

**UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO**

Ajda OTA

**VPLIV FERULNE, KAVNE IN p-KUMARNE KISLINE TER NJIHOVIH
STIRENOV NA MODELNE MEMBRANE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EFFECT OF FERULIC, CAFFEIC AND p-COUMARIC ACID AND THEIR
STYRENES ON MODEL MEMBRANES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in živilsko kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Natašo Poklar Ulrih, za recenzenta doc. dr. Rajka Vidriha.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Recenzent: doc. dr. Rajko Vidrih

Komisija za zagovor:

Predsednik:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Rajko VIDRIH

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ajda Ota

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 577.352:547.587.52(043)=163.6
KG modelne membrane/fenoli/fenolne kisline/hidroksicimetne kisline/ferulna kislina/kavna kislina/p-kumarna kislina/stireni/polarizacija/anizotropija/diferenčna dinamična kalorimetrija/DSC
AV OTA, Ajda
SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentor)/VIDRIH, Rajko (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2009
IN VPLIV FERULNE, KAVNE IN p-KUMARNE KISLINE TER NJIHOVIH STIRENOV NA MODELNE MEMBRANE
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 46 str., 1 pregl., 34 sl., 38 vir.
IJ sl
JI sl/an
AI Hidroksicimetne kisline so fenilpropanoidni metaboliti rastlin in rastlinskih proizvodov. Nahajajo se v sadju, zelenjavi, čaju in zeliščih in imajo pomemben vpliv na organoleptične lastnosti teh živil. Da bi primerjali stopnjo urejenosti lipidnega dvosloja smo izvedli meritve polarizacije in anizotropije fluorescence difenilheksatriena (DPH) v prisotnosti lipidnih modelnih membran. Ugotovili smo, da prisotnost ferulne, kavne in p-kumarne kisline poveča urejenost in zmanjša dinamiko alkilnih verig fosfolipidov v okolici DPH, dodatek stirenov ferulne, kavne in p-kumarne kisline pa urejenost membrane zmanjša. Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) smo spremljali fazne prehode majhnih enoslojnih liposomov (ULV) iz dipalmitoil-fosfatidilholina (DPPC) ob prisotnosti kislin oz. njihovih stirenov. Iz prve meritve smo določili temperaturo in entalpijo faznega prehoda. Drugo meritev smo uporabili za oceno reverzibilnosti faznega prehoda lipidov iz gel v tekoče neurejeno stanje. Iz DSC termogramov je razvidno, da dodatek kavne, ferulne in p-kumarne kisline oz. njihovih stirenov povzroči znižanje temperature predprehoda (T_m') in temperature glavnega prehoda (T_m) in znižanje entalpije glavnega faznega prehoda (ΔH_{cal}). Rezultati DSC meritev učinka posameznih hidroksicimetnih kislin in njihovih stirenov na ULV narejene iz DPPC se ujemajo z rezultati dobljenimi z merjenjem polarizacije in anizotropije DPH.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dd
DC UDC 577.352:547.587.52(043)=163.6
CX model membranes/phenols/phenolic acids/hydroxycinnamic acids/ferulic acids/caffeic acid/p-coumaric acid/styrenes/polarization/anisotropy/differential scanning calorimetry/DSC
AU OTA, Ajda
AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)/ VIDRIH, Rajko (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2009
TI EFFECT OF FERULIC, CAFFEIC AND p-COUMARIC ACID AND THEIR STYRENES ON MODEL MEMBRANES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 46 p., 1 tab., 34 fig., 38 ref.
LA sl
AL sl/an
AB The hydroxycinnamic acids are phenylpropanoid metabolites commonly found in plants and plant products. They are present in fruits, vegetables, tea and herbs and have a significant effect on the sensory characteristics of plant-based foods. The steady-state DPH polarisation and anisotropy measurements were performed to compare the level of order in the lipid bilayer. Addition of ferulic, caffeic and p-coumaric acid increases the ordering and decreases the dynamics of phospholipid alkyl chains in DPH environment. Addition of styrenes of ferulic, caffeic and p-coumaric acid decreases the ordering of lipid bilayer. Differential scanning calorimetry (DSC) measurements were performed in order to track phase transitions of dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC) unilamellar vesicles (ULV) in the presence of ferulic, caffeic and p-coumaric acid and their styrenes. The first DSC scan was used to obtain the temperature and the enthalpy of the phase transition. The second scan was used to assess the reversibility of the phase transition. DSC thermograms show a decrease in temperature of phase pretransitions (T_m') and temperature of main phase transition (T_m) as well as a decrease of main phase transition enthalpy (ΔH_{cal}) in the presence of ferulic, caffeic and p-coumaric acid and their styrenes. The results of DSC measurements of the effect of individual hydroxycinnamic acids and their styrenes on ULV liposomes from DPPC correspond with the results obtained by measuring the polarisation and anisotropy of DPH.

Kazalo vsebine

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 FENOLI.....	2
2.2 FENOLNE KISLINE.....	3
2.3 HIDROKSICIMETNE KISLINE IN NJIHOVI STIRENI.....	3
2.4 MODELNE MEMBRANE.....	6
3 MATERIALI IN METODE.....	7
3.1 MATERIALI.....	7
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema.....	7
3.1.2 Raztopine.....	8
3.1.3 Laboratorijska oprema.....	8
3.2 METODE.....	9
3.2.1 Priprava liposomov za merjenje fluorescence.....	9
3.2.2 Priprava stirenov.....	9
3.2.3 Priprava liposomov za merjenje z metodo DSC.....	10
3.2.4 Merjenje polarizacije in anizotropije.....	10
3.2.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija.....	11
4 REZULTATI.....	13
4.1 MERJENJE POLARIZACIJE IN ANIZOTROPIJE.....	13
4.1.1 Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v MLV in ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH.....	13
4.1.1.1 Ferulna kislina in stiren ferulne kisline.....	13
4.1.1.2 Kavna kislina in stiren kavne kisline.....	16

4.1.1.3	p-kumarna kislina in stiren p-kumarne kisline	18
4.1.2	Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v ULV narejenih iz DPPC.....	21
4.2	DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMetriJA (DSC).....	25
4.2.1	Fazni prehodi lipidnih veziklov (ULV) DPPC v odvisnosti od ferulne, kavne oziroma p-kumarne kisline in njihovih stirenov	25
4.2.2	Reverzibilnost faznih prehodov.....	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	35
5.1	RAZPRAVA.....	35
5.2	SKLEPI.....	38
6	POVZETEK.....	39
	SUMMARY	40
7	VIRI	41
	ZAHVALA	46

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Termodinamske vrednosti faznih prehodov lipidnih veziklov DPPC v prisotnosti ferulne, kavne in p-kumarne kisline oz. njihovih stirenov.....	30
---	----

Kazalo slik

Slika 1: Razdelitev rastlinskih fenolov (Rijken in sod., 2002).	2
Slika 2: Strukturne formule kavne, ferulne in p-kumarne kisline (Miller in Rice-Evans, 1997).....	4
Slika 3: Dekarboksilacija hidroksicimetnih kislin v 4-vinil derivate (stirene) in redukcija v 4-etil derivate (Vanbeneden in sod., 2008; Peppercorn in Goldman, 1971).....	5
Slika 4: Strukturne formule polarnih glav fosfolipidov: (a) POPE, (b) POPC in DPPC in (c) POPS (Hatziantoniou in Demetzos, 2008).....	6
Slika 5: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.	14
Slika 6: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.	14
Slika 7: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.	15
Slika 8: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.	15

- Slika 9:** Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm. 16
- Slika 10:** Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm. 17
- Slika 11:** Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm. 17
- Slika 12:** Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm. 18
- Slika 13:** Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 19
- Slika 14:** Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 19
- Slika 15:** Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s p-kumarno

kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 20

Slika 16: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 20

Slika 17: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 21

Slika 18: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 22

Slika 19: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 23

Slika 20: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 23

Slika 21: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 24

- Slika 22:** Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm..... 25
- Slika 23:** DSC termogram ULV veziklov DPPC po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0. 26
- Slika 24:** Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano ferulno kislino oz. stirenom ferulne kisline v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0. 27
- Slika 25:** Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano kavno kislino oz. stirenom kavne kisline v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0. 28
- Slika 26:** Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano p-kumarno kislino oz. stirenom p-kumarne kisline v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0..... 28
- Slika 27:** Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano ferulno, kavno oz. p-kumarno kislino v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0..... 29
- Slika 28:** Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodanim stirenom ferulne, kavne oz. p-kumarne kisline v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0. 29

- Slika 29:** DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodano ferulno kislino v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0..... 31
- Slika 30:** DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodano kavno kislino v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0..... 32
- Slika 31:** DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodano p-kumarno kislino v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0..... 32
- Slika 32:** DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodanim stirenom ferulne kisline v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0..... 33
- Slika 33:** DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodanim stirenom kavne kisline v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0..... 33
- Slika 34:** DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodanim stirenom p-kumarne kisline v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM HEPES pufru, pH 7,0..... 34

Okrajšave in simboli

CH	holesterol
DPH	difenilheksatrien (1,6-difenil-1,3,5-heksatrien)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPC	1,2-diheksadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
MLV	veliki večslojni liposomi (multilamellar vesicles)
POPC	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
POPE	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamin
POPS	1-palmitoil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo-L-serin]
ULV	majhni enoslojni liposomi (unilamellar vesicles)

1 UVOD

Fenolne spojine vplivajo na prehranske, organoleptične in komercialne lastnosti rastlinskih živil. Med fenolne spojine sodijo tudi fenolne kisline, ki so aromatski sekundarni metaboliti rastlin. Fenolne kisline so v zadnjem času postale predmet številnih raziskav predvsem zaradi svoje zaščitne vloge (Robbins, 2003).

Hidroksicimetne kisline, fenilpropanoidne rastlinske metabolite, pogosto najdemo v rastlinah in živilih rastlinskega izvora (Marinova in sod., 2009; Vanbeneden in sod., 2006; Laranjinha, 2002; Kroon in Williamson, 1999). Zanimive so zlasti zaradi različnih bioloških in farmakoloških aktivnosti, zlasti antioksidativih (Zhu in sod., 2006; Cheng in sod., 2007). V naravi prevladujejo p-kumarna, ferulna in kavna kislina, ki so večinoma vezane na polisaharide celične stene (Vanbeneden in sod., 2006; Rodríguez in sod., 2008). Proste oblike se v naravi akumulirajo le izjemoma (Bengoechea in sod., 1995).

Hidroksicimetne kisline so poznane tudi kot prekursorji za aromatične sestavine rastlin, kot so vanilin in 4-vinil gvajakol. Stireni, produkti dekarboksilacije hidroksicimetnih kislin, se uporabljajo kot intermediati v biotehnoški proizvodnji novih arom (Barthelmebs in sod., 2000; Rosazza in sod. 1995; Ou in Kwok, 2004).

