

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok KOLIČ

**VPLIV RASTLINSKIH IZVLEČKOV NA OKSIDATIVNI
METABOLIZEM KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON OXIDATIVE
METABOLISM OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Petra Rasporja in za recenzentko prof. dr. Darjo Žgur Bertok.

Mentor: prof. dr. Peter RASPOR

Recenzentka: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rok Količ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.22+579.24:547.9:602.3:582.282.23(043)=163.6
KG	kvasovke/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /izvleček rožmarina/stres/oksidativni stres/karbonili/malondialdehid
AV	KOLIČ, Rok
SA	RASPOR, Peter (mentor)/ ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	VPLIV RASTLINSKIH IZVLEČKOV NA OKSIDATIVNI METABOLIZEM KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XII, 45 str., 4 pregl., 15 sl., 8 pril., 71 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil preučiti vpliv predhodne izpostavitve celic <i>Saccharomyces cerevisiae</i> izvlečku iz rožmarina in naknadne izpostavitve induktorju reaktivnih kisikovih zvrsti na živost ter oksidativne poškodbe proteinov in lipidov modelnega organizma kvasovke <i>S. cerevisiae</i> . Uporabili smo komercialno pripravljen izvleček rožmarina in ga dodali celicam v koncentracijah 0,01 g/L in 0,05 g/L. Živost celic smo preverjali s pomočjo komercialnega kompleta, ki vsebuje fluorescentni barvili SYTO [®] 9 in propidijev jodid (PJ). Rezultati so pokazali, da je izvleček rožmarina ugodno vplival na živost celic kvasovk. Oksidativne poškodbe proteinov smo merili z metodo, ki meri vsebnost karbonilov, oksidativne poškodbe lipidov pa po metodi TBA, ki meri vsebnost malondialdehidov. Rezultati so pokazali, da predtretiranje celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> z izvlečkom rožmarina ni zmanjšalo vsebnosti karbonilov in malondialdehidov, ki jih povzroča menadion.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.22+579.24:547.9:602.3:582.282.23(043)=163.6

CX yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/rosemary extract/stress/oxidative stress/carbonyls/malondialdehyde

AU KOLIČ, Rok

AA RASPOR, Peter (supervisor)/ ŽGUR BERTOK, Darja (reviewer)

PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2009

TI THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON OXIDATIVE METABOLISM OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae*

DT Graduation Thesis

NO XII, 45 p., 4 tab., 15 fig., 8 ann., 71 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The aim of our research was to investigate the effect of pre-treating cells with rosemary extract and further exposure to inductor of reactive oxygen species on viability and oxidative damage of proteins and lipids on model organism yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We used commercially prepared rosemary extract, which was added to the cells in the concentration of 0.01 g/L and 0.05 g/L. Yeast viability was determined by using commercial kit with SYTO[®] 9 and propidium iodide dyes. The results showed that the rosemary extract increased viability. Oxidative protein damages were determined with a method measuring carbonyl content and lipid damages according to the TBA method measuring content of malondialdehydes. The results indicated that pre-treating of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae* with rosemary extract did not decrease the amount of carbonyls and malondialdehydes, which are caused by menadione.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	X
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI RAZISKAVE.....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 STRES.....	3
2.2 OKSIDATIVNI STRES	3
2.2.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	4
2.2.2 Tarče ROS v celici in poškodbe celičnih komponent	6
2.2.3 Obrambni sistemi pred ROS	8
2.2.4 Metode detekcije ROS.....	9
2.3 RASTLINSKI IZVLEČKI.....	10
2.3.1 Uporaba rastlinskih izvlečkov	10
2.3.2 Antioksidativno delovanje rastlinskih izvlečkov	10
2.3.3 Antioksidativno delovanje rožmarina (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	11
2.3.4 Sistemi antioksidativnega delovanja izvlečkov rožmarina	12
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 POTEK DELA.....	15
3.2 MATERIALI.....	16
3.2.1 Mikroorganizem	16
3.2.2 Gojišče in raztopine	16
3.2.3 Reagenti in barvila	18
3.2.4 Rastlinski izvleček rožmarina.....	19

3.2.5	Oprema in aparature	19
3.3	METODE	20
3.3.1	Priprava inokuluma	20
3.3.2	Spremljanje rasti z merjenjem optične gostote (Madigan in sod., 2003)	21
3.3.3	Štetje celic s hemocitometrom (Madigan in sod., 2003)	21
3.3.4	Potek poskusa.....	21
3.3.5	Preverjanje živosti	22
3.3.6	Določanje suhe biomase (Paš in sod., 2004)	23
3.3.7	Določanje oksidativnih poškodb proteinov	23
3.3.8	Določanje oksidativnih poškodb lipidov.....	24
3.3.9	Statistična obdelava podatkov.....	24
4	REZULTATI	26
4.1	SPREMLJANJE RASTI KVASOVKE	26
4.1.1	Inokulum	26
4.1.2	Bioproces	27
4.2	DOLOČANJE ŽIVOSTI:	28
4.2.1	Določanje živosti celic v prisotnosti in odsotnosti izvlečka rožmarina	28
4.2.2	Določanje živosti v prisotnosti in odsotnosti menadiona	30
4.2.3	Določanje živosti z izvlečkom in menadionom.....	31
4.3	DOLOČANJE MASE SUHE SNOVI	33
4.4	DOLOČANJE KARBONILOV	34
4.5	DOLOČANJE MALONDIALDEHIDOV	35
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	36
5.1	RAZPRAVA	36
5.1.1	Določanje živosti	37
5.1.2	Določanje oksidativnih poškodb proteinov in lipidov	38
5.2	SKLEPI	40
6	POVZETEK.....	41
7	VIRI	42

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava tekočega gojišča YEPD (Atlas, 1993).....	16
Preglednica 2: Sestava pufra 10x PBS	17
Preglednica 3: Sestava natrij-kalijevega pufra	17
Preglednica 4: Reagent za določanje lipidne peroksidacije.....	18

KAZALO SLIK

Slika 1: Redoks cikel menadiona. Menadion je v celici reduciran z NAD(P)H kinon oksidoreductazo (NQOR). Pri tem nastane hidrokinon. Hidrokinon, ki izhaja iz menadiona se oksidira z molekularnim kisikom ter tvori superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$) (Klotz in sod., 2002; Criddle in sod., 2006; Kawamura in sod., 2006).....	6
Slika 2: Rožmarin	11
Slika 3: Strukturna formula karnozolne kisline (Masuda in sod., 2001).....	12
Slika 4: Strukturna formula karnozola (Masuda in sod., 2001)	12
Slika 5: Kaskada reakcij karnozolne kisline (Richheimer in sod., 1999).....	13
Slika 6: Antioksidativni mehanizem iz kinona karnozolne kisline. Različne oblike puščic pomenijo drugačen tip reakcije, kot je prikazano na dnu slike. Zvezdica (*) označuje spojine z antioksidativno aktivnostjo (Masuda in sod., 2002).....	14
Slika 7: Hodogram poskusa.....	15
Slika 8: Rastna krivulja kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155, pridobljena s spremljanjem optične gostote (OD_{650}) med 25 urnim aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ($T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) v tekočem gojišču YEPD.....	27
Slika 9: Rastna krivulja kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155, pridobljena s spremljanjem optične gostote (OD_{650}) med 9 urnim aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ($T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) v tekočem gojišču YEPD.....	28
Slika 10: Vpliv izvlečka rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) na preživetje kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufu ($\text{pH} = 7,0$), $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) v stacionarni fazi rasti pri dveh različnih časih glede na kontrolo.....	29
Slika 11: Vpliv menadiona (2 mM) na preživetje kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufu ($\text{pH} = 7,0$), $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) v stacionarni fazi rasti pri dveh različnih časih glede na kontrolo.....	30
Slika 12: Vpliv enourne izpostavitve izvlečku rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter nato še 15-minutnie izpostavitve menadionu (2 mM) na preživetje kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufu ($\text{pH} = 7,0$), $T = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) v stacionarni fazi rasti glede na kontrolo.....	32
Slika 13: Določanje mase suhe snovi v enem mL vzorca kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufu ($\text{pH} = 7,0$), $T= 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) glede na kontrolo po enourni izpostavitvi izvlečku rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter nato še po 15-minutni izpostavitvi 2 mM menadionu v stacionarni fazi rasti.	33
Slika 14: Določanje vsebnosti karbonilov na miligram suhe snovi kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufu ($\text{pH} = 7,0$), $T= 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) glede na kontrolo po enourni izpostavitvi izvlečku rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter nato še po 15-minutni izpostavitvi 2 mM menadionu v stacionarni fazi rasti.	34
Slika 15: Določanje malondialdehidov kvasovke <i>S. cerevisiae</i> ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufu ($\text{pH} = 7,0$), $T= 28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) glede na kontrolo po enournem izpostavljanju izvlečku rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter nato še s 15-minutnim izpostavljanjem 2 mM menadionom v stacionarni fazi rasti.	35

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Spreminjanje optične gostote (OD_{650}) *S. cerevisiae* ZIM 2155 za inokulum vzorcev dveh ponovitev A in B v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku pri 200 obr/min in 28 °C
- Priloga A2: Spreminjanje optične gostote (OD_{650}) *S. cerevisiae* ZIM 2155 za bioproces vzorcev v dveh ponovitvah A in B v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku pri 200 obr/min in 28 °C
- Priloga B1: Določanje živosti celic stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) v dveh ponovitvah A in B pri dveh različnih časih glede na kontrolo pri izpostavljanju z izvlečkom rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) v stacionarni fazi rasti
- Priloga B2: Določanje živosti celic stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po 15 min in 35 min izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B
- Priloga B3: Določanje živosti celic stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po eno urni izpostavitvi z izvlečkom rožmarina in 15-minutni izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B
- Priloga C: Določanje mase suhe snovi stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po eno urni izpostavitvi z izvlečkom rožmarina in 15-minutni izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B
- Priloga D: Določanje absorbance karbonilov na miligram suhe snovi stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po eno urni izpostavitvi z izvlečkom rožmarina in 15-minutni izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B
- Priloga E: Določanje lipidne peroksidacije na miligram suhe snovi stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po eno urni izpostavitvi z izvlečkom rožmarina in 15-minutni izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

angl.	angleško
BHT	butiliran hidroksitoluen
Cys	cistein
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
e ⁻	elektron
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina
FRET	Fluorescenčni prenos resonančne energije
g	gravitacijski pospešek
G ₀ /G ₁	faza celične rasti
GC	gvanidinijev klorid
His	histidin
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
M	mol/L
mM	10 ⁻³ mol/L
MDA	malondialdehid
Met	metionin
min	minuta
NADH	nikotinamid adenzin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenzin dinukleotid fosfat
obr/min	obrati na minuto
OD	optična gostota
PBS	raztopina fosfatnega pufra
Phe	fenilalanin
PJ	propidijev jodid
PUFA	polinenasičene maščobne kisline
ROS	reaktivne kisikove zvrsti

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	standardna deviacija
SOD	superoksid dismutaza
TBA	tetra-butilamin
TCA	trikarboksilna kislina
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
YEPD	gojišče (kvasni ekstrakt, pepton, glukoza)
UV	ultravijolična
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov

1 UVOD

Rastline sintetizirajo veliko različnih sekundarnih metabolitov, ki nimajo neposrednega vpliva na rast ali metabolno aktivnost. To so biološko aktivne spojine, ki lahko z antioksidativnim delovanjem preprečijo bolezni ter kvar živil (Halliwell in Gutteridge, 1992; Farombi in sod., 1998; Koleva in sod., 2000). Rastline, ki vsebujejo spojine z antioksidativnim delovanjem, se v prehrani uporabljajo kot začimbe predvsem pri pripravi jedi z nizko hranilno vrednostjo. Primeri teh rastlin so origano, žajbelj, česen, timijan, nageljnova žbica ter rožmarin (Dorman in Deans, 2000; Hammer in sod., 1999; Mata in sod., 2007).

Rožmarin ima močne antioksidativne lastnosti. Večinoma se ga uporablja v kulinariki. Antioksidativne lastnosti imajo fenolni diterpeni (karnozolna kislina, karnozol, rozmanol in epi- ter izo-rozmanol) in flavonoidi (Tada, 2000; Wada in sod., 2004). Karnozolna kislina in karnozol sta priznana kot najpomembnejši spojini z antioksidativnim delovanjem (Ibanez in sod., 2003)

V eksperimentalnem delu smo preverjali vpliv izvlečka rožmarina na živost in oksidativne poškodbe proteinov in lipidov kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasovka predstavlja primeren modelni organizem za raziskave različnih vidikov oksidativnega stresa na biokemijskem, molekularno-biološkem in celičnem nivoju, ker so oksidativne poškodbe proteinov, lipidov, nukleinskih kislin in drugih celičnih komponent, kot tudi obrambni sistemi proti oksidativnemu stresu zelo podobni višjim organizmom na vseh nivojih celične organizacije (Sigler in sod., 1999).

1.1 CILJI RAZISKAVE

Cilj naloge je ugotoviti oz. pojasniti sposobnost izbranega rastlinskega izvlečka (rožmarina) na zmanjšanje oksidativnih poškodb proteinov in lipidov pri modelnem mikroorganizmu *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Izbrani izvlečki vplivajo na živost, kultivabilnost in znotrajcelično oksidacijo *Saccharomyces cerevisiae*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 STRES

Stres je vsaka sprememba optimalnih pogojev rasti celic. Razlikujemo manjši in večji stres; manjši stres se nanaša na pogoje v okolju, ki še dovoljujejo rast, v primeru večjega stresa je rast inhibirana (Ruis, 1997). Izpostavitve manjšemu stresu povzroči učinkovitejši odziv na večji stres (Hohmann in Mager, 1997).

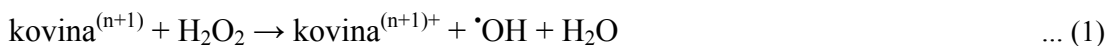
Odziv na stres je molekularni mehanizem, ki se inducira ob fizičnih ali kemijskih spremembah celice. Te nastanejo zaradi sprememb v okolju ter zaradi prilagajanja na spremembe v okolju. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* mora spremembe v okolju zaznati, se na njih primerno odzvati ter se prilagoditi na novo okolje. Odziv na stres ščiti celico in popravlja morebitne (molekularne) poškodbe (Hohmann in Mager, 1997). Ločimo zgodnji in pozni odziv na stres. Zgodnji odziv (npr. aktivacija metabolizma trehaloze) omogoči minimalno zaščito proti nenadnemu stresu in inducira zakasneli oz. pozni odziv na stres (npr. sinteza encimov za uničenje toksičnih kisikovih zvrsti). Zakasneli odziv nudi celici konstantno in bolj učinkovito zaščito, ker omogoča prilagoditev na nenehen stres (Ruis, 1997). Zaščita pred različnimi stresnimi dejavniki je tudi pridobitev tolerance (Hohmann in Mager, 1997).

Fenomen navzkrižne zaščite (angl. cross protection) pomeni, da prisotnost določene vrste stresa vodi k povišanju tolerance na drugo vrsto stresa (npr. pomanjkanje hranil, ko kvasovka vstopi v stacionarno fazo rasti, sproži splošni odziv na stres) (Hohmann in Mager, 1997).

2.2 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je definiran kot porušenje ravnotežja med tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti - ROS (angl. reactive oxygen species, ROS) in antioksidanti v celici (Betteridge, 2000). Do porušanja ravnotežja pride zaradi izpostavljenosti celic različnim okoljskim stresnim dejavnikom (kot so prisotnost oksidantov, temperaturni šok, etanol in kovinski ioni), mutacij v encimih, ki sodelujejo pri obrambi ali zaradi pomanjkanja antioksidantov (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

Za uničenje ROS je odgovoren ti. odziv na oksidativni stres. Ta vključuje encimske in neencimske obrambne mehanizme (npr. glutation, tioredoksin). Različne kovine v reducirani obliki (Cu, Fe) izzovejo nastanek ROS (superoksidni anion se pretvori v hidroksilni radikal) v Fentonovi reakciji (enačba 1), zato je pomembna tudi homeostatska regulacija kovin v celici (Hohmann in Mager, 1997; Santoro in Thiele, 1997).



