

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Manca MEDVED

**VPLIV ESTROV KAVNE KISLINE NA KVASOVKO**  
*Saccharomyces cerevisiae* **NA CELIČNI RAVNI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Manca MEDVED

**VPLIV ESTROV KAVNE KISLINE NA KVASOVKO**  
*Saccharomyces cerevisiae* **NA CELIČNI RAVNI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja

**CAFFEIC ACID ESTERS ACTIVITY IN THE YEAST**  
*Saccharomyces cerevisiae* **AT THE CELLULAR LEVEL**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilsvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Polono Jamnik, za somentorja doc. dr Tomaža Polaka in za recenzentko prof. dr. Heleno Abramovič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Mentorica: prof. dr. Polona JAMNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Somentor: doc. dr. Tomaž POLAK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: prof. dr. Helena ABRAMOVIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 15.4.2016

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

Manca Medved

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 602.3:582.282.23:547.56:577.11 (043.2)
KG	estri kavne kisline/metilni ester kavne kisline/etilni ester kavne kisline/izopropilni ester kavne kisline/fenetilni ester kavne kisline/fenolne spojine/propolis/ <i>in vivo</i> antioksidativna učinkovitost/ metabolna aktivnost/kvasovka/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AV	MEDVED, Manca
SA	JAMNIK, Polona (mentorica)/POLAK, Tomaž (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	VPLIV ESTROV KAVNE KISLINE NA KVASOVKO <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NA CELIČNI RAVNI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XII, 53, [14] str., 9 pregl., 15 sl., 5 pril., 87 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru magistrske naloge smo s pomočjo kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , kot modelnega organizma, preverili vpliv in delovanje estrov kavne kisline (EKK), kot so metilni ester kavne kisline (CAME), etilni ester kavne kisline (CAEE), izopropilni ester kavne kisline (CAIPE) in fenetyl ester kavne kisline (CAPE) na celični ravni. Kvasovko smo inkubirali v pufru PBS pri 28 °C in 220 obr./min ter jo izpostavili preučevanim snovem v koncentracijah 1, 10, 100 in 1000 µM. Po 2-urni izpostavitvi smo izmerili znotrajcelično oksidacijo z uporabo barvila 2',7'-diklorofluorescein diacetat. Izkazalo se je, da so EKK v večji meri znižali znotrajcelično oksidacijo kvasnih celic v primerjavi s kontrolo, izjema je bil CAPE (1000 µM). Odvisnost znotrajcelične oksidacije kvasovk od koncentracije EKK je bila razvidna pri CAPE in delno pri CAEE ter CAME. Opazili smo, da je vpliv CAPE (1000 µM) na znotrajcelično oksidacijo kvasnih celic različen od ostalih preučevanih EKK pri isti koncentraciji. V nadalnjih poskusih smo preverili, kako posamezni EKK v izbranih koncentracijah vplivajo na raven ATP kvasnih celic in ugotovili, da so v večji meri povišali celično metabolno energijo kvasovk, izjema je bil CAME (1000 µM). Celično suspenzijo smo nato izpostavili tudi kombinacijam posameznih EKK z etanolnim izvlečkom propolisa (EIP) in kombinaciji dveh izbranih EKK. Opazili smo, da sta kombinaciji EIP s CAPE (100 µM) in EIP s CAIPE (1000 µM) pripomogli k dodatnemu znižanju znotrajcelične oksidacije v primerjavi z delovanjem EIP ali posameznih EKK ter nista povzročili sprememb v celični metabolni energiji kvasnih celic v primerjavi z EIP. S pomočjo metode štetja kolonij na ploščah smo ugotovili, da EKK v izbranih koncentracijah nimajo vpliva na živost oz. kultivabilnost kvasnih celic.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 602.3:582.282.23:547.56:577.11 (043.2)  
CX caffeic acid esters/caffeic acid methyl ester/caffeic acid ethyl ester/caffeic acid isopropyl ester/caffeic acid phenethyl ester/phenolic compounds/propolis/*in vivo* antioxidant activity/metabolic activity/yeast/*Saccharomyces cerevisiae*  
AU MEDVED, Manca  
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/POLAK, Tomaž (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology  
PY 2016  
TI CAFFEIC ACID ESTERS ACTIVITY IN THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* AT THE CELLULAR LEVEL  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO XII, 53, [14] p., 9 tab., 15 fig., 5 ann., 87 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of the M.sc thesis was to determine activity of caffeic acid esters (CAE) such as caffeic acid methyl ester (CAME), caffeic acid ethyl ester (CAEE), caffeic acid isopropyl ester (CAIPE) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) at the cellular level using yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. Yeast was incubated in PBS buffer at 28 °C and 220 rpm and than exposed to the tested compounds in concentrations of 1, 10, 100 and 1000 µM. After 2-hour exposure we measured intracellular oxidation using a dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. It was found that all of the tested CAE largely decreased intracellular oxidation, except CAPE (1000 µM). We also detected that intracellular oxidation was CAE concentration dependent for CAPE and partially for CAEE and CAME. The effect of CAPE on yeast intracellular oxidation at concentration of 1000 µM was different from other tested CAE at the same concentration. In further experiments cell metabolic energy after exposure of yeast to individual CAE in selected concentrations was determined. In general it increased, except for CAME (1000 µM). Cell suspension was then exposed to the combinations of individual CAE with ethanol extract of propolis (EEP) and to the combinations of two selected CAE. We found that combinations EEP with CAPE (100 µM) and EEP with CAIPE (1000 µM) additionaly decreased intracellular oxidation compared to EEP or to individual CAE, while cell metabolic energy showed no changes compared to EEP. By using colony forming units method, we determined that CAE in selected concentrations showed no impact on yeast cell viability or culturability.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	3
2.1 OKSIDATIVNI STRES	3
<b>2.1.1 Oksidativni stres</b>	3
<b>2.1.2 Reaktivne kisikove zvrsti</b>	3
2.1.2.1 Vrste reaktivnih kisikovih zvrst	3
2.1.2.2 Izvor reaktivnih kisikovih zvrst	3
2.1.2.3 Delovanje reaktivnih kisikovih zvrst	4
2.2 ANTIOKSIDANTI	5
2.3 KVASOVKA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> KOT MODELNI ORGANIZEM ZA ŠTUDIJ ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA BIOAKTIVNIH SPOJIN	6
2.4 PROPOLIS	7
<b>2.4.1 Funkcija propolisa v panju</b>	7
<b>2.4.2 Rastlinski viri propolisa</b>	7
<b>2.4.3 Lastnosti in kemijska sestava propolisa</b>	8
<b>2.4.4 Antioksidativna učinkovitost propolisa</b>	9
2.5 ESTRI KAVNE KISLINE	9
<b>2.5.1 Uvrstitev estrov kavne kisline</b>	9
<b>2.5.2 Kemijska struktura estrov kavne kisline</b>	10
<b>2.5.3 Preučevani estri kavne kisline</b>	11
2.5.3.1 Metilni ester kavne kisline – CAME	11
2.5.3.2 Etilni ester kavne kisline – CAEE	12
2.5.3.3 Izopropilni ester kavne kisline – CAIPE	13
2.5.3.4 Fenetilni ester kavne kisline – CAPE	13
<b>2.5.4 Vpliv kemijske strukture na aktivnost EKK</b>	14
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	16

<b>3.1</b>	<b>SHEMA POTEKA DELA</b>	16
<b>3.2</b>	<b>MATERIALI</b>	17
<b>3.2.1</b>	<b>Mikroorganizem</b>	17
<b>3.2.2</b>	<b>Propolis</b>	17
<b>3.2.3</b>	<b>Estri kavne kisline</b>	17
<b>3.2.4</b>	<b>Gojišča</b>	17
<b>3.2.4.1</b>	Precepljanje kulture kvasovk <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155	17
<b>3.2.4.2</b>	Namnoževanje kulture kvasovk <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155 do začetka stacionarne faze rasti	18
<b>3.2.5</b>	<b>Raztopine in reagenti</b>	18
<b>3.2.5.1</b>	Inkubacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	18
<b>3.2.5.2</b>	Določanje znotrajcelične oksidacije celic	19
<b>3.2.5.3</b>	Določanje celične metabolne energije	19
<b>3.3</b>	<b>APARATURE, NAPRAVE IN PRIBOR</b>	21
<b>3.3.1</b>	<b>Priprava založne raztopine EIP</b>	21
<b>3.3.2</b>	<b>Kemijska sinteza EKK ter priprava založnih in delovnih raztopin EKK</b>	21
<b>3.3.3</b>	<b>Priprava gojišč, raztopin in reagentov za kultivacijo kvasovk <i>S. cerevisiae</i></b>	21
<b>3.3.4</b>	<b>Kultivacija in inkubacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i></b>	21
<b>3.3.5</b>	<b>Merjenje znotrajcelične oksidacije</b>	22
<b>3.3.6</b>	<b>Določanje celične metabolne energije</b>	22
<b>3.3.7</b>	<b>Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje raztopin, reagentov in vzorcev</b>	22
<b>3.4</b>	<b>METODE</b>	23
<b>3.4.1</b>	<b>Priprava etanolnega izvlečka propolisa (EIP)</b>	23
<b>3.4.2</b>	<b>Kemijska sinteza estrov kavne kisline (EKK) ter priprava založnih in delovnih raztopin</b>	23
<b>3.4.3</b>	<b>Kultivacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i></b>	24
<b>3.4.4</b>	<b>Izpostavitev celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> estrom kavne kisline in/ali izvlečku propolisa</b>	25
<b>3.4.5</b>	<b>Določanje znotrajcelične oksidacije celic</b>	26
<b>3.4.6</b>	<b>Določanje celične metabolne energije s pomočjo reagenta BacTiter-Glo™</b>	27
<b>3.4.7</b>	<b>Določanje živosti/kultivabilnosti celic z metodo štetja kolonij na ploščah (CFU)</b>	28
<b>3.4.8</b>	<b>Statistična analiza rezultatov</b>	29
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	30
<b>4.1</b>	<b>PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI POSAMEZNIH ESTROV KAVNE KISLINE, ETANOLNEGA IZVLEČKA PROPOLISA IN RAZLIČNIH KOMBINACIJ PREUČEVANIH SNOVI</b>	30

<b>4.1.1</b>	<b>Preverjanje antioksidativne učinkovitosti posameznih estrov kavne kisline</b>	30
<b>4.1.2</b>	<b>Preverjanje antioksidativne učinkovitosti preučevanih snovi pri različnih kombinacijah</b>	35
4.2	DOLOČANJE CELIČNE METABOLNE ENERGIJE KVASOVKE	37
<b>4.2.1</b>	<b>Določanje celične metabolne energije kvasovke po izpostavitvi posameznim estrom kavne kisline</b>	37
<b>4.2.2</b>	<b>Določanje celične metabolne energije kvasovke po izpostavitvi različnim kombinacijam preučevanih snovi</b>	38
4.3	PREVERJANJE ŽIVOSTI/KULTIVABILNOSTI KVASNICH CELIC	39
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	40
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	44
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	45
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	46
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

## KAZALO PREGLEDNIC

Str.

Preglednica 1: Ime in funkcionalna skupina (R, slika 2) nekaterih estrov kavne kisline (Wang in sod., 2014; Medana in sod., 2008; Falcao in sod., 2009)	11
Preglednica 2: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993)	17
Preglednica 3: Sestava tekočega gojišča (Atlas in Lawrence, 1993)	18
Preglednica 4: Sestava pufra PBS	18
Preglednica 5: Sestava 50 mM raztopine kalijevega dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	19
Preglednica 6: Sestava 50 mM raztopine dikalijevega hidrogenfosfata ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	19
Preglednica 7: Sestava 1 mM založne raztopine 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ )	19
Preglednica 8: Volumen ( $\mu\text{L}$ ) dodanega 96 % etanola k izbranemu estru kavne kisline za pripravo založnih raztopin	24
Preglednica 9: Preučevana snov, koncentracija založne/delovne raztopine, volumen založne/delovne raztopine in koncentracija snovi v celični suspenziji	25

## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Osnovna struktturna formula kavne kisline (Rani in Devanand, 2013)	10
Slika 2: Osnovna struktturna formula estrov kavne kisline (Medana in sod., 2008)	10
Slika 3: Osnovna struktturna formula metilnega estra kavne kisline (CAME) (Cayman Europe, 2015)	11
Slika 4: Osnovna struktturna formula etilnega estra kavne kisline (CAEE) (Celli in sod., 2007)	12
Slika 5: Osnovna struktturna formula izopropilnega estra kavne kisline (CAIPE) (Dalton, 2015)	13
Slika 6: Osnovna struktturna formula fenetilnega estra kavne kisline (CAPE) (Celli in sod., 2007)	13
Slika 7: Shematski prikaz poteka dela	16
Slika 8: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi estru kavne kisline CAME v koncentracijah 1000 µM, 100 µM, 10 µM in 1 µM	31
Slika 9: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi estru kavne kisline CAEE v koncentracijah 1000 µM, 100 µM, 10 µM in 1 µM	32
Slika 10: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi estru kavne kisline CAIPE v koncentracijah 1000 µM, 100 µM, 10 µM in 1 µM	33
Slika 11: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi estru kavne kisline CAPE v koncentracijah 1000 µM, 100 µM, 10 µM in 1 µM	34
Slika 12: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP) (60 µM), kombinaciji izbranih estrov kavne kisline z EIP (60 µM) ter kombinaciji izbranih EKK v določenih koncentracijah	36
Slika 13: Celična metabolna energija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitvi estrom kavne kisline CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM)	37

Slika 14: Celična metabolna energija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP) (60 µM), kombinaciji izbranih estrov kavne kisline (EKK) z EIP (60 µM) ter kombinaciji EKK v določenih koncentracijah

38

Slika 15: Določanje živosti/kultivabilnosti celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estrom kavne kisline CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM)

39

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi posameznim estrom kavne kisline (EKK)

PRILOGA B: Določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi različnim kombinacijam preučevanih snovi

PRILOGA C: Določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi posameznim estrom kavne kisline (EKK) v izbranih koncentracijah

PRILOGA D: Določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi različnim kombinacijam preučevanih snovi

PRILOGA E: Preverjanje živosti/kultivabilnosti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin-trifosfat
CABE	benzilni ester kavne kisline (ang. caffeic acid benzyl ester)
CACE	cinamilni ester kavne kisline (ang. caffeic acid cinnamyl ester)
CAEE	etilni ester kavne kisline (ang. caffeic acid ethyl ester)
CAIE	izoprenilni ester kavne kisline (ang. caffeic acid isoprenyl ester)
CAIPE	izopropilni ester kavne kisline (ang. caffeic acid isopropyl ester)
CAME	metilni ester kavne kisline (ang. caffeic acid methyl ester)
CAPE	fenetilni ester kavne kislin (ang. caffeic acid phenethyl ester)
CFU	število enot, ki tvorijo kolonije (ang. colony forming units)
DCF	diklorofluorescein (ang. diclorofluorescein)
ddH <sub>2</sub> O	bidestilirana voda
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
EIP	etanolni izvleček propolisa
EKK	ester kavne kisline
FI	fluorescenčna intenziteta
GAE	ekvivalent galne kisline (mol/L) (ang. gallic acid equivalent)
H <sub>2</sub> DCF	2',7'-diklorodihidrofluorescein (ang. 2',7'-diclorodihydrofluorescein)
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (ang. 2',7'-diclorodihydrofluorescein diacetate)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	žveplova kislina
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogenfosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dikalijev hidrogenfosfat
L	luminiscenca
NaCl	natrijev klorid
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	natrijev sulfat
obr./min	obrati na minuto
OD	optična gostota
OD <sub>650</sub>	optična gostota pri 650 nm
PBS	pufer z NaCl, KCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO (ang. phosphate-buffered saline)
PFI	prirast fluorescenčne intenzitete
RCFU	relativni CFU
RL	relativna luminiscenca
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species)
RPFI	relativni prirast fluorescenčne intenzitete
SD	standardni odklon
SPE	ekstrakcija na trdni fazni (ang. solid-phase extraction)
w/v	g/100 mL
YPED	gojišče (kvasni ekstrakt, pepton, glukoza)
ZIM	zbirka industrijskih mikroorganizmov

## 1 UVOD

Propolis ima poleg vseh ostalih bioloških učinkovitosti tudi antioksidativno učinkovitost (Kumazawa in sod., 2004; Russo in sod., 2002; Petelinc in sod., 2013a, 2013b; Cigut in sod., 2011). Dokazano je, da antioksidativna učinkovitost ni povezana s celotnim izvlečkom propolisa, ampak le s posameznimi spojinami propolisa (Petelinc in sod., 2013b). Predvideva se, da je ta lastnost povezana s fenolnimi spojinami.

Najbolj preučevana fenolna spojina in biološko aktivna sestavina v propolisu je fenetilni ester kavne kisline (CAPE, ang. caffeic acid phenethyl ester), ki sodi med estre kavne kisline (EKK). Deluje protitumorsko, protivnetno, protivirusno in ima močno antioksidativno učinkovitost (Russo in sod., 2002; Okutan in sod., 2004). Predhodne raziskave so že pokazale, da CAPE lahko vstopa v kvasno celico in povzroči spremembe v znotrajcelični oksidaciji (Petelinc in sod., 2013b). Znanih je še nekaj kemijsko precej podobnih EKK, kot so metilni ester kavne kisline (CAME, ang. caffeic acid methyl ester), etilni ester kavne kisline (CAEE, ang. caffeic acid ethyl ester), izopropilni ester kavne kisline (CAIPE, ang. caffeic acid isopropyl ester), itd. EKK so naravno prisotne fenolne spojine, ki spadajo med derivate hidroksicimetnih kislin (Vermerris in Nicholson, 2008; LeBlanc in sod., 2012). V naravi jih najdemo v zdravilnih rastlinah, zeliščih, drevesih različnih geografskih regij in ostalih rastlinskih virih, možna pa je tudi njihova kemijska sinteza (Tolba in sod. 2014). Zgrajeni so iz kavne kisline, ki sestoji iz fenolnega obroča ter dveh hidroksilnih skupin in alkohola, ki se pri vsakem EKK razlikuje. Zanimivi so zaradi svojega biološkega in farmakološkega delovanja, med katerim izstopajo antioksidativna, protitumorska in protivnetna aktivnost (Banskota in sod., 2001; Fiuzza in sod., 2001; Awad in sod., 2009; Wang in sod., 2014; Lee in sod., 2001).

V magistrski nalogi smo s pomočjo modelnega organizma kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* preučili vpliv EKK, kot so CAME, CAPE, CAEE in CAIPE ter kombinacij nekaterih EKK z etanolnim izvlečkom propolisa (EIP) na znotrajcelično oksidacijo in celično metabolno energijo.

### 1.1 CILJI NALOGE

- Preveriti vpliv posameznih estrov kavne kisline pri različnih koncentracijah na znotrajcelično oksidacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- Preveriti vpliv posameznih estrov kavne kisline na raven ATP v kvasnih celicah.
- Preveriti vpliv kombinacije izbranih estrov kavne kisline in etanolnega izvlečka propolisa na znotrajcelično oksidacijo in raven ATP v kvasnih celicah.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

- Preučevani estri kavne kisline bodo različno vplivali na znotrajcelično oksidacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.
- Vpliv preučevanih estrov kavne kisline na znotrajcelično oksidacijo bo odvisen od njihove koncentracije.
- Preučevani estri kavne kisline bodo različno vplivali na raven ATP v kvasnih celicah.
- Vpliv kombinacije izbranih preučevanih estrov kavne kisline in izvlečka propolisa na znotrajcelično oksidacijo in raven ATP v kvasnih celicah bo drugačen v primerjavi s posameznimi preučevanimi estri kavne kisline ali etanolnim izvlečkom propolisa.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OKSIDATIVNI STRES

#### 2.1.1 Oksidativni stres

Oksidativni stres je porušeno ravnotežje med reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) in antioksidanti v prid ROS (Sies, 1997). Antioksidativni obrambni sistemi v normalnih fizioloških pogojih ohranjajo nivo ROS na osnovni, neškodljivi ravni. V stresnih pogojih pa raven ROS preseže antioksidativno sposobnost celic, zato se ravno vesje med nastankom in odstranjevanjem ROS poruši in pride do oksidativnega stresa. Do oksidativnega stresa lahko pride zaradi povečanega nastanka ROS, zaradi znižanja aktivnosti antioksidativnih obrambnih sistemov oz. pomanjkanja antioksidantov v celici, ali pa zaradi pojava obojega (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Poljšak in sod., 2013; Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

#### 2.1.2 Reaktivne kisikove zvrsti

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS, ang. reactive oxygen species) so množica reaktivnih molekul in prostih radikalov nastalih iz molekularnega kisika (Turrens, 2003). Prosti radikali so reaktivne kemijske zvrsti z enim ali več neparnih elektronov v zunanjih orbitalih (Halliwell in Gutteridge, 2007; Poljšak in sod., 2013). So nestabilne in zelo reaktivne molekule, ki lahko oddajo ali sprejmejo elektron od drugih molekul in se zaradi tega obnašajo kot oksidanti ali reducenti (Lobo in sod., 2010).