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

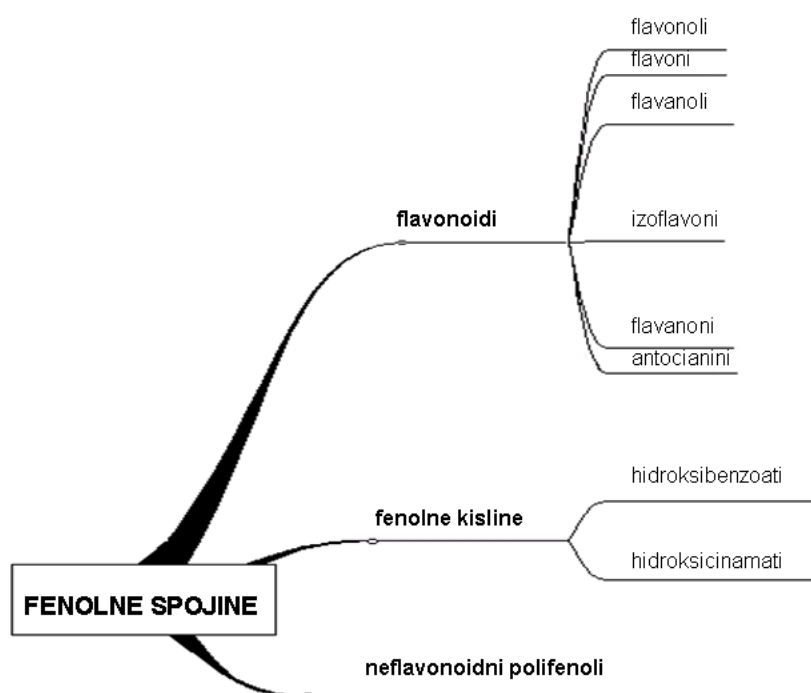
V nalogi smo skušali ugotoviti, kako prisotnosti posameznih kislin in njihovih stirenov vpliva na lastnosti umetnih lipidnih membran in proučiti vpliv temperature na fizikalne lastnosti membran. Kot membranski model smo uporabili majhne enoslojne liposome (ULV) in velike večslojne liposome (MLV) iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in ULV iz DPPC.

Predvidevamo, da ferulna, kavna in p-kumarna kislina ter njihovi stireni vplivajo na fluidnost modelnih membran.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FENOLI

Fenolne spojine so vse tiste spojine, ki imajo vsaj en aromatski obroč in najmanj eno ali več -OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi najdemo običajne spojine z več -OH skupinami, zato se je zanje uveljavilo tudi ime polifenoli (Abram, 2000). Pri višjih rastlinah so identificirali več tisoč molekul s polifenolno strukturo, več sto pa jih najdemo v užitnih rastlinah. So sekundarni metaboliti rastlin, ki modulirajo aktivnost širokega spektra encimov in celičnih receptorjev. Vključeni so v obrambo pred ultravijoličnim sevanjem in napadi patogenov (Manach in sod., 2004). Fenolne spojine imajo velik vpliv na prehranske, organoleptične in komercialne lastnosti živil rastlinskega izvora. Njihovo uživanje pozitivno vpliva na zdravje, saj imajo antioksidativne, antivirusne, antialergene, kardioprotektivne in antikarcinogene učinke (Kadoma in Fujisawa, 2008).



Slika 1: Razdelitev rastlinskih fenolov (Rijken in sod., 2002).

2.2 FENOLNE KISLINE

Fenolne kisline so aromatski sekundarni metaboliti prisotni v vseh rastlinah. Zaradi svoje strukture sodijo med enostavne fenole (Gülçin, 2006). Termin fenolne kisline opisuje fenole z eno karboksilno skupino. Fenolne kisline predstavljajo skoraj eno tretjino prehranskih fenolov. Vplivajo na barvo, senzorične, prehranske in antioksidativne lastnosti živil rastlinskega izvora.

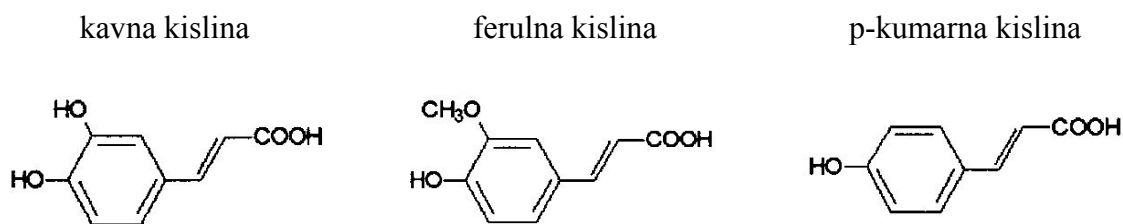
Naravne fenolne kisline glede na zgradbo C obroča delimo na:

- hidroksicimetne kisline in
- hidroksibenzojske kisline (Rodriguez in sod., 2008).

2.3 HIDROKSICIMETNE KISLINE IN NJIHOVI STIRENI

Hidroksicimetne kisline so fenilpropanoidni metaboliti rastlin in rastlinskih proizvodov. Poleg drugih funkcij so vključene tudi v biosintezo kompleksnejših fenolnih snovi - flavonoidov (Laranjinha, 2002). Nahajajo se v sadju, zelenjavi, čaju in zeliščih in imajo pomemben vpliv na organoleptične lastnosti teh živil. Prispevajo h grenkobi in astringenci, zlasti pa k porjavenju sadja in pijač (Bengoechea in sod., 1995). Sintetizirajo se iz L-fenilalanina in L-tirozina v šikimatni poti (Zhu in sod., 2006).

Hidroksicimetne kisline so zanimive predvsem zaradi različnih bioloških in farmakoloških aktivnosti, zlasti antioksidativne aktivnosti. Najbolj zastopane in najbolj raziskane so kavna, ferulna in p-kumarna kislina. Učinkovitost teh kislin kot antioksidantov je sledeča: kavna kislina > ferulna kislina > p-kumarna kislina (Cheng in sod., 2007; Gumul in Korus, 2006; Kadoma in Fujisawa, 2008). Povezana je s tipom in številom funkcionalnih skupin vezanih na aromatski obroč (Karamać in sod., 2005; Adam in sod, 2002).



Slika 2: Strukturne formule kavne, ferulne in p-kumarne kisline (Miller in Rice-Evans, 1997).

V rastlinah so v glavnem prisotne zaestrene z drugimi hidroksikislinami ali sladkorji ter v glikozilirani obliki. Proste oblike hidroksicimetnih kislin se akumulirajo le v izjemnih okoliščinah in le v zelo majhnih količinah. V prosti obliki delujejo kot regulatorji fitohormonov ali kot fitotoksini (Bengoechea in sod., 1995). Vezane oblike hidroksicimetnih kislin so vključene v mehanizme eliminacije toksinov in služijo kot zaloga obrambnih snovi (fitoaleksinov) v stresnih pogojih. Proste hidroksicimetne kisline najdemo v živilih rastlinskega izvora, ki so bila podvržena zamrzovanju, sterilizaciji ali fermentaciji (Rodríguez in sod., 2008).

Kavna kislina, tako prosta kot zaestrena, je najbolj zastopana fenolna kislina in predstavlja med 75% in 100% hidroksicimetnih kislin v večini sadja. Ferulna kislina je najbolj razširjena fenolna kislina v zrnih žit, ki predstavljajo glavni prehranski vir. Večina ferulne kisline se nahaja v aleuronski plasti in perikarpu zrna, kjer je zaestrena z arabinosilani in hemicelulozami (Manach in sod., 2004). Je znan antioksidant, ima pa tudi antimikrobno, protivnetno in antikancerogeno aktivnost, ščiti pred boleznimi srca in ožilja in znižuje holersterol (Max in sod., 2009).

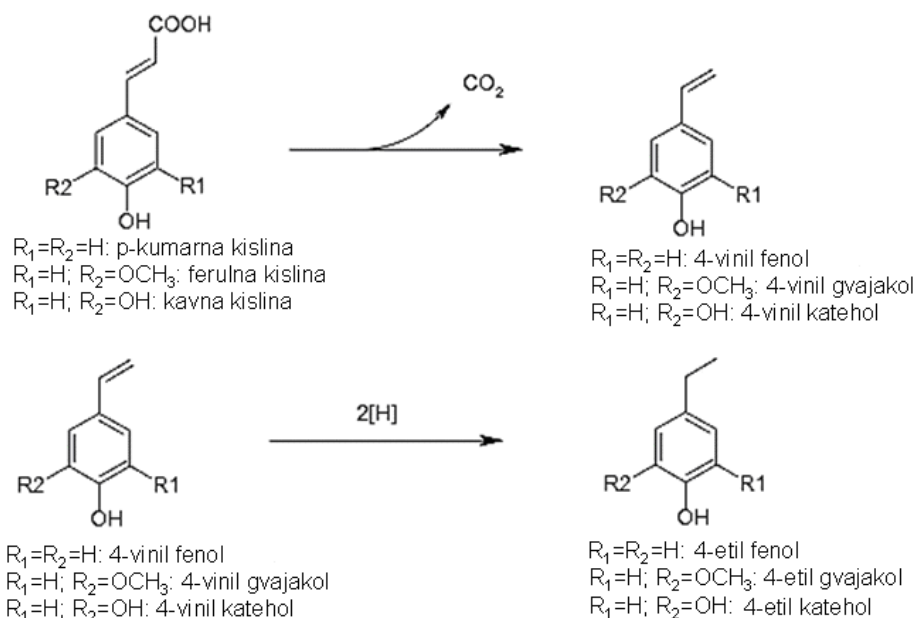
Številne hidroksicimetne kisline so poznane tudi kot prekurzorji za aromatične sestavine rastlin. Take sestavine so tudi stireni, ki nastanejo z dekarboksilacijo (Vanbeneden in sod., 2008).

Poleg kemičnih metod za pridobivanje stirenov (dehidrogenacija etilbenzena, dekarboksilacija trans-cimetnih kislin, ...) ki poteka pri visokih temperaturah poznamo tudi biokatalitično dekarboksilacijo trans-cimetnih kislin, kjer so reakcijski pogoji milejši (Takemoto in Achiwa, 2001).

Različni mikroorganizmi proste fenolne kisline metabolizirajo v 4-vinil derivate, ki jih nato reducirajo v 4-etil derivate (Cavin in sod., 1997; Godoy in sod., 2008; Rodriguez in sod., 2008; Takemoto in sod., 2001; Oelofse in sod., 2008). Ker so hidroksicinamati naravne antimikrobne snovi, je sposobnost mikroorganizmov, da jih dekarboksilirajo kompetitivna prednost. Če so hlapni razpadni produkti inhibitorni za druge organizme, pa to predstavlja še dodatno prednost (Pinches in Apps, 2007).

Nastali dekarboksilirani hlapni fenoli (4-vinil in 4-etil derivati) prispevajo k aromi brezalkoholnih pijač kot so sadni sokovi in kava. Uporabljajo se tudi kot intermediati v biotehnološki proizvodnji novih arom (Barthelmebs in sod., 2000). Najbolj znana je uporaba ferulne kisline kot prekursorja za vanilin (preko 4-vinil derivata) v biotransformacijskih procesih (Li in sod., 2008; Rosazza in sod. 1995; Ou in Kwok, 2004).

Zaradi svoje karakteristične arome in nizkega praga zaznave pa so poznani tudi kot POF (phenolic off-flavour) v številnih pivih in vinih. Prag zaznave fenolnih kislin je do 600 ppm, prag zaznave 4-vinil derivatov teh kislin pa do 0,3 ppm (Vanbeneden in sod., 2006).