Kvasovka se mora uspešno prilagajati na spremembe temperature, osmolarnosti, ionske koncentracije, hranil ter na pojav ROS (Hohmann in Mager, 1997). Koncentracija ROS se lahko poveča, če je celica podvržena različnim okoljskim stresnim dejavnikom, kot so prisotnost oksidantov, temperaturni šok, etanol in kovinski ioni (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

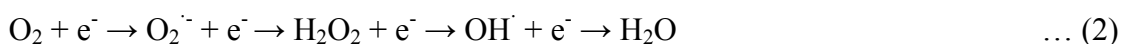
Kvasovke imajo v celicah antioksidativne obrambne sisteme, ki so v normalnih razmerah dovolj učinkoviti, da vzdržujejo količino ROS na neškodljivi ravni. Ločimo primarne in sekundarne antioksidativne sisteme, primarni odstranjujejo ROS, sekundarni pa odstranjujejo poškodovane molekule. Če ti obrambni sistemi ne zadostujejo oz. odpovejo, se sproži oksidativni stres (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

2.2.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

ROS so stranski produkti celičnega metabolizma. (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). So zelo nestabilne molekule, ki imajo en elektron ali več nesparjenih elektronov (Santoro in Thiele, 1997). Pojem ROS zajema molekule kisika v različnih reduciranih in/ali vzbujenih stanjih ter spojine kisika z vodikom, klorom in dušikom (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

Kopičenje ROS povzroča staranje celic in sproži programirano celično smrt (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

V organizmu prosti kisikovi radikali nastajajo pri redoks in encimskih reakcijah, pri čemer prihaja do prenosa elektrona. Primer take reakcije je redukcija kisika do vode pri aerobnem metabolizmu (enačba 2).



ROS nastajajo s pomočjo endogenih (mitohondrij, citokrom P450, peroksisom in tudi vnetni celični odzivi) ali eksogenih virov (radiacija in različni okoljski agensi npr. ksenobiotiki in kovinski ioni) (Inoue in sod., 2003; Gupta in sod., 1997; Klaunig in sod., 1997).

Glavni ROS so:

- superoksidni anion (O_2^-)
 - nastane npr. z redukcijo elektronov v mitohondriju in avtooksidacijo ob reagiranju z reducenti, kot so glutation, NADH ...
 - superoksidna dismutaza (SOD) ga pretvori v kisik in vodikov peroksid,
 - z oksidirano obliko kovine (Fe III, Cu II) se v Haber-Weiss-ovi reakciji (enačba 3) pretvori v kisik (O_2). Reducirana oblika kovine lahko nato vstopi v Fentonovo reakcijo (enačba 1).

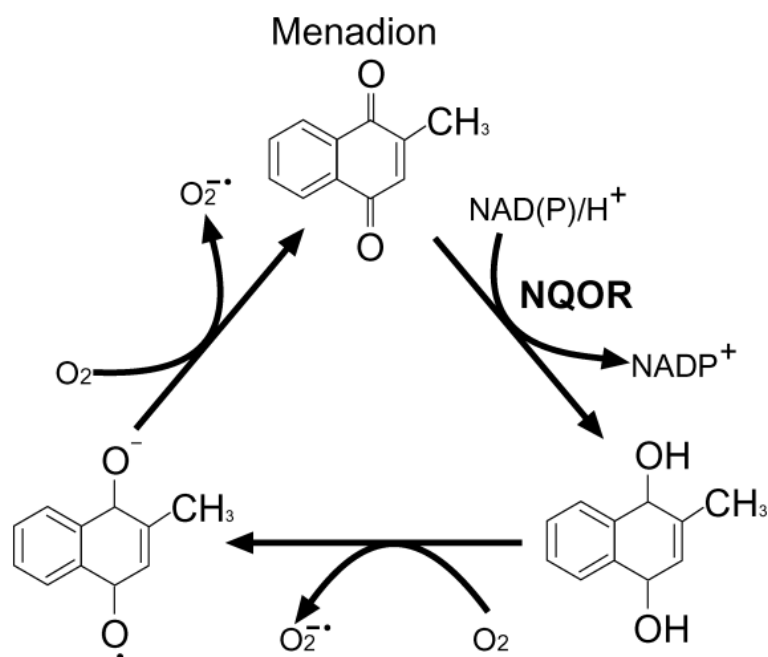


- hidroksilni radikal ($OH\cdot$)
 - nastane spontano iz H_2O_2 , s Fentonovo reakcijo iz H_2O_2 v prisotnosti kovine v reducirani obliki (Fe (II), Cu (I), Ti (III)), zaradi UV in ionizirajočega sevanja,
 - je najbolj reaktiven radikal z visokim pozitivnim redukcijskim potencialom
- singlet kisik (1O_2)
 - nastaja fotokemijsko s fotosenzibilno reakcijo z vzbujanjem elektronov in biokemijsko (peroksidazni encimi),
 - je boljši oksidant kot navadni kisik.
- vodikov peroksid (H_2O_2)
 - nima nespajenih elektronov,
 - nastane v reakciji z superoksidno dismutazo,
 - uniči ga katalaza.
- dikisik (O_2 z dvema nespajenima elektronoma na π^* orbitali) (Santoro in Thiele, 1997; Halliwell in Gutteridge, 2000; Madigan in sod., 2003).

Povišane koncentracije superoksidnega aniona, vodikovega peroksida ali kovin v reducirani obliki vodijo k nastanku visoko reaktivnega hidroksilnega radikala (Santoro in Thiele, 1997).

Na toksičnost ROS vplivajo mesto delovanja, nivo kemijske reaktivnosti, koncentracija, razpršenost. Pomembna je tudi fiziologija celice (kako hitro opravlja biokemijske reakcije) in prisotnost drugih zvrsti stresa (Santoro in Thiele, 1997).

ROS nastajajo tudi s pomočjo 2-metil-1,4-naftokinona (menadion oz. vitamin K₃), ki je sintetičen derivat vitamina K₁. V nasprotju z H₂O₂, menadion izzove nastanek ROS samo znotraj celice. Zato je mogoče proučevati vpliv ROS, ki nastajajo intracelularno. Menadion je v celici reduciran z NAD(P)H kinon oksidoreduktazo (NQOR) (slika 1). Pri tem nastane hidrokinon. Hidrokinon se oksidira z molekularnim kisikom, ki je prisoten v visokih mikromolarnih koncentracijah v bioloških sistemih ter tvori superoksidni anion (O₂^{•-}) in druge ROS (Klotz in sod., 2002; Criddle in sod., 2006; Kawamura in sod., 2006).



Slika 1: Redoks cikel menadiona. Menadion je v celici reduciran z NAD(P)H kinon oksidoreduktazo (NQOR). Pri tem nastane hidrokinon. Hidrokinon, ki izhaja iz menadiona se oksidira z molekularnim kisikom ter tvori superoksidni anion (O₂^{•-}) (Klotz in sod., 2002; Criddle in sod., 2006; Kawamura in sod., 2006).

2.2.2 Tarče ROS v celici in poškodbe celičnih komponent

ROS lahko direktno inaktivirajo proteine, poškodujejo membrane (lipidna peroksidacija polinenasičenih maščobnih kislin) in DNA. Proteine poškoduje hidroksilni radikal z oksidacijo aminokislin (Tyr, Phe, Trp, His, Met, Cys) do karbonilov (Santoro in Thiele, 1997).

Poškodbe molekul so lahko reverzibilne (popravljive) ali ireverzibilne (nepopravljive). Pri reverzibilnih poškodbah je pomembna vloga antioksidativnih obrambnih sistemov in stresnih proteinov (Halliwell in Gutteridge, 2000).

Evkariontska DNA, zapakirana v kromatinu, je le delno zaščitena pred hidrosilnim radikalom, ki povzroča lezije baz in prekinitve dvojne vijačnice (Santoro in Thiele, 1997).

2.2.2.1 Oksidativne poškodbe proteinov

ROS neposredno oksidirajo proteine. Proteini so lahko oksidativno modificirani v reakciji s produkti lipidne peroksidacije (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Oksidacija proteinov vodi k nastanku oksidiranih aminokislin in spremenjene stranske verige aminokislin, ki vsebujejo reaktivne karbonile. Rezultat oksidacije proteinov je izguba katalitične aktivnosti, povečana denaturacija in proteoliza. Vodikov peroksid je šibek oksidant. Inaktivira nekatere encime z oksidacijo tiolnih skupin cisteina v aktivnem mestu. Zaradi tega se tvorijo disulfidi med cisteinom v proteinu in tiolno skupino glutathiona, cisteina ter γ -glutamilsteina. Proteini, ki vsebujejo oksidiran cistein so reaktivirani z detiolacijo preko redukcije glutathiona, glutaredoksina, tioredoksina ali z disulfidno izomerazo. Vodikov peroksid oksidira tudi metionin v metionin sulfoksid oz. sulfon. Metionin sulfoksid reduktaza lahko popravi šibko oksidirane proteine z redukcijo metionin sulfoksida v metionin. Hidrosilni radikal, ki nastane z redukcijo vodikovega peroksida (Fentonova reakcija), je odgovoren za večino oksidativnih poškodb. Oksidacija aminokislin v karbonile je ireverzibilna (npr. v proteinu gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza). Ti proteini se odstranijo s proteolizo (Dean in sod., 1997; Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.2.2.2 Oksidativne poškodbe lipidov

Oksidacija polinenasičenih maščobnih kislin (PUFA) je avtokatalitičen proces v katerem nastajajo maščobni hidroperoksidi. Kvasovka *S. cerevisiae* ne more sintetizirati PUFA, te so prevzete iz okolja in vstavljene v membrano. Lipidna peroksidacija je omejena z prisotnostjo PUFA v membrani. Nastali maščobni hidroperoksidi se nato fragmentirajo in tvorijo epoksidge, aldehide in alkane, ki so lahko zelo reaktivni. Poškodujejo DNA in proteine (Costa in Moradas-Ferreira, 2001). Eden od produktov fragmentacije maščobnega hidroperoksida, 4-hydroxy-2-nonenal, inhibira celično rast (pri G_0/G_1). Za ponovno rast je potrebna povišana sinteza glutathiona (Wonisch in sod., 1997; Turton in sod., 1997).

Lipidna peroksidacija s tvorbo krajših verig maščobnih kislin poslabša strukturno integriteto membran in poveča njihovo fluidnost (Halliwell in Gutteridge, 2000; Marnett, 1999; Do in sod., 1996; Moradas-Ferreira in sod., 1996).

2.2.3 Obrambni sistemi pred ROS

Obrambo pred ROS predstavljajo antioksidativni sistemi – encimi, nizko molekularni antioksidanti, odstranjevalci redoks kovin, popravljalni sistemi. Nekateri sistemi so konstantno prisotni, nekateri pa inducirani. Za uspešno spopadanje z ROS kvasovka uporablja različne regulatorne molekule, senzorje zaznavanja ROS ter dvokomponentne sisteme signaliziranja (Santoro in Thiele, 1997).

2.2.3.1 Encimski obrambni sistemi pred ROS

Encimi, ki sodelujejo pri obrambi pred ROS so superoksid dismutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza (reducira H_2O_2), glutation reduktaza, tioredoksin reduktaza, citokrom c peroksidaza (reducira H_2O_2), glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (sinteza NADPH v ciklu pentoze-5-fosfata). Katalaza A razgradi vodikov peroksid v citoplazmi, katalaza T pa deluje na vodikov peroksid v peroksisomu. Aktivnost katalaze ponazarja enačba 4. Peroksidaza potrebuje za svoje delovanje še reductent, ponavadi NADH (enačba 5). Cu/Zn SOD uniči superoksidni anion v citoplazmi, Mn SOD pa v mitohondriju. Superoksid dismutaza združi dve molekuli superoksida. Pri tem nastane vodikov peroksid in molekula kisika (enačba 6). SOD skupaj s katalazo omogoča pretvorbo superoksida do kisika (enačba 7) (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Jamieson, 1998; Sigler in sod., 1999; Walker, 1998; Madigan in sod., 2003).



2.2.3.2 Neencimski obrambni sistemi pred ROS

Sem sodijo glutation, tioredoksin, metalotionini, poliamini in vitamini. Glutation odstranjuje hidroksilni radikal in singlet kisik, reducira disulfidna mostičke v proteinih ter

regenerira druge antioksidante. Tioredoksin reducira disulfidne mostičke v proteinih. Metalotionini ščitijo celico pred reduciranimi oblikami kovin. Poliamini in vitamini zaščitijo lipide pred oksidacijo (Moradas-Ferreira in sod., 1996; Sigler in sod., 1999; Walker, 1998).

2.2.4 Metode detekcije ROS

Detekcija ROS je mogoča z direktnimi in indirektnimi metodami. Direktna detekcija ROS v bioloških vzorcih je zelo zahtevna zaradi visoko reaktivnih molekul, ki so zelo nestabilne. Najpogosteje se uporabljajo indirektna metode spremljanja sprememb v celici in nastajanja produktov oksidacije s pomočjo kemiluminiscence ali s fluorescenco ter merjenje encimske in neencimske antioksidativne aktivnosti (Wheeler in sod., 1990; Holmgren in sod., 1995; Jamnik in Raspor, 2003; Akerboom in Sies, 1981).

2.2.4.1 Detekcija poškodb proteinov

Kopičenje oksidiranih proteinov najpogosteje detektiramo s karbonilnim testom (Stadtman in sod., 1992; Stadtman in Oliver, 1991). To je spektrofotometrična metoda, ki dokazuje pojav karbonilnih skupin na proteinih in kvantitativno določa oksidativne poškodbe proteinov z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) (Levine in sod., 1994; Burcham in Kuhan, 1996; Adams in sod., 2001). Karbonile lahko detektiramo tudi z merjenjem protiteles na DNPH z imunoblot analizo (Nakamura in Goto, 1996; Shacter in sod., 1994).

2.2.4.2 Detekcija lipidne peroksidacije

Znani so številni analitični testi za določanje lipidne peroksidacije. In sicer, fluorometrija, spektrofotometrija, plinska kromatografija, HPLC, plinsko-tekočinska kromatografija, spektrofotometrično določanje malondialdehida (MDA) z ali brez tiobarbiturične kisline (TBA) (Wilson in sod., 1997).

Najbolj pogosto se uporablja določanje MDA z TBA. Metoda je zelo preprosta, ima pa tudi zelo visoko občutljivost. Pomanjkljivost metode je nizka specifičnost (Wilson in sod., 1997). Pri metodi je bistvena reakcija med MDA in TBA, pri čemer nastane $\text{MDA}(\text{TBA})_2$, rdeče obarvan produkt z maksimalno absorbanco pri 532 nm (Li in sod., 2004). Vsebnost

TBA lahko določimo z merjenjem fluorescence pri 555 nm (valovna dolžina vzbujanja je $\lambda_v = 515$ nm, valovna dolžina emisije je $\lambda_e = 555$ nm) (Nguyen-nhu in Knoops, 2002).

2.3 RASTLINSKI IZVLEČKI

2.3.1 Uporaba rastlinskih izvlečkov

Rastline sintetizirajo veliko različnih, kompleksnih molekul, ki nimajo neposrednega vpliva na rast ali metabolno aktivnost. To so t.i. sekundarni metaboliti. Rastlinske sekundarne metabolite imenujemo fitokemikalije. Fitokemikalije so biološko aktivne rastlinske spojine, ki lahko z antioksidativnim delovanjem preprečijo bolezni (Halliwell in Gutteridge, 1992; Farombi in sod., 1998). Antioksidanti ščitijo druge molekule pred oksidacijo, ko so izpostavljeni prostim radikalom in ROS, ki so vzrok različnih bolezni ter kvaru živil (Halliwell in Gutteridge, 1992; Farombi, 2000; Koleva in sod., 2000).