##### 2.1.2.1 Vrste reaktivnih kisikovih zvrsti

Med najpomembnejše ROS v celici spadajo vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) in singletni kisik ( $^1O_2$ ) ter prosti radikali, kot so superoksidni radikal ( $O_2^-$ ), hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ), peroksilni radikal ( $ROO^\cdot$ ), aloksilni radikal ( $RO^\cdot$ ) in hidroperoksilni radikal ( $HOO^-$ ) (Korošec, 2000; Pisoschi in Pop, 2015; Halliwell in Gutteridge, 2007).

##### 2.1.2.2 Izvor reaktivnih kisikovih zvrsti

ROS v celici neprestano nastajajo endogeno kot del normalnega celičnega metabolizma in iz eksogenih virov ob izpostavitvi zunanjim virom oksidacije (Abram, 2000; Batič in Raspor, 2000). Endogene ROS najdemo v mitohondrijih, endoplazmatskem retikulumu, peroksisomih, citoplazmi in v celični membrani. Nastajajo pri oksidativni fosforilaciji, metabolizmu citokroma P450 in aktivaciji protivnetnih celic (Abram, 2000; Klauing in Kamendulis, 2004). Njihov vir pa so tudi flavoproteini, lipoksiogenaze, hemoglobin, cikloooksigenaze in ksantin oksidaza (Korošec, 2000).

Eksogeni izvor nastanka ROS so onesnaževalci atmosfere, ionizirajoče sevanje, ksenobiotiki, kovinski ioni, farmacevtiki, industrijske kemikalije (Trouba in sod., 2002; Abram, 2000), cigaretni dim, alkohol, okužbe z mikroorganizmi in virusi (Poljšak in sod., 2013).

#### 2.1.2.3 Delovanje reaktivnih kisikovih zvrsti

ROS nastajajo neprekinjeno kot posledica biokemijskih reakcij in zaradi zunanjih dejavnikov. Škodljivi postanejo takrat, ko jih v celici nastane preveč in jih endogeni antioksidativni obrambni sistem ne zmore več odstraniti (Russo in sod., 2002). ROS v visoki koncentraciji direktno ali indirektno poškodujejo celične sestavne dele tako, da oksidirajo proteine, nukleinske kisline in lipide. Reakcija ROS z biološkimi makromolekulami vodi do verižnih reakcij in nastanka novih ROS, ki še dodatno poškodujejo sestavne dele celic (Korošec, 2000; Betteridge, 2000).

ROS so vpletene v patogenezo številnih kroničnih bolezni (Ikner in Shiozaki, 2005). Nezadostnost in neučinkovitost endogenega antioksidativnega obrambnega sistema pri človeku in živalih se izrazi v boleznih, kot so rakava obolenja, bolezni srca, nevrodegenerativne bolezni itd. (Ikner in Shiozaki, 2005; Raspor in sod., 2000). Irreverzibilno napredovanje oksidativnih poškodb s strani ROS vodi tudi v staranje, ki se pojavi zaradi oslabljenih fizioloških funkcij, kar še dodatno spodbudi nastanek bolezni in s tem krajanje življenske dobe (Pisoschi in Pop, 2015).

ROS pri normalnih pogojih nastajajo s strani dobro reguliranega sistema in pomagajo vzdrževati homeostazo (Devasagayam in sod., 2004). Nizke koncentracije ROS delujejo kot signalne molekule, ki so vključene v regulacijo celične proliferacije, apoptoze in izražanje genov preko transkripcijskih faktorjev. Njihov nastanek s strani fagocitov pa je ključen pri obrambnem mehanizmu proti različnim vrstam mikroorganizmov (Pisoschi in Pop, 2015).

## 2.2 ANTIOKSIDANTI

Antioksidativni obrambni sistem se je pri aerobnih organizmih razvil tekom evolucije, kot odgovor na povečano koncentracijo kisika v atmosferi (Halliwell, 1996; Halliwell in Gutteridge, 2007). Pomemben je za popravilo in preprečevanje oksidativnih poškodb v celicah, zniževanje oksidativnega stresa in zaščito celic pred negativnimi učinki ROS (Korošec, 2000; Pisoschi in Pop, 2015).

Antioksidant je vsaka snov, ki je sposobna že v nizki koncentraciji (v primerjavi z oksidirajočim substratom), bistveno upočasnititi ali preprečiti oksidacijo substrata (Halliwell in Gutteridge, 2007). Je molekula z nizko molekulsko maso, ki je dovolj stabilna, da lahko odda elektron prostemu radikalju, ga nevtralizira in zmanjša njegovo škodljivost. Antioksidanti z lovljenjem prostih radikalov in varno interakcijo prekinejo verižno reakcijo preden pride do poškodb molekul v celici (Lobo in sod., 2010). Način, kako antioksidanti preprečujejo oksidacijo, je odvisen od vrste antioksidanta (Abram, 2000). S svojim delovanjem preprečujejo oksidativni stres, mutacije DNA, transformacije malignih celic in zmanjšujejo nastanek rakavih obolenj ter ostalih degenerativnih bolezni (Pisoschi in Pop, 2015).

Nekatere antioksidante sintetizira celica sama, to so tako imenovani endogeni antioksidanti. Med njih spadajo encimski in neencimski antioksidanti, ki so prisotni tako v vodnih kot membranskih celičnih predelih. Redoks homeostaza v celicah je dosežena s pomočjo kompleksnega endogenega antioksidativnega sistema, ki vsebuje endogene antioksidativne encime, kot so superoksidna dismutaza, katalaza in glutation peroksidaza ter s pomočjo neencimskih antioksidantov, kot so glutation, ubikinon, proteini, sečna kislina, koencim Q in lipoična kislina (Pisoschi in Pop, 2015; Korošec, 2000).

Ostale antioksidante pa dobimo z živili ali s prehranskimi dopolnilni in jih imenujemo eksogeni antioksidanti (Korošec, 2000; Pisoschi in Pop, 2015). Med glavne eksogene antioksidante spadajo vitamin C in E, karotenoidi in fenolne spojine (stilbeni, fenolne kisline, kot so benzojska ter hidroksibenzojska kislina, derivati cimetne ter hidroksicimetne kisline, flavonoidi, flavonoli, flavani, flavanoni, flavoni in antocianidi) (Pisoschi in Pop, 2015).

## 2.3 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM ZA ŠTUDIJ ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA BIOAKTIVNIH SPOJIN

Na podlagi *in vitro* študij ni mogoče predvidevati, ali bodo antioksidativne spojine pokazale enako aktivnost tudi v celici. Za preučevanje antioksidativne aktivnosti bioaktivnih spojin v celicah se kot modelni organizem lahko uporablja kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti (Petelinc in sod., 2011, 2013b; Slatnar in sod., 2012; Paškulin in sod., 2010, 2012).

Kvasovka *S. cerevisiae* je eden najbolj preprostih enoceličnih evkariontskih organizmov s hitro rastjo in kratkim življenjskim ciklom (90 minut). Stabilna je tako v haploidni, kot v diploidni obliki in je najpogosteje uporabljen evkariontski modelni organizem (Menacho-Marquez in Murguia, 2007).

Med kvasovko in človekom je ohranjenih veliko skupnih celičnih procesov, zato je kot modelni organizem uporabna za preučevanje številnih bolezni (Zakrajšek in sod., 2011; Ma, 2001). Primerna je tudi za preučevanje ključnih evkariontskih celičnih procesov, kot so metabolne poti, stresni odziv, staranje, regulacija izražanja genov, transdukcija signalov, celični cikel, apoptoza in številnih drugih bioloških procesov (Menacho-Marquez in Murguia, 2007; Karathia in sod., 2011). S pomočjo razumevanja delovanja procesov v kvasovki in preučevanja vloge genov, lahko pojasnimo tudi funkcije in delovanje genov pri višjih evkariontih, vključno s človekom (Ma, 2001).

Kvasne celice imajo pred uporabo ostalih večceličnih modelnih organizmov številne tehnične prednosti: zaradi hitrega življenjskega cikla so primerne za presajalne metode; v tekočem mediju imajo razpršeno rast, v trdnem pa rastejo v kolonijah; kultura za rast ne potrebuje posebnih sterilnih tehnik, niti dragih gojišč. Poleg tega so eksperimenti s kvasovko lahko izvedljivi, hitrejši in cenejši od metod s človeškimi celicami (Guthrie in Fink, 1991; Menacho-Marquez in Murguia, 2007; Ma, 2001).

Ob nacepitvi kvasnih celic v gojišče z glukozo, se le-te pričnejo hitro razmnoževati, dokler ne izčrpajo zunanjih virov ogljika. Takrat kultura postane nasičena in preide v stacionarno fazo, kjer so celice v mirujočem stanju. Evkariontski organizmi preživijo večino življenjskega obdobja v stacionarni fazi rasti, zato se kvasovka *S. cerevisiae* kot modelni organizem uporablja ravno v tej fazi (Zakrajšek in sod., 2011). Kvasovka v stacionarni fazi je podobna celicam večceličnih organizmov z več vidikov: večino svoje energije celice pridobivajo z mitohondrijskim dihanjem, celice so v  $G_0$  fazi, njihove poškodbe se kopijo skozi čas (Longo in sod., 1996).

## 2.4 PROPOLIS

Propolis je viskozna, naravna snov iz smol in balzamov, ki jo čebele nabirajo iz različnih rastlinskih virov. Čebele prinesajo smolo do panja, kjer jo prežvečijo, ji dodajo encime in izločke iz sline, delno prebavljen material pa zmešajo s čebeljim voskom in ga nato uporabijo v panju (Russo in sod., 2002; Burdock, 1998). Beseda propolis izvira iz grških besed *pro-*, ki pomeni pred oz. v obrambo ter *polis-*, ki pomeni mesto. Dobesedni pomen besede je torej obramba mesta oz. panja (Burdock, 1998).

### 2.4.1 Funkcija propolisa v panju

Čebele uporabljajo propolis zaradi njegovih mehanskih in bioloških lastnosti (Bankova in sod., 2000). Z njim zamašijo luknje v satju, zgradijo reže ter s prevleko zgladijo površino notranjih sten celic satja (Kuropatnicki in sod., 2013; Božnar 2002). Propolis uporablja za popravilo satja, pri čemer skušajo zapreti vse špranje manjše od 5 mm (Bankova in sod., 2000; Meglič, 2004). Čebele s propolisom zadelajo tudi vhod panja, zato se propolis imenuje zadelavina (Meglič, 2004; Božnar, 2002). Ena čebelja družina nabere na leto 100 do 150 g propolisa (Božnar, 2002).

Čebelje družine živijo v zaprtem sistemu, zaradi česar se lahko morebitna bolezen hitro razširi po celotnem panju. Propolis je naravni antibiotik (Božnar, 2002). Deluje antiseptično in zmanjšuje mikrobnost po stenah panja. Na ta način preprečuje mikroben okužbo satovja, ličink ter zalog medu (Kuropatnicki in sod., 2013). S propolisom je panj zaščiten pred zunanjim vlago, nekontroliranim pretokom zraka in pred vdorom zunanjih vsiljivcev (Simone-Finstrom in Spivak, 2010). S propolisom čebele prevlečejo tudi morebitne škodljivce, jih mumificirajo in preprečijo, da bi njihovi ostanki postali vir okužb (Meglič, 2004).

### 2.4.2 Rastlinski viri propolisa

Snovi v smolah surovega, nepredelanega propolisa izvirajo iz treh različnih virov: rastlinski izločki, ki jih nabirajo čebele, izločene snovi iz čebeljega metabolizma in snovi, ki jih čebele vnesejo tekom izdelave propolisa, ki poteka v čebeljem panju (Marcucci, 1995). Rastlinski izločki, ki jih čebele nabirajo za izdelavo propolisa, nastajajo tekom naravnih procesov v različnih delih rastlin. Gre se za snovi, ki jih rastline aktivno izločajo, snovi, ki so izločene iz ran na rastlinah, lipofilne snovi na listih in listnih popkih, rastlinske sluzi, drevesne smole, in drevesni sok (Bankova in sod., 2000; Božnar, 2002). Rastlinski vir izločkov predstavljajo različne vrste dreves kot so bukev, breza, jelša, topol, brest, akacija, kostanj, breskev, vrba, češnja, marelica, sliva, iglavci, itd. (Meglič, 2004; Božnar, 2002; Kuropatnicki in sod., 2013; Marcucci, 1995).

### 2.4.3 Lastnosti in kemijska sestava propolisa

Propolis ima prijetno aroma, ki diši po topolovih popkih, medu, vosku in vaniliji. Obenem je grenkega okusa (Božnar, 2002; Lotfy, 2006). Lahko je od rumeno-zelene do temno rjave barve, odvisno od njegovega vira in starosti (Lotfy, 2006). Pri višjih temperaturah je propolis mehkejši, upogljiv in zelo lepljiv. Pri nižjih temperaturah pa je trši, krhek in lomljiv. Navadno postane tekoč pri temperaturah od 60 °C do 70 °C, pri nekaterih vzorcih pa je točka taljenja nad 100 °C (Kuropatnicki in sod., 2013).

Kemijska sestava, barva in aroma se med posameznimi vzorci surovega propolisa razlikujejo glede na geografsko lego, rastlinski vir in letni čas nabiranja. Prav zaradi tega je za propolis nemogoče postaviti natančne standarde, saj po sestavi nista povsem enaki niti dve vrsti propolisa (Božnar, 2002; Lotfy, 2006; Burdock, 1998; Marcucci, 1995). V njem so določili že več kot 360 sestavin. Približno polovica je rastlinskih smolnatih snovi, okoli 30 % je voskov in maščobnih kislin, 10 % je eteričnih olj, 5 % cvetnega prahu in 5 % drugih organskih snovi. Je bogat z minerali (Mg, Ca, K, Na, Cu, Zn, Mn, Fe, I) in vitaminimi kot so B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C in E (Božnar, 2002; Lotfy, 2006; Burdock, 1998). Propolis vsebuje tudi nekatere encime in izločke čebel (Meglič, 2004; Lotfy, 2006).

Propolis uporabljamo v naravni obliki, kot vodni ali alkoholni izvleček (Božnar, 2002). Najpogostejši je etanolni izvleček propolisa (EIP), vendar se za ekstrakcijo lahko uporablja tudi druga topila (Burdock, 1998).

Propolis je kompleksna mešanica naravnih snovi (Russo in sod., 2002). V njem so med organskimi snovmi določili fenolne kisline (cimetna, kavna kislina, itd.) in njihove estre (alifatske estre, aromatske estre), flavonoide (flavonole, flavone, flavonone, dihidroflavonole, kalkone in dihidrokalkone), aminokisline, aromatske kisline, hidroksi in keto voske, voskaste kisline, ketone, terpenoide, alkohole, aldehyde, steroide in sladkorje (Viuda-Martos in sod., 2008; Marcucci, 1995; Russo, 2002). Zaradi razlik v kemijski sestavi in različnih koncentracij aktivnih snovi so aktivnosti propolisa z različnih področij različne (Kumazawa in sod., 2004).

Propolis ima številne biološke in farmakološke lastnosti. Deluje bakteriostatično, bakteriocidno, protivirusno, fungicidno, fungistatično, protiparazitsko, antioksidativno, protitoksično, protitumorsko, biostimulativno, imunostimulativno, protivnetno, anestetično, protiulkusno in hepatoprotektivno (Meglič, 2004; Lotfy, 2006; Bankova in sod., 2000).

#### 2.4.4 Antioksidativna učinkovitost propolisa

Propolis ima številne biološke in farmakološke lastnosti, ki jih pripisujejo njegovi kompleksni kemijski sestavi ter interakcijam med posameznimi kemijskimi spojinami. Najbolj pomembno vlogo imajo fenolne spojine, predvsem fenolne kisline in njihovi estri (Socha in sod., 2014).

Antioksidativna učinkovitost propolisa je v glavnem povezana z visoko vsebnostjo flavonoidov (Kumazawa in sod., 2004; Božnar, 2002). Glavne antioksidativne spojine v propolisu so: CAPE, kavna kislina, kvercetin, kampferol, galangin in ester cimetne kisline (Zhang in sod., 2014). V kolikor ima propolis močno antioksidativno učinkovitost, vsebuje veliko količino naštetih antioksidativnih spojin (Ahn in sod., 2007). Prisotnost in količina fenolnih spojin v vzorcih propolisa se razlikuje glede na biogeografske lastnosti kraja (lokalna flora, podnebje in sezonski vplivi), kjer je bil nabran surov propolis, posledično pa je različno močna tudi njegova antioksidativna učinkovitost (Ahn in sod., 2007; Silva in sod., 2004).

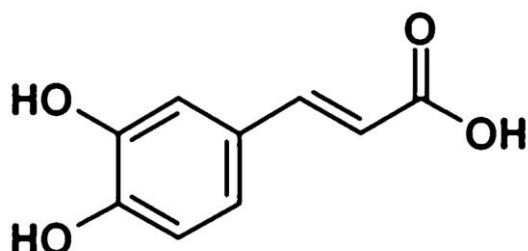
Petelinc in sod. (2013b) so v EIP poleg ostalih fenolnih spojin dokazali tudi prisotnost EKK: CAPE, izoprenilni ester kavne kisline (CAIE, ang. caffeic acid isoprenyl ester), benzilni ester kavne kisline (CABE, ang. caffeic acid benzyl ester) in cinamilni ester kavne kisline (CACE, ang. caffeic acid cinnamyl ester). Po preverjanju celičnega privzema so v celice kvasovke *S. cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi EIP vstopili le CAPE, CABE in CACE. Ti so verjetno odgovorni za znižano znotrajcelično oksidacijo, ki je bila določena po izpostavitvi celic kvasovk EIP.

### 2.5 ESTRI KAVNE KISLINE

#### 2.5.1 Uvrstitev estrov kavne kisline

Estri kavne kisline spadajo med fenolne spojine. Fenolne spojine so vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč (benzen) in najmanj eno hidrosilno skupino ( $-OH$ ) direktno vezano na aromatski obroč. V naravi so običajne spojine z več  $-OH$  skupinami, ki so vezane na en ali več aromatskih obročev, zato se je zanje uveljavilo ime polifenoli (Abram, 2000; Vermerris in Nicholson, 2008). Fenolne spojine so fitokemikalije, ki so bioaktivna neesencialna hranila rastlinskega izvora in imajo številne pozitivne učinke na zdravje ljudi (Huang in sod., 2010). Najdemo jih v zdravilnih rastlinah, sadju, zelenjavi, začimbah, žitih in v pijačah. Poleg tega jih rastline kot sekundarne metabolite proizvajajo za zaščito pred ultravijoličnim sevanjem, patogeni, paraziti in vsiljivci (Huang in sod., 2010; Pandey in Rizvi, 2009).

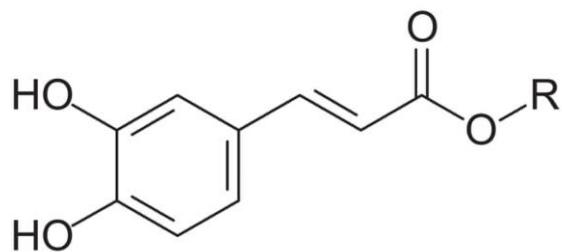
Obstaja več kot 8000 polifenolov, ki jih razdelimo v različne skupine glede na število fenolnih obročev in na osnovi strukturnih elementov, ki vežejo aromatske obroče med seboj. Lahko pa jih razdelimo glede na število ogljikovih atomov v molekuli. Glavni razredi fenolnih spojin so: fenolne kisline, flavonoidi, stilbeni in lignani (Pandey in Rizvi, 2009; Vermerris in Nicholson, 2008). Fenolne kisline se razdelijo na dve glavni skupini: hidroksibenzojske kisline in hidroksicimetne kisline (Gocer in Gulcin, 2011). Med hidrokscimetnimi kislinami je najbolj zanimiva kavna kislina, za katero je značilen C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> osnovni skelet in je prisotna v številnih rastlinah v obliki preprostih derivatov, kot so glikozidi, amidi in estri (Wang in sod., 2014; LeBlanc in sod., 2012).



Slika 1: Osnovna struktura formula kavne kisline (Rani in Devanand, 2013)

### 2.5.2 Kemijska struktura estrov kavne kisline

Obstajajo različni EKK, ki jih lahko ekstrahiramo iz različnih rastlinskih virov iz narave z ekstrakcijskimi metodami, ali pa jih pridobimo s kemijsko sintezo iz kavne kisline in alkohola (Akyol in sod., 2012; Tolba in sod., 2014). Možna je tudi biosinteza EKK z različnimi encimi (Zhang in sod., 2014).