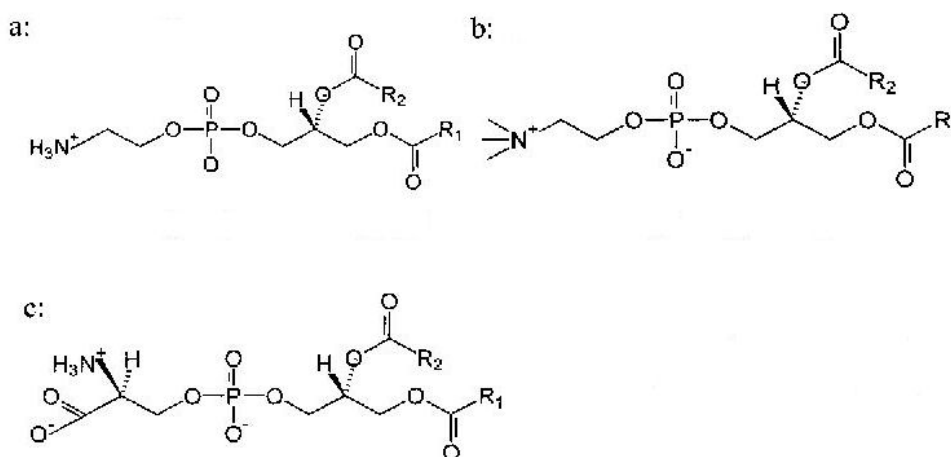
Slika 3: Dekarboksilacija hidroksicimetnih kislin v 4-vinil derivate (stirene) in redukcija v 4-etil derivate (Vanbeneden in sod., 2008; Peppercorn in Goldman, 1971).

2.4 MODELNE MEMBRANE

Kompleksnost bioloških membran je bila povod za razvoj številnih enostavnejših modelnih sistemov, katerih geometrijo in sestavo lahko spreminjamo. Modelni sistemi ohranijo osnovno strukturo lipidnega dvosloja, hkrati pa sistem poenostavijo tako, da lahko proučujemo vlogo, organizacijo in dinamiko posameznih komponent.

Modelni sistemi vključujejo: dvosloje v obliki veziklov, planarne dvosloje in fragmente naravnih celičnih membran (Chan in Boxer, 2007).

V naših poskusih smo uporabljali liposome iz mešanice palmitoil-oleoil-fosfatidilholina (POPC), palmitoil-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoil-oleoil-fosfatidilserina (POPS) in holesterola (CH), ter liposome iz dipalmitoil-fosfatidilholina (DPPC). Polarne glave fosfolipidov so prikazane na sliki 4.



Slika 4: Strukturne formule polarnih glav fosfolipidov: (a) POPE, (b) POPC in DPPC in (c) POPS (Hatziantonioy in Demetzos, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

POPC	Avanti Polar Lipids, ZDA
POPE	Avanti Polar Lipids, ZDA
POPS	Avanti Polar Lipids, ZDA
DPPC	Avanti Polar Lipids, ZDA
CH	Merck, Nemčija
kloroform	Merck, Nemčija
metanol	Merck, Nemčija
DPH	Aldrich Chem. Co. Milwaukee, ZDA
DMF	Merck, Nemčija
etanol	Merck, Nemčija
kavna kislina	Sigma - Aldrich, Nemčija
ferulna kislina	Sigma - Aldrich, Nemčija
p-kumarna kislina	Sigma - Aldrich, Nemčija
HEPES	Sigma - Aldrich, Nemčija
DMSO	Merck, Nemčija

3.1.2 Raztopine

Raztopine lipidov

10 mg/mL v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3:7 (v/v)

Raztopina DPH

1 mM raztopina v DMSO

Raztopine kislin in stirenov

10 mM raztopine v 99 % etanolu

Pufer za vezikle

20 mM HEPES pH 7,0

3.1.3 Laboratorijska oprema

rotavapor	BÜCHI R-200; Švica
mešalnik	Vibromix, Tehtnica Železniki, Slovenija
ekstrudor	AVESTIN, Kanada
N-DSC III kalorimeter	CSC 6300, CSC, ZDA
vakuumska črpalka	Thermolyne Nuova Stirrer, Thermo Scientific, ZDA
fluorescenčni spektrofotometer	Cary Eclipse, Varian, Mulgrave, Victoria, Avstralija
2,5 mL kvarčne kivete	FLR Cary, Varian, Avstralija

3.2 METODE

3.2.1 Priprava liposomov za merjenje fluorescence

Liposome smo pripravili iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS, CH. Lipide smo raztopili v mešanici metanola in kloroforma v razmerju 3:7 (v/v). Z metodo tankih filmov smo iz DPPC oz. zmesi lipidov POPC, POPE, POPS, CH v molskem razmerju POPC:POPE:POPS:CH = 4:2:1:3,6, ki ponazarja sestavo bioloških celičnih membran, pripravili liposome. V stekleno bučko smo odpipetirali 0,8 mL raztopine POPC, 3,8 mL raztopine POPE, 2,1 mL raztopine POPS in 3,7 mL raztopine CH. Na rotavaporju smo pri tlaku 17 mbar iz zmesi odparili topilo, morebitne preostanke topila pa izčrpali z vakuumsko črpalko. Na steni bučke je nastal tanek film lipidov. V bučko smo dodali 2,1 mL destilirane vode ali pufra in jo dali na stresalnik. Za lažje oblikovanje liposomov smo bučko med stresanjem namakali v vodni kopeli s temperaturo 40 °C. Tako smo pripravili MLV s končno koncentracijo lipidov 8,3 mg/mL. Poleg MLV smo z enakim postopkom pripravili tudi ULV, kjer smo posušnim lipidom v bučki namesto 2,1 mL dodali 5,7 mL destilirane vode ali pufra. Raztopino lipidov v destilirani vodi smo s pomočjo ekstrudorja 11-krat iztisnili preko polikarbonatne filtrne membrane z velikostjo por 400 nm, nato pa še 11-krat preko membrane z velikostjo por 100 nm. Tako smo dobili ULV, s končno koncentracijo lipidov 3,1 mg/mL (Kure, 2006).

Po enakem postopku smo pripravili tudi liposome ULV iz DPPC, kjer smo v bučki posušili 0,5 mL raztopine DPPC in nato dodali 1 mL destilirane vode. Tako smo dobili ULV s končno koncentracijo 5,0 mg/mL. Liposome smo prepihali z dušikom in jih shranili na 4 °C.

3.2.2 Priprava stirenov

Z modificirano termično dekarboksilacijo v DMF smo pripravili stirene iz ferulne, kavne in p-kumarne kisline (Munteanu in sod., 1991; Nomura in sod., 2005).

V 5 mL DMF smo dodali 0,5 g ferulne, kavne oz. p-kumarne kisline in 0,1 g katalizatorja natrijevega acetata. Reakcijsko mešanico smo v bučki, ki smo jo opremili z vodnim hladilnikom, segrevali na oljni kopeli pri temperaturi 130 °C.

Dekarboksilacija je bila zaključena v 10-15 minutah, ko je iz reakcijske mešanice prenehal izhajati CO₂.

Po zaključku dekarboksilacije smo v bučko dodali 50 mL ddH₂O in produkt ekstrahirali s kloroformom, ki smo ga kasneje odparili pri znižanem tlaku. Čistost produkta smo preverili s HPLC.

3.2.3 Priprava liposomov za merjenje z metodo DSC

Liposome (ULV) iz DPPC smo pripravili po postopku, ki je opisan pod točko 3.2.1, le da smo posušene lipide raztopili v 20 mM Hepes puftru. Tako pripravljene liposome smo razredčili s Hepes pufrom. Končna koncentracija je bila 0,5 mg/ml.

3.2.4 Merjenje polarizacije in anizotropije

Polarizacija (P) in anizotropija fluorescence (A) sta definirani kot:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad \dots(1)$$

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \dots(2)$$

kjer sta I_{\parallel} in I_{\perp} intenziteti fluorescence vertikalno in horizontalno polarizirane emisije, ko vzorec vzbujamo z vertikalno polarizirano svetlobo (Lakowicz, 2006).

Meritve polarizacije in anizotropije fluorescence DPH (difenil heksatrien) v prisotnosti lipidov smo opravili s fluorescenčnim spektrometrom v kvarčnih kivetah (10 mm) pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

Raztopini MLV in ULV s končno koncentracijo 0,1 mg/mL smo dodali fluorofor DPH s končno koncentracija v kiveti 1 μM . Skupni volumen raztopine v kiveti je znašal 2,5 mL. Raztopine MLV in ULV smo v prisotnosti DPH titirali z dodajanjem alikvotov raztopin kislin (kavna, ferulna, p-kumarne) oz. njihovih stirenov ali topila (99% etanol) v katerem so bili raztopljeni. Vpliv topila na DPH smo odšteli. Za vsak vzorec smo izmerili tudi vrednost G-faktorja, ki je definiran kot razmerje občutljivosti detekcijskega sistema za vertikalno (S_V) in horizontalno polarizirano svetlobo (S_H) (Lakowicz, 2006).

$$G = \frac{S_V}{S_H} \quad \dots(3)$$

3.2.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) smo spremljali fazne prehode lipidnih veziklov iz DPPC ob prisotnosti kislin oz. njihovih stirenov. Pripravili smo raztopine liposomov in kislin oz. stirenov v molarnem razmerju 1:1. Končni volumen raztopine je bil 0,5 mL. Raztopine smo 20 minut odzračevali, da smo preprečili nastanek mehurčkov med poskusom. Referenčno celico smo napolnili s HEPES pufrom, vzorčno pa s preiskovano raztopino. Zaprli smo kalorimeter, povišali tlak na 3 atmosfere in začeli s poskusom. Vzorce smo segrevali, ohlajali in ponovno segrevali, da smo dobili podatke o reverzibilnosti. Merili smo v temperaturnem območju med 10 $^{\circ}\text{C}$ in 70 $^{\circ}\text{C}$. Hitrost segrevanja in ohlajanja je bila 1 $^{\circ}/\text{min}$. Iz DSC poskusov dobljene termograme smo analizirali z uporabo softverskega programa OriginPro8 in jih obdelali. Termogrami so prikazani kot presežna toplotna kapaciteta $\langle C_p \rangle$ [kJ/molK] v odvisnosti od temperature [$^{\circ}\text{C}$] (Cokan, 2006).

Presežna toplotna kapaciteta je definirana kot:

$$C_p = \frac{q_p}{\Delta T} \quad \dots(4)$$

kjer q_p predstavlja presežen prenos toplote, ΔT pa razliko v temperaturi.

Sprememba entalpije je podana z enačbo:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad \dots(5)$$

kjer sta T_1 in T_2 temperaturi pri katerih se proces začne oz. konča. Sprememba entalpije je površina pod krivuljo C_p v odvisnosti od T (Atkins in de Paula, 2002).