Rastline že stoletja uporabljamo tudi v medicinske namene. Zdravilne učinkovine rastline predstavljajo fitokemikalije, npr. alkaloidi, tanini, flavonoidi in fenolne spojine (Hill, 1952).

2.3.2 Antioksidativno delovanje rastlinskih izvlečkov

Antioksidativne lastnosti imajo številne rastline, ki se v prehrani uporabljajo kot začimbe. Primeri teh rastlin so origano, žajbelj, česen, timijan, nageljnova žbica ter rožmarin (Dorman in Deans, 2000; Hammer in sod., 1999). Te rastline lahko izkoriščamo kot dodatke antioksidantov v prehrabnih dietah, predvsem pri pripravi jedi z nizko hranilno vrednostjo (Mata in sod., 2007).

Rastlinske izvlečke z antioksidativnimi lastnostmi pogosto uporabljajo v procesirani hrani, ker preprečujejo oksidacijo maščob ali olj s strani ROS. Lipidna oksidacija lahko povzroči spremembe v barvi, vonju in aromi hrane, s čimer se zmanjša kvaliteta hrane (Wada in sod., 2004). Primer uporabe rastlinskih izvlečkov je aplikacija antimikrobnih in/ali antioksidativnih spojin na embalažo z namenov vzdrževanja visokih koncentracij preservativov na površini hrane (Oussallah in sod., 2004; Siragusain sod., 1999).

Esencialna olja rastlin, ki imajo največje protimikrobno in antioksidativno delovanje, vsebujejo višje koncentracije fenolnih spojin, kot so carvacrol, eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol) in timol. Te spojine delujejo na citoplazemsko membrano, in sicer

ovirajo protonski gradient, tok elektronov, aktivni transport in/ali koagulacijo celične vsebine (Burt, 2004).

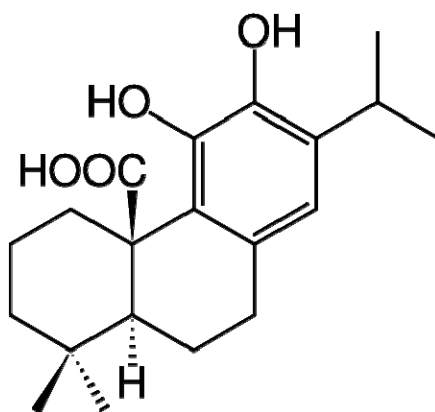
2.3.3 Antioksidativno delovanje rožmarina (*Rosmarinus officinalis* L.)

Rožmarin (slika 2) ima močne antioksidativne lastnosti. Že stoletja ga uporabljajo tako v kulinariki kot tudi v medicini. Številni raziskovalci so poročali o njegovi antioksidativni lastnosti (Chang in sod., 1977; Frankel in sod., 1996), ki jo imajo fenolni diterpeni (karnozolna kislina, karnozol, rozmanol in epi- ter izo-rozmanol) in flavonoidi (Tada, 2000; Wada in sod., 2004). Karnozolna kislina (slika 3) in karnozol (slika 4) sta priznana kot najpomembnejši spojini z antioksidativnim delovanjem (Ibanez in sod., 2003).

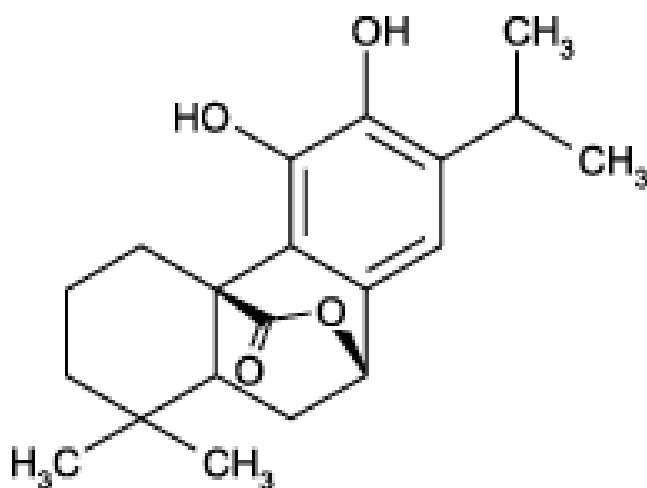


Slika 2: Rožmarin

Izvleček rožmarina deluje v obliki kaskadnega učinka. Karnozolna kislina nevtralizira prosti radikal in se pretvori v karnozol, ki lahko nevtralizira naslednji prosti radikal. Kaskada delovanja se nadaljuje preko rozmanola in gladozola in tako nevtralizira številne proste radikale brez regeneriranja izhodne molekule (primer vitamina E). Vitamin E se mora po uničenju prostega radikala regenerirati preden lahko uniči naslednji prosti radikal. Zanimivo je dejstvo, da v nekaterih primerih rožmarin lahko pomaga pri regeneraciji vitamina E (Masuda in sod., 2001).



Slika 3: Strukturna formula karnozolne kisline (Masuda in sod., 2001)



Slika 4: Strukturna formula karnozola (Masuda in sod., 2001)

Dokazani so bili tudi drugi pozitivni učinki rožmarina, npr. zmanjševanje hepatotoksičnosti (Fahim in sod., 1999; Sotelo-Felix in sod., 2002), antihiperglikemično (Al-Hader in sod., 1994) in antiulcerogenično delovanje (Dias in sod., 2000) ter protiglavno in protimikrobno delovanje (Angioni in sod., 2004).

2.3.4 Sistemi antioksidativnega delovanja izvlečkov rožmarina

Primarni mehanizem vključuje zajetje in stabilizacijo oksidantov. Antioksidacijski proces poteka v dveh fazah:

1. Faza zajetja radikala



2. Faza uničenja radikala

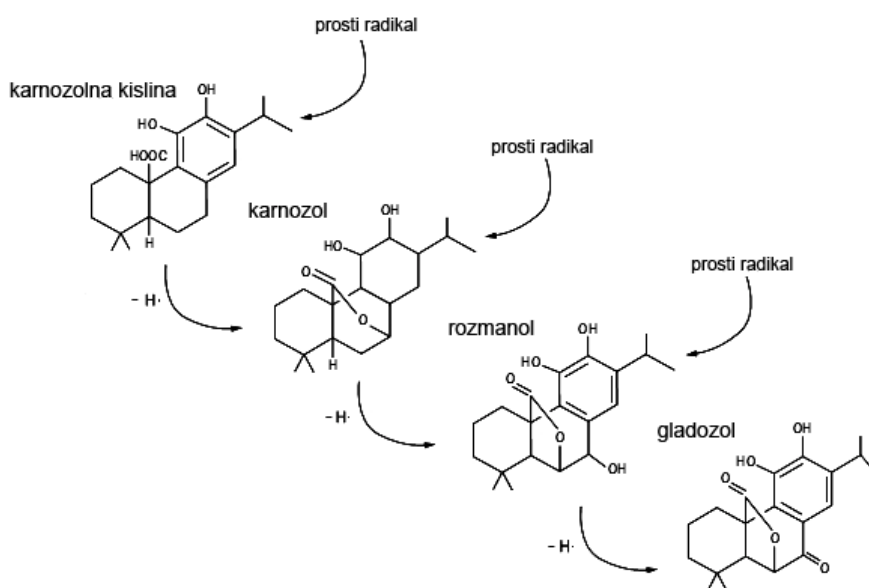
$A^{\bullet} \rightarrow$ spojine, ki niso radikali npr. A-A in Aox ... (9)

(S – oksidacijski substrat; AH – antioksidant; A^{\bullet} – radikal antioksidanta; A-A – dimer A in Aox – oksidiran A)

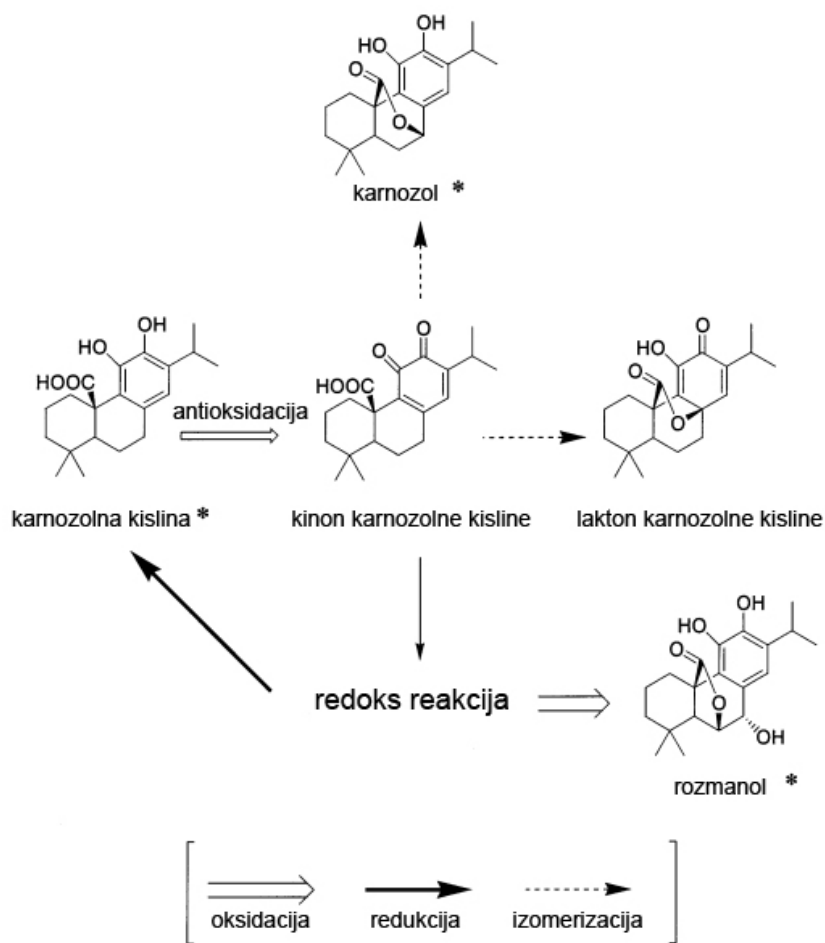
Prva faza je reverzibilni proces (enačba 8), druga pa nereverzibilni proces (enačba 9) in mora tvoriti stabilno spojino (uničenje radikala) (Masuda in sod., 2001).

Karnozolna kislina in sorodni diterpeni kot sta karnozol in rozmanol so znani po visoki antioksidativni aktivnosti (Inatani in sod., 1983). Karnozolna kislina ima tipično *o*-difenolno strukturo, zato se lahko oksidira. Večina difenolnih spojin ima antioksidativno aktivnost (Shahidi in Janitha, 1992).

Antioksidativni mehanizem karnozolne kisline so sprva razlagali kot kaskado reakcij – transformacij karnozolne kisline do karnozola, karnozola do rozmanola ter rozmanola do gladozola (slika 5) (Richeimer in sod., 1999; Masuda in sod., 2001). Slika 6 prikazuje nov predlagan mehanizem kinona karnozolne kisline. Kinon karnozolne kisline je neaktiven v reakcijah z radikali, vendar zelo nestabilen v raztopini. V raztopini se pretvori po dveh poteh. Prva pot je izomerizacija do laktonskih derivatov – karnozola. Druga reakcija je spontana redoks reakcija, ki tvori karnozolno kislino oz. rozmanol, odvisno od lastnosti topila. Kinon karnozolne kisline torej lahko tvori zelo antioksidativno aktivno karnozolno kislino, ta pa še dodatno prispeva k antioksidativnosti raztopine. Sintetizirana karnozol in rozmanol pa še dodatno prispevata k antioksidativni aktivnosti raztopine po porabi karnozolne kisline v naslednjih stopnjah antioksidacije (Masuda in sod., 2002).



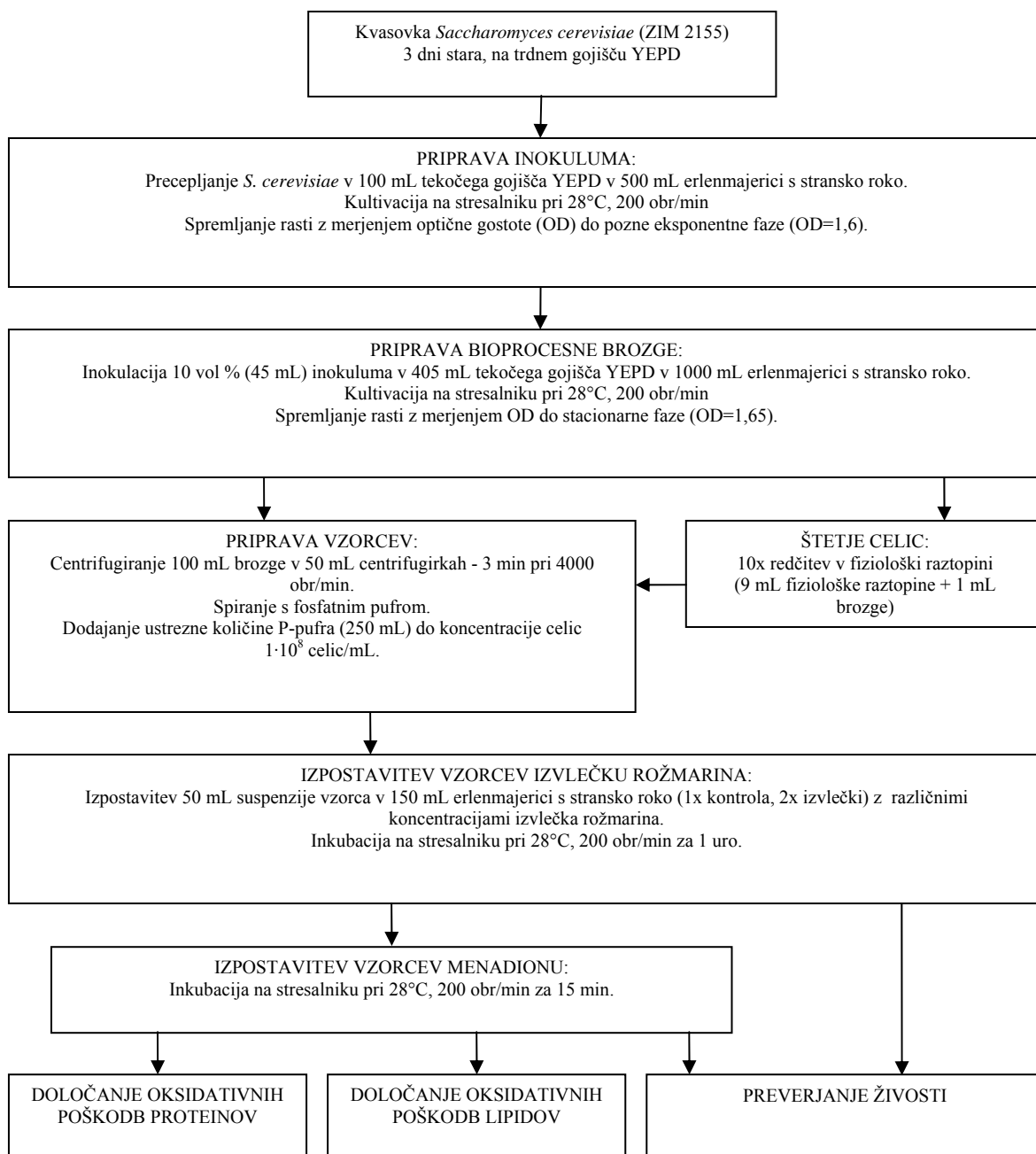
Slika 5: Kaskada reakcij karnozolne kisline (Richeimer in sod., 1999).



Slika 6: Antioksidativni mehanizem iz kinona karnozolne kisline. Različne oblike puščic pomenijo drugačen tip reakcije, kot je prikazano na dnu slike. Zvezdica (*) označuje spojine z antioksidativno aktivnostjo (Masuda in sod., 2002).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 7: Hodogram poskusa

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizem

Uporabili smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Kvasovko smo hranili na petrijevih ploščah s trdnim YEPD gojiščem v inkubatorju pri 28 °C. Za poskus smo uporabljali 3 dni staro kulturo.