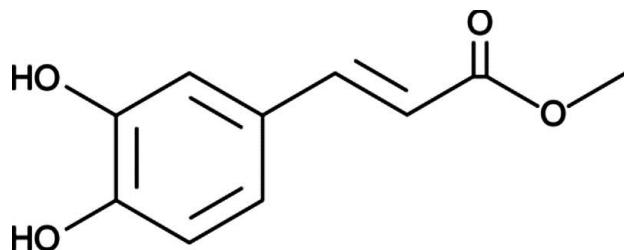
Slika 2: Osnovna struktura formula estrov kavne kisline (Medana in sod., 2008)

Preglednica 1: Ime in funkcionalna skupina (R, slika 2) nekaterih estrov kavne kisline (Wang in sod., 2014; Medana in sod., 2008; Falcao in sod., 2010)

Ester kavne kisline (EKK)	Funkcionalna skupina (R)
Metilni ester kavne kisline (CAME)	-CH <sub>3</sub>
Etilni ester kavne kisline (CAEE)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Izopropilni ester kavne kisline (CAIPE)	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Fenetilni ester kavne kisline (CAPE)	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
Propilni ester kavne kisline	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Butilni ester kavne kisline	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
Amilni ester kavne kisline	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>
Izoamilni ester kavne kisline	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Heksilni ester kavne kisline	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>
Heptilni ester kavne kisline	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>
Oktilni ester kavne kisline	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>
Izoprenilni ester kavne kisline (CAIE)	-CH <sub>2</sub> (CH) <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Benzilni ester kavne kisline (CABE)	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
Cinamilni ester kavne kisline (CACE)	-CH <sub>2</sub> (CH) <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>

### 2.5.3 Preučevani estri kavne kisline

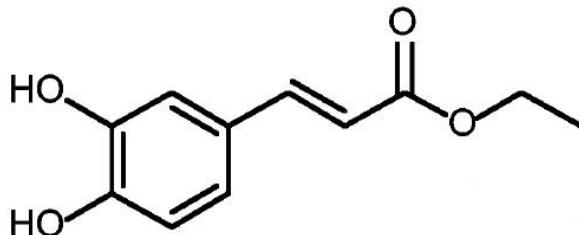
#### 2.5.3.1 Metilni ester kavne kisline – CAME



Slika 3: Osnovna strukturna formula metilnega estra kavne kisline (CAME) (Cayman Europe, 2015)

CAME je ester kavne kisline in metilnega alkohola. Prisotnost CAME so dokazali v kitajski zdravilni rastlini *Polygonum amplexicaule*, v rastlini *Solanum torvum* in v listih rastline *Perilla frutescens* (Xiang in sod., 2011; Takahashi in sod., 2010; Lee in sod., 2001). Tako kot ostali EKK, tudi CAME deluje antioksidativno *in vitro* in ima zaščitno vlogo pri oksidativnem stresu (Ishige in sod., 2001). Fiuza in sod. (2004) poročajo o njegovem antiproliferativnem in citotksičnem delovanju. Kot nekateri uporabni derivati kavne kisline, ima tudi CAME protitumorsko delovanje, in sicer je le-to še bolj učinkovito kot pri kavni kislini (Lee in sod., 2001). Kaže tudi protivnetno in protibolečinsko delovanje *in vitro* ter *in vivo* (Shin in sod., 2004). Takahashi in sod. (2010) poročajo, da je CAME iz ekstrakta *Solanum torvum* deloval inhibitorno na  $\alpha$ -glukozidazo in tako pokazal antihiperglikemično aktivnost ter proti-diabetični učinek *in vivo*.

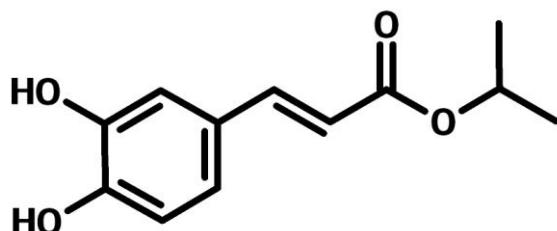
### 2.5.3.2 Etilni ester kavne kisline – CAEE



Slika 4: Osnovna strukturna formula etilnega estra kavne kisline (CAEE) (Celli in sod., 2007)

CAEE je ester kavne kisline in etilnega alkohola. V naravi je prisoten v številnih zdravilnih rastlinah, zeliščih ter drevesih iz različnih geografskih področij. Njegovo prisotnost so dokazali v metanolnem, etanolnem ali vodnem izvlečku rastlin *Ipomoea subincana* in *Ipomoea batatas*, *Salvia guaranitica*, *Acroptilon repens*, *Taraxacum mongolicum* in v tradicionalnih kitajskih zdravilih, ki se uporabljajo za zdravljenje vnetij in nalezljivih bolezni. Ta EKK z nizko molekulsko maso se nahaja v belih in rdečih vinih, ni pa ga mogoče najti v grozdnih jagodah. Pokazali so, da CAEE v dealkoholiziranem izvlečku belega vina deluje protifibrotično in hepatoprotektivno tako na celični, kot na molekularni ravni (Boselli in sod., 2009). Marder in sod. (1996) so v etanolnem izvlečku argentinske rastline *Salvia guaranitica* dokazali prisotnost CAEE in ciriziola, katerima pripisujejo pomirjevalni in hipnotični učinek. V rastlini *Gonzalagunia rosea* s katero zdravijo epilepsijo in anksioznost, so kot glavno biološko aktivno komponento poleg CAPE določili tudi CAEE, ki slovi po svojih antioksidativnih in nevroprotективnih lastnostih (Ahmed in sod., 2016). Nedavne raziskave so pokazale, da je njegova antioksidativna učinkovitost 2,4-krat višja od antioksidanta butil hidroksitoluena (BHT). Zaradi kemijske strukture deluje protitumorsko proti nekaterim vrstam raka, kot so levkemija, rak na dojki in kožni rak. Tako CAPE kot tudi CAEE sta pokazala citotoksično delovanje proti celicam raka na grlu (Boselli in sod., 2009; Lim in sod., 2014). CAEE ima tudi protivnetno delovanje (Chiang in sod., 2005).

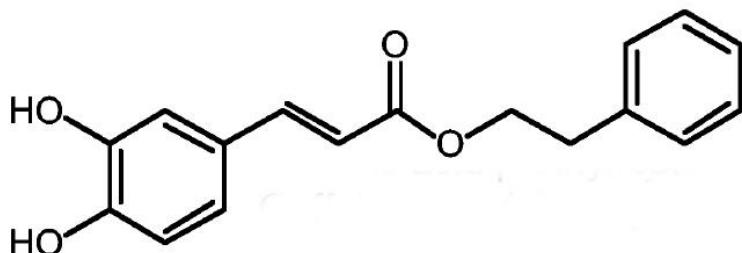
### 2.5.3.3 Izopropilni ester kavne kisline – CAIPE



Slika 5: Osnovna struktturna formula izopropilnega estra kavne kisline (CAIPE) (Dalton, 2015)

CAIPE je ester kavne kisline in izopropilnega alkohola. Raziskave o CAIPE so relativno nove in od vseh naštetih EKK, velja za najmanj poznanega in preučevanega. CAIPE je antioksidant, dober lovilec radikalov in močno inhibira rast nekaterih tumorskih celic (Wang in sod., 2014). Poleg CAEE je CAIPE ena izmed aktivnih komponent v rastlini *Gonzalagunia rosea* (Ahmed in sod., 2016). Shi in sod. (2015) poročajo o sintezi hibrida aspirina in CAIPE z antioksidativno aktivnostjo, ki bi ga lahko uporabljali kot potencialno kardioprotektivno zdravilo z zmanjšanim tveganjem za hemoragično možgansko kap.

### 2.5.3.4 Fenetilni ester kavne kisline – CAPE



Slika 6: Osnovna struktturna formula fenetilnega estra kavne kisline (CAPE) (Celli in sod., 2007)

CAPE je ester kavne kisline in fenetilnega alkohola. CAPE je od vseh EKK najbolj preučevan. Prvič so ga identificirali v propolisu ter v popkih topola in velja za eno najbolj pomembnih in aktivnih komponent propolisa (Bankova in sod., 2000; Gocer in sod., 2011). Številne raziskave poročajo o njegovih koristnih bioloških aktivnostih, kot so: antioksidativna aktivnost, protitumorska aktivnost *in vitro* ter *in vivo* in protivnetna aktivnost. Ima pa tudi imunomodulatorno in antiproliferativno aktivnost. Deluje antibiotično in protivirusno, protiglivično ter ima nevroprotективne, hepatoprotективne in kardioprotективne lastnosti (Akyol in sod., 2013; Gocer in sod., 2011; Tolba in sod., 2014).

CAPE je zanimiv zaradi svojega močnega antioksidativnega delovanja, ki je v različnih študijah dokazano tako *in vitro* kot *in vivo*. Russo in sod. (2002) so raziskali antioksidativno aktivnost EIP, ki ni vseboval CAPE ter EIP, ki je vseboval CAPE. Slednji je pokazal višjo aktivnost kot EIP brez CAPE. Dokazali so, da ima CAPE pomembno vlogo pri antioksidativni aktivnosti EIP *in vitro*. Poleg tega CAPE inducira apoptozo rakavih celic, znižuje lipidno peroksidacijo, inhibira proteinsko tirozinsko kinazo ter aktivacijo NF-κB (Jung in sod., 2010). Število raziskav o delovanju CAPE *in vivo* v različnih živalskih modelih se povečuje (Celli in sod., 2007). Zaradi svojih številnih aktivnosti bi bil CAPE primeren kot prehranski dodatek za izboljšanje zdravja pri ljudeh in za zaščito pred boleznimi, ki jih povzročajo ROS. Vendar so za varno terapevtsko uporabo potrebne še nadaljnje študije (Tolba in sod., 2014).

#### 2.5.4 Vpliv kemijske strukture na aktivnost EKK

Preučevani EKK so si med seboj kemijsko precej podobni. Vsi vsebujejo katehol, ki je močan antioksidant (Zhang in sod., 2014). Imajo karbonilno skupino (C=O) in po dve hidroksilni skupini (–OH) na fenolnem delu, ki sta pomembni aktivni funkcionalni skupini (Zhang in sod., 2014). Hidroksicimetne kisline so zaradi prisotnosti  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOH}$  skupine boljši antioksidanti kot ostale fenolne kisline. Na antioksidativno aktivnost vpliva ravno prisotnost različnih skupin na fenolni strukturi, ki so odgovorne za njihovo sposobnost oddajanja vodika. Velja, da je fenolna spojina brez dodane funkcionalne skupine neaktivna kot donor vodika in zaradi tega imajo monofenolne spojine manjšo antioksidativno aktivnost kot polifenoli. Prisotnost dodatne –OH skupine na *ortho* ali *para* položaju ali prisotnost karbonilne skupine, kot je aromatska kislina, ester ali lakton, poveča antioksidativno učinkovitost fenolne kisline. Zaradi svoje resonančne strukture fenolne spojine stabilizirajo nastali radikal, poleg tega so –OH skupine dobri donorji vodika in omogočajo, da se le-ta zlahka odda (Gocer in Gulcin, 2011).

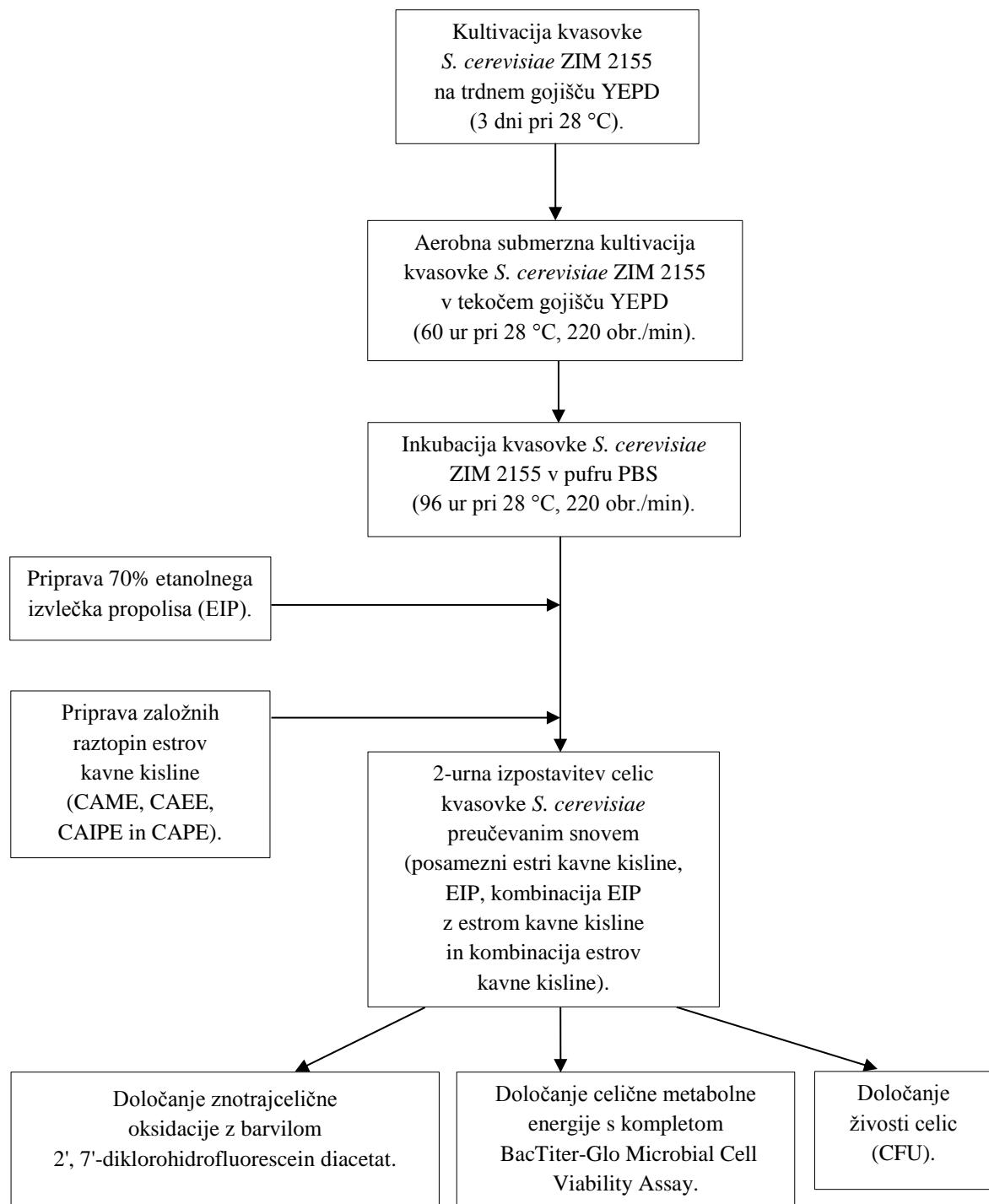
Aktivnost EKK je odvisna tudi od stopnje njihove vključitve v celice, za kar pa je odgovorna topnost v lipidih oz. lipofilnost. Za EKK je značilna visoka lipofilnost, saj se bolje topijo v lipidih oz. nepolarnih topilih od ostalih hidroksicimetnih kislin. Posledično lažje prehajajo skozi celično membrano v notranjost celice in imajo kot antioksidanti še boljšo antioksidativno učinkovitost (Fiuza in sod., 2004; Wang in sod., 2014). Na lipofilnost EKK vpliva prisotnost –OH skupin na fenolnem delu in dolžina alkilne esterske verige (Fiuza in sod., 2004).

Jayapraksam in sod. (2006) so ugotovili, da so kemijsko sintetizirani EKK z daljšo alkilno verigo, ki so tudi bolj lipofilni, boljši antioksidanti v primerjavi z EKK s krajšo alkilno verigo. Tisti s srednjo dolgo alkilno verigo (od C<sub>4</sub> do C<sub>8</sub>) pa so manj aktivni v primerjavi s kavno kislino.

Nasprotno pa so Silva in sod. (2000) pri sintetiziranih EKK z metilno, etilno in propilno verigo pokazali, da daljšanje alkilne verige EKK iz metilne v propilno, ne izboljša njihove antioksidativne učinkovitosti. S sintezo je mogoče pridobiti tudi kemijsko spremenjene in izboljšane derivate EKK z močnejšo aktivnostjo (Zhang in sod., 2014). Poznavanje strukturnih lastnosti EKK je vsekakor nujna podlaga za razumevanje povezave med njihovo strukturo in aktivnostjo. Majhne razlike v kemijski strukturi EKK lahko privedejo do velikih sprememb v njihovi aktivnosti (Fiuza in sod., 2004).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SHEMA POTEKA DELA



Slika 7: Shematski prikaz poteka dela

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Mikroorganizem

Za izvedbo poskusa smo uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Za poskus smo uporabili tri dni staro kulturo, ki smo jo inkubirali na petrijevih ploščah s trdnim gojiščem YEPD pri temperaturi 28 °C.

### 3.2.2 Propolis

Uporabili smo propolis, ki izvira iz Savinjske doline, letnik 2010.

### 3.2.3 Estri kavne kisline

Estri kavne kisline so bili pridobljeni s kemijsko sintezo na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Uporabili smo naslednje EKK: metilni ester kavne kisline (CAME), etilni ester kavne kisline, (CAEE), izopropilni ester kavne kisline (CAIPE) in fenetilni ester kavne kisline (CAPE). Vse EKK smo do začetka analiz hranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C.

### 3.2.4 Gojišča

#### 3.2.4.1 Precepljanje kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155

##### - Trdno gojišče YEPD

Trdno gojišče YEPD smo uporabljali za precepljanje in vzdrževanje kulture ter določanje živosti kvasnih celic z metodo štetja kolonij na ploščah (CFU).

Preglednica 2: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993)

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
kvasni ekstrakt (Biolife)	5 g	1 % (w/v)
pepton (Biolife)	10 g	2 % (w/v)
glukoza (Merck)	10 g	2 % (w/v)
agar (Biolife)	10 g	2 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	dodamo do 500 mL	

Pripravljeno gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar. Po končanem avtoklaviranju smo gojišče ohladili na 45 °C in ga razlili v petrijeve plošče.

### 3.2.4.2 Namnoževanje kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 do začetka stacionarne faze rasti

#### - Tekoče gojišče YEPD

Tekoče gojišče YEPD smo uporabili za namnoževanje kulture kvasovk *S. cerevisiae* do začetka stacionarne faze rasti.

Preglednica 3: Sestava tekočega gojišča (Atlas in Lawrence, 1993)

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
dH <sub>2</sub> O	dodamo do 1 L	

Pripravljeno gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar.

### 3.2.5 Raztopine in reagenti

#### 3.2.5.1 Inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*

#### - Pufer PBS

Pufer PBS (ang. phosphate-buffered saline) smo uporabili za vzdrževanje kulture v stacionarni fazni rasti.

Preglednica 4: Sestava pufra PBS

Sestavina	Končna koncentracija		
1 tabletka (Oxoid)	NaCl	8 % (w/v)	
	KCl	0,2 % (w/v)	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 % (w/v)	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 % (w/v)	
ddH <sub>2</sub> O	dodamo do 100 mL		

PBS pufer smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar.

### 3.2.5.2 Določanje znotrajcelične oksidacije celic

#### - Kalijev fosfatni pufer (pH 7,8)

50 mM kalijev fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo v določenem razmerju zmešali 50 mM raztopino kalijevega dihidrogenfosfata -  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Preglednica 5) in 50 mM raztopino dikalijevega hidrogenfosfata -  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Preglednica 6), dokler nismo dosegli pH 7,8. Pripravljen pufer smo avtoklavirali 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar. Avtoklaviran pufer smo sterilizirali s filtracijo (velikost por: 0,2 µm) in ga do uporabe hranili v hladilniku. Pred uporabo smo ga v inkubatorju segreli na temperaturo 28 °C.

Preglednica 5: Sestava 50 mM raztopine kalijevega dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Merck)	3,40 g	50 mM
ddH <sub>2</sub> O	dodamo do 500 mL	

Preglednica 6: Sestava 50 mM raztopine dikalijevega hidrogenfosfata ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Merck)	4,36 g	50 mM
ddH <sub>2</sub> O	dodamo do 500 mL	

#### - Reagent 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA)

Uporabili smo sveže pripravljeno 1 mM raztopino H<sub>2</sub>DCFDA. Reagent smo hranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Pripravili smo 1 mM založno raztopino H<sub>2</sub>DCFDA tako, da smo 0,0049 g H<sub>2</sub>DCFDA raztopili v 10 mL 96 % etanola. Za vsak poskus smo pripravili svežo raztopino H<sub>2</sub>DCFDA.

Preglednica 7: Sestava 1 mM založne raztopine 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (H<sub>2</sub>DCFDA)

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
H <sub>2</sub> DCFDA (Sigma)	0,0049 g	1 mM
etanol (96 %, Merck)	10 mL	

### 3.2.5.3 Določanje celične metabolne energije

#### - Komplet »BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay« (Promega)

Komplet je sestavljen iz rekonstruiranega reagenta »BacTiter-Glo™ Reagent« (Promega), ki vsebuje:

- substrat »BacTiter-Glo™ Substrate«
- pufer »BacTiter-Glo™ Buffer«

Reagent BacTiter-Glo<sup>TM</sup> smo pripravili tako, da smo BacTiter-Glo<sup>TM</sup> pufer in BacTiter-Glo<sup>TM</sup> substrat segreli na sobno temperaturo. Nato smo prenesli 10 mL pufra v stekleničko s substratom, na ta način ustvarili encim/substrat mešanico in pridobili BacTiter-Glo<sup>TM</sup> reagent. Nastalo homogeno raztopino smo premešali, jo alikvotirali in shranili v temi. Da smo dosegli najvišjo občutljivost, smo reagent pred uporabo pustili stati 15 minut na sobni temperaturi. Rekonstruiran reagent »BacTiter-Glo<sup>TM</sup> Reagent« je stabilen 8 ur na sobni temperaturi, 4 dni pri temperaturi 4 °C, 1 teden pri temperaturi -20 °C in 1 mesec pri temperaturi -70 °C, pri čemer izgubi manj kot 20 % svoje aktivnosti.

#### - PBS pufer

Sestava pufra PBS je navedena v preglednici 4.