4 REZULTATI

4.1 MERJENJE POLARIZACIJE IN ANIZOTROPIJE

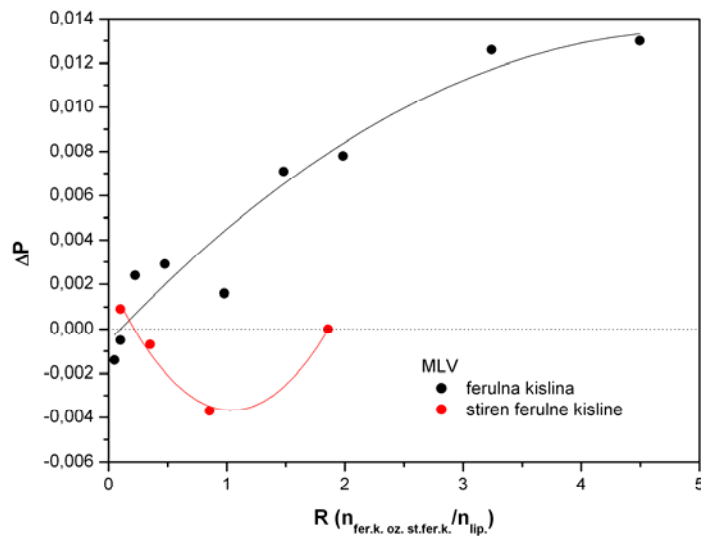
4.1.1 Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v MLV in ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH

Za ugotavljanje stopnje urejenosti lipidnega dvosloja smo izvedli meritve polarizacije in anizotropije fluoroforja DPH. DPH je nepolarni fluorofor, ki zazna spremembo stanja membrane. Vrednosti polarizacije in anizotropije DPH v prisotnosti lipidov (membran) so najvišje v gel stanju, najnižje v tekočem neurejenem stanju, srednje pa v tekočem urejenem stanju (Xu in London, 2000).

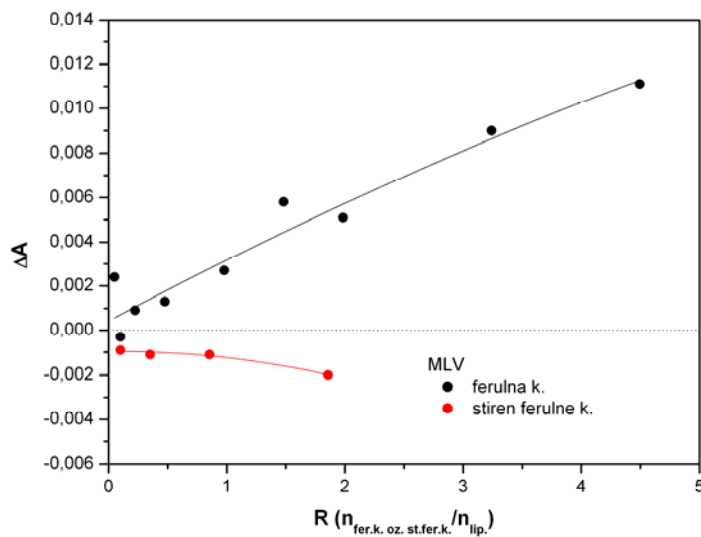
4.1.1.1 Ferulna kislina in stiren ferulne kisline

Slike 5, 6, 7 in 8 prikazujejo spremembo polarizacije in anizotropije DPH v prisotnosti MLV in ULV ob dodatku ferulne kisline oz. stirena ferulne kisline. Dodatek ferulne kisline je v prisotnosti MLV in ULV povzročil povečanje vrednosti polarizacije in anizotropije (merjene kot ΔP in ΔA).

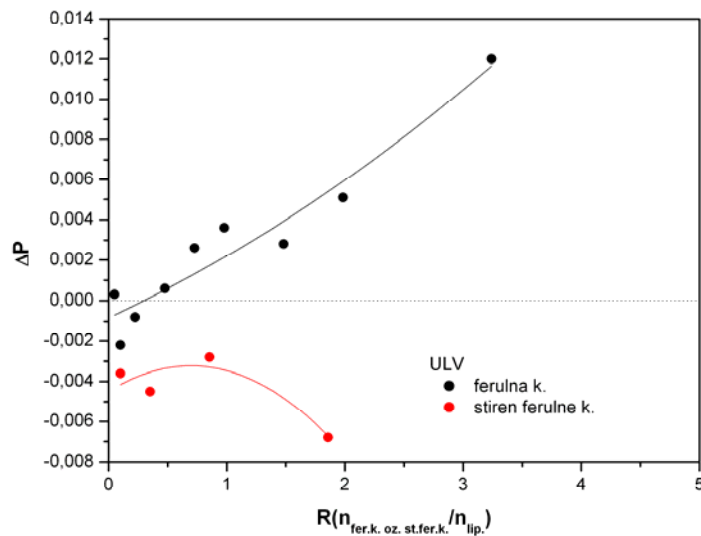
Titracija MLV in ULV s stirenom ferulne kisline je pri vseh molarnih razmerjih povzročila padec polarizacije. Vrednosti ΔP in ΔA so negativne v celotnem koncentracijskem območju.



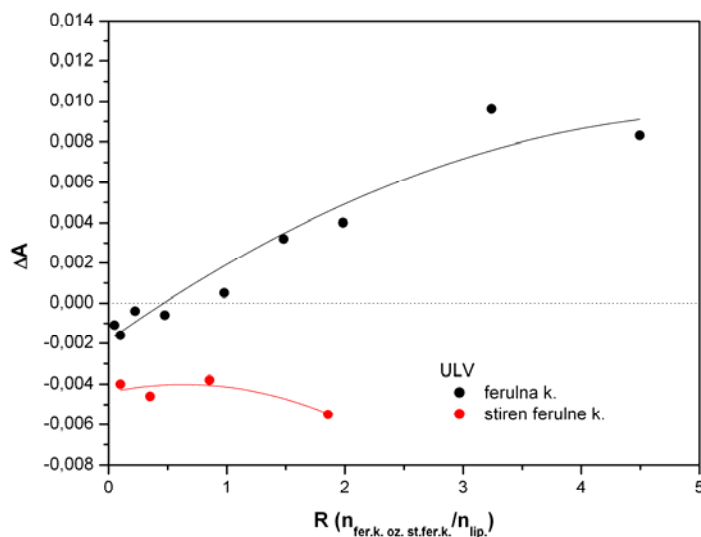
Slika 5: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



Slika 6: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



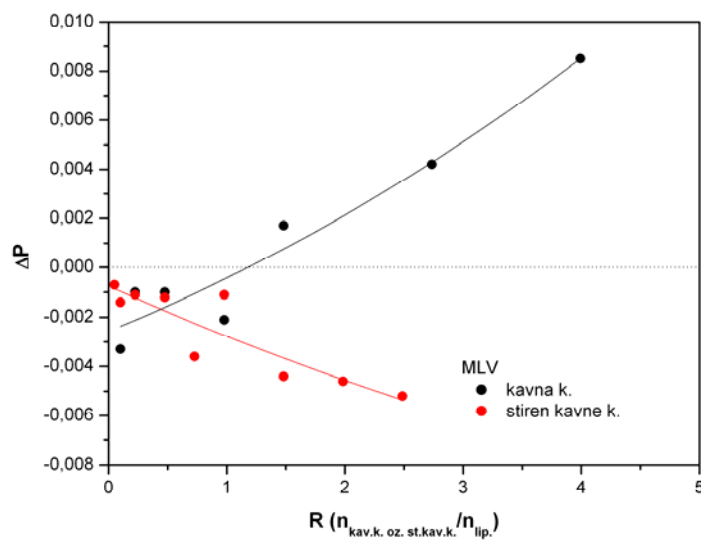
Slika 7: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



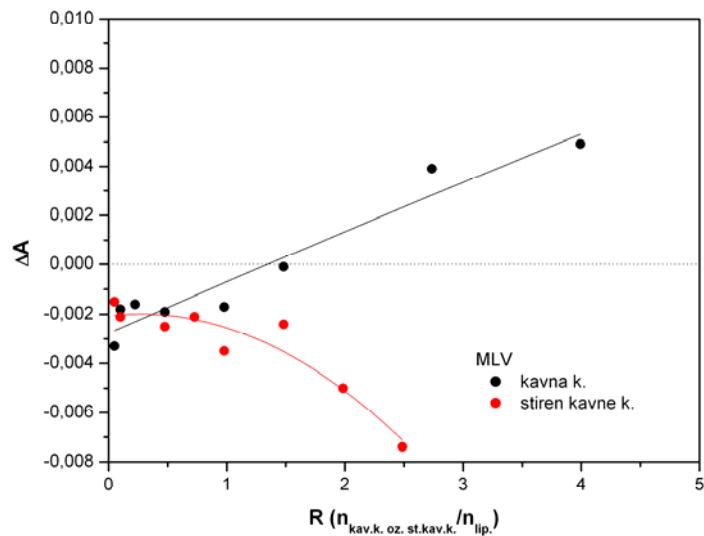
Slika 8: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

4.1.1.2 Kavna kislina in stiren kavne kisline

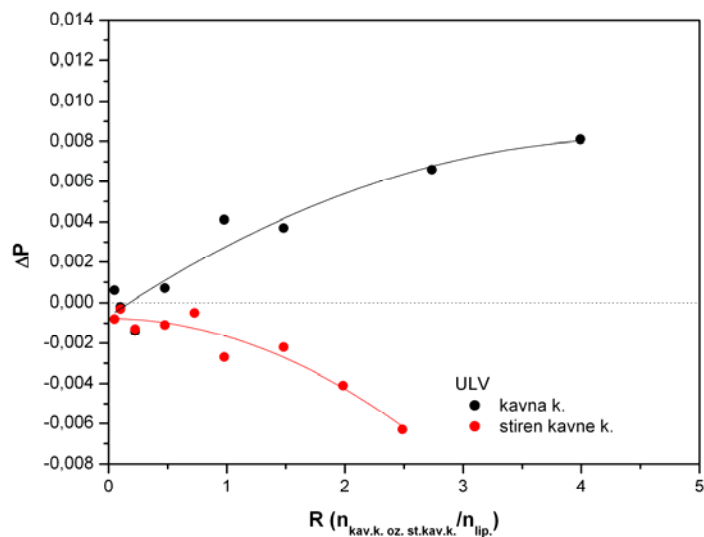
Titracija MLV in ULV s kavno kislino (slike 9, 10, 11 in 12) je imela podoben učinek na spremembe v ΔP in ΔA kot titracija s ferulno kislino, le da so bile spremembe manjše. Za razliko od stirena ferulne kisline je stiren kavne kisline povzročil večje padanje vrednosti ΔP in ΔA .