3.2.2 Gojišče in raztopine

Gojišče YEPD:

Preglednica 1: Sestava tekočega gojišča YEPD (Atlas, 1993)

Sestavina	Masa (g)
glukoza (Kemika)	20
pepton (Biolife)	20
kvasni ekstrakt (Biolife)	10
dH ₂ O	1000 mL

Tekoče YEPD gojišče smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase na stresalniku. Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 120 °C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili in ga uporabili za namnoževanje aerobne submerzne kultivacije. Pri pripravi trdnega gojišča YEPD, za hranjenje in precepljanje kulture kvasovk, smo dodali še 20 g/L biološkega agarja (Biolife). Po sterilizaciji smo gojišče ohladili in ga aseptično razlili v petrijeve plošče.

Fiziološka raztopina:

- 8,5 % NaCl (Merck)

Kalij-fosfatni pufer (pH = 7,0):

- 50 mM K₂HPO₄ (Merck)

- 50 mM KH_2PO_4 (Merck)

Pufer 10x PBS (pH = 7,2):

Preglednica 2: Sestava pufra 10x PBS

Sestavina	Masa (g)
Na_2HPO_4 (brezvodni) (Merck)	10,9
NaH_2PO_4 (brezvodni) (Merck)	3,2
NaCl (Merck)	90
dH_2O	1000 mL

Natrij-kalijev fosfatni pufer (pH = 7,0):

Preglednica 3: Sestava natrij-kalijevega pufra

Sestavina	Koncentracija (mM)
Na_2HPO_4 (Merck)	50
KH_2PO_4 (Merck)	50
EDTA (Kemika)	0,1

Raztopina HCl:

- 2 M HCl (Merck)

Raztopina 2,4-dinitrofenilhidrazin:

- 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin (Merck) v 2 M HCl (Merck)

Raztopina TCA:

- 20 % (m/v) TCA (Merck)

Kalij-fosfatni pufer (pH = 2,3):

- 2 mM KH_2PO_4 (Merck)
- 2 mM K_2HPO_4 (Merck)
- korekcija pH s 3-fluoroocetno kislino

Raztopina gvanidijevega klorida:

- 6 M raztopina gvanidijevega klorida (GC) v 2 mM kalij-fosfatnem pufru

Raztopina etanol-etil acetat (1:1):

- etanol (Merck)
- etilacetat (Merck)

3.2.3 Reagenti in barvila

Bradfordov reagent (Bio Rad Protein Assay)

Inhibitor celičnih proteaz (Roche Diagnostic GMBN)

Reagent za določanje lipidne peroksidacije:

Preglednica 4: Reagent za določanje lipidne peroksidacije

Sestavina	Masa (g)
TCA (Merck)	15
TBA (Sigma – Aldrich)	0,37
BHT (Sigma – Aldrich)	0,01
HCl (Merck)	25 mL 1 M
dH ₂ O	1000 mL

Menadion 2mM (Sigma)

Komplet: LIVE/DEAD[®] Funga Light[™] Yeast Viability Kit (Molecular Probes)

- barvilo SYTO[®] 9: 3,34 mM, raztopina v DMSO
- barvilo propidijev jodid: 20 mM, raztopina v DMSO
- Komplet smo hranili pri T= - 20 °C.

Protipenilec (Carl Becker Chemie)

3.2.4 Rastlinski izvleček rožmarina

Uporabili smo komercialno pripravljen lipidotopen izvleček VivOX 70 (Vitiva, Markovci, Slovenija)

Pripravili smo 10 % izhodno raztopino z raztapljanjem ustrezne količine izvlečka v 96 % etanolu.

Končni koncentraciji izvlečka, ki smo ju uporabili pri poskusu sta bili 0,01 g/L in 0,05 g/L.

3.2.5 Oprema in aparature

3.2.5.1 Steklovina in potrošni material:

- centrifugirke (1,5 mL, 2 mL, 12 mL, 50 mL)
- cepilne zanke (Bioster)
- cirkonij- kremenčeve kroglice (premer 0,5 mm; Biospec Products)
- čaše
- infuzijske steklenice za 50 mL, 150 mL, 500 mL
- kovinske žličke
- merilne bučke
- merilni valji
- 96-mestne mikrotiterske ploščice za merjenje absorbance in fluorescence (Nunc)
- UV-STAR® 96- mestne mikrotiterske ploščice za merjenje absorbance (Greiner)
- nastavki za pipeto
- parafilm
- petrijeve plošče (Golias)
- sterilni membranski filtri s premerom por 0,45 µm (Sartorius)
- števna ploščica Bürker-Türk (Brand)
- 500 mL erlenmajerice s stransko roko (Shott Duran in Borosilicate)
- 1000 mL erlenmajerice s stransko roko (Shott Duran)

3.2.5.2 Aparature:

- avtoklav (Sutjeska)
- avtomatske pipete (Gilson)
- brezprašna komora (Iskra PIO SMBC 122)

- centrifuge (Eppendorf 5415C, Tehnica Železniki Centric 322A)
- čitalec mikrotiterskih plošč Safire II (Tecan)
- digestorij
- hladilnik (LTH)
- inkubator (I-50 VPC, Kambič)
- magnetno mešalo (Tehnica Železniki 550 M)
- magnetki
- mikroskop (Leica ATC 2000)
- naprava za filtriranje (Sartorius)
- pH meter (Mettler Toledo)
- rotacijski stresalnik (Tehnica Železniki)
- spektrofotometer za merjenje optične gostote (Iskra MA 9520)
- sušilnik (Sutjeska)
- tehtnica (Sartorius analytic)
- tehtnica (Sartorius excellence)
- vodna kopel (Labnet International)
- vrtinčnik VIBROMIX 104 EV (Tehnica Železniki)
- zamrzovalna omara - 80 °C (Heto)
- zamrzovalna skrinja (Gorenje)

3.2.5.3 Programska oprema

Magellan (Tecan)

3.3 METODE

3.3.1 Priprava inokuluma

Za pripravo inokuluma smo uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155. Kvasovko, ki smo jo tri dni inkubirali na trdem gojišču YEPD pri 28 °C, smo s cepilno zanko precepili v tekoče gojišče YEPD do optične gostote $OD_{650}=0,09$.

3.3.2 Spremljanje rasti z merjenjem optične gostote (Madigan in sod., 2003)

Rast kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem optične gostote (OD) pri valovni dolžini 650 nm (OD_{650}). Pred vsako meritvijo smo s pomočjo kontrole (samo gojišče YEPD) umerili napravo.

3 dni staro kulturo *S. cerevisiae* smo iz trdnega gojišča YEPD precepili v 100 mL tekočega gojišča YEPD do OD 0,2 ter dodali protipenilec.

Inkubacija kvasovke je potekala na stresalniku pri 28 °C in 200 obr/min.

Nato smo vsake dve uri zmerili OD_{650} (zadnja meritev je bila izvedena po 14 h).

Delali smo v dveh paralelkah.

3.3.3 Štetje celic s hemocitometrom (Madigan in sod., 2003)

Štetje celic smo izvedli, ko je bila kultura v stacionarni fazi. 1 mL brozge smo dodali 9 mL fiziološke raztopine in premešali z električnim mešalom. Eno kapljico smo dali na Bürker –Türkovi hemocitometer, prešteli celice v treh različnih pravokotnikih ter izračunali povprečje celic.

Izračun skupnega števila celic:

$$\text{št. vseh celic} / \text{mL} = X \cdot R \cdot f$$

X - povprečno št. prešteti celic; R – redčitveni faktor; f – faktor števne ploščice, odvisen od območja štetja ($f = 1 \cdot 10^6$)

3.3.4 Potek poskusa

Za izvedbo poskusa smo s predposkusi določili optimalni čas izpostavitve celic izvlečku rožmarina, koncentracijo in optimalni čas izpostavitve menadiona.

100 mL kulture v stacionarni fazi smo najprej centrifugirali 3 minute pri 4000 obr/min, odstranili supernatant ter sprali s kalijevim fosfatnim pufrom. Celice smo nato resuspendirali v kalijevem fosfatnem pufri do koncentracije $1 \cdot 10^8$ celic/mL.

- Brez izvlečka rožmarina – negativna kontrola

50 mL resuspendiranih celic smo inkubirali na stresalniku 1 h in 15 minut pri 200 obr/min.

- Z izvlečkom rožmarina

50 mL resuspendiranim celicam smo dodali izvleček rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter inkubirali na stresalniku 1 h in 15 minut pri 200 obr/min.

- Z menadionom – pozitivna kontrola

50 mL resuspendiranih celic smo inkubirali na stresalniku 1 h pri 200 obr/min. Celicam smo nato dodali menadion in inkubirali 15 minut pri 200 obr/min.

- Z izvlečkom rožmarina in z menadionom

50 mL resuspendiranim celicam smo dodali izvleček rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter inkubirali na stresalniku 1 h pri 200 obr/min. Celicam smo nato dodali menadion in inkubirali 15 minut pri 200 obr/min.

Optimalen čas inkubacije (1 h in 15 min) je bil določen na podlagi rezultatov predposkusov.

3.3.5 Preverjanje živosti

Živost celic smo preverjali s pomočjo komercialnega kompleta, ki vsebuje fluorescentni barvili SYTO[®] 9 in propidijev jodid (PJ). Barvili se razlikujeta po valovni dolžini fluorescence in zmožnostjo vstopa v celico. SYTO[®] 9 obarva vse kvasne celice, celice s poškodovano in nepoškodovano membrano. V nasprotju, PJ vstopa v celice, ki imajo poškodovano membrano, kar povzroči znižanje fluorescence barvila SYTO[®] 9 zaradi ti. fluorescenčnega prenosa resonančne energije (angl. FRET). Z mešanico barvil se celice z nepoškodovano membrano obarvajo fluorescenčno zeleno, celice s poškodovano membrano pa fluorescenčno rdeče (Haugland, 2008; Zhang in Fang, 2004).

Po inkubaciji smo 1 mL suspenzije centrifugirali 3 minute pri 11000 x g, odstranili supernatant, sprali z 1x PBS in ponovno resuspendirali v 1x PBS. Enemu mililitru suspenzije celic s koncentracijo $1 \cdot 10^6$ celic/mL smo dodali barvili, 1 μ l SYTO[®] 9 in 1 μ l PJ. Suspenzijo smo inkubirali 20 minut v temi pri 37 °C. Po inkubaciji smo izmerili fluorescenco s analizatorjem mikrotiterskih plošč Safire II. Izmerili smo fluorescenco barvila SYTO[®] 9 z valovno dolžino vzbujanja 488 nm (± 15 nm), emisije pa 530 nm (± 15 nm).

3.3.6 Določanje suhe biomase (Paš in sod., 2004)

Po inkubaciji smo 8 mL brozge centrifugirali 3 minute pri 4000 obr/min, sprali z destilirano vodo ter ponovno centrifugirali. Pelet smo sušili v peči pri 105 °C 2,5 h. Po sušenju smo zmerili suho biomaso za analitsko tehtnico. Vrednost suhe biomase smo uporabili za normalizacijo rezultatov karbonilov in lipidne peroksidacije.

3.3.7 Določanje oksidativnih poškodb proteinov

Postopek določanja oksidativnih poškodb proteinov vključuje pripravo celičnega ekstrakta, ter določanje karbonilov, ki so jih opisali Levine in sod. (1994) ter Adams in sod. (2001).

3.3.7.1 Priprava vzorcev - lizata za analizo proteinov

Po poteku poskusa smo 12,5 mL suspenzije centrifugirali 3 minute pri 4000 obr/min, sprali z 50 mM NaK fosfatnim pufrom ter ponovno centrifugirali. Pelet smo shranili pri -80 °C.

Pred analizo smo vzorce odtajali na ledu pri 4 °C in jih ves čas obdelave hranili na ledu.

Polovico tabletke z inhibitorjem proteaz smo raztopili v 5 mL NaK fosfatnega pufra.

Peletu smo dodali 500 µl NaK fosfatnega pufra z inhibitorjem proteaz in resuspendirali s pipeto. Suspenziji smo dodali cirkonij-kremenčeve kroglice (pelet:kroglice ≈ 1:1) ter mešali z električnim mešalom 5x po eno minuto. Suspenzijo smo nato centrifugirali 15 min pri 14000 obr/min in 4 °C.

Supernatant – lizat smo prenesli sterilno mikrocentrifugirko.

3.3.7.2 Določanje karbonilov

Karbonile smo določali s spektrofotometrično metodo ti. karbonilnim testom, ki dokazuje pojav karbonilnih skupin na proteinih in kvantitativno določa oksidativne poškodbe proteinov z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 360 nm (Levine in sod., 1994; Burcham in Kuhan, 1996; Adams in sod., 2001).

300 µl lizata smo dodali 300 µl 20 % TCA in inkubirali 10 minut pri 4 °C (na ledu). Suspenzijo smo centrifugirali 3 minute pri 11000 x g. Supernatant smo odstranili, pelet pa resuspendirali v 0,5 mL 10 mM DNPH. Suspenzijo smo rahlo mešali z električnim mešalom (pribl. 1000 obr/min) eno uro pri sobni temperaturi. Suspenziji smo nato dodali

0,5 mL 20 % TCA, centrifugirali 3 minute pri 11000 x g. Supernatant smo odstranili, pelet pa resuspendirali v 1 mL raztopine etanol - etil acetata. Suspenzijo smo pustili mirovati 10 minut na sobni temperaturi. Zatem smo jo centrifugirali 5 minut pri 11000 x g ter odstranili supernatant. Postopek spiranja z etanol - etil acetatom smo ponovili trikrat.

Pelet smo resuspendirali v 1 mL 6 M GC in inkubirali 30 minut pri 37 °C. Suspenzijo smo centrifugirali 3 minute pri 6000 obr/min. Absorbanco supernatanta smo zmerili pri 360 nm. Slepri vzorec je predstavljal 6 M GC.

Vsebnost karbonilov smo izrazili kot absorbanca na miligram suhe snovi (A/ss).

3.3.8 Določanje oksidativnih poškodb lipidov

Oksidativne poškodbe lipidov smo določili z TBA metodo, ki smo jo povzeli po Ortega-Villasante in sod. (2005). Lipidni hidroperoksidi ob prisotnosti kisline razpadejo do malondialdehidov, ki reagirajo z tiobarbiturno kislino (TBA) ter tvorijo rdeč kromogen. Metoda je občutljiva vendar nespecifična (Niki, 2000). Vsebnost TBA smo določili z merjenjem fluorescence pri 555 nm (valovna dolžina vzbujanja je $\lambda_v = 515$ nm, valovna dolžina emisije je $\lambda_e = 555$ nm) (Nguyen-nhu in Knoops, 2002).

Po poteku poskusa z izvlečkom rožmarina in menadionom smo 12,5 mL suspenzije centrifugirali 3 minute pri 4000 obr/min, sprali z 50 mM NaK fosfatnim pufrom ter ponovno centrifugirali. Pelet smo shranili pri -80 °C.

Pred analizo smo vzorce odtajali na ledu pri 4 °C. Odtajano biomaso smo resuspendirali v 500 μ l reagenta za določanje lipidne peroksidacije, dodali cirkonij-kremenčeve kroglice ter mešali z električnim mešalom 5x po eno minuto. Vzorce smo nato inkubirali 30 min pri 90 °C. Po inkubaciji smo vzorce ohladili na ledu, dodali butanol v razmerju 1:2, centrifugirali 10 minut pri 14000 obr/min ter zmerili fluorescenco supernatanta pri 555 nm (valovna dolžina vzbujanja je $\lambda_v = 515$ nm, valovna dolžina emisije je $\lambda_e = 555$ nm).