### 3.3 APARATURE, NAPRAVE IN PRIBOR

Pri delu smo poleg standardne laboratorijske opreme uporabljali naslednje aparature, naprave in pribor.

#### 3.3.1 Priprava založne raztopine EIP:

- rotavapor R-215/V-700/V-850/B-491 (Buchi)
- vrtinčno mešalo Yellowline TTS 2 (IKA)
- kolona Strata-X 8B-S100-UBJ (Phenomenex)

#### 3.3.2 Kemijska sinteza EKK ter priprava založnih in delovnih raztopin EKK:

- tehtnica CPA324S (Sartorius)
- povratni vodni hladilnik
- rotavapor R-215/V-700/V-850/B-491 (Buchi)
- lij ločnik
- filter modri trak 392 (Sartorius)
- vrtinčno mešalo Yellowline TTS 2 (IKA)

#### 3.3.3 Priprava gojišč, raztopin in reagentov za kultivacijo kvasovk *S. cerevisiae*:

- pH-meter S20 SevenEasy (Mettler Toledo)
- avtoklav – parni sterilizator (Sutjeska)
- sušilnik laboratorijske steklovine SO-250 (Elektromedicina)
- magnetno mešalo MM-540 (Tehtnica)
- magnetno mešalo Rotamix 550 MMH (Tehtnica)
- tehtnica TE214S (Sartorius)
- tehtnica PS 1200/C/2 (Radwag)

#### 3.3.4 Kultivacija in inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*:

- brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- vrtinčno mešalo yellowline TTS 2 (IKA)
- centrifuga Centric 200 (Tehtnica)
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica)
- inkubator IG 150 (Jouan)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- dve 100-mL erlenmajerici s stransko kiveto z 1 utorom (SchottDuran)

- dve 1-L erlenmajerici s stransko kivetom z 1 utorom (SchottDuran)
- 500-mL erlenmajerica s stransko kivetom (Simex)
- 50-mL merilni valj
- 100-mL merilni valj

### **3.3.5 Merjenje znotrajcelične oksidacije:**

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- 96-mestne mikrotitrskie plošče črne barve (Nunc)
- brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- inkubator IG 150 (Jouan)
- centrifuga Centric 200 (Tehnica)

### **3.3.6 Določanje celične metabolne energije:**

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- 96-mestne mikrotitrskie plošče bele barve (Nunc)
- prozorne 96-mestne mikrotitrskie ploščice (Nunc)

### **3.3.7 Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje raztopin, reagentov in vzorcev:**

- hladilnik (4 °C) (LTH)
- zamrzovalnik (-20 °C) (LTH)
- zamrzovalnik Ultra Freeze (-80 °C) (Heto)

### 3.4 METODE

#### 3.4.1 Priprava etanolnega izvlečka propolisa (EIP)

Propolis smo ekstrahirali s 100 mL 70 % etanola in ga mešali 1 uro pri sobni temperaturi. Z nadaljnjam centrifugiranjem pri 3000 g za 5 minut in 2x koncentriranjem supernatanta z rotavaporjem, smo pridobili surov ekstrakt propolisa. Surov ekstrakt propolisa smo očistili z ekstrakcijo s trdno fazo (SPE). SPE smo izvedli z uporabo kolone Strata-X (33 µm polimerna reverzna faza 60 mg/3 mL 8B-S100-UBJ, Phenomenex). Kolono smo aktivirali z metanolom (2 mL), aktivacijsko topilo pa odstranili z 20 mM amonijevim formiatom (2 mL). Sledil je nanos vzorca (200 µL surovega izvlečka + 200 µL 20 mM amonijevega formiata). Nezaželene komponente smo iz kolone odstranili s spiranjem z raztopino 15 % metanola v 20 mmol/L amonijevem formiatu (2 mL), čemur je sledilo sušenje polnila z vakuumom (3 min). Kolono smo nato eluirali s 96 % etanolom (2 mL) in tako pridobili založno raztopino EIP s koncentracijo 0,012 M (ekvivalent galne kisline (GAE) mol/L).

#### 3.4.2 Kemijska sinteza estrov kavne kisline (EKK) ter priprava založnih in delovnih raztopin

EKK smo pripravili tako, da smo najprej zatehtali 60 mg kavne kisline (Sigma – Aldrich, kataloška številka: C0625, 98 %). Nato smo posameznemu EKK dodali izbrani alkohol (100 mL) in koncentrirano H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 mL), ki deluje kot katalizator. Pri CAME smo dodali metanol, pri CAEE etanol, pri CAIPE izopropilni alkohol (izo-2-propanol) in pri CAPE fenetilni alkohol (2-feniletanol, Sigma – Aldrich, kataloška številka: 77851, 99 %). Nastalo raztopino smo segrevali s povratnim vodnim hladilnikom pri 100° C (1 ura) in jo ohlajeno približno do polovice koncentrirali na rotavaporju. Nato smo ji dodali kloroform (50 mL) in vodo (50 mL), jo prelili v ljiljančnik in močno stresali (1 min). Odvzeli smo spodnjo organsko fazo (kloroform) in filtrirali preko 10 g brezvodnega natrijevega sulfata (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ter filtra modri trak. Raztopino smo dali na rotavapor in topilo odparili do suhega. Vsi EKK so bili pripravljeni po tem postopku, le pri CAPE smo namesto vode uporabili nasičeno raztopino NaCl.

Nato smo iz kemijsko sintetiziranih EKK pripravili založno raztopino (0,2 M) tako, da smo v stekleno epruveto v kateri je bil kemijsko sintetiziran EKK z znano maso, dali ustrezен volumen 96 % etanola (Preglednica 8).

Preglednica 8: Volumen ( $\mu\text{L}$ ) dodanega 96 % etanola k izbranemu estru kavne kisline za pripravo založnih raztopin

Ester kavne kisline	Masa (mg)	Volumen 96 % etanola ( $\mu\text{L}$ )
CAME	21,3	559,5
CAEE	14,52	348,7
CAIPE	8,86	199,3
CAPE	5,22	91,8

V nadaljevanju smo pripravili redčitve posameznih EKK tako, da smo založno raztopino (0,2 M) razredčili z 96 % etanolom in na ta način pridobili naslednje koncentracije posameznih EKK: 0,02; 0,002 in 0,0002 M (delovne raztopine). Redčitve smo vedno pripravljeni za vsak poskus sproti.

### 3.4.3 Kultivacija kvasovk *S. cerevisiae*

Za precepljanje kulture kvasovk *S. cerevisiae* smo uporabili trdno gojišče YEPD (Preglednica 2). Za aerobno submerzno kultivacijo kvasne biomase smo uporabili tekoče gojišče YEPD (Preglednica 3). Za vzdrževanje kvasne biomase v stacionarni fazi rasti pa smo kulturo prenesli v pufer PBS (Preglednica 4).

Tri dni staro kulturo *S. cerevisiae* smo s trdnega gojišča YEPD s cepilno zanko v brezprašni komori pri sterilnih pogojih prenesli v 50 mL tekočega gojišča YEPD (Preglednica 3) v 100-mL erlenmajerici s stransko kiveto (Schott Duran z 1 utorom). Kulturo smo precepili do optične gostote pri 650 nm ( $\text{OD}_{650}$ ) 0,95. Nato smo prenesli 40 mL celične suspenzije v 360 mL tekočega gojišča YEPD (Preglednica 3) v 1-L erlenmajerici s stransko kiveto (Schott Duran z 1 utorom). Kultivacija kvasovk je potekala pri 28 °C in 220 obr./min 60 ur, oz. do začetka stacionarne faze rasti.

Po 60 urah kultivacije smo kulturo prenesli v pufer PBS. Pred prenosom smo s spektrofotometrom izmerili  $\text{OD}_{650}$  in v kolikor je bila celična gostota kulture ustrezna (okoli 2), smo odvzeli 50 mL brozge ( $5 \times 10^8$  celic/mL), jo prenesli v falkonko in centrifugirali 3 min pri 4000 obr./min (centrifuga 322A, Tehnica). Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant in sediment sprali s 50 mL pufra PBS ogretim na 28 °C, celično suspenzijo smo ponovno centrifugirali in sprali s 50 mL pufra PBS ogretim na 28 °C. Nato smo prenesli 40 mL celične suspenzije v 500 mL erlenmajerico (Simex z 1 utorom) in dodali 160 mL pufra PBS ogretega na 28 °C. Končna koncentracija je bila  $1 \times 10^8$  celic/mL. Tako pripravljeno kulturo kvasovk smo inkubirali 96 ur na stresalniku pri 220 obr./min in temperaturi 28 °C. Kvasovka namreč po 2 do 8 dneh inkubacije v pufru PBS doseže stabilno fiziološko, metabolno in oksidativno stanje (Zakrajšek in sod., 2011).

### 3.4.4 Izpostavitev celic kvasovke *S. cerevisiae* estrom kavne kisline in/ali izvlečku propolisa

Po 96 urah stresanja in inkubacije celične kulture kvasovk *S. cerevisiae* v pufru PBS smo celice izpostavili preučevanim snovem. V falkonko smo prenesli 10 mL celične suspenzije in v vsako dodali ustrezni volumen založne oz. delovne raztopine estra kavne kisline (EKK) (50 µL) ali etanolnega izvlečka propolisa (EIP) (50 µL) (Preglednica 9).

Preglednica 9: Preučevana snov, koncentracija založne/delovne raztopine, volumen založne/delovne raztopine in koncentracija snovi v celični suspenziji

	Preučevana snov	Koncentracija založne/delovne raztopine (M)	Volumen založne/delovne raztopine (µL)	Koncentracija snovi v celični suspenziji (µM)
Posamezni estri kavne kisline	CAME	0,2	50	1000
		0,02		100
		0,002		10
		0,0002		1
	CAEE	0,2		1000
		0,02		100
		0,002		10
		0,0002		1
	CAIPE	0,2		1000
		0,02		100
		0,002		10
		0,0002		1
	CAPE	0,2		1000
		0,02		100
		0,002		10
		0,0002		1
EIP	EIP	0,012*	50	60*
Kombinacija	CAPE + EIP	0,02	50	100
		0,012*		60*
	CAIPE + EIP	0,2	50	1000
		0,012*		60*
	CAIPE + CAPE	0,2	50	1000
		0,02		100

\*Legenda: ekvivalent galne kisline (GAE) (mol/L)

Po izpostavitvi preučevanim snovem je sledila 2-urna aerobna submerzna inkubacija kvasovke *S. cerevisiae* na stresalniku pri 28 °C in 220 obr./min v temi. Nato smo s pomočjo določanja znotrajcelične oksidacije kvasnih celic preverjali antioksidativno učinkovitost preučevanih snovi. Določali smo tudi celično metabolno energijo kvasnih celic s pomočjo reagenta BacTiter-Glo™ in preverili njihovo živost z metodo štetja kolonij na ploščah (CFU). Meritve smo opravili tudi za kontrolne vzorce, kjer celic kvasovke *S. cerevisiae* nismo izpostavili nobeni od preučevanih snovi.

### **3.4.5 Določanje znotrajcelične oksidacije celic**

Znotrajcelično oksidacijo celic kvasovk *S. cerevisiae* smo določali s pomočjo fluorescenčnega barvila 2',7'-diklorodihidrofluorescina (H<sub>2</sub>DCF). Spojina, ki smo jo dodali suspenziji kvasnih celic v obliki diacetatnega estra, 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) (Preglednica 7), je lipofilna snov in zaradi svoje nepolarnosti s pasivno difuzijo hitro prehaja skozi celično membrano v notranjost celice. V celici nespecifične esteraze deacetilirajo H<sub>2</sub>DCFDA do kemijsko reducirane oblike fluorescina (H<sub>2</sub>DCF), ki je polarna oblika spojine in se zaradi tega zadržuje znotraj celice. Tu se v prisotnosti oksidantov oz. reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) oksidira v visoko fluorescirajoči diklorofluorescin (DCF). Merili smo časovno odvisnost intenzitete fluorescence, ki je indikator znotrajcelične oksidacije. Večja kot je intenziteta fluorescence, večja je znotrajcelična oksidacija. Nižja intenziteta fluorescence pa pomeni zmanjšano znotrajcelično oksidacijo in s tem povečano antioksidativno aktivnost celice (Jakubowski in sod., 2000; Rosenkranz in sod., 1992).

V 2-mL mikrocentrifugirko Eppendorf smo prenesli 2 mL suspenzije celic in centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min (centrifuga Centric 200, Tehnica). Po odstranitvi supernatanta smo sedimentu dodali 2 mL 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH 7,8) (Preglednici 5 in 6), ki smo ga predhodno filtrirali in ogrevali na 28 °C, nato suspenzijo celic dobro premešali in jo centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min. Postopek smo ponovili dvakrat. Sedimentu smo nato dodali 990 µL 50 mM kalijevega fosfatnega pufra, dobro premešali in inkubirali 5 min pri temperaturi 28 °C. Po končani inkubaciji smo v temi dodali 10 µL sveže pripravljene 1 mM raztopine H<sub>2</sub>DCFDA (Preglednica 7). Mikrocentrifugirke Eppendorf smo vstavili v falkonko ovito v aluminijasto folijo, to pa prenesli na stresalnik in jo inkubirali v temi 15 min pri temperaturi 28 °C. Nato smo v 5 min nanesli 200 µL vzorca v jamice mikrotitrskih plošč in s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč (Safire 2, Tecan) v 2-urni kinetiki spremljali fluorescenčno intenzitetu (FI). Valovna dolžina vzbujanja spojine DCF je bila 488 nm, emisijska valovna dolžina pa 520 nm. Iz vrednosti meritev smo izračunali prirast fluorescenčne intenzitete (PFI) (Enačba 1). Rezultate smo izrazili kot povprečni relativni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI) glede na kontrolo.

$$PFI = \left( \frac{F_K - F_Z}{F_Z} \right) \quad \dots (1)$$

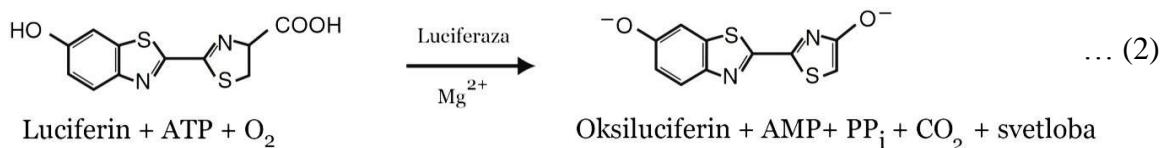
$F_K$  – FI po 2 urah merjenja oksidacije barvila

$F_Z$  – FI v začetku merjenja oksidacije barvila

### 3.4.6 Določanje celične metabolne energije s pomočjo reagenta BacTiter-Glo™

Celično metabolno energijo kvasovke *S. cerevisiae* smo določali s komercialnim kompletom BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay s kataloško številko G8231. Komplet temelji na osnovi določanja količine (kvantifikacije) prisotnih molekul ATP, ki v tem primeru služijo kot indikator za metabolno aktivnost celic. Sestavljen je iz rekonstruiranega komercialnega BacTiter-Glo™ reagenta (Poglavlje 3.2.6.3), ki vsebuje BacTiter-Glo™ pufer in BacTiter-Glo™ substrat. Reagent smo dodali neposredno suspenziji kvasnih celic, pri tem pa ni bilo potrebno odstranjevati gojišča ter spirati celic, saj sestava reagenta omogoča, da le-ta v enem koraku povzroči lizo celic in s tem nastanek luminiscenčnega signala (Promega Corporation, 2012).

Ob lizi celične membrane se sprostijo molekule ATP. Celica pri tem izgubi sposobnost sinteze novih molekul ATP. Obenem reagent inhibira delovanje endogenih ATP-az, ki bi lahko razgradile že prisotne molekule ATP. Vsebuje pa tudi luciferin, luciferazo ter ostale komponente, ki so nujne za merjenje prisotnih molekul ATP v bioluminiscenčni reakciji (Promega Corporation, 2012). Metoda temelji na merjenju luminiscenčnega signala, ki je posledica reakcije prikazane v enačbi 2. Intenziteta svetlobe (luminiscenčni signal) je sorazmerna s količino molekul ATP v vzorcu oz. s številom metabolno aktivnih celic v vzorcu. Substrat za luciferazo je luciferin. Da pa reakcija sploh lahko poteče, morajo biti poleg ATP prisotni tudi molekularni kisik in  $Mg^{2+}$  (Enačba 2).



Komplet ima številne prednosti. Je enostaven za uporabo in sestavljen iz manjšega števila korakov v postopku kot podobni znani testi za merjenje molekul ATP. Omogoča hitro pridobivanje rezultatov ter nastanek stabilnega luminiscenčnega signala, ki ga lahko zaznamo že 5 minut po dodatku reagenta. Postopek je visoko občutljiv, saj omogoča zaznavo nizkega števila mikroorganizmov (Promega Corporation, 2012).

V 1,5-mL mikrocentrifugirko Eppendorf smo prenesli 1 mL suspenzije celic in centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min. Po odstranitvi supernatanta smo sedimentu dodali 1 mL pufra PBS (Preglednica 4), ki smo ga predhodno filtrirali in ogrevali na 28 °C. Suspenzijo celic smo dobro premešali in jo centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min. Postopek smo ponovili dvakrat. Nato smo pripravili redčitev  $10^{-1}$  tako, da smo v novo 1,5-mL mikrocentrifugirko Eppendorf prenesli 100 µL suspenzije celic in dodali 900 µL pufra PBS ter nastalo mešanico dobro premešali. V jamice bele mikrotitrsko plošče smo v treh ponovitvah nanesli 100 µL redčitve  $10^{-1}$ . Nato smo v sterilno plastično banjico pretočili BacTiter-Glo™ reagent, ki smo ga 15 minut pred uporabo segreli na sobno temperaturo. Z multikanalno pipeto smo v vsako jamico mikrotitrsko plošče s celično suspenzijo dodali 100 µL reagenta. S pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč (Safire 2, Tecan) smo vzorce premešali in jih nato inkubirali pet minut na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo s čitalcem mikrotitrskih plošč (Safire 2, Tecan) izmerili luminiscenco (L). V jamice prozorne mikrotitrsko plošče pa smo v treh ponovitvah vnesli vzorce brez reagenta in s tem preverili še vrednost optične gostote (OD<sub>650</sub>). Meritve smo preračunali v L/OD in rezultate izrazili kot relativne vrednosti L/OD (RL/OD) glede na kontrolo.

### 3.4.7 Določanje živosti/kultivabilnosti celic z metodo štetja kolonij na ploščah (CFU)

Živost kvasnih celic smo določali s pomočjo metode štetja kolonij na trdnih gojiščih. Po inkubaciji zrastejo na ploščah kolonije, ki jih preštejemo in izrazimo kot CFU (ang. colony forming units) oz. število enot, ki tvorijo kolonije. Namesto navajanja števila celic, uporabljamo enoto CFU. Pri tem predpostavljam, da je vsaka kolonija ločena enota in izhaja iz posamezne viabilne mikrobne celice. Zato velja, da je število viabilnih celic enako številu kolonij. S skupnim seštevkom CFU na inkubiranih ploščah, volumnom uporabljeni suspenzije celic in s pripadajočim razredčitvenim faktorjem suspenzije celic, smo izračunali izvorno število živih oz. kultivabilnih celic v vzorcu kar izrazimo kot CFU/mL.

Po izpostavitvi celic kvasovke preučevanim snovem, ki je potekala med 2-urno aerobno submerzno inkubacijo na stresalniku pri 28 °C in 220 obr./min v temi, smo iz falkonke prenesli 1 mL suspenzije kvasnih celic v sterilno 1,5 mL-mikrocentrifugirko Eppendorf in jo centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min (centrifuga Centric 200, Tehtnica). Po odstranitvi supernatanta smo sedimentu dodali 1 mL pufra PBS, ki smo ga predhodno ogrevali na 28 °C. Postopek smo ponovili dvakrat in ob koncu celični suspenziji dodali 1 mL pufra PBS. Po spiranju s pufrom PBS smo pripravili redčitveno vrsto po Kochu in prenesli 100 µL ustrezne razredčitve ( $10^{-5}$ ) na trdno gojišče YEPD. Po 72 urah inkubacije pri temperaturi 28 °C v inkubatorju (IG 150, Jouan) smo presteli število kolonij na ploščah in izračunali CFU/mL, ter na ta način določili živost kvasnih celic. Rezultate smo izrazili kot relativni CFU/mL (RCFU/mL) glede na kontrolo.

### 3.4.8 Statistična analiza rezultatov

- Povprečna vrednost

Pridobljene rezultate meritev smo podali kot povprečne vrednosti vseh meritev znotraj določene metode, v skladu z enačbo 3 (Košmelj, 2007).

$$\bar{x} = \left( \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \right) \quad \dots (3)$$

kjer je:

$\bar{x}$  – povprečna vrednost

n – število vzorcev

x – vrednosti i-te meritve

- Standardni odklon

Za oceno variabilnosti rezultatov smo uporabili standardni odklon (SD), ki smo ga izračunali s pomočjo enačbe 4 (Košmelj, 2007).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \dots (4)$$

kjer je:

$x_i$  – vrednosti i-te meritve

n – število vzorcev

$\bar{x}$  – povprečna vrednost

- Studentov t-test

S pomočjo t-testa smo preverili domneve o enakosti dveh povprečij. Če je bila p vrednost  $\leq 0,05$ , je bila razlika med aritmetičnima sredinama statistično značilna. T-test smo opravili v programu Microsoft Excel (*t*-test v paru) in uporabili dvorepo porazdelitev.