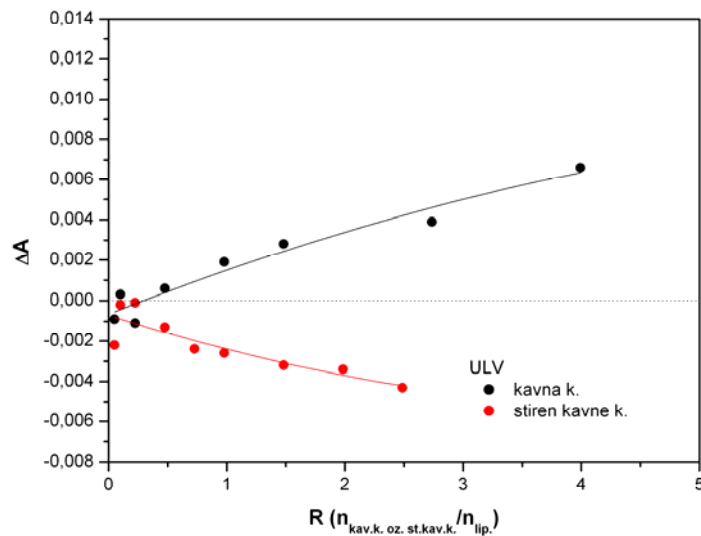
Slika 9: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



Slika 10: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



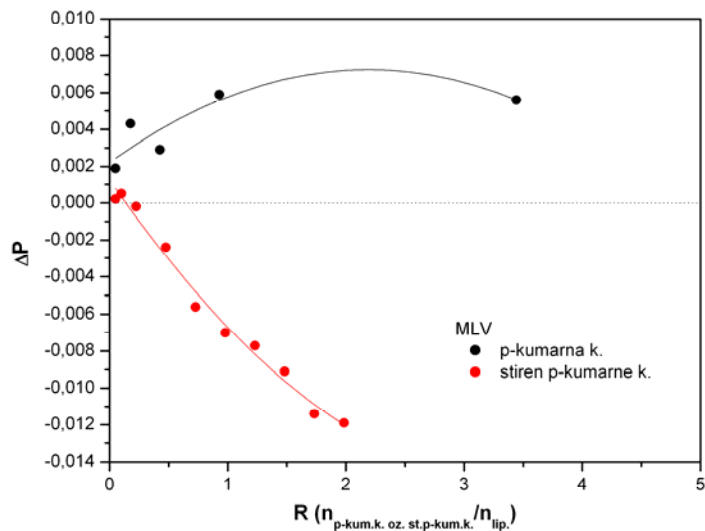
Slika 11: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



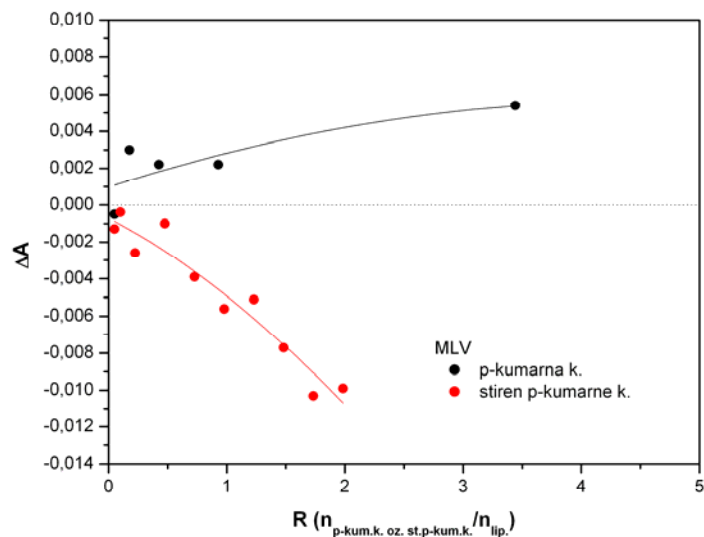
Slika 12: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

4.1.1.3 p-kumarna kislina in stiren p-kumarne kisline

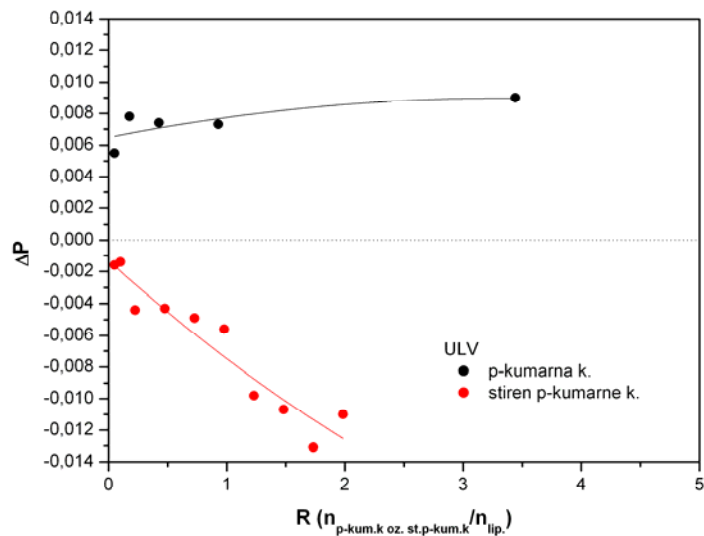
Titracija MLV in ULV s p-kumarno kislino (slike 13, 14, 15 in 16) je imela podoben učinek kot titracija s kavno kislino. Stiren p-kumarne kisline je povzročil padanje vrednosti polarizacije in anizotropije. V primerjavi s stirenom kavne kisline je bil padec ΔP in ΔA skoraj dvakrat večji.



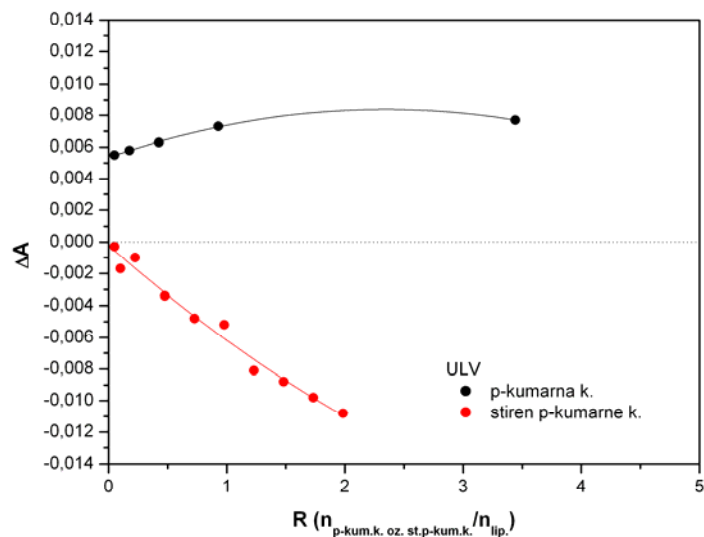
Slika 13: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



Slika 14: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini MLV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



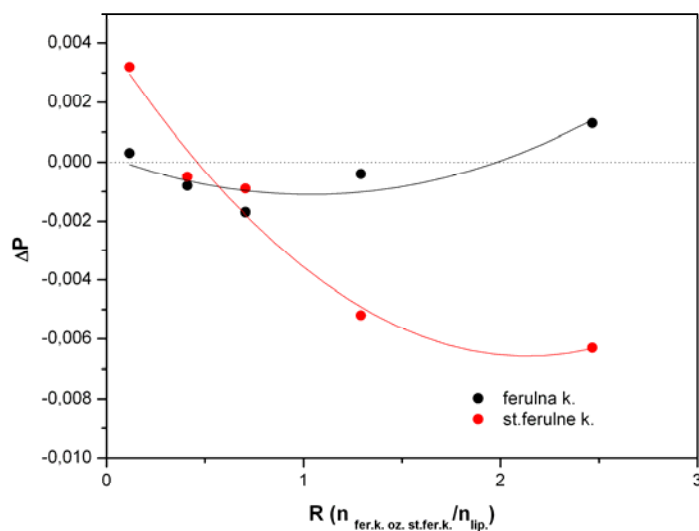
Slika 15: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.



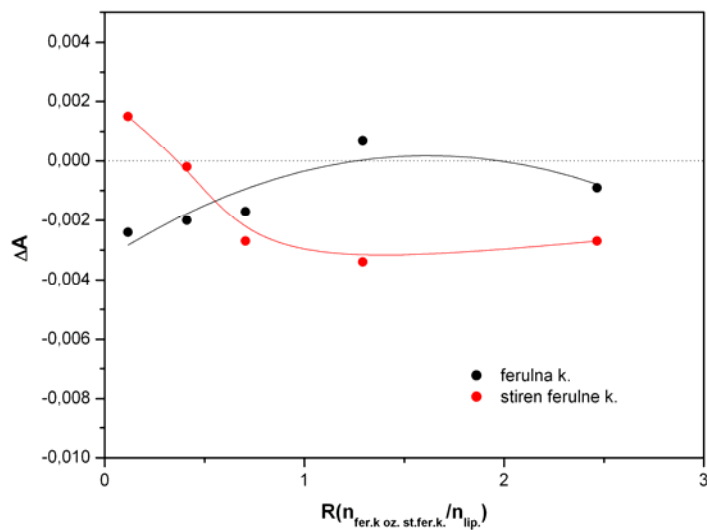
Slika 16: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz zmesi lipidov POPC, POPE, POPS in CH in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

4.1.2 Merjenje polarizacije in anizotropije DPH v ULV narejenih iz DPPC

Dodatek ferulne kisline (slika 17 in 18) ULV, narejenih iz DPPC, je pri nižjih molarnih razmerjih povzročil padec polarizacije. Anizotropija je z naraščanjem molarne razmerja ferulne kisline napram lipidom padala in dosegla najnižjo vrednost pri molarnem razmerju 2,5. Titracija ULV s stirenom ferulne kisline je povzročila padec polarizacije in anizotropije v celotnem preiskovanem območju. Ko je molarno razmerje stirena ferulne kisline napram lipidom preseglo vrednost 2,5, so vrednosti ΔP in ΔA narastle, vendar ostale še zmeraj negativne.

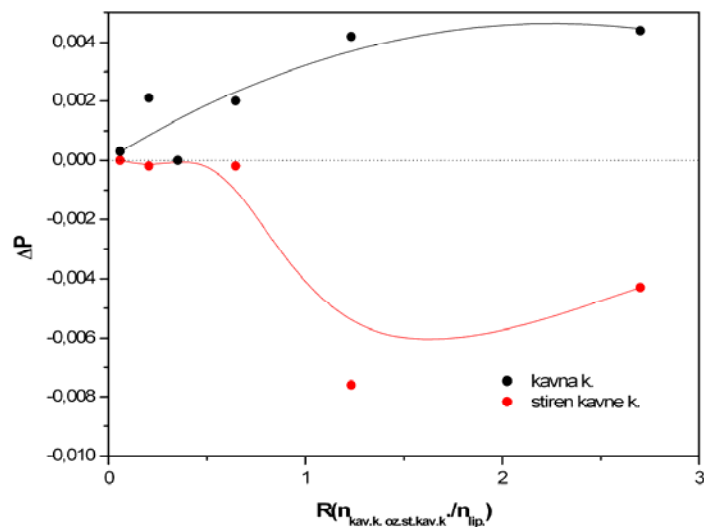


Slika 17: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

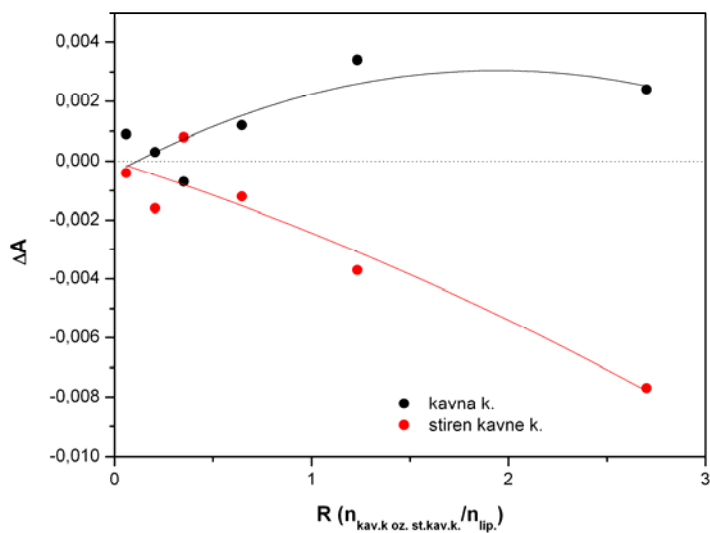


Slika 18: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s ferulno kislino oz. s stirenom ferulne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

Pri študiju sprememb ΔP in ΔA DPH v prisotnosti DPPC je bilo le v primeru kavne kisline opazno povečanje ΔP in ΔA . Stiren kavne kisline pa je imel na DPPC liposome podoben učinek kot stiren ferulne kisline.