Vsebnost MDA smo izrazili kot fluorescenca na miligram suhe snovi (F/ss)

3.3.9 Statistična obdelava podatkov

Rezultate določanja živosti, karbonilov in malondialdehidov smo pripravili in uredili z računalniškim programom Microsoft Excel. Tako urejene podatke smo statistično analizirali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) s

proceduro GLM (angl. General Linear Models). Pričakovane povprečne vrednosti so bile izračunane z uporabo testa mnogoterih primerjav (Duncanov test) in so primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI

V hipotezi trdimo, da izvleček rožmarina vpliva na živost, kultivabilnost in znotrajcelično oksidacijo *Saccharomyces cerevisiae*.

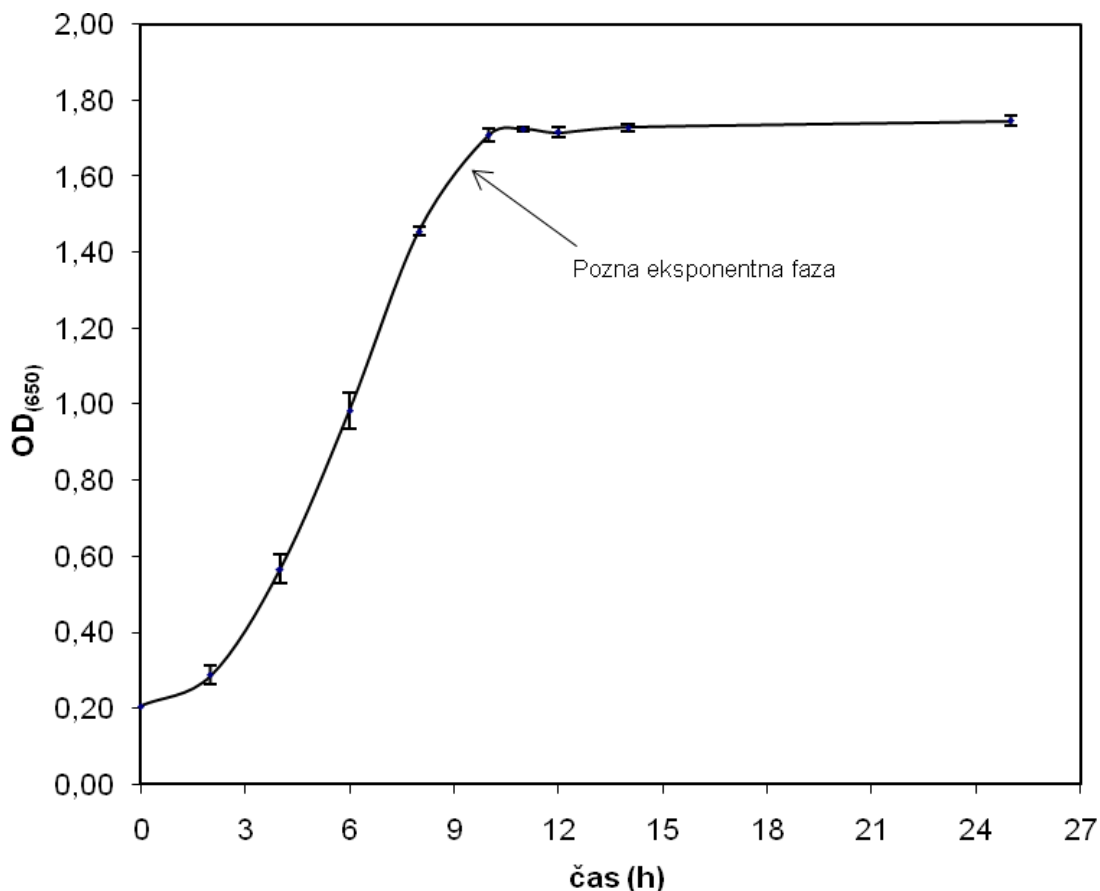
Preverili smo vpliv predhodne izpostavitve celic *Saccharomyces cerevisiae* izvlečku rožmarina in naknadne izpostavitve induktorju reaktivnih kisikovih zvrsti na živost ter oksidativne poškodbe proteinov in lipidov. Glede kultivabilnosti smo se odločili, da je ne bomo spremljali, ker smo z metodo merjenja živosti, ki temelji na podlagi spremljanja integritete celičnih membran, dobili dovolj informacij o delovanju izvlečka na celični ravni.

Naše rezultate smo pridobili v raziskavah na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil med 23.2.2007 in 4.12.2007.

4.1 SPREMLJANJE RASTI KVASOVKE

4.1.1 Inokulum

Rast kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 smo spremljali z merjenjem optične gostote (OD_{650}) do stacionarne faze (Slika 8). Inkubacija je potekala v tekočem gojišču YEPD na stresalniku pri 200 obr/min in 28 °C.

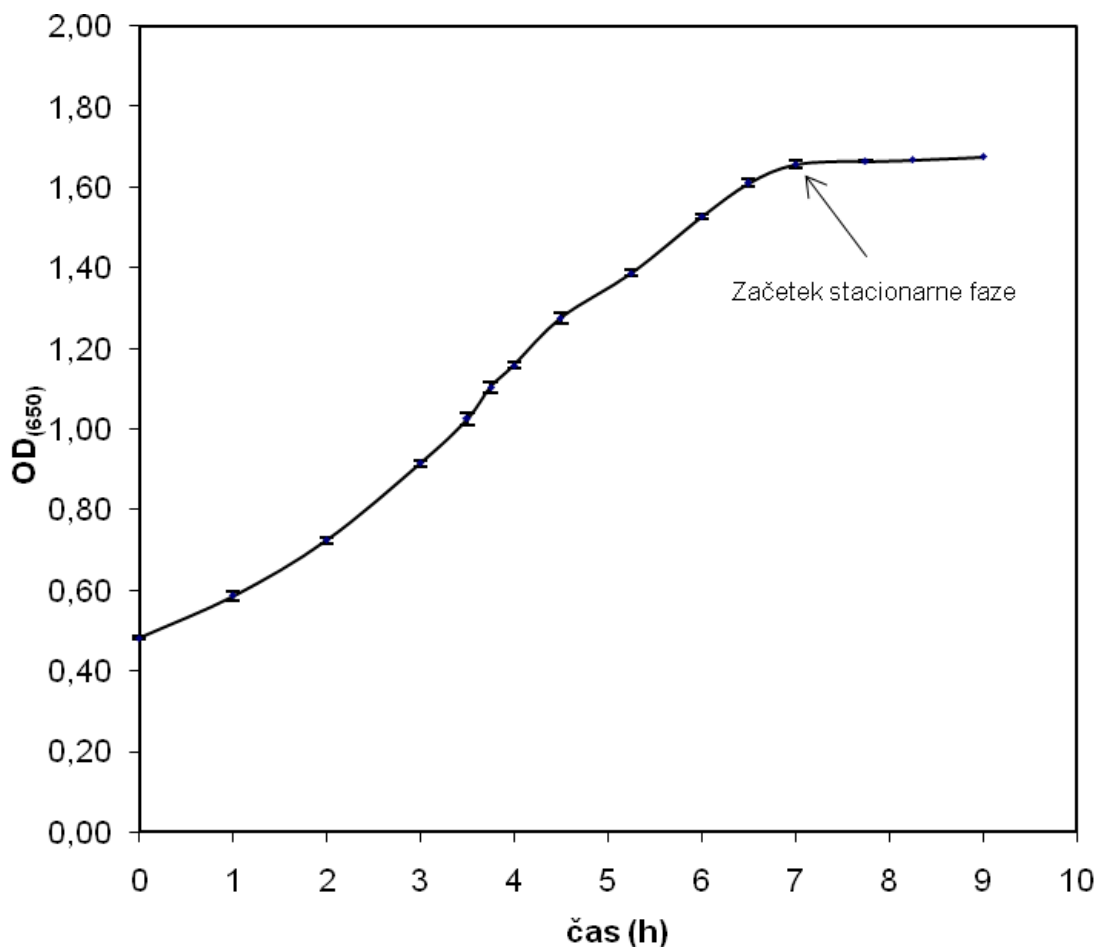


Slika 8: Rastna krivulja kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155, pridobljena s spremljanjem optične gostote (OD₆₅₀) med 25 urnim aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku (T=28 °C, 200 obr/min) v tekočem gojišču YEPD. Rezultati so podani kot povprečje dveh neodvisnih poskusov in dveh ponovitev \pm SD.

Na podlagi rastne krivulje smo določili pozno eksponentno fazo za inokulum, ki je bila pri vrednosti 1,65. V pozni eksponentni fazi je visoka koncentracija celic z visoko metabolo aktivnostjo.

4.1.2 Bioproces

Za bioproces smo uporabili inokulum kvasovk v pozni eksponentni fazi rasti. Rast kvasovke smo spremljali z merjenjem optične gostote (OD₆₅₀) do stacionarne faze (slika 9). Kultivacija je potekala na stresalniku pri 200 obr/min in 28 °C.



Slika 9: Rastna krivulja kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155, pridobljena s spremljanjem optične gostote (OD_{650}) med 9 urnim aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku ($T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 obr/min) v tekočem gojišču YEPD. Rezultati so podani kot povprečje dveh neodvisnih poskusov in dveh ponovitev \pm SD.

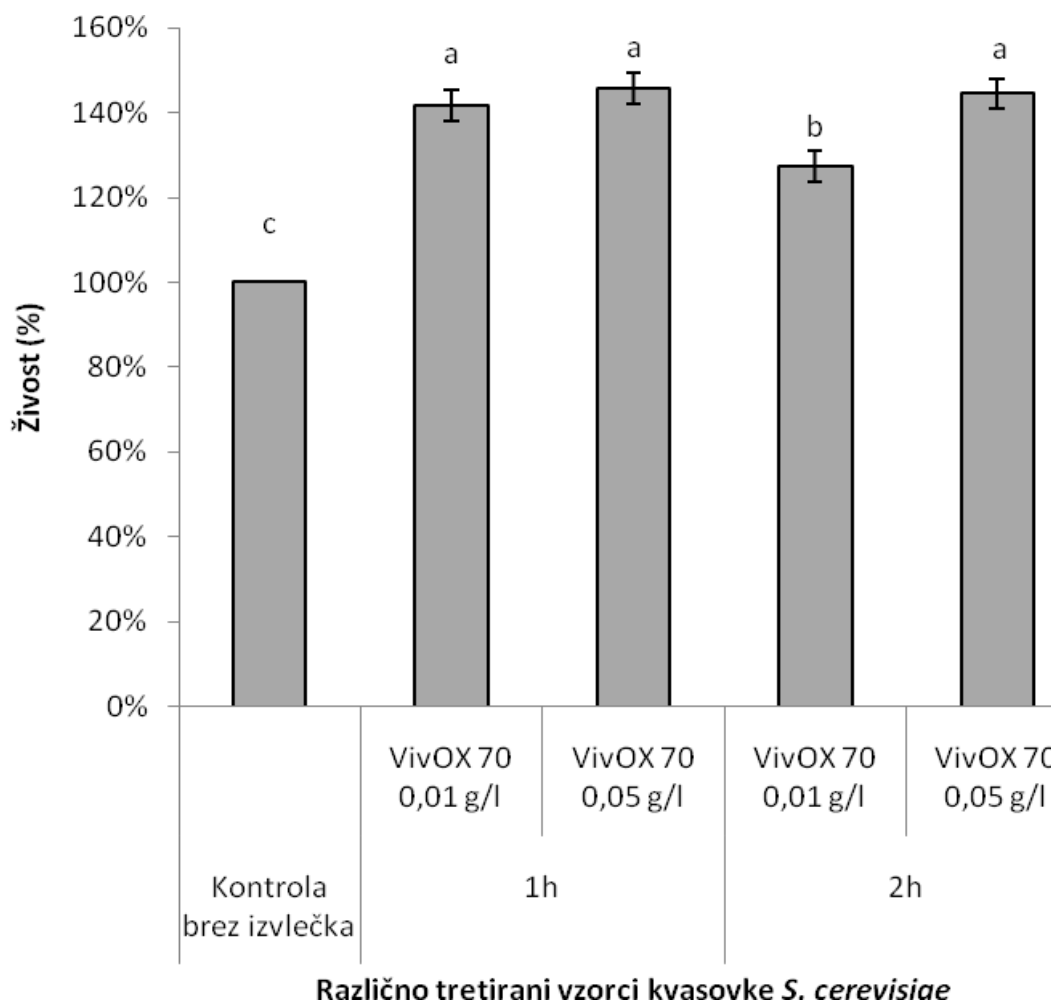
Na podlagi rastne krivulje smo določili začetek stacionarne faze za bioprocen, ki je bila pri vrednosti 1,65 (slika 9), ter celice kvasovk nato po spiranju s fosfatnim pufrom izpostavili izvlečku rožmarina.

4.2 DOLOČANJE ŽIVOSTI:

4.2.1 Določanje živosti celic v prisotnosti in odsotnosti izvlečka rožmarina

Kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 2155 smo po namnoževanju v tekočem gojišču YEPD sprali s kalijevim fosfatnim pufrom ($\text{pH} = 7,0$) ter ponovno resuspendirali v kalijevem fosfatnem puftru ($\text{pH} = 7,0$) do končne koncentracije celic $1 \cdot 10^8$ celic/mL. S tem smo izničili vpliv gojišča na rast oz. preživetje. Suspenzijo celic kvasovk smo izpostavili dvema različnima

koncentracijama izvlečka rožmarina. Nižja koncentracija, 0,01 g/L predstavlja koncentracijo, ki je pokazala antioksidativno delovanje in-vitro (0,007 g/L). Analize so opravili na Katedri za kemijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta. Dodatno smo naredili poskus s 5x višjo koncentracijo. Po enourni in dvourni izpostavitvi izvlečku rožmarina smo preverjali vpliv izvlečka na živost celic.



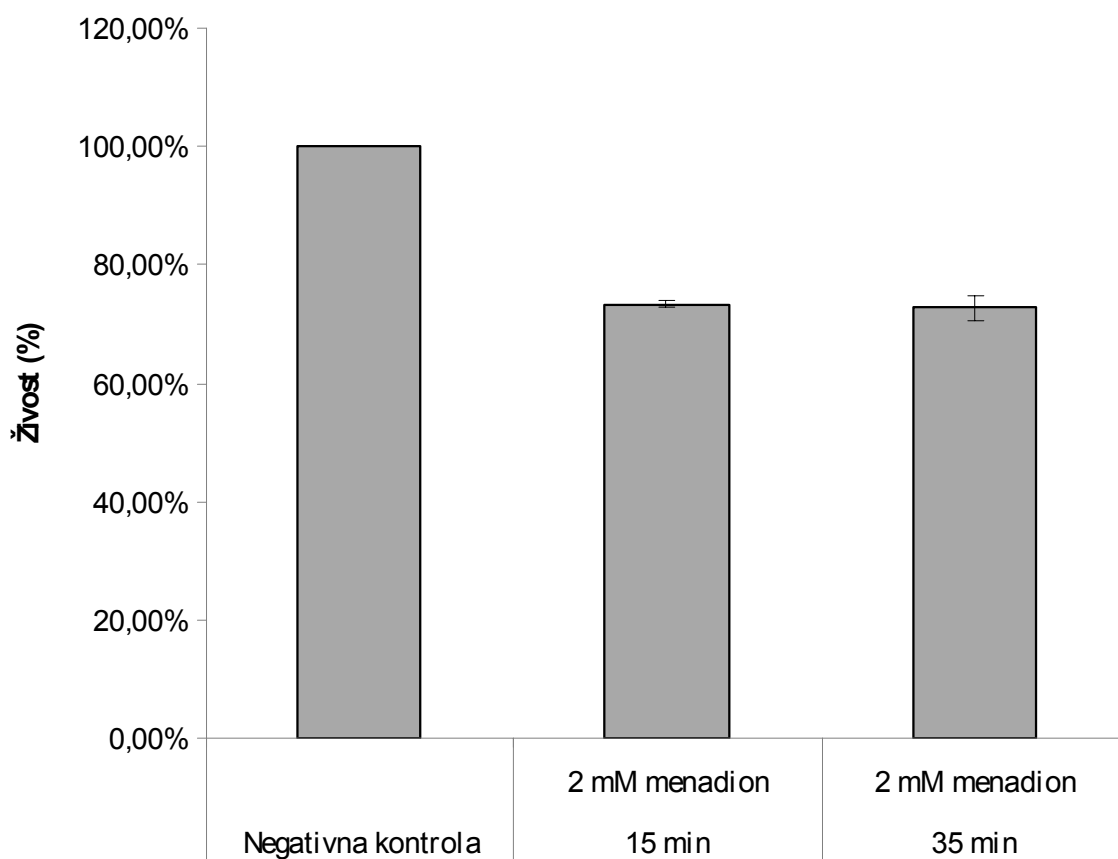
Slika 10: Vpliv izvlečka rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) na preživetje kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0), T = 28 °C, 200 obr/min) v stacionarni fazi rasti pri dveh različnih časih glede na kontrolo. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh neodvisnih poskusov in dveh ponovitvah ± SD. Povprečne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b, c) se med seboj statistično razlikujejo pri $P \leq 0,05$.

