. i. dekompozicije modelnih trakov.

S stališča analízne kemije, bi lahko uporabili še dodatno (neodvisno) analízno metodo oz. tehniko, kjer bi se še dodatno prepričali o izmerjeni količini analita v vzorcu.

Rezultati kažejo, da je vsebnost teobromina odvisna tudi od koncentracije ekstrakcijskega topila. Večjo vsebnost omenjenega smo zaznali pri vzorcih, ki smo jih macerirali z »absolutnim« etanolom. Vsebnost vode lahko inhibira izolacijo željene substance ali namesto nje izloči (obori) drugo. Z daljšanjem časa postopka izolacije se posledično povečuje tudi količina izoliranega teobromina, kar lahko še posebej opazujemo pri plodovih. Predvidevali smo, da bomo optimalno vrednost dosegli pri dvigu temperature na 41 °C (1 ura). Rezultat pri plodovih v »absolutnem« etanolu je potrdil naša predvidevanja – izolirali smo največjo vsebnost teobromina. Identično opazimo pri listih, kjer je % izolirane učinkovine največji.

Prvi del hipoteze lahko potrdimo.

~ ~ ~

V drugem sklopu eksperimentalnega dela smo izvajali difuzijo ekstraktov na trdno gojišče. Pri delu smo uporabljali tehniko difuzijskega antibiograma. Na agarno gojišče smo nacepili *Saccharomyces cerevisiae* in dodali pripravljene izolate. S skladu s predvidevanji je vzorec z najvišjo vsebnostjo teobromina (pripravljen pri 41 °C, času 1 ure, vsebnost 12,8 %) dosegel pojav minimalne inhibicijske cone, ki jo modelni organizem skozi kasnejše obdobje tudi preraste. Ker je v istem času, ko se je pojavila inhibicijska cona, modelni organizem prerastel tudi standardni teobromin, predvidevamo, da vzorec vsebuje še dodatne komponente, ki ustvarjajo prispevek k aktivnosti.

Tudi drugi del hipoteze lahko potrdimo.

~ ~ ~

Na tem planetu je mnogo zdravilnih rastlin, ki vsebujejo učinkovine, ki bi jih lahko uporabili v medicinske namene. Narava nam ponuja mnogo izzivov in nudi pomoč, le sprejeti jo moramo. Pred kratkim je znana slovenska kemičarka, *prof. dr. Aleksandra Kornhauser Frazer*, v intervjuju za Val 202 dejala: »Kemija naravnih spojin je ena od najlepših kemij, srečna sem, da sem delovala na tem področju.« Profesorica tovrstnega področja ne bi mogla predstaviti bolje. Ko gledava nazaj na opravljeno delo, se še kako strinjava z njo. Toliko motivacije, kot nama je prinesla navadna bodika, drobno drevesce, ki v sebi skriva neizmerna povezovanja naravoslovnih vsebin, je pravi čudež. Skozi delo sva spoznali, da želiva še ustvarjati in biti del nadaljnjih eksperimentov.

6. LITERATURA

Agro. (2017). *Protokoli fermentacije*. Pridobljeno s <https://www.kokot-agro.hr/2017/08/17/protokoli-fermentacije/>

Ahtik, G. Užmah, T. (2018). Preučevanje lastnosti cikličnega terpena in študij njegove vsebnosti v vzorcih, pripravljenih z maceracijo (Raziskovalna naloga). Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško.