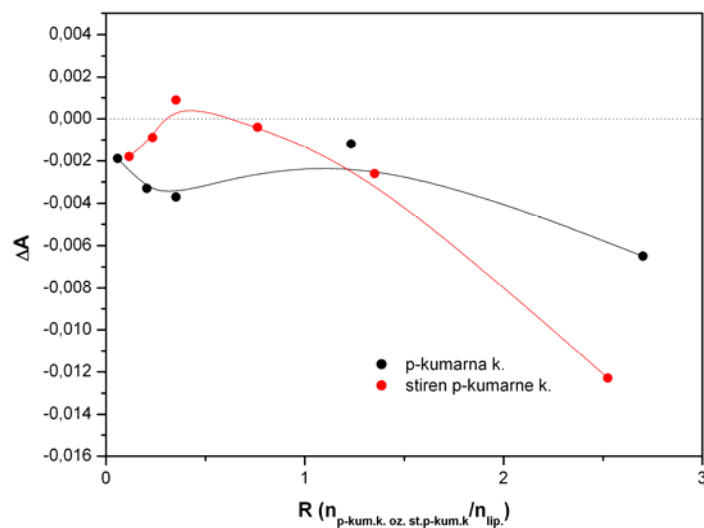


Slika 19: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

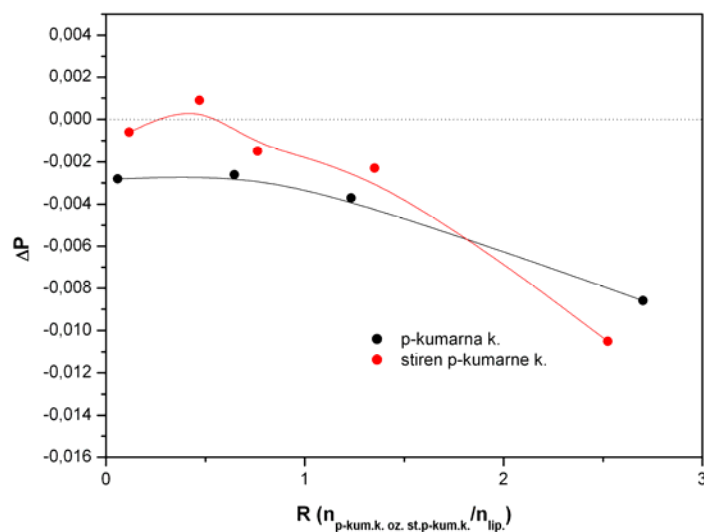


Slika 20: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s kavno kislino oz. s stirenom kavne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

Titracija ULV s p-kumarno kislino oz. stirenom p-kumarne kisline (slika 21 in 22) pri nižjih molarnih razmerjih ni povzročila večjih sprememb ΔP in ΔA . Ko je molarno razmerje p-kumarne kisline oz. stirena p-kumarne kisline preseglo vrednost 1,0 so vrednosti ΔP in ΔA močno padle.



Slika 21: Spremembe v polarizaciji (ΔP) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

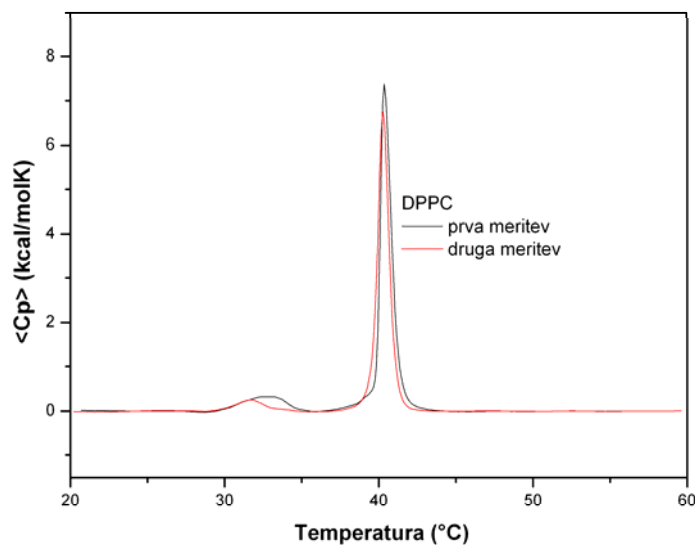


Slika 22: Spremembe v anizotropiji (ΔA) fluoroforja DPH dodanega raztopini ULV narejenih iz DPPC in titriranega s p-kumarno kislino oz. s stirenom p-kumarne kisline pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm.

4.2 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMetriJA (DSC)

4.2.1 Fazni prehodi lipidnih veziklov (ULV) DPPC v odvisnosti od ferulne, kavne oziroma p-kumarne kisline in njihovih stirenov

Na DSC termogramu lipidnih veziklov DPPC (Slika 23) sta lepo vidna glavni fazni prehod pri temperaturi $40,4 \pm 0,1$ °C in manjši fazni predprehod pri temperaturi $32,6 \pm 0,2$ °C. Entalpija faznega predprehoda ($\Delta H_{cal}'$) znaša $5,6 \pm 0,8$ kJ/molK, entalpija glavnega faznega prehoda (ΔH_{cal}) pa $35,1 \pm 0,4$ kJ/molK.



Slika 23: DSC termogram ULV veziklov DPPC po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hapes pufri, pH 7,0.

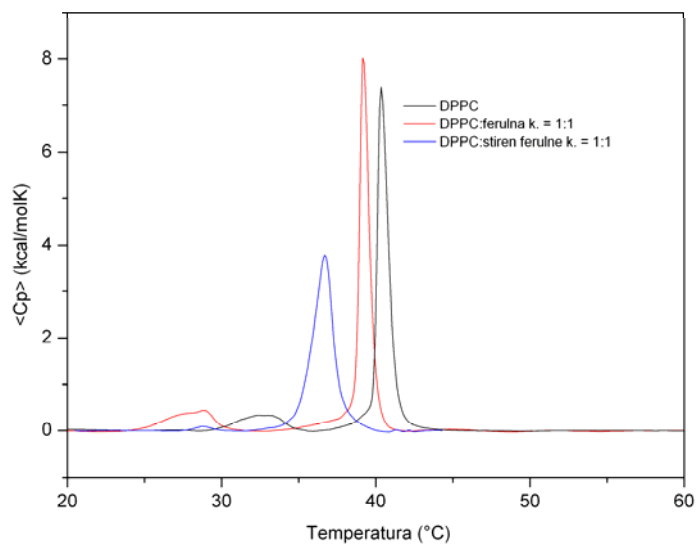
Iz DSC termogramov (slika 24, 25 in 26) je razvidno, da dodatek ferulne, kavne in p-kumarne kisline oz. njihovih stirenov DPPC veziklom (v molarnem razmerju 1:1), povzroči znižanje temperature predprehoda (T_m') in temperature glavnega prehoda (T_m).

Dodatek ferulne kisline zniža T_m' ($28,4 \pm 0,1$ °C) in T_m ($39,2 \pm 0,1$ °C). Zniža se tudi ΔH_{cal} in sicer na $33,2 \pm 0,3$ kJ/molK. Podoben učinek opazimo tudi ob dodatku kavne kisline (slika 26) T_m' pade na $27,8 \pm 0,1$ °C, T_m pa na $39,3 \pm 0,1$ °C. Entalpija glavnega faznega prehoda ostane nespremenjena, entalpije faznega predprehoda pa pade na $3,3 \pm 0,4$ kJ/molK.

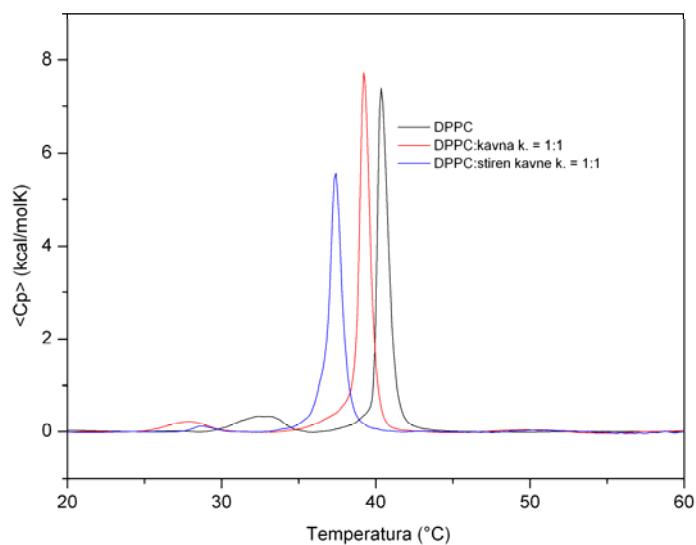
Dodatek p-kumarne kisline zniža T_m' na $28,0 \pm 0,1$ °C in T_m na $39,0 \pm 0,1$ °C. Znižata se tudi $\Delta H_{cal}'$ ($3,1 \pm 0,1$ kJ/molK) in ΔH_{cal} ($29,0 \pm 0,1$ kJ/molK).

Dodatek stirena ferulne kisline (slika 24), stirena kavne kisline (slika 25) in stirena p-kumarne kisline (slika 26) povzroči padec T_m' in T_m . V vseh primerih se močno znižajo entalpije faznih predprehodov. Znižajo se tudi entalpije glavnih faznih prehodov. Padec ΔH_{cal} je največji v primeru dodanega stirena p-kumarne kisline, ko znaša $23,9 \pm 0,2$ kJ/molK.

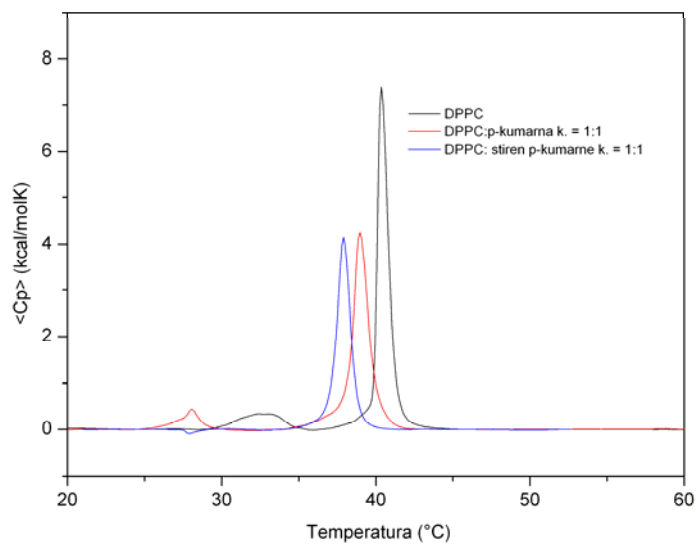
Termodinamske vrednosti faznih prehodov lipidnih veziklov DPPC v prisotnosti ferulne, kavne in p-kumarne kisline oz. njihovih stirenov so podane v tabeli 1.