S slike 10 je razvidno, da je izvleček ugodno vplival na celice, saj se je odstotek živih celic v prvi uri inkubacije statistično značilno povečal pri obeh koncentracijah izvlečka za približno 42 odstotkov, kljub temu da so bile celice pred izpostavljanjem v stacionarni fazi.

Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo pri glavnem poskusu celice kvasovk izpostavljali izvlečku rožmarina s koncentracijo 0,01 g/L eno uro.

4.2.2 Določanje živosti v prisotnosti in odsotnosti menadiona

Kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 2155 smo po namnoževanju v tekočem gojišču YEPD sprali s kalijevim fosfatnim pufrum (pH = 7,0) ter ponovno resuspendirali v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0) do končne koncentracije celic $1 \cdot 10^8$ celic/mL. Kvasovko *S. cerevisiae* smo v stacionarni fazi rasti (dodatna enourna inkubacija, določena v predposkusu, je potekala v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0) pri $T = 28$ °C in 200 obr/min) izpostavili 2 mM menadionu. Po 15-minutni in 35-minutni izpostavitvi menadionu smo preverjali vpliv na živost celic.



Različno tretirani vzorci kvasovke *S. cerevisiae*

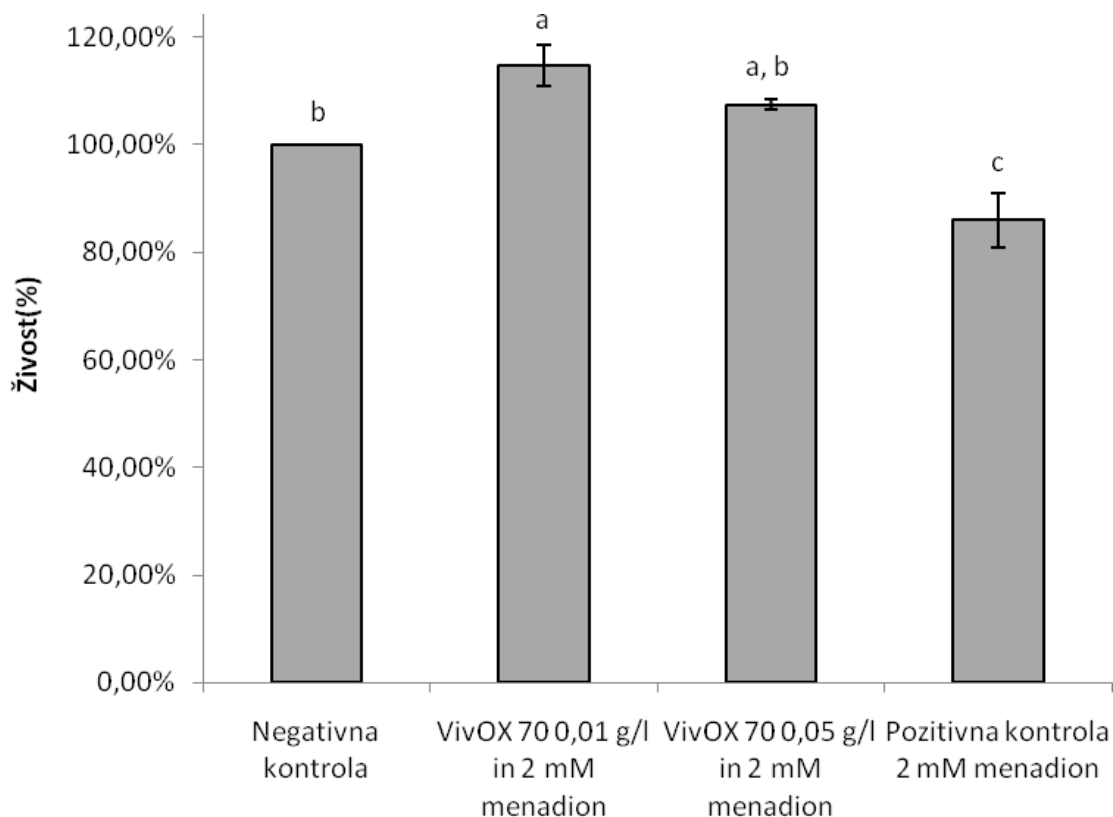
Slika 11: Vpliv menadiona (2 mM) na preživetje kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0), $T = 28$ °C, 200 obr/min) v stacionarni fazi rasti pri dveh različnih časih glede na kontrolo. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh neodvisnih poskusov in dveh ponovitev \pm SD.

Na sliki 11 je prikazan negativen vpliv menadiona na živost celic, ki že po 15-minutni izpostavitvi zniža živost celic za približno 27 odstotkov v primerjavi z negativno kontrolo. Po 35-minutni izpostavitvi 2 mM menadionu se nato živost zmanjša vendar za manj kot odstotek v primerjavi s 15 minutno izpostavitvijo.

Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo pri glavnem poskusu celice kvasovk izpostavljali 2 mM menadionu 15 minut.

4.2.3 Določanje živosti z izvlečkom in menadionom

Kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 2155 smo po pomnoževanju v tekočem gojišču YEPD sprali s kalijevim fosfatnim pufrom (pH = 7,0) ter ponovno resuspendirali v kalijevem fosfatnem pufu (pH = 7,0) do končne koncentracije celic $1 \cdot 10^8$ celic/mL. S tem smo izničili vpliv gojišča za nadaljnje poskuse izpostavitve z izvlečkom rožmarina in menadionom. Celice kvasovk *S. cerevisiae* smo eno uro v kalijevem fosfatnem pufu (pH = 7,0) izpostavljali izvlečku rožmarina dveh koncentracij (0,01 g/L in 0,05 g/L). Po enourni izpostavitvi izvlečku rožmarina smo celice kvasovk ponovno sprali s kalijevim fosfatnim pufrom (pH = 7,0) pred nadaljevanjem poskusa. Kvasovke smo nato 15 minut izpostavljali viru oksidativnega stresa, menadionu (2 mM). Preverjali smo vpliv izvlečka rožmarina na živost celic.

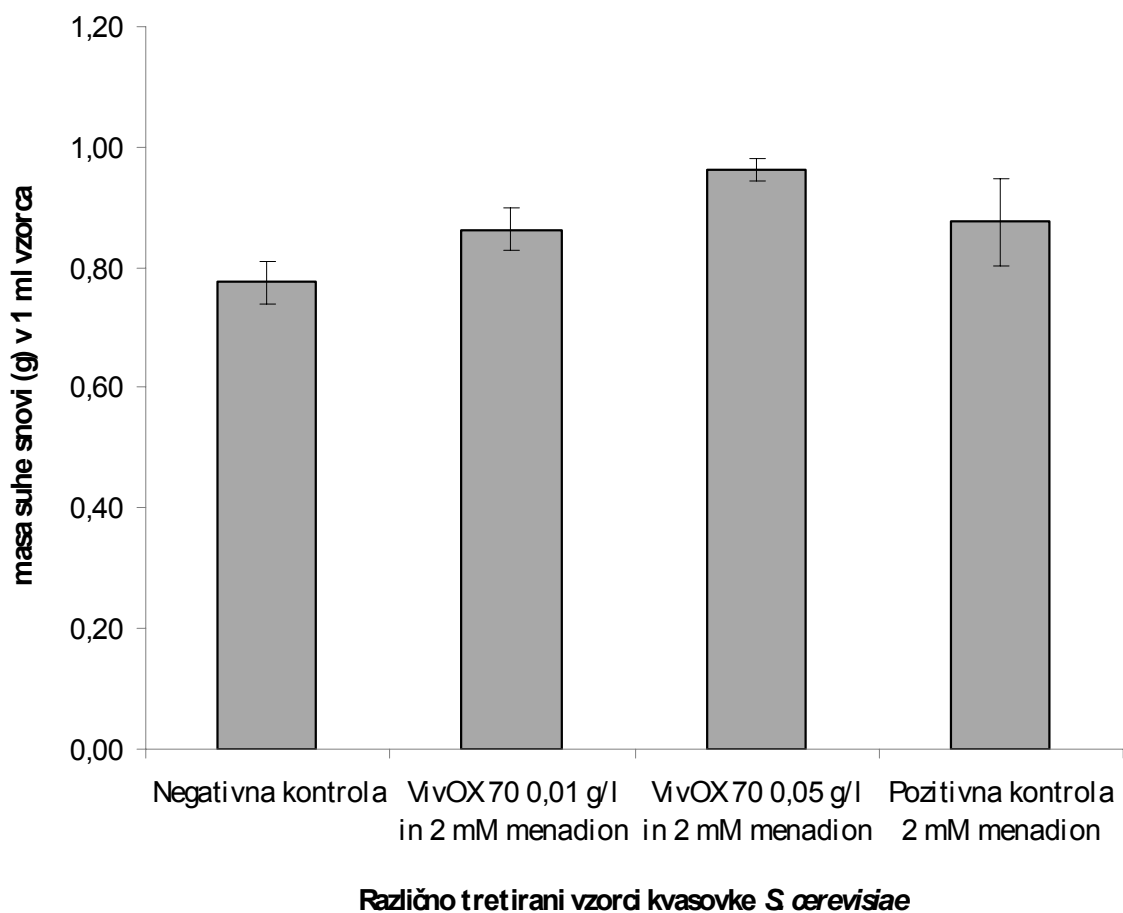


Različno tretirani vzorci kvasovke *S. cerevisiae*

Slika 12: Vpliv enourne izpostavitve izvlečku rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter nato še 15-minutnie izpostavitve menadionu (2 mM) na preživetje kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v kalijeve fosfatnem pufru (pH = 7,0), T = 28 °C, 200 obr/min) v stacionarni fazi rasti glede na kontrolo. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh neodvisnih poskusov in dveh ponovitvah \pm SD. Povprečne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b, c) se med seboj statistično razlikujejo pri $P \leq 0,05$.

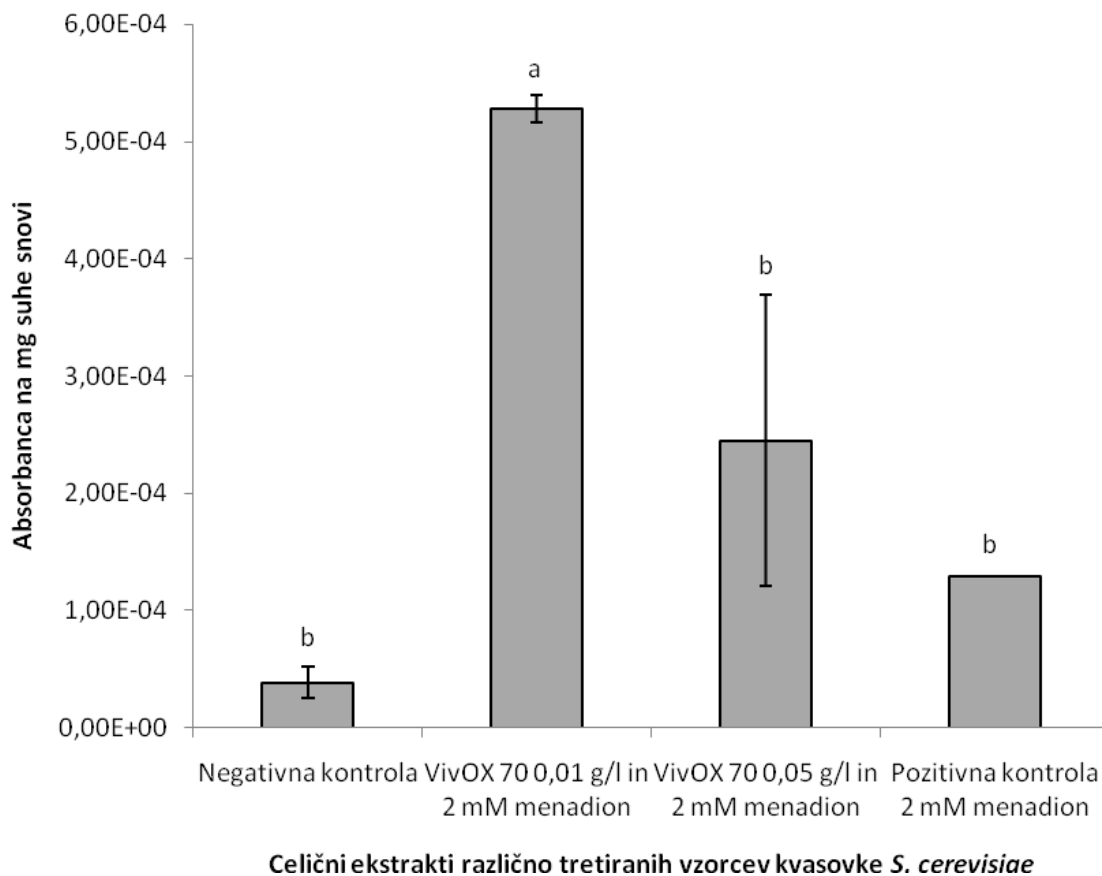
Izvleček rožmarina koncentracije 0,01 g/L je statistično značilno pripomogel k preživetju kulture in povečanju odstotka živosti za približno 15 odstotkov v primerjavi z negativno kontrolo ter za približno 29 odstotkov v primerjavi s pozitivno kontrolo (slika 12). Izvleček rožmarina koncentracije 0,05 g/L je prav tako pripomogel k preživetju kulture in povečanju odstotka živosti, vendar slabše kot nižja koncentracija izvlečka. Rezultata nismo statistično potrdili.

4.3 DOLOČANJE MASE SUHE SNOVI



Slika 13: Določanje mase suhe snovi v enem mL vzorca kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v kalijevelem fosfatnem pufru (pH = 7,0), T= 28 °C, 200 obr/min) glede na kontrolo po enourni izpostavitvi izvlečku rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter nato še po 15-minutni izpostavitvi 2 mM menadionu v stacionarni fazi rasti. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh neodvisnih poskusov in dveh ponovitvah ± SD.