Alič, V. (2017). *Odpiramo vinski slovar: Kaj so selekcionirane kvasovke?*. O vinu, pridobljeno s <https://www.ovinu.si/181?cctest&>

Big plantnursery. (ni letnice). *Camelliasinensis var. Sinensis*. Pridobljeno s https://www.google.si/search?rlz=1C1AWUA_enSI784SI790&tbm=isch&q=camellia+sinensis&chips=q:camellia+sinensis,online_chips:plant+camellia&sa=X&ved=0ahUKEwjBjoCp4afgAhVNhqYKHUA3CXkQ4IYIKygE&biw=1024&bih=586&pr=1#imgrc=pSFpglJ94iat9M

Bioforma. (ni letnice). *Listi čajevca*. Pridobljeno s <https://www.bioforma.si/olje-čajevca>

Bodi Eko. (2013). *Guarana – naravni stimulans brez škodljivih posledic*. Pridobljeno s <https://www.bodieko.si/guarana>

Botanični vrt Univerze v Ljubljani. (ni letnice). *Rastline, ki rastejo v Botaničnem vrtu, splošni podatki o rastlini Navadna bodika, Ilex aquifolium*. Pridobljeno s <http://www.botanicni-vrt.si/component/rastline/ilex-aquifolium>

De Pietro, M. A. (2017). *Health benefits of kola nut*. Pridobljeno s <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319626.php>

Gabrovšek, A. Tašler, N. (2018). *Delovanje modelnih učinkovin družine benzosultamov na kvasovke Saccharomyces cerevisiae* (Raziskovalno delo). Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Ljubljana.

Gabrovšek, A., Tašler, N., Klemen, T., Jeran, M. (2018). *Delovanje modelnih učinkovin družine benzosultamov na kvasovke Saccharomyces cerevisiae*. V Doljak, B. (ur.), et al. *Zbornik povzetkov*, BIOMolekularec.si in Dan biomolekularnih znanosti 2018 (str. 50). Ljubljana: Slovensko biokemijsko društvo.

Gajšt, L., Ivanc, K. (2016). *Razvoj reakcijskega sistema za oksidacijo organskih hidrazidov in uporabe kemiluminiscenčne svetlobe* (Raziskovalno delo). Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Ljubljana.

Jeran, M., Žohar, M. (2016). O lastnostih in pridobivanju eteričnih olj, *Naravoslovna solnica*, 20, 2, 9-11.

Jež, M. (2014). Navadna bodika. Narava, gore. Pridobljeno s https://www.google.si/search?q=navadna+bodika&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKewis6cy26KfgAhVQaFAKHSTYA3MQ_AUIDigB&biw=1024&bih=586#imgsrc=cQE1Z5-ATO6WCM

Hohkraut, K. (2015). *Pridobivanje in karakterizacija eteričnega olja navadnega česna, Allium sativum, ter poskusi njegovih aktivnosti za nadaljnje aplikacije in preparate za medicinske namene* (Raziskovalno delo). Osnovna šola Primoža Trubarja Laško, Laško.

Jurana d.o.o. (ni letnice). *Pravilna priprava vinskih kvasovk pred fermentacijo (rehidracija)*. Pridobljeno s <https://www.jurana.com/novice/priprava-kvasovk.html/>

Klun, N. K. (2017). Navadna bodika velja za prinašalko miru. *Revija Jana*. Pridobljeno s <https://govori.se/astro/navadna-bodika-velja-za-prinasalko-miru>

Lukan, T. (2012). *Klasične in sodobne metode določanja števila kvasovk vrst Saccharomyces cerevisiae in Dekkera bruxellensis v realnih vzorcih* (Diplomsko delo). Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, Ljubljana. Pridobljeno s http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_lukan_tina.pdf

Lunder, M. (2016). Vse o čokoladi. Pridobljeno s <https://kvarkadabra.net/2016/05/vse-o-cokoladi/>

Mastnak, M. (1992). *Sprehodi po arboretumu, Strupeni plodovi jeseni*. Pridobljeno s <https://arboretumvolcijpotok.wordpress.com/2013/11/04/navadna-bodika/>

Mimo vrste. (2019) *Palični mešalniki Bosch*. 2019, Pridobljeno s https://www.mimovrste.com/palichni-mesalniki?b%5B%5D=bosch&gclid=CjwKCAiAz7TfBRAKEiwAz8fKOErgG8aAAiUlTTzj-h5mvLM1KkxCqgRS12wmyLLYxuGhvSKqisy5CRoCHpMQAvD_BwE