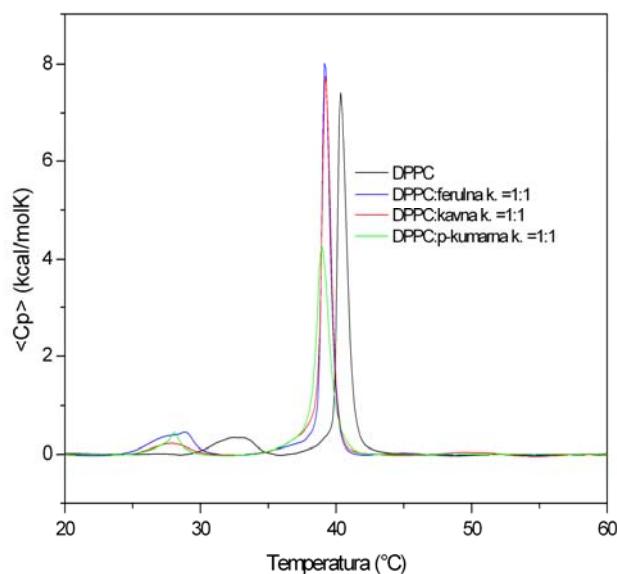
Slika 24: Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano ferulno kislino oz. stirenom ferulne kisline v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes pufri, pH 7,0.



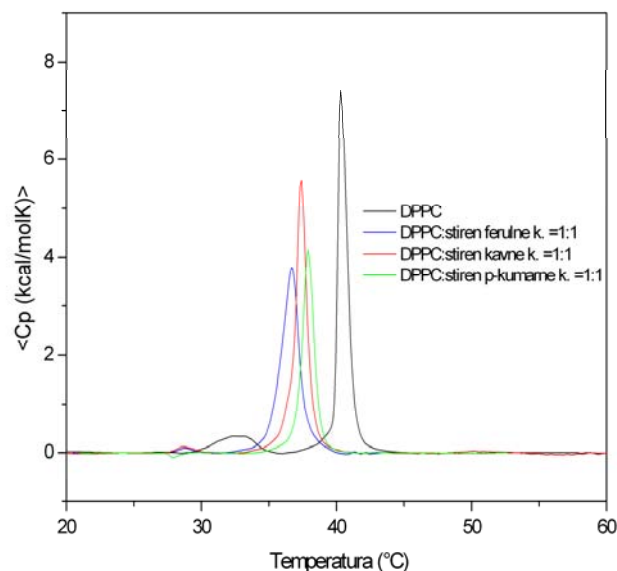
Slika 25: Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano kavno kislino oz. stirenom kavne kisline v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes pufru, pH 7,0.



Slika 26: Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramom veziklov DPPC z dodano p-kumarno kislino oz. stirenom p-kumarne kisline v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes pufru, pH 7,0.



Slika 27: Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramami veziklov DPPC z dodano ferulno, kavno oz. p-kumarno kislino v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes puftru, pH 7,0.



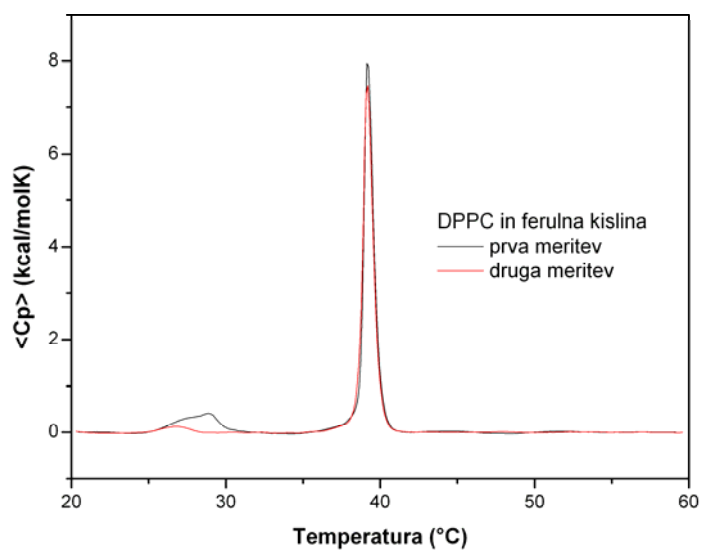
Slika 28: Primerjava DSC termograma ULV veziklov DPPC z DSC termogramami veziklov DPPC z dodanim stirenom ferulne, kavne oz. p-kumarne kisline v molskem razmerju 1:1. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes puftru, pH 7,0.

Preglednica 1: Termodinamske vrednosti faznih prehodov lipidnih veziklov DPPC v prisotnosti ferulne, kavne in p-kumarne kisline oz. njihovih stirenov. T_m' - temperatura predprehoda, T_m - temperatura glavnega prehoda, $\Delta H_{cal}'$ - entalpija predprehoda, ΔH_{cal} - entalpija glavnega prehoda.

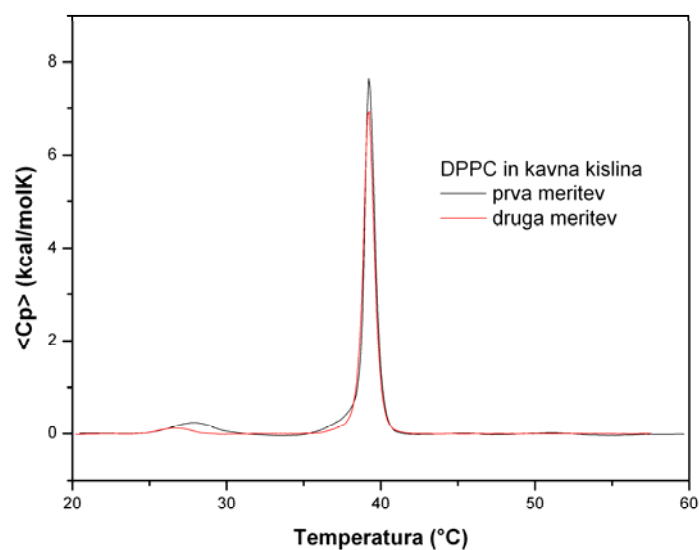
molska razmerja	T_m' (°C)	T_m (°C)	$\Delta H_{cal}'$ (kJ/mol)	ΔH_{cal} (kJ/mol)
DPPC (c=0.5mg/mL)	32,6±0,2	40,4±0,1	5,6±0,8	35,1±0,4
DPPC : ferulna k. = 1:1	28,4±0,1	39,2±0,1	5,8±0,6	33,2±0,3
DPPC : kavna k. = 1:1	27,8±0,1	39,3±0,1	3,3±0,4	35,2±0,2
DPPC : p-kumarna k. = 1:1	28,0±0,1	39,0±0,1	3,1±0,1	29,0±0,1
DPPC : stiren ferulne k. = 1:1	28,7±0,2	36,6±0,1	0,8±0,2	33,8±0,3
DPPC: stiren kavne k. = 1:1	28,8±0,1	37,4±0,1	0,8±0,1	31,4±0,2
DPPC : stiren p-kumarne k. = 1:1	28,1±0,1	37,9±0,1	-0,4±0,1	23,9±0,2

4.2.2 Reverzibilnost faznih prehodov

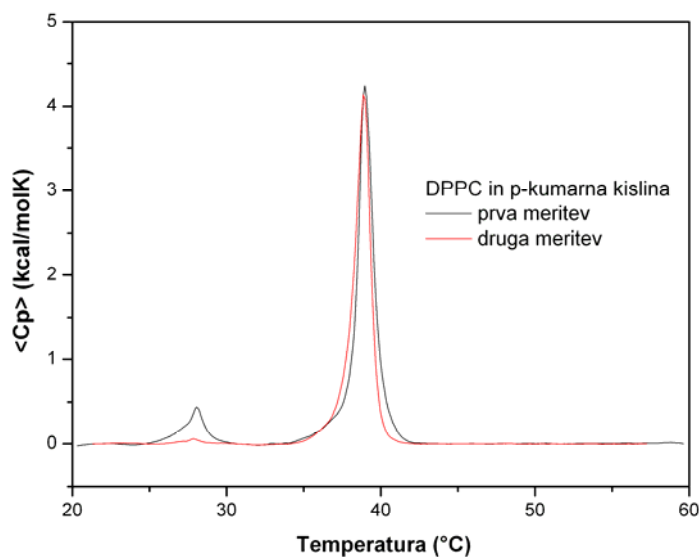
Slike 23, 29, 30, 31, 32, 33 in 34 in prikazujejo rezultate reverzibilnosti faznih prehodov DPPC brez ali z dodatkom ferulne, kavne in p-kumarne kisline ter njihovih stirenov. Opazimo da v vseh primerih pride do znižanja entalpij obeh faznih prehodov. Ob dodatku stirenov fazni predprehod popolnoma izgine.



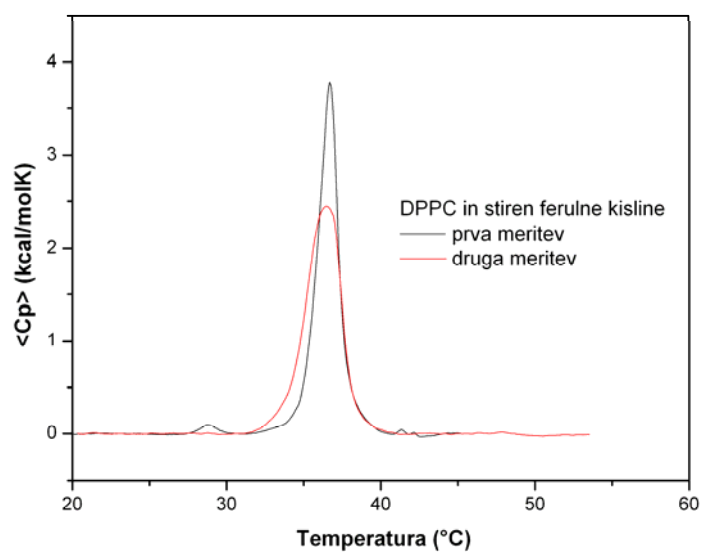
Slika 29: DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodano ferulno kislino v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes pufru, pH 7,0.