- Duncan test

Statistično značilne razlike med različnimi tretiranjami smo ugotavljali z Duncanovim testom mnogoterih primerjav s 95 % intervalom zaupanja.

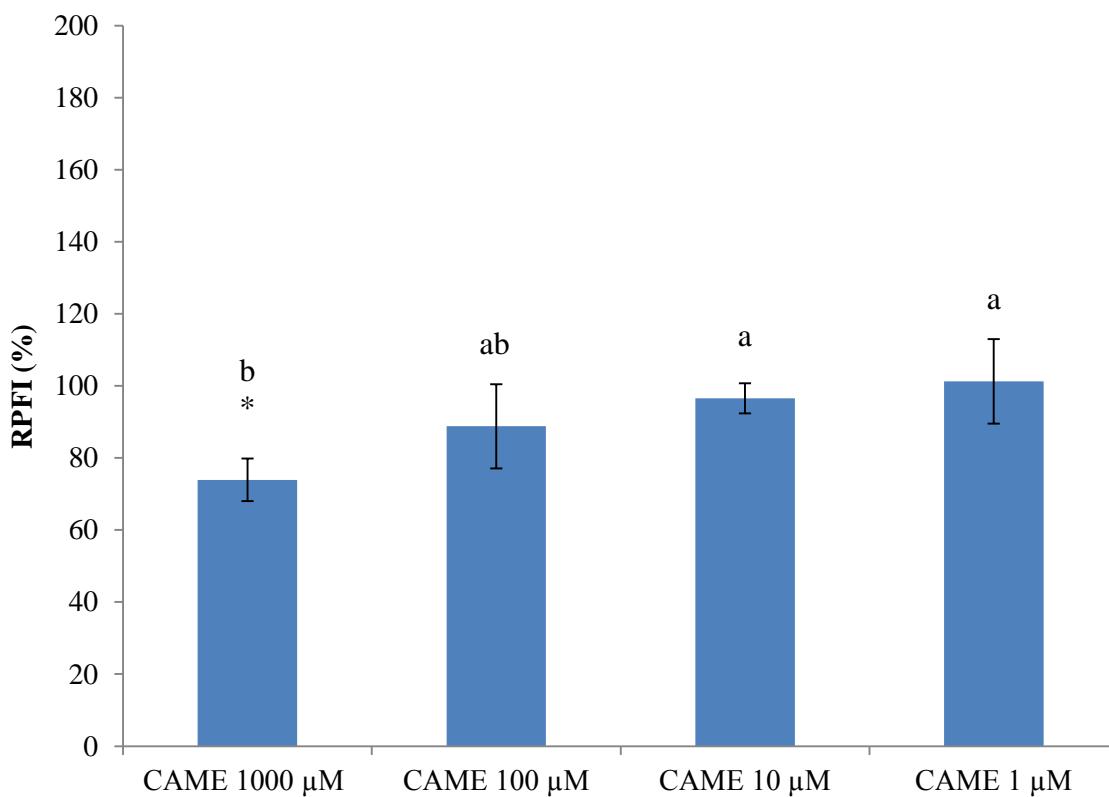
## 4 REZULTATI

V okviru magistrske naloge smo želeli s pomočjo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki smo jo uporabili kot modelni organizem, preučiti vpliv in delovanje EKK kot so CAME, CAEE, CAIPE in CAPE v celici. Kvasovko *S. cerevisiae* v stacionarni fazni rasti smo izpostavili preučevanim snovem. Zanimalo nas je, kako posamezni EKK pri različnih koncentracijah (1, 10, 100 in 1000 µM) vplivajo na znotrajcelično oksidacijo kvasnih celic. Na podlagi dobljenih rezultatov smo za nadaljnje poskuse uporabili le EKK v izbranih koncentracijah in preverili še vpliv na celično metabolno energijo. Nato smo iz njih in EIP sestavili kombinacije in še zanje preverili vpliv na znotrajcelično oksidacijo in celično metabolno energijo. Da bi preverili morebitni toksični učinek EKK na kvasovko, smo s pomočjo metode štetja kolonij na ploščah (CFU), določili, ali dodatek EKK v izbranih koncentracijah vpliva na živost oz. kultivabilnost kvasnih celic.

### 4.1 PREVERJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI POSAMEZNIH ESTROV KAVNE KISLINE, ETANOLNEGA IZVLEČKA PROPOLISA IN RAZLIČNIH KOMBINACIJ PREUČEVANIH SNOVI

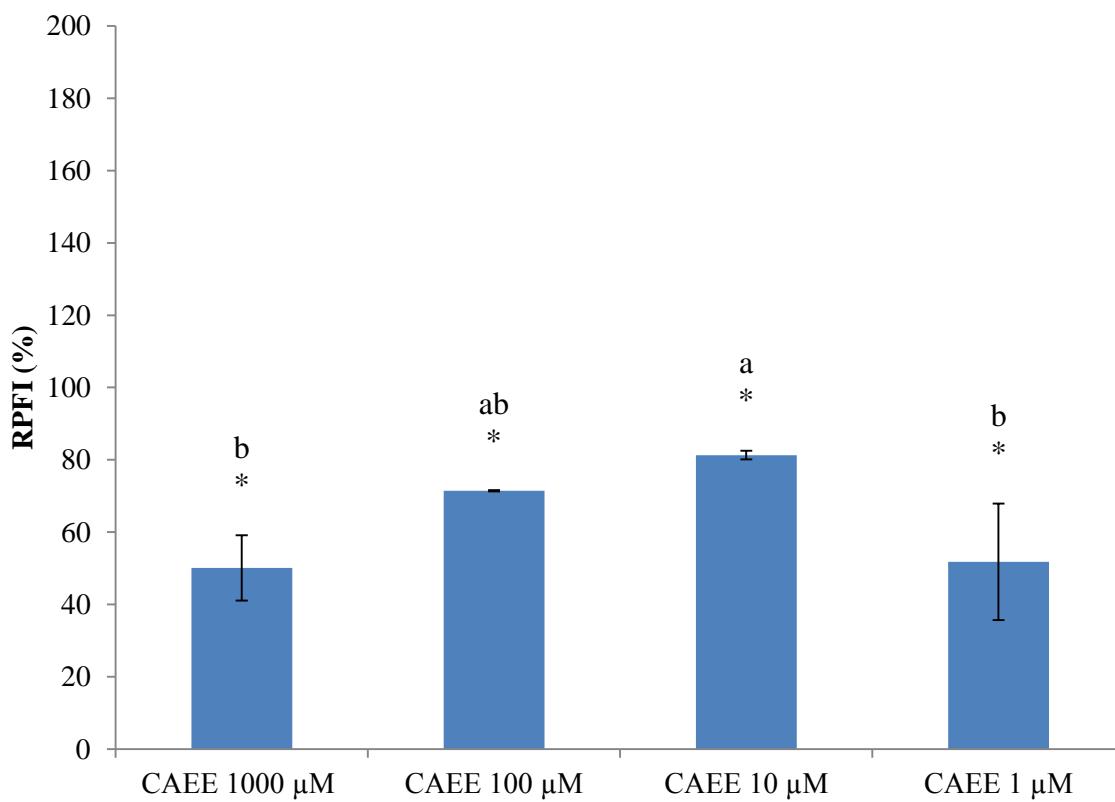
#### 4.1.1 Preverjanje antioksidativne učinkovitosti posameznih estrov kavne kisline

Preverili smo antioksidativno učinkovitost estrov kavne kisline CAME, CAEE, CAIPE in CAPE pri različnih koncentracijah (1000, 100, 10 in 1 µM). Za vsak preučevani EKK smo naredili do štiri biološke ponovitve, znotraj teh pa še tri ali več tehničnih ponovitev. Meritve smo opravili tudi za kontrolo, kjer celic kvasovke *S. cerevisiae* nismo izpostavili nobenemu od preučevanih EKK.



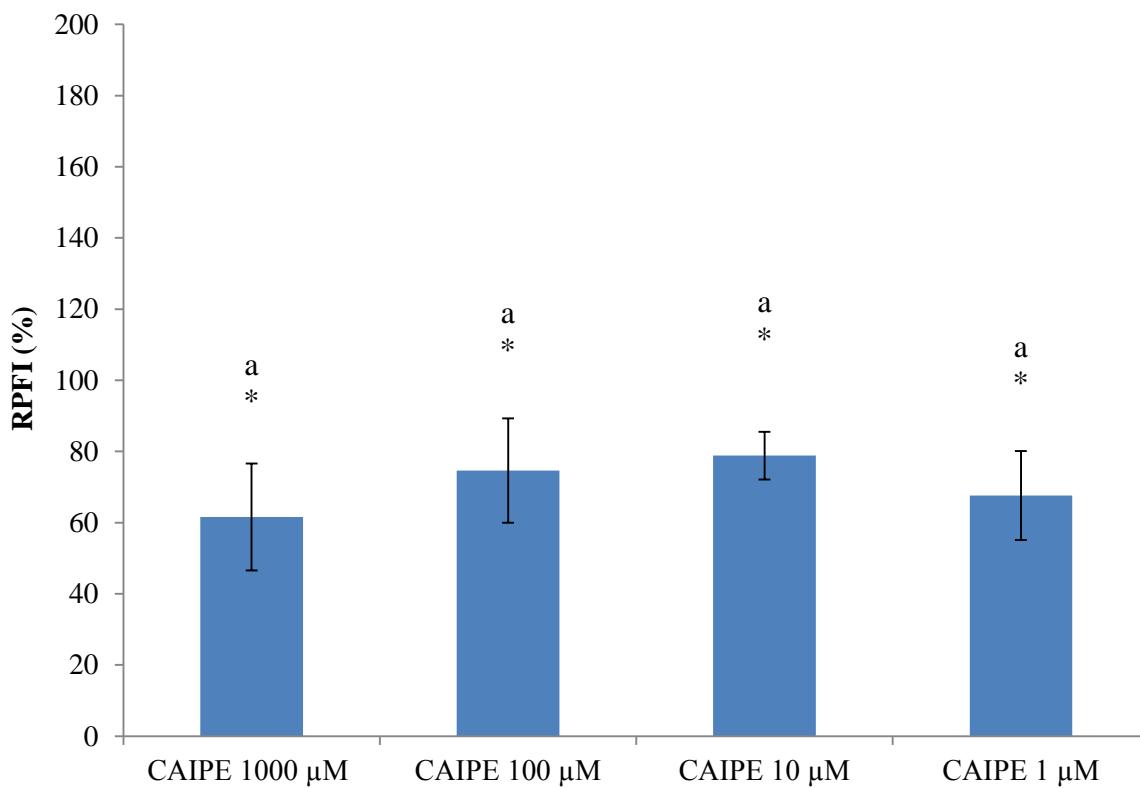
Slika 8: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estru kavne kisline CAME v koncentracijah 1000  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 1  $\mu\text{M}$ . Rezultati so izraženi kot povprečni relativni prirost fluorescenčne intenzitete (RPFI)  $\pm$  SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (\*), se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ . Vrednosti označene z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.

Ester kavne kisline CAME je pri najvišji koncentraciji (1000  $\mu\text{M}$ ) statistično značilno znižal znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae*, saj se je le-ta v primerjavi s kontrolo znižala za 26 %. Vrednosti pri nižjih koncentracijah (100, 10 in 1  $\mu\text{M}$ ) se statistično ne razlikujejo od vrednosti kontrole.



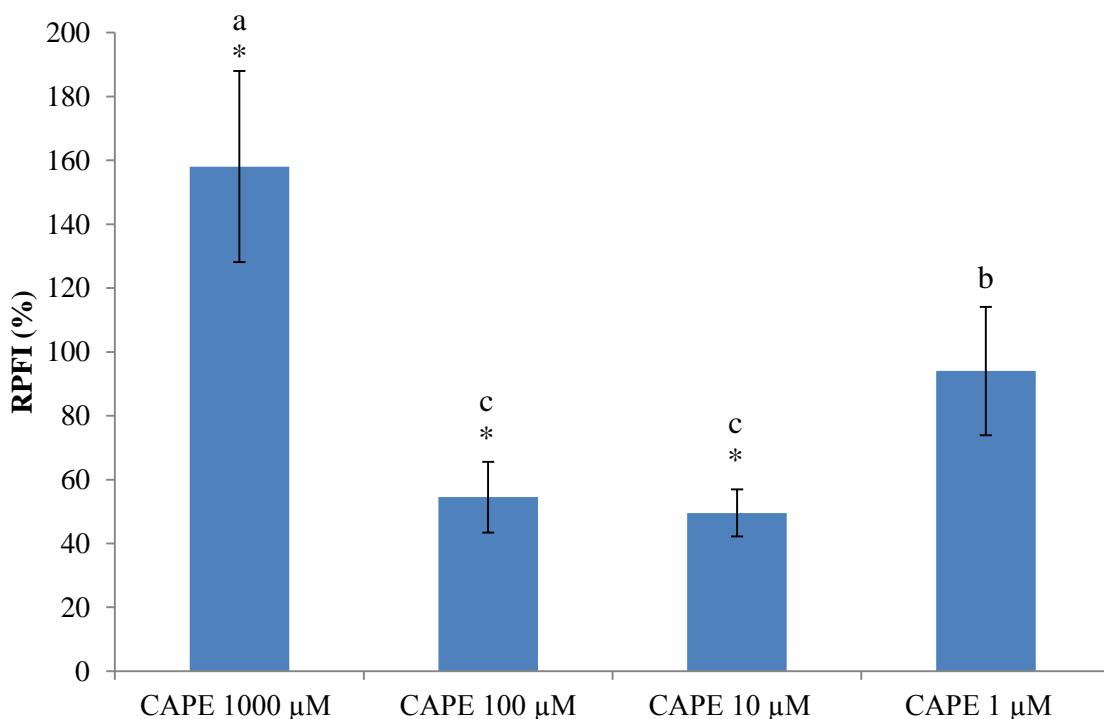
Slika 9: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estru kavne kisline CAEE v koncentracijah 1000  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 1  $\mu\text{M}$ . Rezultati so izraženi kot povprečni relativni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI)  $\pm$  SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (\*), se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ . Vrednosti označene z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.

Kot lahko vidimo na sliki 9, je CAEE pri vseh koncentracijah statistično značilno znižal znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae* glede na kontrolo. Pri najvišji (1000  $\mu\text{M}$ ) in najnižji (1  $\mu\text{M}$ ) koncentraciji je bilo znižanje v primerjavi z ostalimi preučevanimi koncentracijami največje, in sicer pri najvišji koncentraciji za 50 %, pri najnižji pa za 48 % v primerjavi s kontrolo.



Slika 10: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estru kavne kisline CAIPE v koncentracijah 1000  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 1  $\mu\text{M}$ . Rezultati so izraženi kot povprečni relativni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI)  $\pm$  SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (\*), se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ . Vrednosti označene z indeksom (a) se med seboj ne razlikujejo.

Dodatek CAIPE je pri vseh koncentracijah (1000  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 1  $\mu\text{M}$ ) povzročil znižanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *S. cerevisiae* v primerjavi s kontrolo, med posameznimi koncentracijami razlik v oksidaciji ni bilo opaziti.



Slika 11: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estru kavne kisline CAPE v koncentracijah 1000  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  in 1  $\mu\text{M}$ . Rezultati so izraženi kot povprečni relativni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI)  $\pm$  SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (\*), se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ . Vrednosti označene z različnim indeksom (a, b, c) se med seboj razlikujejo.

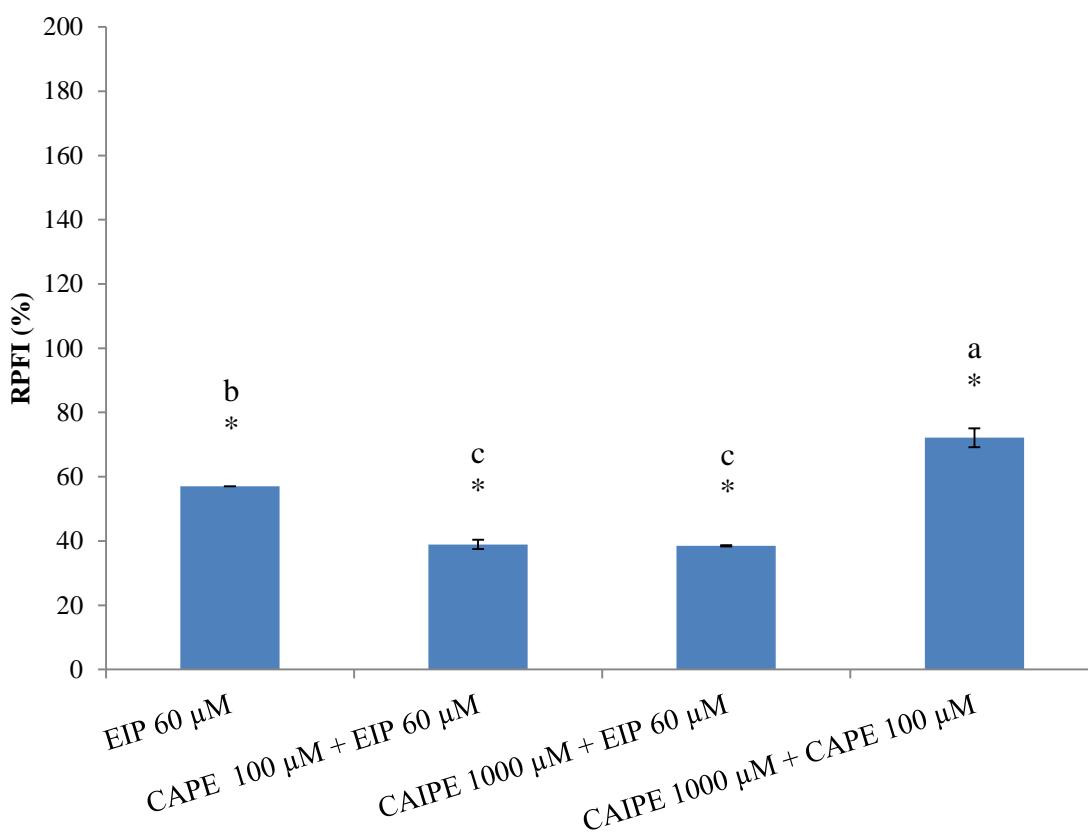
Ester kavne kisline CAPE je pri najvišji koncentraciji (1000  $\mu\text{M}$ ) statistično značilno povišal znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae* in sicer za 60 % v primerjavi s kontrolo. Iz rezultatov je razvidno, da znižanje koncentracije CAPE iz 1000  $\mu\text{M}$  na 100  $\mu\text{M}$  ali 10  $\mu\text{M}$ , povzroči statistično značilno znižanje znotrajcelične oksidacije kvasnih celic, in sicer pri 100  $\mu\text{M}$  za 46 %, pri 10  $\mu\text{M}$  pa za 50 % v primerjavi s kontrolo. Pri najnižji koncentraciji (1  $\mu\text{M}$ ) pa se vrednost znotrajcelične oksidacije ne razlikuje od vrednosti kontrole.

#### **4.1.2 Preverjanje antioksidativne učinkovitosti preučevanih snovi pri različnih kombinacijah**

Na podlagi pridobljenih rezultatov v predhodnih poskusih smo izbrali določene EKK v določenih koncentracijah in preverili antioksidativno učinkovitost njihovih kombinacij in kombinacije z EIP:

- EIP (60 µM) s CAPE (100 µM),
- EIP (60 µM) s CAIPE (1000 µM) in
- CAIPE (1000 µM) s CAPE (100 µM).

Za vsako kombinacijo preučevanih snovi smo izvedli tri biološke ponovitve, znotraj teh pa največ tri tehnične ponovitve. Meritve smo opravili tudi za kontrolo, kjer celic kvasovke *S. cerevisiae* nismo izpostavili nobeni od kombinacij preučevanih snovi.



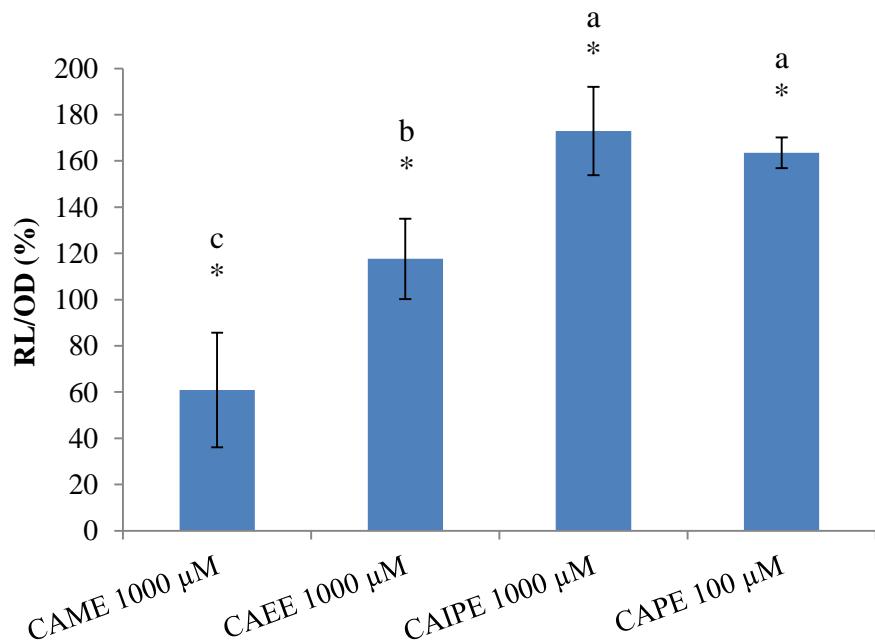
Slika 12: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP) (60 µM), kombinaciji izbranih estrov kavne kisline z EIP (60 µM) ter kombinaciji izbranih EKK v določenih koncentracijah. Rezultati so izraženi kot povprečni relativni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI) ± SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (\*), se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ . Vrednosti označene z različnim indeksom (a, b, c) se med seboj razlikujejo.