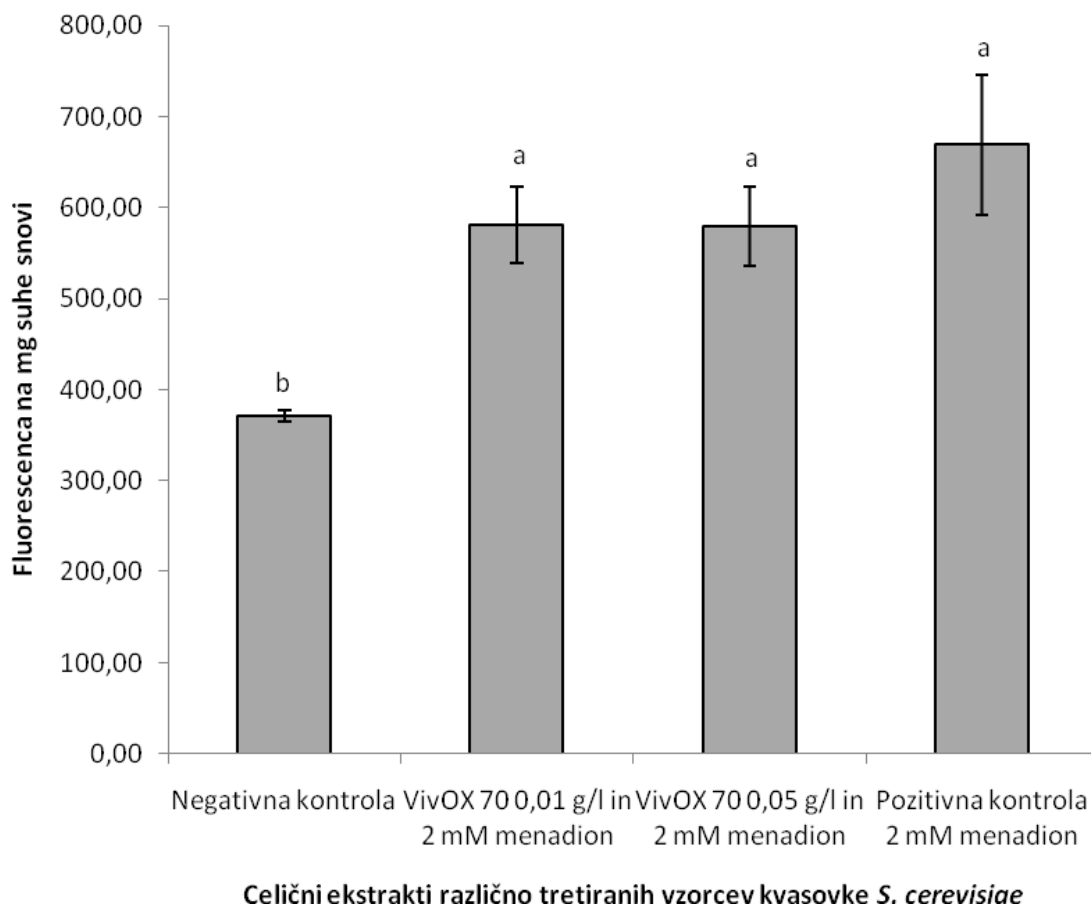
4.4 DOLOČANJE KARBONILOV



Slika 14: Določanje vsebnosti karbonilov na miligram suhe snovi kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v kalijeve fosfatnem pufru (pH = 7,0), T= 28 °C, 200 obr/min) glede na kontrolo po enurni izpostavitvi izvlečku rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter nato še po 15-minutni izpostavitvi 2 mM menadionu v stacionarni fazi rasti. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh neodvisnih poskusov in dveh ponovitev \pm SD. Povprečne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b) se med seboj statistično razlikujejo pri $P \leq 0,05$.

Izpostavitev kvasovk izvlečku rožmarina ter nato še menadionu je povišalo vsebnost karbonilov v primerjavi z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo (slika 14). Vrednosti za vsebnost karbonilov je bila pri celicah, ki so bile predhodno izpostavljene izvlečku rožmarina, približno 10x višja kot v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultat je statistično značilen.

4.5 DOLOČANJE MALONDIALDEHIDOV



Slika 15: Določanje malondialdehidov kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0), T = 28 °C, 200 obr/min) glede na kontrolo po enournem izpostavljanju izvlečku rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter nato še s 15-minutnim izpostavljanjem 2 mM menadionom v stacionarni fazi rasti. Rezultati so podani kot povprečna vrednost dveh neodvisnih poskusov in dveh ponovitev \pm SD. Povprečne vrednosti, ki so ob istem času merjenja označene z različnim indeksom (a, b) se med seboj statistično razlikujejo pri $P \leq 0,05$.

Vsebnost malondialdehidov se ni statistično značilno znižala pri celicah, ki so bile predhodno izpostavljene izvlečku rožmarina in nato še menadionu v primerjavi s celicami, ki so bile izpostavljene samo menadionu (slika 15). Višja koncentracija izvlečka (0,05 g/L) ni statistično značilno pripomogla k znižanju lipidne peroksidacije v primerjavi z nižjo koncentracijo izvlečka (0,01 g/L).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V skladu z delovno hipotezo, ki pravi da izvleček rožmarina vpliva na živost, kultivabilnost in znotrajcelično oksidacijo *Saccharomyces cerevisiae*, je bilo v okviru dveh neodvisnih poskusih in dveh neodvisnih ponovitvah preverjeno ali predhodna izpostavitve celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 izvlečku rožmarina in naknadne izpostavitve induktorju reaktivnih kisikovih zvrsti vpliva na živost ter oksidativne poškodbe proteinov in lipidov. Delovno hipotezo smo delno potrdili. Kultivabilnosti nismo spremljali, ker smo z metodo merjenja živosti, ki temelji na podlagi spremljanja integritete celičnih membran, dobili dovolj informacij o delovanju izvlečka na celični ravni.

5.1 RAZPRAVA

Rožmarin sintetizira kompleksne molekule, ki nimajo neposrednega vpliva na rast ali metabolno aktivnost. To so t.i. fitokemikalije. Že stoletja ga uporabljajo tako v kulinariki kot tudi v medicini. Številni raziskovalci so poročali o njegovi antioksidativni lastnosti (Chang in sod., 1977; Frankel in sod., 1996; Halliwell in Gutteridge, 1992; Farombi in sod., 1998), ki jo imajo fenolni diterpeni (karnozolna kislina, karnozol, rozmanol in epi- ter izo-rozmanol) in flavonoidi (Tada, 2000; Wada in sod., 2004). Karnozolna kislina in karnozol sta priznana kot najpomembnejši spojini z antioksidativnim delovanjem (Ibanez in sod., 2003). Antioksidanti ščitijo druge molekule pred oksidacijo, ko so izpostavljeni ROS, ki so vzrok različnim boleznim ter kvaru hrane (Halliwell in Gutteridge, 1992; Farombi, 2000; Koleva in sod., 2000). Rastlinske izvlečke z antioksidativnimi lastnostmi pogosto uporabljajo v procesiranih živilih, ker preprečujejo oksidacijo maščob ali olj s strani ROS. Lipidna oksidacija lahko povzroči spremembe v barvi, vonju in aromi živil, s čimer se zmanjša kakovost (Wada in sod., 2004). Primer uporabe rastlinskih izvlečkov je aplikacija antimikrobnih in/ali antioksidativnih spojin na embalažo z namenov vzdrževanja visokih koncentracij konzervansov na površini živil (Oussallah in sod., 2004; Siragusain sod., 1999). Te spojine delujejo na citoplazemsko membrano, in sicer ovirajo protonski gradient, tok elektronov, aktivni transport in/ali koagulacijo celične vsebine (Burt, 2004).

5.1.1 Določanje živosti

Najprej smo želeli preveriti vpliv izvlečka rožmarina na živost kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155. Po pomnoževanju v tekočem gojišču YEPD do stacionarne faze rasti smo kvasovko sprali s kalijevim fosfatnim pufrom (pH = 7,0) ter ponovno resuspendirali v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0) do končne koncentracije celic $1 \cdot 10^8$ celic/mL. S tem smo izničili vpliv gojišča na rast oz. preživetje. Suspenziji celic kvasovke smo dodali izvleček rožmarina. Nižja koncentracija, 0,01 g/L, predstavlja koncentracijo, ki je pokazala antioksidativno delovanje v modelnih testih (0,007 g/L) (Katedra za kemijo, oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta). Dodatno smo naredili poskus s 5x višjo koncentracijo. Inkubacija je potekala v fosfatnem pufru pri $T = 28$ °C in 200 obr/min. Vzorčili smo po eni uri in dveh urah.

S slike 10 je razvidno, da je izvleček ugodno vplival na živost celice, saj se je odstotek živih celic v prvi uri inkubacije statistično značilno povečal pri obeh koncentracijah izvlečka za približno 42 odstotkov v primerjavi s kontrolo, kljub temu da so bile celice pred izpostavljanjem v stacionarni fazi rasti. Izvleček je verjetno omogočil porabo rezervnih snovi za rast oz. je izvleček deloval kot hranilo celici. Po dveh urah izpostavitve ni bilo statistično značilnega povečanja odstotka živosti v primerjavi s prvo uro izpostavitve. Za nadaljnje poskuse smo nato izbrali čas izpostavitve eno uro.

Za pozitivno kontrolo smo izbrali menadion kot generator superoksidnih radikalov in preverili njegov vpliv na živost po 15-minutni in po 35-minutni izpostavitvi. Izpostavitvev kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 2155 menadionu je pokazala, da že 15-minutna izpostavitvev 2 mM menadionu negativno vpliva na živost celic (slika 11). Živost celic se je zmanjšala za približno 27 odstotkov v primerjavi z negativno kontrolo. Za nadaljnje poskuse smo nato izbrali čas izpostavitve 15 minut.

V nadaljevanju poskusa smo želeli preveriti ali predtretiranje celic z izvlečkom rožmarina zaščiti celico pred nastajanjem oksidativnih poškodb proteinov in lipidov, ki jih povzroča menadion. Kvasovko smo eno uro inkubirali v prisotnosti izvlečka rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) v kalijevem fosfatnem pufru (pH = 7,0) pri 28 °C in 200 obr/min ter nato dodali 2 mM menadion za 15 minut. Izvleček rožmarina koncentracije 0,01 g/L je statistično značilno pripomogel k preživetju kulture in povečanju odstotka živosti za približno 15 odstotkov v primerjavi z negativno kontrolo ter za približno 29 odstotkov v primerjavi s

pozitivno kontrolo (slika 12). Izvleček rožmarina koncentracije 0,05 g/L je prav tako pripomogel k preživetju kulture oz. povečanju odstotka živosti, vendar slabše kot nižja koncentracija izvlečka. Rezultata nismo statistično potrdili.

5.1.2 Določanje oksidativnih poškodb proteinov in lipidov

Določanje karbonilov je potekalo po metodi, ki so jo opisali Levine in sod. (1994) ter Adams in sod. (2001).

Izpostavitvev kvasovk izvlečku rožmarina ter nato še menadionu je povišalo vsebnosti karbonilov v primerjavi z negativno kontrolo in pozitivno kontrolo (slika 14). Vrednosti za vsebnost karbonilov je bila pri celicah, ki so bile izpostavljene izvlečku rožmarina, približno 10x višja kot v primerjavi z negativno kontrolo.

Izvleček rožmarina ni deloval antioksidativno na proteine in prispeval k povišanju karbonilov. Predhodna izpostavitvev celic izvlečku rožmarina ni zmanjšala poškodb proteinov oz. vsebnost karbonilov zaradi menadiona, temveč smo celo zaznali porast vsebnosti karbonilov. Izvleček rožmarina verjetno vsebuje vir kovinskih ionov, ki so vstopili v Fentonovo ter Haber-Weiss-ovo reakcijo (Hohmann in Mager, 1997; Santoro in Thiele, 1997). Aminokislinske stranske verige encimov so oksidirane preko različnih encimskih in neencimskih oksidacijskih sistemov, ki so odvisni od kovinskih ionov. Kot pri vseh reakcijah oksidaz z mešano funkcijo, je pri oksidacijah proteinov potreben O₂ ter donor elektronov (npr. NAD(P)H, askorbat, itd.). Karbonili se v glavnem tvorijo s kovinami katalizirano oksidacijo, prisotnost askorbata pa dodatno poviša konverzijo nekaterih aminokislin do karbonilov z redukcijo kovin (npr. Fe²⁺ and Cu⁺) (Amici in sod., 1989; Yen in sod., 1999). Posledica je bila porušena homeostatska regulacija kovin v celici, nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti ter povišana tvorba karbonilov. V našem primeru je verjetno donor elektronov karnozolna kislina iz izvlečka rožmarina, ki je povzročila redukcijo kovinskih ionov, le-ti pa so vstopili v Fentonovo reakcijo.

Oksidacija proteinov je mestno specifična reakcija, kjer se Fe²⁺ veže na vezavno mesto za kovine na proteinu in reagira z H₂O₂ v Fentonovi reakciji. Pri tem nastane ROS, ki reagira s stransko verigo aminokislin (prolina, lizina, arginina in histidina), ki je v bližini vezavnega mesta kovin ter tvori derivat karbonila (Amici in sod., 1989).

Določanje vsebnosti malondialdehidov je potekalo po TBA metodi. Vsebnost malondialdehidov se je znižala vendar ne statistično značilno pri celicah, ki so bile

predhodno izpostavljene izvlečku rožmarina in nato še menadionu v primerjavi s celicami, ki so bile izpostavljene samo menadionu (slika 15). Višja koncentracija izvlečka (0,05 g/L) ni statistično značilno pripomogla k znižanju lipidne peroksidacije v primerjavi z nižjo koncentracijo izvlečka (0,01 g/L).

Predtretiranje celic z izvlečkom rožmarina ni bistveno zmanjšalo lipidno peroksidacijo oz. vsebnost malondialdehidov. Rezultata nismo statistično potrdili. Zaradi lipidotopne narave izvlečka lahko sklepamo, da se je delno vgradil v celično membrano, kjer je neposredno deloval na lipide v membrani ter s tem delno ohranil integriteto celične membrane, kar je verjetno pripomoglo tudi k povišanju živosti.

Naši rezultati antioksidativnega delovanja izvlečka rožmarina na lipide in prooksidativnega delovanja na proteine se delno ujemajo z rezultati, ki so jih dobili Lund in sod. (2007). V raziskavi so sicer dokazali, da izvleček rožmarina inhibira oksidacijo lipidov, ne pa oksidacijo proteinov govejega mesa.

Kot modelni organizem smo v raziskavi uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Oksidativne poškodbe proteinov, lipidov, nukleinskih kislin in drugih celičnih komponent, kot tudi obrambni sistemi proti oksidativnemu stresu, so pri mikroorganizmih zelo podobni višjim organizmom na vseh nivojih celične organizacije. Zato mikroorganizmi predstavljajo primerne modelne organizme za raziskave različnih vidikov oksidativnega stresa na biokemijskem, molekularno-biološkem in celičnem nivoju (Sigler in sod., 1999).

5.2 SKLEPI

Na podlagi raziskovalnega dela lahko podamo naslednje sklepe:

- izvleček rožmarina ugodno vpliva na preživetje kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti,
- predhodna izpostavitve celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* izvlečku rožmarina ni zmanjšalo vsebnosti karbonilov in malondialdehidov, ki jih povzroča menadion.

6 POVZETEK

Oksidativni stres je definiran kot porušenje ravnotežja med tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti in antioksidanti v celici. Do porušenia ravnotežja pride zaradi izpostavljenosti celic različnim okoljskim stresnim dejavnikom (kot so prisotnost oksidantov, temperaturni šok, etanol in kovinski ioni), mutacij v encimih, ki sodelujejo pri obrambi ali zaradi pomanjkanja antioksidantov. Kvasovke imajo v celicah antioksidativne obrambne sisteme, ki so v normalnih razmerah dovolj učinkoviti, da vzdržujejo količino ROS na neškodljivi ravni. Če ti obrambni sistemi ne zadostujejo oz. odpovejo, se sproži oksidativni stres. ROS lahko direktno inaktivirajo proteine, poškodujejo membrane (lipidna peroksidacija polinenasičenih maščobnih kislin) in DNA. Antioksidativne lastnosti imajo številne rastline, ki se v prehrani uporabljajo kot začimbe v procesirani hrani, ker preprečujejo oksidacijo maščob ali olj s strani ROS. Primeri teh rastlin so origano, žajbelj, česen, timijan, nageljnova žbica ter rožmarin. Rožmarin ima močne antioksidativne lastnosti. Karnozolna kislina in karnozol v rožmarinu sta priznana kot najpomembnejši spojini z antioksidativnim delovanjem. V diplomski nalogi smo želeli preveriti vpliv izvlečka rožmarina na oksidativne poškodbe proteinov in lipidov. V prvem delu poskusa smo preverjali vpliv na živost kvasovke v stacionarni fazi rasti ob prisotnosti izvlečka rožmarina. Suspenziji celic kvasovk smo dodali izvleček rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) ter inkubirali eno uro pri 28 °C in 200 obr/min. Izvleček je ugodno vplival na živost celic, saj se je odstotek živih celic v prvi uri inkubacije povečal. V nadaljevanju poskusa smo želeli preveriti ali predtretiranje celic z izvlečkom rožmarina zaščiti celico pred nastajanjem oksidativnih poškodb proteinov in lipidov, ki jih povzroča menadion, ki je generator superoksidnih radikalov. Oksidativne poškodbe proteinov oz. karbonile smo določali s spektrofotometrično metodo ti. karbonilnim testom. Oksidativne poškodbe lipidov smo določili z TBA metodo. Izvleček ni deloval antioksidativno na proteine in prispeval k povišanju karbonilov. Izvleček rožmarina ni deloval antioksidativno na lipide. Predtretiranje celic z izvlečkom rožmarina ni zmanjšalo lipidne peroksidacije oz. vsebnosti malondialdehidov.