Naij.com. (2019). *To Pilgrims: Don't Bring Kola Nut During Hajj*. Pridobljeno s <http://aboutislam.net/science/faith-science/pilgrims-dont-bring-kola-nut-hajj/>

Natural Food Series. (2018). *11 Health Benefits of Kola Nut*. Pridobljeno s <https://www.naturalfoodseries.com/11-benefits-kola-nut/>

Nurserylive. (2018). *Guarana*. Pridobljeno s <https://nurserylive.com/buy-aromatic-plants-online-in-india/guarana-plants-in-india>

OLX – spletna trgovina. (ni letnice). *Clatronic EKP 2419 enodelni štedilnik*. Pridobljeno s <https://www.popscreen.com/prod/MTYzNzg4NDIw/Clatronic-EKP-2419-Einzelkochplatte-ElektroGro%C3%9Fger%C3%A4te>

PubChem. (ni letnice). *Theobromine*. PubChem. Open Chemistry Database. National Center for Biotechnology Information. Pridobljeno s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/theobromine#section=Top>

Rode, J. (ni letnice). *Navadna bodika*. Revija Zeleni raj. Didakta. Pridobljeno s <http://revijazeleniraj.si/clanek/zelenjava/56029077905f5/navadna-bodika>

Roth. (2016). *Varnostni list za teobromin*. Pridobljeno s https://www.carlroth.com/downloads/sdb/sl/8/SDB_8963_SI_SL.pdf

Silva, C., (2018). *Guarana Extract Protects Against Neuronal Death in Huntington's Animal Model*, Study Reports. Pridobljeno s: <https://huntingtonsdiseaseneews.com/2018/08/23/huntingtons-worm-model-shows-guarana-may-reduce-neuronal-death/>

Spletna vrtnarija. (ni letnice). *Navadna bodika, Ilex aquifolium*. Pridobljeno s <http://www.spletna-vrtnarija.com/172/2527/rastlina/navadna-bodika>

Špringer, J. (ni letnice). *Čajevec, Camelliasinensis*. Pridobljeno s <http://www.pomurske-lekarne.si/tocka-zdravja/cajevec-camellia-sinensis>

Teekanne. (2018). *Čajevec, Camelliasinensis*. Pridobljeno s <https://www.teekanne.si/si/vse-o-aju/veda-o-aju/-ajevec-camellia-sinensis>

Vižintin, A. (2018). *Grenak priokus čokolade*. Radio Študent. Pridobljeno s <https://radiostudent.si/znanost/frequenza-della-scienza/grenek-priokus-%C4%8Dokolade>

Wikipedija. (2018). Kola. Pridobljeno s <https://sl.wikipedia.org/wiki/Kola>

Wikipedija. (ni letnice). *Saccharomyces cerevisiae*. Pridobljeno s https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae

Wikipedija. (ni letnice). *Teobromin*, Pridobljeno s <https://bs.wikipedia.org/wiki/Teobromin>

Zhong, J., Tang, N., Asadzadeh, B., Yan, W. (2017). Measurement and Correlation of Solubility of Theobromine, Theophylline, and Caffeine in Water and Organic Solvents at Various Temperatures, *J. Chem. Eng. Data*, 62, 2570-2577.

7. DODATEK

7.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ



Ime kemikalije	Formula	M (g/mol)	Piktogram	H - stavki	P - stavki	CAS
Etanol	C ₂ H ₆ O	46,07		H225	P210	64-17-5
Teobromin	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,2		H302	P270 P330	83-67-0
Agar-agar	/	/	/	/	/	9002-18-0

Tabela 3: Varnostna opozorila kemikalij (Roth, 2016)

7.2 PRIPRAVA RAZTOPIN

Priprava 1 L 90 % raztopine etanola:

900 mL absolutnega etanola in 100 mL destilirane vode.

Priprava 1 L 80 % raztopine etanola:

800 mL absolutnega etanola in 200 mL destilirane vode.