Po dodatku 60 µM EIP in vseh izbranih kombinacij je v primerjavi s kontrolo prišlo do znižanja znotrajcelične oksidacije pri kvasovki *S. cerevisiae*. Zato lahko trdimo, da imajo EIP (60 µM) in vse izbrane kombinacije antioksidativno aktivnost. EIP je pri koncentraciji 60 µM statistično značilno znižal znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovke *S. cerevisiae* za 43 % v primerjavi s kontrolo. Kombinaciji CAIPE (1000 µM) z EIP (60 µM) ter CAPE (100 µM) z EIP (60 µM) sta se izkazali kot kombinaciji z najmočnejšo antioksidativno učinkovitostjo in se statistično značilno razlikujeta od ostalih preučevanih spojin ter kombinacij. Znotrajcelična oksidacija kvasovke se je pri obeh kombinacijah znižala za 61 % v primerjavi s kontrolo. Dodatek kombinacije CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM) pa je znotrajcelično oksidacijo kvasnih celic statistično znižal najmanj, in sicer za 28 % v primerjavi s kontrolo.

## 4.2 DOLOČANJE CELIČNE METABOLNE ENERGIJE KVASOVKE

### 4.2.1 Določanje celične metabolne energije kvasovke po izpostavitvi posameznim estrom kavne kisline

Preverili smo celično metabolno energijo kvasovke *S. cerevisiae* po izpostavitvi estrom kavne kisline CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM). Za vsak preučevani EKK pri izbranih koncentracijah, smo naredili do štiri biološke ponovitve, znotraj teh pa še tri ali več tehničnih ponovitev. Meritve smo opravili tudi za kontrolo, kjer celic kvasovke nismo izpostavili nobenemu od preučevanih EKK.



Slika 13: Celična metabolna energija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estrom kavne kisline CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM). Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti L/OD (RL/OD) ± SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (\*), se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ . Vrednosti označene z različnim indeksom (a, b, c) se med seboj razlikujejo.

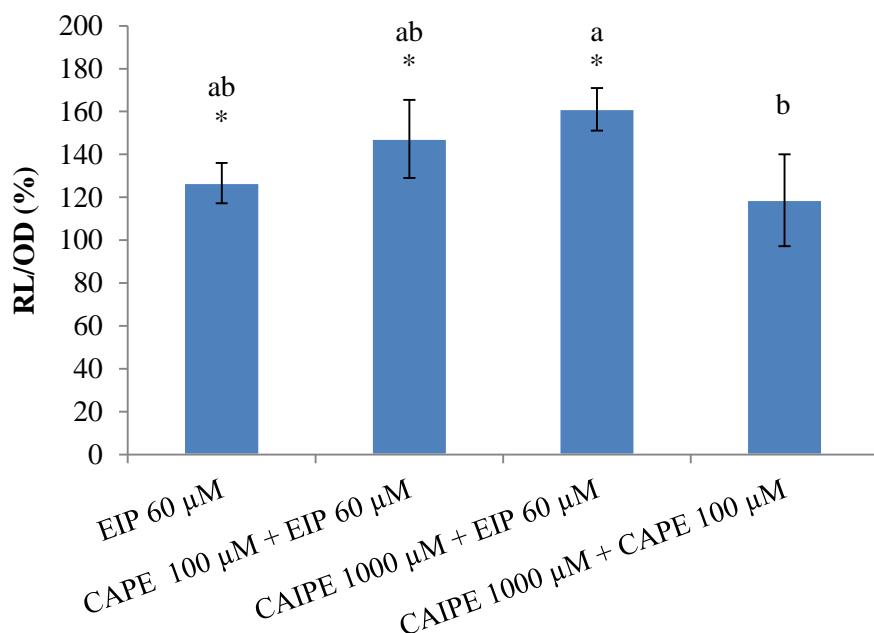
Kot lahko vidimo na sliki 13, se je celična metabolna energija celic kvasovke po izpostavitvi CAME (1000 µM) najbolj znižala, in sicer za 39 % v primerjavi s kontrolo in se statistično značilno razlikuje od vseh ostalih preučevanih spojin pri izbranih koncentracijah. Pri CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM) pa smo v primerjavi s CAME (1000 µM) izmerili višjo raven ATP, kar nakazuje na višjo metabolno aktivnost kvasnih celic v primerjavi s kontrolo. S slike 13 je razvidno, da CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM) v primerjavi s CAME (1000 µM) in CAEE (1000 µM) najbolj povišata celično metabolno energijo, saj se je le-ta v primerjavi s kontrolo povečala za 73 % in 64 %.

#### 4.2.2 Določanje celične metabolne energije kvasovke po izpostavitvi različnim kombinacijam preučevanih snovi

Na podlagi pridobljenih rezultatov v predhodnih poskusih smo izbrali določene EKK v določenih koncentracijah in preverili vpliv na celično metabolno energijo njihovih kombinacij in kombinacije z EIP:

- EIP (60 µM) s CAPE (100 µM),
- EIP (60 µM) s CAIPE (1000 µM) in
- CAIPE (1000 µM) s CAPE (100 µM).

Za vsako kombinacijo preučevanih snovi smo izvedli tri biološke ponovitve, znotraj teh pa največ tri tehnične ponovitve. Meritve smo opravili tudi za kontrolo, kjer celic kvasovke *S. cerevisiae* nismo izpostavili nobeni od kombinacij preučevanih snovi.

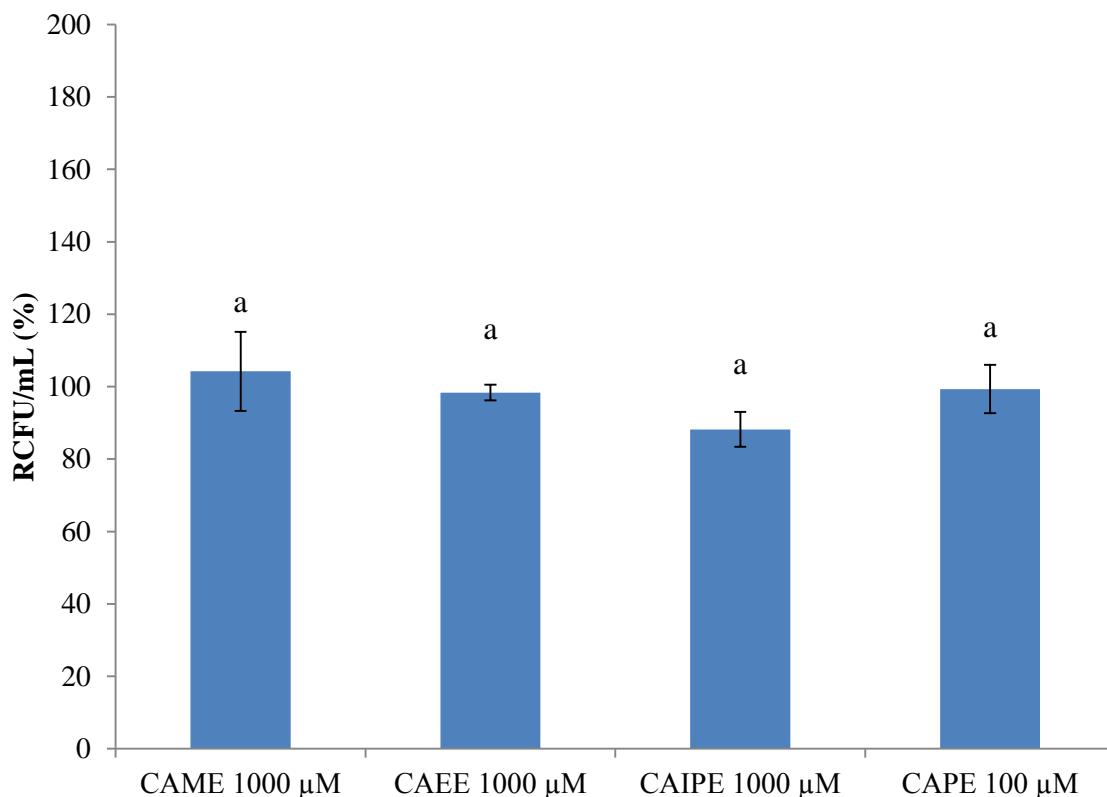


Slika 14: Celična metabolna energija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP) (60 µM), kombinaciji izbranih estrov kavne kisline (EKK) z EIP (60 µM) ter kombinaciji EKK v določenih koncentracijah. Rezultati so izraženi kot relativne vrednosti L/OD (RL/OD) ± SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (\*), se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ . Vrednosti označene z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.

Izkazalo se je, da so tako EIP (60 µM) kot kombinaciji CAPE (100 µM) z EIP in CAIPE (1000 µM) z EIP statistično značilno povečali celično metabolno energijo kvasovke *S. cerevisiae* v primerjavi s kontrolo in da med njimi ni statističnih razlik. Po dodatku kombinacije CAIPE (1000 µM) s CAPE (100 µM) se celična metabolna energija ni razlikovala od vrednosti kontrole.

#### 4.3 PREVERJANJE ŽIVOSTI/KULTIVABILNOSTI KVASNICH CELIC

Z metodo štetja kolonij na ploščah (CFU) smo žeeli preveriti, kako estri kavne kisline CAME, CAEE, CAIPE in CAPE v izbranih koncentracijah, določenih v predhodnih poskusih, vplivajo na živost oz. kultivabilnost celic kvasovke *S. cerevisiae*.



Slika 15: Določanje živosti/kultivabilnosti celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estrom kavne kisline CAME (1000  $\mu\text{M}$ ), CAEE (1000  $\mu\text{M}$ ), CAIPE (1000  $\mu\text{M}$ ) in CAPE (100  $\mu\text{M}$ ). Rezultati so izraženi kot relativni CFU (RCFU)/mL  $\pm$  SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (\*), se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri  $p \leq 0,05$ . Vrednosti označene z indeksom (a) se med seboj ne razlikujejo.

Pridobljeni rezultati kažejo, da se živost oz. kultivabilnost kvasnih celic po dodatku estrov kavne kisline CAME, CAEE in CAIPE (1000  $\mu\text{M}$ ) ne razlikuje od vrednosti kontrole. Prav tako med posameznimi EKK ni statistično značilnih razlik.

## 5 RAZPRAVA

V skladu s hipotezami magistrske naloge smo preučili vpliv in delovanje EKK, kot so CAME, CAEE, CAIPE in CAPE na kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* na celični ravni. Raziskali smo, kako posamezni EKK pri določenih koncentracijah vplivajo na znotrajcelično oksidacijo in celično metabolno energijo kvasnih celic. Na podlagi dobljenih rezultatov smo sestavili kombinacije EKK v izbranih koncentracijah in EIP ter še zanje preverili vpliv na znotrajcelično oksidacijo in raven ATP kvasovke. Da bi preverili morebitni toksični učinek EKK v izbranih koncentracijah na kvasovko, smo s CFU določili živost oz. kultivabilnost kvasnih celic.

Petelinc in sod. (2013b) so preučevali aktivnosti EIP v kvasovki *S. cerevisiae* in identificirali posamezne fenolne spojine v njem. Preverili so tudi celični privzem posameznih fenolnih spojin EIP in ugotovili, da izmed vseh v celice kvasovk po 2-urni izpostavitvi vstopijo le določeni EKK, in sicer: CAPE, CABE (benzilni ester kavne kisline) in CACE (cinamilni ester kavne kisline), katerim so pripisovali biološke aktivnosti propolisa.

Na podlagi teh ugotovitev smo žeeli preveriti delovanje še ostalih v naravi prisotnih EKK, osredotočili smo se na EKK: CAME, CAPE, CAEE in CAIPE. Nekateri od njih so iz literature poznani po biološkem in farmakološkem delovanju, kot so antioksidativno, protitumorsko, antiproliferativno, imunomodulatorno, protivnetno, imunostimulativno, proti-mutageno, kemopreventivno delovanje, itd. (Banskota in sod., 2001; Fiуza in sod., 2004; Akyol in sod., 2013; Wu in sod., 2007). Raziskave delovanja EKK v celici so redke, sploh pa je preučevanje kombinacij posameznih EKK ali kombinacij EKK s propolisom slabo poznano.

Kvasovko *S. cerevisiae* smo izpostavili posameznim EKK (CAME, CAPE, CAIPE in CAEE) v različnih koncentracijah (1000, 100, 10 in 1  $\mu\text{M}$ ) in skladno z delovnimi hipotezami najprej preverili njihov vpliv na znotrajcelično oksidacijo. Tako je iz rezultatov (Slika 8-11) mogoče razbrati, da so EKK v preučevanih koncentracijah v večji meri pokazali antioksidativno delovanje v kvasnih celicah, izjema je bil CAPE v koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$ , kjer smo opazili povišano znotrajcelično oksidacijo v primerjavi s kontrolo (za 58 %). Znano je, da eksogeni antioksidanti pri višjih koncentracijah povzročijo povišanje v znotrajcelični oksidaciji (Bouayed in Bohn, 2012). Izmed vseh preučevanih EKK in koncentracij se je po tretiranju celic znotrajcelična oksidacija najbolj znižala pri CAPE (100  $\mu\text{M}$  za 45 % in 10  $\mu\text{M}$  za 50 %), ter CAEE (1000  $\mu\text{M}$  za 50 % in 1  $\mu\text{M}$  za 48 %). Odvisnost ravni oksidacije v celicah od koncentracije EKK v testiranem koncentracijskem območju je bila najbolj razvidna pri CAPE in delno pri CAEE ter CAME. Ob primerjanju delovanja preučevanih EKK je moč opaziti, da zlasti CAPE pri koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$ , različno vpliva na znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae* v primerjavi z delovanjem ostalih preučevanih EKK pri isti koncentraciji. Razlog za to bi lahko pripisali njihovi kemijski strukturi. EKK so si med seboj kemijsko

precej podobni, razlikujejo se le v funkcionalnih skupinah. CAPE se izmed vseh preučevanih EKK v kemijski strukturi funkcionalne skupine najbolj razlikuje, medtem, ko gre pri ostalih preučevanih EKK le za manjše razlike v funkcionalnih skupinah. Vsaka strukturna sprememba EKK lahko namreč povzroči velike spremembe v njihovi aktivnosti (Fiuza in sod., 2004).

EKK zaradi svoje lipofilnosti zlahka prehajajo v notranjost celice in lahko kot antioksidanti delujejo še bolj učinkovito (Fiuza in sod., 2004). Po ugotovitvah Jayapraksam in sod. (2006) naj bi bili EKK z daljšimi alkilnimi verigami ( $C_{16}$ - $C_{22}$ ) bolj lipofilni in boljši antioksidanti kot EKK s krajsimi alkilnimi verigami ( $C_4$ - $C_8$ ). Silva in sod. (2000) pa so pokazali, da daljšanje alkilnih verig (metil → propil) kemijsko sintetiziranih EKK ni vplivalo na izboljšanje njihove antioksidativne učinkovitosti. Boljše poznavanje strukturnih in kemijskih lastnosti EKK bi omogočilo boljše razumevanje povezave med njihovo strukturo in biološko aktivnostjo (Fiuza in sod., 2004). Modifikacija kemijske strukture bi se lahko zgodila tudi tekom tretiranja s strani kvasovk, kar bi se ravno tako odrazilo v različnem delovanju EKK.

Na podlagi pridobljenih rezultatov vpliva preučevanih EKK (CAME, CAEE, CAIPE in CAPE) na znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae* smo za nadaljnje poskuse uporabili le EKK v izbranih koncentracijah: CAME pri 1000  $\mu\text{M}$ , CAEE pri 1000  $\mu\text{M}$ , CAIPE pri 1000  $\mu\text{M}$  in CAPE pri 100  $\mu\text{M}$  ter izmerili njihov vpliv na celično metabolno energijo kvasovke *S. cerevisiae* (Slika 13). Preverili smo tudi, kako je sprememba znotrajcelične oksidacije povezana s spremembami ravni ATP v kvasovki. Metabolna aktivnost pri CAME (1000  $\mu\text{M}$ ) se je v primerjavi s kontrolo statistično značilno znižala. Pri isti koncentraciji pa CAME statistično značilno zmanjša znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae* v primerjavi s kontrolo (Slika 8). Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da CAME (1000  $\mu\text{M}$ ) za svojo antioksidativno aktivnost potrebuje celično energijo, kar pa se kaže v manjši ravni izmerjene ATP v primerjavi s kontrolo. Morda CAME pri kvasovki *S. cerevisiae* inducira lastne endogene antioksidativne sisteme, za kar je potrebna celična energija in posledično pride do zmanjšanja ravni ATP. Vendar je pri tem potrebno poudariti, da se raven ATP v celici ni znižala toliko, da bi to vplivalo na živost oz. kultivabilnost kvasnih celic, saj se le-ta v primerjavi s kontrolo ni zmanjšala (Slika 15). V primeru dodatka CAEE (1000  $\mu\text{M}$ ), CAIPE (1000  $\mu\text{M}$ ) in CAPE (100  $\mu\text{M}$ ) pa se je metabolna aktivnost kvasovke *S. cerevisiae* statistično značilno povečala v primerjavi s kontrolo. Nasprotno pa smo pri omenjenih EKK opazili zmanjšano znotrajcelično oksidacijo kvasovke v primerjavi s kontrolo (Slika 9, 10 in 11).

Delovanje in vpliv EKK na znotrajcelično oksidacijo in celično metabolno energijo kvasovke *S. cerevisiae* v kombinaciji z drugimi EKK ali z EIP je manj poznano. Za preučevanje vpliva kombinacij smo izbrali CAPE (100  $\mu\text{M}$ ) in CAIPE (1000  $\mu\text{M}$ ). Zanj smo se odločili zato, ker oba statistično značilno znižata znotrajcelično oksidacijo in najbolj povišata raven ATP kvasnih celic v primerjavi s kontrolo.

Celično suspenzijo kvasovke *S. cerevisiae* smo izpostavili EIP (60 µM), kombinacijam posameznega EKK z EIP (CAPE 100 µM + EIP 60 µM ter CAIPE 1000 µM + EIP 60 µM) in kombinaciji dveh izbranih EKK (CAIPE 1000 µM + CAPE 100 µM). Predhodna študija je pokazala, da EIP pri koncentraciji 60 µM ekvivalentov galne kisline (GAE) po 2h urah izpostavitve zniža znotrajcelično oksidacijo kvasnih celic za približno 45 % v primerjavi s kontrolo (Petelinc in sod., 2013b).

S slike 12 je razvidno, da kombinaciji CAPE (100 µM) z EIP (60 µM) in CAIPE (1000 µM) z EIP (60 µM) v primerjavi s kontrolo statistično enako in najbolj prispevata k znižanju znotrajcelične oksidacije (za 61 %) in tako še dodatno znižata oksidacijo v celicah v primerjavi z delovanjem samo EIP (60 µM). Sklepamo, da so v EIP prisotne kemijske spojine, ki sinergistično reagirajo z izbranim EKK (CAPE ali CAIPE) in pripomorejo k dodatnemu znižanju znotrajcelične oksidacije kvasnih celic. Do enakih spoznanj so pri preučevanju antioksidativne aktivnosti EIP z in brez CAPE prišli tudi Russo in sod. (2002), kjer so dokazali, da je EIP s CAPE pokazal višjo antioksidativno aktivnost kot brez CAPE. Od vseh preučevanih EKK je CAPE zaradi svoje kompleksne kemijske strukture s srednjem dolgo alkilno verigo ključna komponenta EIP in izrazit antioksidant.

Po izpostavitvi celic samo kombinaciji CAIPE (1000 µM) s CAPE (100 µM) pa se je znotrajcelična oksidacija znižala manj kot pri EIP (60 µM) oz. posameznem EKK, in sicer le za 28 %. Tudi pri preverjanju celične metabolne energije v kvasnih celicah, izpostavljenih kombinacijam, je pri vseh, razen pri kombinaciji CAIPE (1000 µM) s CAPE (100 µM), ki se ni razlikovala od vrednosti kontrole, prišlo do statistično značilnega povečanja metabolne aktivnosti in do statistično značilnega znižanja znotrajcelične oksidacije kvasnih celic v primerjavi s kontrolo (Slika 14). Povečana raven ATP in zmanjšana znotrajcelična oksidacija pri CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM) ter pri preučevanih kombinacijah (Slika 13 in 14), je morda povezana s pospešeno porabo kisika in manjšo proizvodnjo ROS. EKK lahko naredijo prenašalce elektronov mitohondrijske respiratorne verige bolj učinkovite, pri čemer ne pride do takoj velikega puščanja elektronov. Povečana respiratorna zmogljivost omogoča hitrejši tok elektronov in tako zmanjšanje tvorbe ROS (Cadenas in Davies, 2000). Če primerjamo kombinacije CAPE (100 µM) z EIP (60 µM), CAIPE (1000 µM) z EIP (60 µM) in CAPE (100 µM) z CAIPE (1000 µM) pri vplivu na celično metabolno energijo, ugotovimo, da v primerjavi z EIP (60 µM) ni sprememb.