7 VIRI

- Al-Hader A., Hasan Z., Aqel M. 1994. Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects of *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 43: 217-221.
- Adams S., Green P., Claxton R., Simcox S., Williams M.V., Walsh K., Leeuwenburgh C. 2001. Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways. *Frontiers in Bioscience*, 6: 17-24.
- Akerboom T.P.M., Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, 77: 373-382.
- Amici A., Levine R.L., Tsai L., Stadtman E.R. 1989. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalysed oxidation reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 3341-3346.
- Angioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J.D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. 2004. Chemical composition, plant genetic difference, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 11: 3530-3535.
- Atlas R.M. 1993. *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 1006-1007.
- Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, 2, Suppl. 1: 35-85.
- Burcham P.C., Kuhan Y.T. 1996. Introduction of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product, malondialdehyde. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220: 996-1001.
- Burt S.A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Chang S., Ostric-Matijasevic B., Hsieh O., Huang C.-L. 1977. Natural antioxidants from rosemary and sage. *Journal of Food Science*, 42: 1102-1106.
- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 217-246.
- Criddle D.N., Gillies S., Baumgartner-Wilson H.K., Jaffar M., Chinje E.C., Passmore S., Chvanov M., Barrow S., Gerasimenko O.V., Tepikin A.V., Sutton R., Petersen O.H.

2006. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 52: 40485-40492.
- Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Journal of Biochemistry*, 324: 1-18.
- Dias P., Foglio M., Possenti A., de Carvahlo E.J. 2000. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 69: 57-62.
- Do T.Q., Schultz J.R., Clarke C.F. 1996. Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 7534-7539.
- Dorman H.J.D., Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- Fahim F., Esmat A., Fadel H., Hassan K. 1999. Allied studies on the effect of *Rosemarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50: 413-427.
- Farombi E.O., Nwankwo J.O., Emerole G.O. 1998. Effect of methanolic extract of browned yam flour diet on 7,12-Dimethylbenzanthracene (DMBA) and 3-methylcholanthrene (3-MC) induced toxicity in the rat. *Proceedings of the Federation of African Society on Biochemistry and Molecular Biology*, 1: 15-20.
- Farombi E.O. 2000. Mechanisms for the hepatoprotective action of kolaviron: studies on hepatic enzymes, microsomal lipids and lipid peroxidation in carbon tetrachloride-treated rats. *Pharmacological Research*, 42: 75-80.
- Frankel E.N., Huang S., Prior E., Aeschbach R. 1996. Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72: 201-208.
- Gupta M., Dobashi K., Greene E.L., Orak J.K., Singh I. 1997. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat subcellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 176: 337-347.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1992. Free radicals, antioxidants and human diseases: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 119: 598-620.

- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. V: Antioxidants in nutrition, health and disease. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 111-135.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990.
- Haugland R.P. 2002. Nucleic acid detection and genomics technology. V: Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 9th ed. Gregory J. (ed.). Eugene, Molecular Probes: 265-352.
- Hill A.F. 1952. Economic Botany. A textbook of useful plants and plant products. 2nd ed. New York, McGraw-Hill Book Company Inc.: 560 str.
- Hohmann W.H., Mager S. 1997. Stress response – Mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses – Molecular biology intelligence unit. Hohmann W.H., Mager S. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 1-5.
- Holmgren A., Björnstedt M. 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, 252: 199-208.
- Ibanez E., Kubatova A., Senorans F.J., Cavero S., Reglero G., Hawthorne S.B. 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2: 375-382.
- Inatani R., Nakatani N., Fuwa, H. 1983. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47: 521-528.
- Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 2495-2505.
- Jamieson D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14: 1511-1527.
- Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, 17, 6: 316-323.

- Kawamura F., Hirashima N., Furuno T., Nakanishi M. 2006. Effects of 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione) on cellular signaling in RBL-2H3 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 4: 605-607.
- Klaunig J.E., Xu Y., Bachowski S., Jiang J. 1997. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. V: *Free radical toxicology*. Wallace K.B. (ed.). London, Taylor & Francis: 375-400.
- Klotz L.O., Patak P., Ale-Agha N., Buchczyk D.P., Abdelmohsen K., Gerber P.A., von Montfort C., Sies H. 2002. 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K3, decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Research*, 62: 4922-4928.
- Koleva I.I., Niederlander H.A.G., Van Been T.A. 2000. An on-line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. *Analytical Chemistry*, 72, 10: 2323-2328.
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233: 346-357.
- Li K., Shang X., Chen Y. 2004. High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. *Clinica Chimica Acta*, 346, 2: 199-203.
- Lund M.N., Hviid M.S., Skibsted L.H. 2007. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science*, 76: 226-233.
- Marnett L.J. 1999. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. IARC Scientific Publications, 150: 17-27.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. New Jersey, Pearson Education, Inc.: 1019 str.
- Masuda T., Inaba Y., Takeda Y. 2001. Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 11: 5560-5565.
- Masuda T., Inaba Y., Maekawa T., Takeda Y., Tamura H., Yamaguchi H. 2002. Recovery mechanism of the antioxidant activity from carnosic acid quinone, an oxidized sage and rosemary antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5863-5869.

- Mata A.T., Proenca C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araujo M.E.M. 2007. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103: 778-786.
- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19, 4: 651-658.
- Nakamura A., Goto S. 1996. Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Biochemistry*, 119: 768-774.
- Niki E. 2000. Lipid peroxides. V: Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Gutteridge J.M.C., Taniguchi N. (eds.). New York, Oxford University Press: 360 str.
- Nguyen-nhu N.T., Knoop B. 2002. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicology Letters*, 135: 219-228.
- Oussallah M., Caillet S., Salmieri S., Saucier L., Lacroix M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5598-5605.
- Paš M., Milačič R., Drašlar K., Pollak N., Raspor P. 2004. Uptake of chromium(III) and chromium(VI) compounds in the yeast cell structure. *Biometals*, 17: 25-33.
- Richheimer S.L., Bailey D.T., Bernart M.W., Kent M., Vininski J.V., Anderson L.D. 1999. Antioxidant activity and oxidative degradation of phenolic compounds isolated from rosemary. *Recent Research Developments in Oil Chemistry*, 3: 45-58.
- Ruis H. 1997. Yeast stress responses: achievements, goals and look beyond yeast. V: Yeast stress responses - Molecular biology intelligence unit. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 231-247.
- Santoro N., Thiele D.J. 1997. Oxidative stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses - Molecular biology intelligence unit. Hohmann W.H., Mager S. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 171-211.
- Shacter E., Williams J.A., Lim M., Levine R.L. 1994. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine*, 17: 429-437.

- Shahidi F., Janitha P. K., Wanasundara P. D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32: 67-103.
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms - I. Microbial vs. higher cells – damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiologica*, 44, 6: 587-624.
- Siragusa G.R., Cutter C.N., Willett J.L. 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiology*, 16: 229-235.
- Sotelo-Felix J., Martinez-Fong D., Mureil De la Torre P. 2002. Protective effect of carnosol on CCl₄-induced acute liver damage in rats. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14: 1001-1006.
- Stadtman E.R., Strake-Reed P.E., Oliver C.N., Carney J.M., Floyd R.A. 1992. Protein modification in aging. *EXS*, 62: 64-72.
- Stadtman E.R., Oliver C.N. 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 2005-2008.
- Tada M. 2000. Biological activities of antioxidants from herb in *Libiatae*. *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, 184: 33-39.
- Turton H.E., Dawes I.W., Grant C.M. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. *Journal of Bacteriology*, 179, 4: 1096-1101.
- Walker G.M. 1998. *Yeast physiology and bacteriology*. Chichester, Wiley: 350 str.
- Wada M., Kido H., Ohyama K., Kishikawa N., Ohba Y., Kuroda N., Nakashima K. 2004. Evaluation of quenching effects of non-water-soluble and water-soluble rosemary extracts against active oxygen species by chemiluminescent assay. *Food Chemistry*, 87: 261-267.
- Wheeler C.R., Salzman J.A., Elsayed N.M., Omaye S.T., Korte D.W. 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxidase and glutathione. *Analytical Biochemistry*, 184: 193-199.
- Wilson D.W., Metz H.N., Graver L.M., Rao P.S. 1997. Direct method for quantification of free malondialdehyde with high-performance capillary electrophoresis in biological samples. *Clinical Chemistry*, 43, 10: 1982-1984.

- Wonisch W., Hayn M., Schaur R.J., Tatzber F., Kranner I., Grill D., Winkler R., Bilinski T., Kohlwein S.D., Esterbauer H. 1997. Increased stress parameter synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Letters*, 405, 1: 11-15.
- Yen G., Chen H., Lee C. 1999. Measurement of antioxidative activity in metal ion-induced lipid peroxidation systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 1213-1217.
- Zhang T., Fang H.H.P. 2004. Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using BacLight. *Biotechnology Letters*, 26: 989-992.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Rasporju za pregled diplomskega dela.

Prof. dr. Darji Žgur-Bertok se zahvaljujem za recenzijo diplomskega dela.

Posebno se zahvaljujem delovni mentorici doc. dr. Poloni Jamnik za strokovno vodenje, praktične nasvete, spodbude, potrpežljivost in prijetne klepete.

Doc dr. Lei Gašperlin se zahvaljujem za statistično analizo rezultatov.

Zahvaljujem se tudi ga. Ivici Hočevar in Lini Burkan za pregled referenc.

Ga. Markovič, ga. Pitako in ga. Mohar se zahvaljujem za odpravljanje birokratskih težav.

Hvala za pomoč in nasvete Vidi, Tini, Marku in Blažu ter vsem ostalim zaposlenim na Katedri za biotehnologijo.

Največja zahvala pa gre Katarini za vso podporo in razumevanje tekom študija. mwa

PRILOGE

Priloga A1: Spreminjanje optične gostote (OD_{650}) *S. cerevisiae* ZIM 2155 za inokulum vzorcev dveh ponovitev A in B v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku pri 200 obr/min in 28 °C

OD_{650}/t (h)	0	2	4	6	8	10	11	12	14	25
Vzorec A	0,206	0,304	0,595	1,017	1,465	1,698	1,719	1,706	1,722	1,738
Vzorec B	0,205	0,27	0,539	0,951	1,447	1,721	1,729	1,725	1,735	1,756
Povprečje	0,206	0,287	0,567	0,984	1,456	1,710	1,724	1,716	1,729	1,747
SD	0,001	0,024	0,040	0,047	0,013	0,016	0,007	0,013	0,009	0,013

Priloga A2: Spreminjanje optične gostote (OD_{650}) *S. cerevisiae* ZIM 2155 za bioproces vzorcev v dveh ponovitvah A in B v odvisnosti od časa v tekočem gojišču YEPD na stresalniku pri 200 obr/min in 28 °C

OD_{650}/t (h)	0	1	2	3	3,5	3,75	4	4,5	5,25	6	6,5	7	7,75	8,25	9
Vzorec A	0,48	0,58	0,72	0,92	1,02	1,1	1,15	1,27	1,38	1,52	1,6	1,65	1,66	1,668	1,675
Vzorec B	0,49	0,6	0,73	0,91	1,04	1,11	1,16	1,28	1,39	1,53	1,62	1,66	1,67		
Povprečje	0,482	0,587	0,724	0,915	1,026	1,105	1,158	1,276	1,387	1,527	1,610	1,657	1,665	1,668	1,675
St. dev.	0,004	0,011	0,008	0,007	0,015	0,013	0,008	0,012	0,007	0,007	0,010	0,009	0,002		

Priloga B1: Določanje živosti celic stesane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) v dveh ponovitvah A in B pri dveh različnih časih glede na kontrolo pri izpostavljanju z izvlečkom rožmarina (0,01 g/L in 0,05 g/L) v stacionarni fazi rasti

Vzorec	Negativna kontrola	1h		2h	
		VivOX 70 0,01 g/L	VivOX 70 0,05 g/L	VivOX 70 0,01 g/L	VivOX 70 0,05 g/L
A	100%	139,23%	148,44%	130,09%	147,03%
B	100%	144,41%	143,09%	124,79%	142,10%
Povprečje	1,000	141,82%	145,77%	127,44%	144,57%
St. dev	0,000	3,66	3,78	3,75	3,49

Prikazane so relativne vrednosti glede na negativno kontrolo.

Priloga B2: Določanje živosti celic stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po 15 min in 35 min izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B

Vzorec	Negativna kontrola	15 min 2 mM menadion	35 min 2 mM menadion
A	100,00%	73,78%	74,96%
B	100,00%	73,05%	70,70%
Povprečje	100,00%	73,42%	72,83%
St. dev.	0,000	0,5	3,0

Priloga B3: Določanje živosti celic stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po eno urni izpostavitvi z izvlečkom rožmarina in 15-minutni izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B

Vzorec	Negativna kontrola	VivOX 70 0,01 g/L in 2 mM menadion	VivOX 70 0,05 g/L in 2 mM menadion	2 mM menadion
A	100,00%	117,40%	106,84%	89,56%
B	100,00%	112,08%	108,13%	82,44%
Povprečje	100,00%	114,74%	107,49%	86,00%
St. dev.	0,000	3,8	0,9	5,0

Priloga C: Določanje mase suhe snovi stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po eno urni izpostavitvi z izvlečkom rožmarina in 15-minutni izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B

Vzorec / masa v 1 ml	Negativna kontrola	VivOX 70 0,01 g/L in 2 mM menadion	VivOX 70 0,05 g/L in 2 mM menadion	2 mM menadion
A	0,75	0,84	0,95	0,93
B	0,80	0,89	0,98	0,82
Povprečje	0,77	0,86	0,96	0,87
St. dev.	0,04	0,04	0,02	0,07

Priloga D: Določanje absorbance karbonilov na miligram suhe snovi stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufru, T = 28 °C, 200 obr/min) po eno urni izpostavitvi z izvlečkom rožmarina in 15-minutni izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B

Vzorec / A/mg ss	Negativna kontrola	VivOX 70 0,01 g/L in 2 mM menadion	VivOX 70 0,05 g/L in 2 mM menadion	2 mM menadion
A	4,84E-05	5,20E-04	3,33E-04	
B	2,95E-05	5,36E-04	1,57E-04	1,29E-04
Povprečje	3,90E-05	5,28E-04	2,45E-04	1,29E-04
St. dev.	1,34E-05	1,13E-05	1,24E-04	

Priloga E: Določanje lipidne peroksidacije na miligram suhe snovi stresane kulture kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 2155 (v fosfatnem pufri, T = 28 °C, 200 obr/min) po eno urni izpostavitvi z izvlečkom rožmarina in 15-minutni izpostavitvi z 2 mM menadionom pri vzorcu v dveh ponovitvah A in B

Vzorec / F/mg ss	Negativna kontrola	VivOX 70 0,01 g/L in 2 mM menadion	VivOX 70 0,05 g/L in 2 mM menadion	2 mM menadion
A	375,22	611,18	548,52	615,09
B	366,83	550,88	610,65	723,88
Povprečje	371,03	581,03	579,59	669,49
St. dev.	5,93	42,64	43,93	76,93