Za preverjanje morebitnih toksičnih učinkov izbranih koncentracij EKK smo izmerili živost oz. kultivabilnost celic kvasovke *S. cerevisiae*. Pridobljeni rezultati kažejo, da EKK na kultivabilnost kvasnih celic nimajo vpliva, saj se vrednosti statistično značilno ne razlikujejo od vrednosti kontrole (Slika 15).

S pridobljenimi rezultati magistrske naloge smo potrdili hipotezo o različnem vplivu EKK na znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae*. Delno smo potrdili hipotezo, da bo vpliv EKK na znotrajcelično oksidacijo odvisen od njihove koncentracije, saj je bila odvisnost razvidna pri CAPE in delno pri CAEE in CAME. EKK so različno vplivali na raven ATP. Vpliv kombinacij izbranih EKK in/ali EIP na znotrajcelično oksidacijo pa je bil drugačen, ko so bile celice izpostavljene samo EIP ali posameznim EKK, medtem ko se raven ATP v kvasnih celicah pri kombinacijah EKK z EIP ni razlikovala od izpostavitev samo EIP.

## 6 SKLEPI

- Preučevani EKK so v večji meri znižali znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae*, izjema je bil CAPE, ki je pri 1000  $\mu\text{M}$  koncentraciji, znotrajcelično oksidacijo v primerjavi s kontrolo povišal.
- Vpliv preučevanih EKK na znotrajcelično oksidacijo v kvasnih celicah je odvisen od koncentracije pri CAPE in delno pri CAEE in CAME.
- Vpliv CAPE na znotrajcelično oksidacijo kvasovke *S. cerevisiae* je pri koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$  različen od vpliva ostalih preučevanih EKK pri isti koncentraciji.
- Izbrani EKK so v določenih koncentracijah v večji meri povišali celično metabolno energijo kvasnih celic v primerjavi s kontrolo, izjema je bil CAME v koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$ , kjer se je celična metabolna energija znižala.
- Kombinacija izbranih EKK (CAPE pri 100  $\mu\text{M}$  in CAIPE pri 1000  $\mu\text{M}$ ) z EIP (60  $\mu\text{M}$ ) je še dodatno pripomogla k znižanju znotrajcelične oksidacije v primerjavi z delovanjem posameznih EKK ali samo EIP (60  $\mu\text{M}$ ).
- Kombinacija izbranih EKK (CAPE pri 100  $\mu\text{M}$  in CAIPE pri 1000  $\mu\text{M}$ ) z EIP (60  $\mu\text{M}$ ) ni povzročila sprememb v celični metabolni energiji kvasnih kvasovke v primerjavi z delovanjem samo EIP (60  $\mu\text{M}$ ).
- EKK v izbranih koncentracijah na živost oz. kultivabilnost kvasovke *S. cerevisiae* nimajo vpliva.

## 7 POVZETEK

V okviru magistrske naloge smo s pomočjo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki smo jo uporabili kot modelni organizem, preverili vpliv in delovanje estrov kavne kisline (EKK) na celični ravni. Raziskali smo, kako posamezni EKK, kot so CAME (metilni ester kavne kisline), CAEE (etilni ester kavne kisline), CAIPE (izopropilni ester kavne kisline) in CAPE (fenetilni ester kavne kisline) vplivajo na znotrajcelično oksidacijo kvasnih celic v stacionarni fazi rasti. Kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 2155 smo inkubirali v pufru PBS pri 28 °C in 220 obr./min ter jo izpostavili preučevanim snovem v koncentracijah 1000, 100, 10 in 1 µM. Po 2-urni izpostavitvi smo izmerili znotrajcelično oksidacijo z uporabo barvila 2',7'-diklorofluorescein diacetat. Izkazalo se je, da so EKK v preučevanih koncentracijah v večji meri znižali znotrajcelično oksidacijo kvasnih celic, izjema je bil CAPE v koncentraciji 1000 µM, kjer smo opazili povišano znotrajcelično oksidacijo v primerjavi s kontrolo. Odvisnost znotrajcelične oksidacije kvasovk od koncentracije EKK je bila razvidna pri CAPE in delno pri CAEE in CAME. Ob primerjanju delovanja preučevanih EKK je moč opaziti, da je vpliv CAPE na znotrajcelično oksidacijo kvasovke pri koncentraciji 1000 µM, različen od ostalih EKK pri isti koncentraciji. To bi lahko pripisali razlike v kemijski strukturi njegove funkcionalne skupine od ostalih preučevanih EKK. V nadalnjih poskusih smo preverili, kako EKK CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM) vplivajo na raven ATP v kvasnih celicah in prišli do ugotovitve, da so EKK v izbranih koncentracijah v večji meri povišali celično metabolno energijo kvasovke, izjema je bil CAME v koncentraciji 1000 µM, kjer se je celična metabolna energija kvasnih celic znižala v primerjavi s kontrolo. Celično suspenzijo kvasovke *S. cerevisiae* smo nato izpostavili tudi kombinacijam posameznih EKK z EIP (CAPE 100 µM + EIP 60 µM ter CAIPE 1000 µM + EIP 60 µM) in kombinaciji dveh izbranih EKK (CAIPE 1000 µM + CAPE 100 µM). Opazili smo, da sta kombinaciji EIP (60 µM) s CAPE (100 µM) in EIP (60 µM) s CAIPE (1000 µM) pripomogli k dodatnemu znižanju znotrajcelične oksidacije kvasnih celic v primerjavi z delovanjem EIP (60 µM) ali posameznih EKK ter nista povzročili sprememb v celični metabolni energiji kvasnih celic v primerjavi z EIP (60 µM). Da bi preverili morebitni toksični učinek EKK na kvasovko, smo s pomočjo metode štetja kolonij na ploščah (CFU) določili, ali dodatek preučevanih EKK v izbranih koncentracijah vpliva na živost oz. kultivabilnost kvasnih celic. Rezultati, ki smo jih pri tem pridobili kažejo, da EKK na kultivabilnost kvasovke *S. cerevisiae* nimajo vpliva.

## 8 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. Oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsvo: 23-32
- Ahmed F., Mullaly M., Muhammed A., Saleem A., Arnason J.T. GABA<sub>A</sub> activity of Q'eqchi' plants for neurological disorders: potential sources of natural anti-epileptic and anxiolytic drugs. Centre for Advanced Resarch in Environmental Genomics (CAREG), University of Ottawa: 1 str.  
[http://science.uottawa.ca/biology/sites/science.uottawa.ca.biology/files/fida\\_al\\_noor\\_ahmed\\_poster.pdf](http://science.uottawa.ca/biology/sites/science.uottawa.ca.biology/files/fida_al_noor_ahmed_poster.pdf) (marec 2016)
- Ahn M., Kumazawa S., Usui Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F., Nakayama T. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. Food Chemistry, 101: 1383-1392
- Akyol S., Ginis Z., Armutcu F., Ozturk G., Yigitoglu M.R. Akyol O. 2012. The potential usage of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against chemotherapy-induced and radiotherapy-induced toxicity. Cell Biochemistry and Function, 30, 5: 438-443
- Akyol S., Ozturk G., Ginis Z., Armutcu F., Yigitoglu M.R., Akyol O. 2013. *In vivo* and *in vitro* antineoplastic actions of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Therapeutic perspectives. Nutrition and Cancer, 65, 4: 515-526
- Atlas R.M., Lawrence P. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press: 1079 str.
- Awad R., Ahmed F., Bourbonnais-Spear N., Mullaly M., Ta C.A., Tang A., Merali Z., Maquin P., Caal F., Cal V., Poveda L., Vindas P.S., Trudeau V.L., Arnason J.T. 2009. Ethnopharmacology of Q'eqchi' Maya antiepileptic and anxiolytic plants: Effects on the GABAergic system. Journal of Ethnopharmacology, 125: 257-264
- Bankova V.S., De Castro S.L., Marcucci M.C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 31: 3-15
- Banskota A., Tezuka Y., Kadota S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytoremediation Research, 15: 561-571
- Batič M., Raspor P. 2000. Kvasna biomasa kot vir antioksidativnih snovi. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. Oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? Metabolism, 49, 2: 3-8

Boselli E., Bendia E., Lecce G., Benedetti A., Frega N. 2009. Ethyl caffeate from Verdicchio wine: Chromatographic purification and *in vivo* evaluation of its antifibrotic activity. *Journal of Separation Science*, 32: 3585-3590

Bouayed J., Bohn T. 2012. Dietary derived antioxidants: implications on health. V: Nutrition, well-being and health. Bouayed J. (ed.). Rijeka, InTech: 1-22

Božnar M. 2002. Zaklad iz čebeljega panja. Ljubljana, Kmečki glas: 31-33

Burdock G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363

Cadenas E., Davies K.J.A. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29: 222-230

Cayman Europe. 2015. Cayman's european gateway: 1 str.  
<http://www.caymaneurope.com/app/template/Product.vm/catalog/17873/a/z;jsessionid=F E7595A14CC55AF172364C2964F8E96E> (januar 2015)

Celli N., Dragani L., Murzilli S., Pagliani T., Poggi A. 2007. *In vitro* and *in vivo* stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioactive compound of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 3398-3407

Chiang Y.M., Lo C.P., Chen Y.P., Wang S.Y., Yang N.S., Kuo Y.H., Shyur L.F. 2005. Ethyl caffeate suppresses NF-κB activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE<sub>2</sub> *in vitro* or in mouse skin. *British Journal of Pharmacology*, 146: 352-363

Cigut T., Polak T., Gašperlin L., Raspor P., Jamnik P. 2011. Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 11449-11455

Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 217-246

Dalton. 2015. Dalton Pharma Services, A leading pharmaceutical contract manufacturing company: 1 str.  
[http://www.dalton.com/prod\\_name/845883-03-6.aspx](http://www.dalton.com/prod_name/845883-03-6.aspx) (januar 2014)

Devasagayam T.P., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52: 794-804

Falcao S.I., Vilas-Boas M., Estevinho L.M., Barros C., Domingues M.R.M., Cardoso S.M. 2010. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396: 887-897

Fiúza S.M. Gomes C., Teixeira L.J., Cruz M.T., Cordeiro M.N.D.S., Milhazes N., Borges F., Marques M.P.M. 2004. Phenolic acid derivates with potential anticancer properties – a structure-activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12: 3581-3589

Gocer H., Gulcin I. 2011. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 8: 821-825

Guthrie C., Fink G.R. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* (Volume 194), Academic Press: 933 str.

Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16: 33-50

Halliwell B., Gutteridge J. 2007. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford, University Press: 704 str.

Huang W.Y., Cai Y.Z., Zhang Y. 2010. Natural phenolic compounds from medical herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62,1: 1-20

Ikner A., Shiozaki K. 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutation Research*, 1,2: 13-27

Ishige K., Schubert D., Sagara Y. 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 4: 433-446

Jakubowski W., Bilinski T., Bartosz G. 2000. Oxidation stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 5: 659-664

Jayapraksam B., Vanisree M., Zhang Y., Dewitt D.L., Nair M.G. 2006. Impact of alkyl esters of caffeic acid and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme and lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 5375-5381

Jung B., Kim M., Kim H.A., Kim D., Yang J., Her S., Song Y.S. 2010. Caffeic acid phenethyl ester, a component of beehive propolis, is a novel selective estrogen receptor modulator. *Phytotherapy Resarch*, 24: 295-300

Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. PloS one, 6, 2, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0016015: 10 str.

Klausing J.E., Kamendulis L.M. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 44:239-267

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. Oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. Druga dopolnjena izdaja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.

Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chemistry, 84: 329-339

Kuropatnicki A.K., Szliszka E., Krol W. 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2013, doi:10.1155/2013/964149: 11 str.

LeBlanc L.M, Pare A.F., Francois J.J., Hebert M.J.G., Surette M.E., Touaiba M. 2012. Molecules, 17, 12: 14637-14650

Lee S.P., Jun G. Yoon E., Park S., Yang C. 2001. Inhibitory effect of methyl caffeoate on Fos-Jun-DNA complex formation and suppression of cancer cell growth. Bulletin of the Korean Chemical Society, 22, 10: 1131-1135

Lim D.Y., Lee M., Shin S.H., Chen H., Ryu J., Shan L., Li H., Bode A.M., Zhang W., Dong Z. 2014. (+)-2-(1-Hydroxyl-4-oxocyclohexyl) ethyl caffeoate suppresses solar UV-induced skin carcinogenesis by targeting PI3-K, ERK1/2 and p38. Cancer Prevention Research, 7, 8: 856-865

Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews, 4, 8: 118-126

Longo V.D., Gralla E.B., Valentine J.S. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 271: 12275-12280

Lotfy M. 2006. Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 7: 22-31

- Ma D. 2001. Applications of yeast in drug discovery. V: Progress in drug research. Jucker E. (ed.). Basel, Birkhäuser, 57: 117-162
- Marcucci M.C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, 26: 83-99
- Marder M., Viola H., Wasowski C., Wolfman C., Waterman P.G., Medina J.H., Paladini A.C. 1996. Cirsiliol and caffeic acid ethyl ester, isolated from *Salvia guaranitica*, are competitive ligands for the central benzodiazepine receptors. Phytomedicine, 3, 1: 29-31
- Medana C., Carbone F., Aigotti R., Appendino G., Baiocchi C. 2008. Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS. Phytochemical Analysis, 19: 32-39
- Meglič M. 2004. Čebelji pridelki. Pridobivanje in trženje. Brdo pri Lukovici, Čebelarska zveza Slovenije: 57-64
- Menacho-Marquez M., Murguia J.R. 2007. Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. Clinical and Translational Oncology, 9: 221-228
- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P. in Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. Molecular Microbiology, 194: 651-658
- Okutan H., Ozcelik N., Yilman R.H., Uz E. 2004. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. Clinical Biochemistry, 38: 191-196
- Pandey K.B., Rizvi S.I. 2009. Plant polypenols as dietary antioxidants in human health and disease, Oxidative Medicine Cellular Longevity, 2, 5: 270-278
- Paškulin R., Jamnik P., Obermajer N., Slavić M., Štrukelj B. 2010. Induction of energy metabolism related enzymes in yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ibogaine is adaption to acute decrease in ATP energy pool. European Journal of Pharmacology, 627, 1/3:131-135
- Paškulin R., Jamnik P., Danevčič T., Koželj G., Krašovec R., Krstić-Milošević D., Blagojević D., Štrukelj B. 2012. Metabolic plasticity and energy economizing effect of ibogaine, the principal alkaloid of *Tabernanthe iboga*. Journal of Ethnopharmacology, 142, 1: 319-324
- Petelinc T., Polak T., Gašperlin L., Raspor P., Jamnik P. 2011. Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 21: 11449-11455

Petelinc T., Polak T., Jamnik P. 2013a. Insight into the molecular mechanisms of propolis activity using a subcellular proteomic approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 11502-11510.

Petelinc T., Polak T., Demšar L., Jamnik P. 2013b. Fractionation of phenolic compounds extracted from propolis and their activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one*, 8, 2, 2013, doi:10.1371/journal.pone.0056104: 8 str.

Pisoschi A.M., Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 31: 55-74

Poljšak B., Šuput D., Milisav I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. Hindawi Publishing Corporation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, doi:10.1155/2013/956792: 11 str.

Promega Corporation. 2012. BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay: Instructions for use of products G8230, G8232 and G8233. Madison, Promega Corporation: 17 str.

Raspor P., Kovač B., Batič M., Bergles D. 2000. Bioprocеси придобivanja antioksidантов. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. Portorož, 26. in 27. Oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Rani P.U.; Devanand P. 2013. Bioactivities of caffeic acid methyl ester (methyl-(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoate): a hydroxycinnamic acid derivative from *Solanum melongena* L. fruits. *Journal of Pesticide Science*, 86: 579-589

Rosenkranz A., Schmaldienst S., Stuhlmeier K.M., Chen W., Knapp W., Zlabinger G.J. 1992. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescin-diacetate. *Journal of Immunological Methods*, 156: 39-45

Russo A., Lango R., Vanella A. 2002. Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73, 1: 521-529

Shi Z.H., Li N.G., Tang Y.P., Shi Q.P., Zhang W. 2015. Design of novel asperin-caffeic acid ester hybrids for cardioprotection with reduced risk of hemorrhagic stroke. *Asian Journal of Chemistry*, 27,4: 1342-1346

Shin K., Kim I., Park Y., Ha J., Choi J., Park H., Lee Y.S., Lee K. 2004. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub>, nitric oxide and tumor necrosis factor-α production. *Biochemical Pharmacology*, 68: 2327-2336

Sies H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82: 291-295

Silva F.A.M, Borges F., Guimaraes C., Lima J.L.F.C., Matos C., Reis S. 2000. Phenolic acids and derivates: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2122-2126

Silva J.F.M, Souza M.C., Matta S.R., Andrade M.R., Vidal F.V.N. 2004. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 99: 431-435

Simone-Finstrom M., Spivak M. 2010. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41:295-311

Slatnar A., Jakopič J., Štampar F., Veberič R., Jamnik P. 2012. The effect of bioactive compounds on *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of different berry juices. *PloS one*, 7, 10, 2012, doi:10.1371/journal.pone.0047880: 8 str.

Socha R., Galkowska D., Bugaj M., Juszczak L. 2014. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research*, 29, 5: 416-422

Takahashi K., Yoshioka Y., Kato E., Katsuki S., Iida O., Hosokawa K., Kawabata J. 2010. Methyl caffeoate as an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from *Solanum torvum* fruits and the activity of related compounds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74, 4: 741-745

Tolba M.F., Omar H.A., Azab S.S., Khalifa A.E., Abdel-Naim A.B., Abdel-Rahman S.Z. 2014. Caffeic acid phenethyl ester: A review of its antioxidant activity, protective effects against ischemia-reperfusion injury and drug adverse reactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014: 37-41

Trouba K.J., Hamadeh H.K., Amin R.P., Germolec D.R. 2002. Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4: 665-73

Turrens J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552, 2: 335-344

Vermerris W., Nicholson R. 2008. Phenolic compound biochemistry. New York, Springer: 276 str.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.A. 2008. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73, 9: 117-124

Zakrajšek T., Raspot P., Jamnik P. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism-characterization at cellular and proteome level. *Journal of Proteomics*, 74, 12: 2837-2845

Zhang P., Tang Y., Nian-Guang L., Zhu Y., Jin-Ao D. 2014. Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. *Molecules*, 19: 15458-16476

Wang J., Gu S.S., Pang N., Wang F.Q., Pang F., Cui H.S., Wu X.Y., Wu F.A. 2014. Alkyl caffeoates improve the antioxidant activity, antitumor property and oxidation stability of edible oil. *PloS one*, 9,4, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0095909: 10 str.

Wu W., Lu L., Long Y., Wang T., Liu L., Chen Q., Wang R. 2007. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. *Food Chemistry*, 105, 107-115

Xiang M., Su H., Hu J., Yan Y., 2011. Isolation, identification and determination of methyl caffeoate, ethyl caffeoate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. sinense. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 9: 1685-1691

## ZAHVALA

Najprej se iskreno zahvaljujem svoji izjemni mentorici prof. dr. Poloni Jamnik, ki me je sprejela pod svoje okrilje in omogočila nastanek tega dela. Poleg nesebičnega dajanja pomoči, časa, razpoložljivosti, skrbnosti in zaupanja, me je s svojim profesionalnim in hkrati ljubečim ter razumnim pristopom vodila preko čudovite izkušnje, ki me je močno utrdila in izoblikovala ter zaradi tega pripravila na nove izzive.

Posebej se zahvaljujem dr. Tanji Petelinc za njeno odlično in prijazno vodstvo. Hvaležna sem za njeno pripravljenost, potrebitnost, za vse odgovore, popravke in nasvete tako pri eksperimentalnem, kot tudi pri pisnem delu magistrske naloge. Predstavila mi je svoj način in pristop do znanstvenega dela, zaradi katerega sem se projekta lotila z veseljem in kvalitetno - zato bo brez dvoma tako tudi v prihodnosti.

Hvala somentorju doc. dr. Tomažu Polaku za pripravo vzorcev, ki smo jih potrebovali za eksperimentalni del in strokoven pregled magistrskega dela.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Abramovič za strokoven pregled magistrske naloge in vzpodbudne besede ob koncu najinega prvega snidenja.

Hvala Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, ki mi je omogočila izvedbo magistrske naloge in celotnemu osebju za prijetno delovno vzdušje, kjer sem se vsakič počutila sprejeto.

Zahvaljujem se dr. Karmen Stopar za pomoč, čas in trud pri pregledu in urejanju magistrskega dela. Hvala tudi prof. dr. Lei Demšar za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov.

Posebna hvala ljubemu Tomažu za prav vsak prijeten pogovor in za vse lepe misli zaradi katerih si mi pomagal popestriti in poenostaviti slehrni trenutek ob nastajanju tega drobnega koraka v najinem življenju.

Hvala prijatelju Primožu Turnšku in prijateljici Tini Šubic za naše razumske, obštujijske pogovore.

Posebej se zahvaljujem tudi bratu Luki, ki si je vselej vzel čas za prebiranje in podrobno urejanje končnega izdelka rokopisa.

Hvala mojima staršema, ker sta mi omogočila študij in me ob tem ljubeče podpirala.

Hvala prav vsem, ki so mi v tem času kakorkoli pomagali in mislili name.

## PRILOGA A

### Določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi posameznim estrom kavne kisline (EKK)

Ponovitve 1, 2, 3, 4 so biološke ponovitve. Znak / označuje, da za meritev ni podatka. Znak \* označuje, da se vrednost statistično značilno razlikuje od vrednosti kontrole (100 %) pri  $p \leq 0,05$ .

Pril. A1: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi metilnemu estru kavne kisline (CAME) v koncentracijah 1000, 100, 10 in 1  $\mu\text{M}$ . Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti FI

Ponovitev 1					
Čas (min)	Kontrola	CAME 1000 $\mu\text{M}$	CAME 100 $\mu\text{M}$	CAME 10 $\mu\text{M}$	CAME 1 $\mu\text{M}$
0	1441	1473	1514	1524	1341
30	2593	2509	2663	2766	2418
60	4619	4921	5334	5214	4733
90	6854	7262	8487	8044	7306
120	9597	10254	12398	11629	10832

Ponovitev 2					
Čas (min)	Kontrola	CAME 1000 $\mu\text{M}$	CAME 100 $\mu\text{M}$	CAME 10 $\mu\text{M}$	CAME 1 $\mu\text{M}$
0	1476	1457	1746	1683	1647
30	3124	2550	3614	3386	3443
60	6288	4977	7553	7665	7647
90	11811	8904	14339	14225	14730
120	19914	14481	23988	22598	24197

Ponovitev 3					
Čas (min)	Kontrola	CAME 1000 $\mu\text{M}$	CAME 100 $\mu\text{M}$	CAME 10 $\mu\text{M}$	CAME 1 $\mu\text{M}$
0	1649	1706	1903	2239	1785
30	3611	3608	4085	4475	3677
60	12090	9880	11374	11817	9855
90	21701	18175	20304	20643	16924
120	35085	29613	32620	33610	27364

Ponovitev 4					
Čas (min)	Kontrola	CAME 1000 $\mu\text{M}$	CAME 100 $\mu\text{M}$	CAME 10 $\mu\text{M}$	CAME 1 $\mu\text{M}$
0	1533	1363	1495	1610	1576
30	2561	1900	2315	2626	2613
60	5531	3709	4851	5460	5461
90	8898	5782	7530	8792	8340
120	12672	8254	10711	12564	12225

Pril. A2: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etilnemu estru kavne kisline (CAEE) v koncentracijah 1000, 100, 10 in 1 µM. Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti FI

<b>Ponovitev 1</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAEE 1000 µM</b>	<b>CAEE 100 µM</b>	<b>CAEE 10 µM</b>	<b>CAEE 1 µM</b>
<b>0</b>	1663	1598	1791	1882	1701
<b>30</b>	3341	2687	3292	4057	3006
<b>60</b>	7556	5426	7071	8923	6280
<b>90</b>	13452	8423	11379	13916	9697
<b>120</b>	20269	11700	16093	19184	13717
<b>Ponovitev 2</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAEE 1000 µM</b>	<b>CAEE 100 µM</b>	<b>CAEE 10 µM</b>	<b>CAEE 1 µM</b>
<b>0</b>	1631	1351	1809	1668	3868
<b>30</b>	3459	2222	4063	3512	7911
<b>60</b>	7064	3894	7501	7029	12815
<b>90</b>	13680	6051	12619	12336	18299
<b>120</b>	21479	8544	17572	18003	22897

Pril. A3: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi izopropilnemu estru kavne kisline (CAIPE) v koncentracijah 1000, 100, 10 in 1 µM. Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti FI

<b>Ponovitev 1</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 100 µM</b>	<b>CAIPE 10 µM</b>	<b>CAIPE 1 µM</b>
<b>0</b>	1440	1343	1344	1434	1558
<b>30</b>	3045	2179	2316	2605	2602
<b>60</b>	6077	3889	4407	5004	4702
<b>90</b>	11064	5744	7165	8483	7347
<b>120</b>	16813	7780	10364	12556	10443
<b>Ponovitev 2</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 100 µM</b>	<b>CAIPE 10 µM</b>	<b>CAIPE 1 µM</b>
<b>0</b>	1287	1486	1397	1565	1675
<b>30</b>	2987	2863	2962	3214	3094
<b>60</b>	6594	5918	6667	7422	6839
<b>90</b>	12453	10846	12331	13252	12277
<b>120</b>	19498	17081	19391	20586	18803
<b>Ponovitev 3</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 100 µM</b>	<b>CAIPE 10 µM</b>	<b>CAIPE 1 µM</b>
<b>0</b>	1621	1483	1649	1639	1680
<b>30</b>	2936	2469	2731	2799	2741
<b>60</b>	6115	5034	5595	5955	5859
<b>90</b>	10909	7548	8644	9252	9340
<b>120</b>	15997	10114	11874	12959	13158

Pril. A4: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi fenetilnemu estru kavne kisline (CAPE) v koncentracijah 1000, 100, 10 in 1 µM. Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti FI

<b>Ponovitev 1</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>	<b>CAPE 10 µM</b>	<b>CAPE 1 µM</b>
<b>0</b>	862	/	1076	922	978
<b>30</b>	1393	/	1657	1211	1507
<b>60</b>	2605	/	2830	2019	2960
<b>90</b>	3918	/	3739	2544	4788
<b>120</b>	5409	/	4708	3148	6829
<b>Ponovitev 2</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>	<b>CAPE 10 µM</b>	<b>CAPE 1 µM</b>
<b>0</b>	1184	2925	/	/	/
<b>30</b>	1894	5756	/	/	/
<b>60</b>	3201	11108	/	/	/
<b>90</b>	4591	16598	/	/	/
<b>120</b>	6269	22841	/	/	/
<b>Ponovitev 3</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>	<b>CAPE 10 µM</b>	<b>CAPE 1 µM</b>
<b>0</b>	1544	1926	1523	1382	1610
<b>30</b>	3511	4920	2654	2329	3055
<b>60</b>	6343	10915	4104	3900	5699
<b>90</b>	8162	16022	5358	4893	7993
<b>120</b>	10414	22714	6530	5988	10450
<b>Ponovitev 4</b>					
<b>Čas (min)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>	<b>CAPE 10 µM</b>	<b>CAPE 1 µM</b>
<b>0</b>	1661	2029	1450	1435	1685
<b>30</b>	3557	5148	2223	2202	2841
<b>60</b>	7323	10939	3936	4258	6139
<b>90</b>	11213	16208	5362	5546	8822
<b>120</b>	15884	24263	6709	6949	12244

Pril. A5: Določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi posameznim estrom kavne kisline (EKK) v koncentracijah 1000, 100, 10 in 1  $\mu\text{M}$ . Rezultati so izraženi kot relativni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI)  $\pm$  SD glede na kontrolo (100 %)

		CAME			
Ponovitve	Kontrola	1000 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<b>1</b>	100	/	/	/	/
<b>2</b>	100	72	102	100	110
<b>3</b>	100	81	80	/	/
<b>4</b>	100	70	85	94	93
<b>Povprečje</b>	1	74*	89	97	101
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
<b>SD</b>	0	6	12	4	12
CAEE					
Ponovitve	Kontrola	1000 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<b>1</b>	100	57	71	82	63
<b>2</b>	100	44	72	80	40
<b>Povprečje</b>	100	50*	71*	81*	52*
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
<b>SD</b>	0	9	0,2	1	16
CAIPE					
Ponovitve	Kontrola	1000 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<b>1</b>	100	45	63	73	53
<b>2</b>	100	74	91	86	72
<b>3</b>	100	66	70	78	77
<b>Povprečje</b>	100	62*	75*	79*	68*
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
<b>SD</b>	0	15	15	7	13
CAPE					
Ponovitve	Kontrola	1000 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
<b>1</b>	100	/	64	46	113
<b>2</b>	100	158	/	/	/
<b>3</b>	100	188	57	58	96
<b>4</b>	100	128	42	45	73
<b>Povprečje</b>	100	158*	55*	50*	94
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
<b>SD</b>	0	30	11	7	20

## PRILOGA B

### Določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi različnim kombinacijam preučevanih snovi

Ponovitve 1, 2, 3 so biološke ponovitve. Znak / označuje, da za meritev ni podatka. Znak \* označuje, da se vrednost statistično značilno razlikuje od vrednosti kontrole (100 %) pri  $p \leq 0,05$ .

Pril. B1: Meritve fluorescenčne intenzitete (FI) za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP) (60  $\mu\text{M}$ ), kombinaciji izbranih estrov kavne kisline (EKK) z EIP (60  $\mu\text{M}$ ) ter kombinaciji izbranih EKK v določenih koncentracijah. Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti FI

Ponovitev 1					
Čas (min)	Kontrola	EIP 60 $\mu\text{M}$	CAPE 100 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + CAPE 100 $\mu\text{M}$
0	3921	3016	3341	3755	3610
30	5102	3474	3514	4207	4244
60	8473	5248	5073	6412	6363
90	10987	6302	6059	8022	8302
120	13839	7290	6642	9636	9620

Ponovitev 2					
Čas (min)	Kontrola	EIP 60 $\mu\text{M}$	CAPE 100 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + CAPE 100 $\mu\text{M}$
0	4828	3469	3117	3806	5821
30	7918	4955	4059	4542	8963
60	15376	8266	6280	7424	15424
90	20606	10501	7786	9282	20877
120	27511	12936	9766	11067	27278

Ponovitev 3					
Čas (min)	Kontrola	EIP 60 $\mu\text{M}$	CAPE 100 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + CAPE 100 $\mu\text{M}$
0	4021	/	/	3520	/
30	6418	/	/	3905	/
60	11110	/	/	6105	/
90	13890	/	/	7011	/
120	18009	/	/	7980	/

Pril. B2: Določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP), kombinaciji izbranih estrov kavne kisline (EKK) z EIP (60 µM) ter kombinaciji izbranih EKK v določenih koncentracijah. Rezultati so izraženi kot relativni prirast fluorescenčne intenzitete (RPFI) ± SD glede na kontrolo (100 %)

Ponovitve	Kontrola	EIP 60 µM	CAPE 100 µM + EIP 60 µM	CAIPE 1000 µM + EIP 60 µM	CAIPE 1000 µM + CAPE 100 µM
<b>1</b>	100	56	39	/	66
<b>2</b>	100	58	39	41	78
<b>3</b>	100	/	/	36	/
<b>Povprečje</b>	100	57*	39*	39*	72*
±	±	±	±	±	±
<b>SD</b>	0	1	0,2	3	9

## PRILOGA C

Določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi posameznim estrom kavne kisline (EKK) v izbranih koncentracijah

Ponovitve 1, 2, 3 so biološke ponovitve.

Pril. C1: Meritve luminiscenčne intenzitete za določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estrom kavne kisline (EKK) CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM). Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti luminisce (L) ± SD

Ponovitev 1					
Parelekta	Kontrola	CAME 1000 µM	CAEE 1000 µM	CAIPE 1000 µM	CAPE 100 µM
1	890980	629090	907100	1282900	1267000
2	765170	612760	892860	1499400	1239300
3	695480	620170	923520	1289200	1362700
Povprečje ±	783877 ±	620673 ±	907827 ±	1357167 ±	1289667 ±
SD	99083	8177	15343	123218	64747

Ponovitev 2					
Paralelka	Kontrola	CAME 1000 µM	CAEE 1000 µM	CAIPE 1000 µM	CAPE 100 µM
1	307440	128000	397330	482490	569460
2	323950	122640	313330	485630	526890
3	239360	193430	344100	502080	482470
Povprečje ±	290250 ±	148023 ±	351587 ±	490067 ±	526273 ±
SD	44838	39415	42498	10522	43498

Ponovitev 3					
Paralelka	Kontrola	CAME 1000 µM	CAEE 1000 µM	CAIPE 1000 µM	CAPE 100 µM
1	1188200	1012700	1721900	2277900	2045000
2	1158500	1056000	1677200	2346400	2105900
3	1198600	1083900	1622600	2181300	1876900
Povprečje ±	1181767 ±	1050867 ±	1673900 ±	2268533 ±	2009267 ±
SD	20810	35877	49732	82948	118608

Priloga C2: Meritve luminiscenčne intenzitete v odvisnosti od OD za določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estrom kavne kisline (EKK) CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM). Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti L/OD ± SD

<b>Ponovitev 1</b>					
<b>Paralelka</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAME 1000 µM</b>	<b>CAEE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	9303655	3220597	9568565	13643034	13407407
<b>2</b>	7989941	3136997	9418354	15945409	13114285
<b>3</b>	7262235	3174932	9741772	13710032	14420105
<b>Povprečje</b> ±	8185277 ±	3177509 ±	9576231 ±	14432825 ±	13647266 ±
<b>SD</b>	1034633	41860	161845	1310365	685157
<b>Ponovitev 2</b>					
<b>Paralelka</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAME 1000 µM</b>	<b>CAEE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	1734662	796350	1860740	2455836	2763028
<b>2</b>	1827816	763003	1467359	2471819	2556477
<b>3</b>	1350536	1203422	1611458	2555548	2340951
<b>Povprečje</b> ±	1637672 ±	920925 ±	1646519 ±	2494401 ±	2553485 ±
<b>SD</b>	252991	245217	199020	53554	211054
<b>Ponovitev 3</b>					
<b>Paralelka</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAME 1000 µM</b>	<b>CAEE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	1807698	1520494	2502883	3432813	3073647
<b>2</b>	1762513	1585506	2437909	3536043	3165180
<b>3</b>	1823520	1627396	2358545	3287236	2820992
<b>Povprečje</b> ±	1797911 ±	1577799 ±	2433112 ±	3418697 ±	3019940 ±
<b>SD</b>	31659	53866	72289	125003	178269
<b>Ponovitev</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAME 1000 µM</b>	<b>CAEE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	100	39	117	176	167
<b>2</b>	100	56	101	152	156
<b>3</b>	100	88	135	190	168
<b>Povprečje</b> ±	100 ±	61* ±	118* ±	173* ±	164* ±
<b>SD</b>	0	25	17	19	7

## PRILOGA D

### Določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi različnim kombinacijam preučevanih snovi

Ponovitve 1, 2, 3 so biološke ponovitve. Znak / označuje, da za meritev ni podatka. Znak \* označuje, da se vrednost statistično značilno razlikuje od vrednosti kontrole (100 %) pri  $p \leq 0,05$ .

Pril. D1: Meritve luminiscenčne intenzitete za določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP) (60  $\mu\text{M}$ ), kombinaciji izbranih estrov kavne kisline (EKK) z EIP (60  $\mu\text{M}$ ) ter kombinaciji izbranih EKK v določenih koncentracijah. Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti luminisceence (L)

Ponovitev 1					
Paralelka	Kontrola	EIP 60 $\mu\text{M}$	CAPE 100 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + CAPE 100 $\mu\text{M}$
<b>1</b>	281720	329480	514850	452060	315730
<b>2</b>	326850	367020	525810	402840	348360
<b>3</b>	328780	366550	531050	468510	383020
<b>Povprečje</b>	312450	354350	523903	441137	349037
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
<b>SD</b>	26630	21539	8267	34171	33650
Ponovitev 2					
Paralelka	Kontrola	EIP 60 $\mu\text{M}$	CAPE 100 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + CAPE 100 $\mu\text{M}$
<b>1</b>	304980	357690	463250	512010	389660
<b>2</b>	298660	369610	366510	506980	449790
<b>3</b>	288590	372130	392040	486320	326690
<b>Povprečje</b>	297410	366477	407267	501770	388713
$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
<b>SD</b>	8266	7713	50135	13614	61555
Ponovitev 3					
Paralelka	Kontrola	EIP 60 $\mu\text{M}$	CAPE 100 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + EIP 60 $\mu\text{M}$	CAIPE 1000 $\mu\text{M}$ + CAPE 100 $\mu\text{M}$
<b>1</b>	486300	/	725770	/	/
<b>2</b>	362640	/	778980	/	/
<b>3</b>	314390	/	740850	/	/
<b>Povprečje</b>	387777	/	748533	/	/
$\pm$	$\pm$		$\pm$		
<b>SD</b>	88669	/	27424	/	/

Pril. D2: Meritve luminiscenčne intenzitete v odvisnosti od OD za določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP) (60 µM), kombinaciji izbranih estrov kavne kisline (EKK) z EIP (60 µM) ter kombinaciji izbranih EKK v določenih koncentracijah. Rezultati so izraženi kot absolutne vrednosti luminisceence (L)/OD ± SD

<b>Ponovitev 1</b>					
<b>Paralelka</b>	<b>Kontrola</b>	<b>EIP 60 µM</b>	<b>CAPE 100 µM + EIP 60 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM + EIP 60 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM + CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	3129063	3870164	4428182	5479515	3249365
<b>2</b>	3630322	4311120	4522448	4882909	3585180
<b>3</b>	3651759	4305599	4567517	5678909	3941887
<b>Povprečje</b> ±	3470381 ±	4162294 ±	4506049 ±	5347111 ±	3592144 ±
<b>SD</b>	295784	253007	71100	414189	346313
<b>Ponovitev 2</b>					
<b>Paralelka</b>	<b>Kontrola</b>	<b>EIP 60 µM</b>	<b>CAPE 100 µM + EIP 60 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM + EIP 60 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM + CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	3128000	3966987	5766598	5231710	4090203
<b>2</b>	3063179	4099187	4562365	5180313	4721379
<b>3</b>	2959897	4127135	4880166	4969210	3429216
<b>Povprečje</b> ±	3050359 ±	4064436 ±	5069710 ±	5127078 ±	4080266 ±
<b>SD</b>	84781	85543	624091	139112	646138
<b>Ponovitev 3</b>					
<b>Paralelka</b>	<b>Kontrola</b>	<b>EIP 60 µM</b>	<b>CAPE 100 µM + EIP 60 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM + EIP 60 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM + CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	6274839	/	7069188	/	/
<b>2</b>	4679226	/	7587468	/	/
<b>3</b>	4056645	/	7216071	/	/
<b>Povprečje</b> ±	5003570 ±	/	7290909 ±	/	/
<b>SD</b>	1144113	/	267121	/	/

Pril. D3: Določanje celične metabolne energije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi etanolnemu izvlečku propolisa (EIP) (60 µM), kombinacij izbranih estrov kavne kisline (EKK) z EIP (60 µM) ter kombinacije izbranih EKK v določenih koncentracijah. Rezultati so izraženi kot relativna luminiscenca (RL)/OD ± SD glede na kontrolo (100 %)

Ponovitve	Kontrola	EIP 60 µM	CAPE 100 µM + EIP	CAIPE 1000 µM + EIP	CAIPE 1000 µM + CAPE 100 µM
1	100	120	130	154	104
2	100	133	166	168	134
3	100	/	146	/	/
Povprečje	100	127*	147*	161*	119
±	±	±	±	±	±
SD	0	9	18	10	21

## PRILOGA E

### Preverjanje živosti/kultivabilnosti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*

Ponovitve 1, 2, 3 so biološke ponovitve. Znak / označuje, da za vrednosti ni podatka. Znak \* označuje, da se vrednost statistično značilno razlikuje od vrednosti kontrole (100 %) pri  $p \leq 0,05$ .

Pril. E1: Meritve živosti/kultivabilnosti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi estrom kavne kisline (EKK) CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM). Rezultati so izraženi kot število kolonij na ploščah (CFU)

Ponovitev	Kontrola	CAME 1000 µM	CAEE 1000 µM	CAIPE 1000 µM	CAPE 100 µM
1	106	/	/	/	99
	104	/	/	/	94
	100	/	/	/	83
2	83	102	76	77	80
	84	103	91	88	84
	101	92	98	78	87
3	62	62	97	74	/
	97	97	70	81	/
	59	59	89	102	/

Pril. E2: Določanje živosti/kultivabilnosti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estrom kavne kisline (EKK) CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM). Rezultati so izraženi kot CFU/mL

<b>Ponovitev</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAME 1000 µM</b>	<b>CAEE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	103333333	/	/	/	92000000
<b>2</b>	89333333	99000000	88333333	81000000	83666667
<b>3</b>	72666667	85333333	85666667	75000000	/
<b>Povprečje</b>	88444444	92166667	87000000	78000000	87833333
<b>±</b>	±	±	±	±	±
<b>SD</b>	15352645	9663793	1885618	4242641	5892557

Pril. E3: Določanje živosti/kultivabilnosti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi estrom kavne kisline (EKK) CAME (1000 µM), CAEE (1000 µM), CAIPE (1000 µM) in CAPE (100 µM). Rezultati so izraženi kot relativni CFU (RCFU)/mL ± SD glede na kontrolo (100 %)

<b>Ponovitve</b>	<b>Kontrola</b>	<b>CAME 1000 µM</b>	<b>CAEE 1000 µM</b>	<b>CAIPE 1000 µM</b>	<b>CAPE 100 µM</b>
<b>1</b>	100	/	/	/	104
<b>2</b>	100	112	100	92	95
<b>3</b>	100	96	97	85	/
<b>Povprečje</b>	100	104	98	88	99
<b>±</b>	±	±	±	±	±
<b>SD</b>	0	11	2	5	7