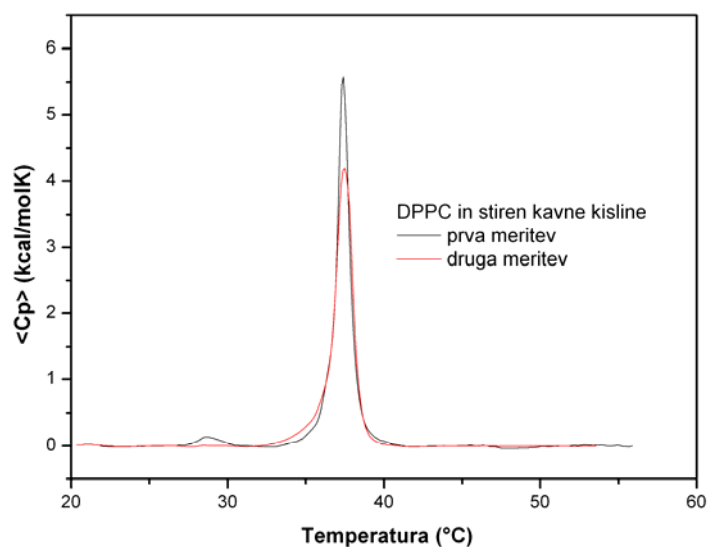
Slika 30: DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodano kavno kislino v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes pufru, pH 7,0.



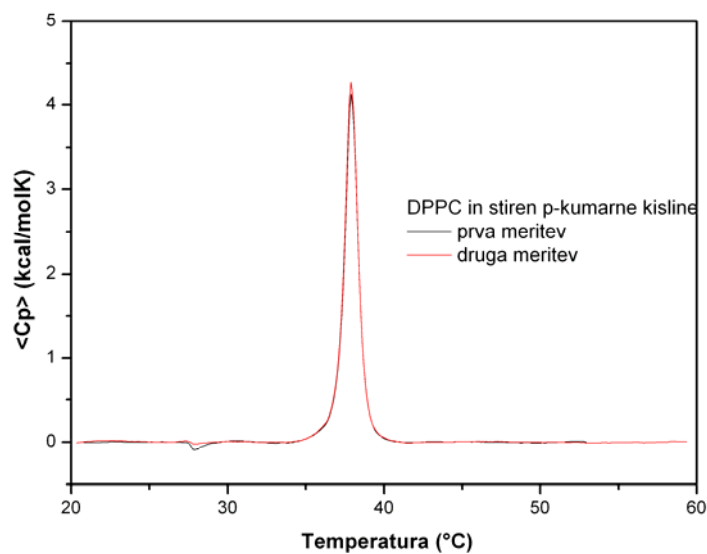
Slika 31: DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodano p-kumarno kislino v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes pufru, pH 7,0.



Slika 32: DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodanim stirenom ferulne kisline v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes pufru, pH 7,0.



Slika 33: DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodanim stirenom kavne kisline v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hepes pufru, pH 7,0.



Slika 34: DSC termogram ULV veziklov DPPC z dodanim stirenom p-kumarne kisline v molskem razmerju 1:1 po prvem in drugem merjenju. Končna koncentracija DPPC veziklov je 0,5 mg/ml v 20 mM Hapes pufri, pH 7,0.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Fluidnost membrane smo ocenili z merjenjem polarizacije in anizotropije nepolarnega fluoroforja DPH. Ob dodatku DPH suspenziji liposomov se ta v celoti veže v lipidni dvosloj. V vodni fazi ne zaznamo emisije DPH. Vsa emisija DPH izhaja iz DPH v membrani (Lakowicz, 2006).

Meritve polarizacije in anizotropije fluorescence DPH v prisotnosti lipidov smo opravili pri 25 °C. Valovna dolžina vzbujanja je bila 358 nm, emisijo pa smo merili pri valovni dolžini 410 nm. Raztopine MLV in ULV smo v prisotnosti DPH titrirali z dodajanjem alikvotov raztopin kislin (kavna, ferulna, p-kumarne) oz. njihovih stirenov ali topila (99% etanol) v katerem so bili raztopljeni. Vpliv topila na fluorescenčni fluorofor DPH v membrani smo odšteli.

Dodatek ferulne, kavne in p-kumarne kisline ULV in MLV, pripravljenih iz mešanice lipidov POPC, POPE, POPS in CH, je povzročil povečanje polarizacije in anizotropije DPH (merjene kot ΔP in ΔA). Učinek je bil najbolj izražen ob dodajanju ferulne kisline, najšibkejši pa ob dodajanju p-kumarne kisline.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da prisotnost ferulne, kavne in p-kumarne kisline ULV in MLV, pripravljenih iz mešanice lipidov POPC, POPE, POPS in CH poveča urejenost in zmanjša dinamiko alkilnih verig fosfolipidov v okolici DPH. Membrana postane bolj rigidna.

Titracija ULV in MLV pripravljenih iz mešanice lipidov POPC, POPE, POPS in CH s stirenom ferulne kisline je pri nižjih molarnih razmerjih povzročila rahel padec polarizacije in anizotropije. Padec je bil v prisotnosti MLV največji pri molarnem razmerju stirena ferulne kisline napram lipidom okoli 1,0, v prisotnosti ULV pa pri molarnem razmerju 2,0.

Titracija ULV in MLV s stirenom kavne oz. p-kumarne kisline je povzročila padec polarizacije in anizotropije. V primeru stirena kavne kisline je prišlo do padca šele, ko je molarno razmerje preseglo vrednost 1, v primeru p-kumarne kisline pa je bil učinek

takojšen. V primerjavi s stirenom kavne kisline je bil padec polarizacije in anizotropije v prisotnosti stirena p-kumarne kisline skoraj dvakrat večji.

Ti rezultati kažejo, da se v prisotnosti stirenov ferulne, kavne in p-kumarne kisline urejenost membrane zmanjša, poveča pa se dinamika alkilnih verig fosfolipidov v okolici DPH. Membrana je v prisotnosti teh stirenov bolj fluidna.

Ko smo kot modelno membrano uporabili ULV iz DPPC je bil vpliv ferulne, kavne in p-kumarne kisline šibkejši, kot smo ga opazili pri modelnih membranah (ULV) pripravljenih iz mešanice lipidov.

Pri titraciji s ferulno kislino se polarizacija in anizotropija DPH skoraj ne spremenita. Titracija ULV s stirenom ferulne kisline je povzročila padec polarizacije in anizotropije, ki sta dosegli minimum pri molarnem razmerju 2,5. Pri titraciji ULV pripravljenih iz DPPC s kavno kislino, je bilo opaženo povečanje ΔP in ΔA DPH v lipidih. Pri drugih kislinah tega učinka nismo opazili. Stiren kavne kisline je imel podoben učinek (znižanje ΔP in ΔA), kot ostali stireni.

Za razliko od ferulne in kavne, titracija s p-kumarno kislino oz stirenom p-kumarne kisline pri nižjih molarnih razmerjih ni pokazala večjih sprememb. Ko je molarno razmerje preseglo vrednost 1,0 sta tako p-kumarna kislina kot njen stiren povzročila močan padec polarizacije in anizotropije. Urejenost membrane se je zmanjšala, povečala se je dinamika alkilnih verig fosfolipidov v okolici DPH. Fluidnost membrane se je močno povečala.

Pri titraciji ULV sestavljenih iz DPPC si učinki posameznih hidroksicimetnih kislin sledijo v skladu z njihovo antioksidativno učinkovitostjo (Cheng in sod., 2007; Gumul in sod., 2006). Najmočnejši je učinek kavne kisline, ki poveča ΔP in ΔA , sledi ferulna kislina, ki nima bistvenega vpliva, najmanjši pa je učinek p-kumarne kisline, ki zniža ΔP in ΔA .

DSC je fizikalna tehnika, s katero lahko določimo termodinamske parametre povezane s toplotno induciranimi faznimi prehodi. Do faznega prehoda pride, ko se alkilne verige lipidnih molekul iz relativno rigidne, iztegnjene, v glavnem trans konformacije v gel stanju, pretvorijo v orientacijsko bolj neurejeno stanje, za katerega je značilna povečana stopnja intra- in intermolekularnega gibanja (McElhaney, 1986).

Vezikli narejeni iz DPPC imajo glavni fazni prehod pri temperaturi $40,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ in manjši fazni predprehod pri temperaturi $32,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Entalpija faznega predprehoda (ΔH_{cal}) znaša $5,6 \pm 0,8$ kJ/molK, entalpija glavnega faznega prehoda (ΔH_{cal}) pa $35,1 \pm 0,4$ kJ/molK. Naše izmerjene temperature faznega predprehoda in faznega prehoda se ujemajo s podatki v literaturi (Chan, 2007).

Iz DSC termogramov (slike 24, 25, 26, 27, 28 in 29) vidimo da dodatek kavne, ferulne in p-kumarne kisline oz. njihovih stirenov povzroči znižanje temperature predprehoda (T_m') in temperature glavnega prehoda (T_m).

Dodatek ferulne kisline zniža entalpijo glavnega faznega prehoda ($\Delta\Delta H_{\text{cal}}$) za $1,9 \pm 0,3$ kJ/molK. Podoben učinek opazimo tudi ob dodatku p-kumarne kisline, kjer entalpija pade za $6,1 \pm 0,1$ kJ/molK. Entalpija glavnega faznega prehoda se ob dodatku kavne kisline ne spremeni. Znižanje entalpije faznega prehoda kaže na entalpijsko destabilizacijo lipidnih veziklov, ki je v prisotnosti kavne kisline ni, največja pa je v prisotnosti p-kumarne kisline.

Rezultati DSC meritev učinka posameznih hidroksicimetnih kislin na ULV narejene iz DPPC se ujemajo z rezultati dobljenimi z merjenjem polarizacije in anizotropije DPH, kjer nismo opazili bistvenega učinka hidroksicimetnih kislin na vrednosti ΔP in ΔA .

Dodatek stirenov ferulne, kavne in p-kumarne kisline v vseh primerih povzroči močan padec entalpije faznega predprehoda in padec entalpije glavnega faznega prehoda. Z merjenji ΔP in ΔA smo opazili znižanje polarizacije in anizotropije DPH v ULV iz DPPC. Rezultati kažejo, da se stireni nalagajo v lipidni dvosloj, ki ga destabilizirajo.

Reverzibilnosti faznih prehodov ULV iz DPPC brez ali z dodatkom ferulne, kavne in p-kumarne kisline ter njihovih stirenov je prikazana na slikah 23, 30, 31, 32, 33, 34 in 35. Opazimo da v prisotnosti ferulne, kavne ali p-kumarne kisline pride do znižanja entalpij obeh faznih prehodov pri drugi meritvi. Ob dodatku stirenov teh kislin pa se glavni fazni prehod zmanjša, fazni predprehod pa popolnoma izgine, kar nam pove, da fazni prehod iz gel v tekoče neurejeno stanje ni popolnoma reverzibilen proces.

5.2 SKLEPI

Dodatek ferulne, kavne in p-kumarne kisline ULV in MLV pripravljenim iz mešanice lipidov POPC, POPE, POPS in CH poveča urejenost in zmanjša dinamiko alkilnih verig fosfolipidov v okolici DPH. Membrana iz tekočega neurejenega stanja preide v bolj urejeno stanje - postane bolj rigidna.

Dodatek stirenov ferulne, kavne in p-kumarne kisline zmanjša urejenost membrane in poveča dinamiko alkilnih verig fosfolipidov v okolici DPH. Membrana je v njihovi prisotnosti bolj fluidna.

Pri titraciji ULV narejenih iz DPPC si učinki posameznih hidroksicimetnih kislin sledijo v skladu z njihovo antioksidativno učinkovitostjo. Najmočnejši je učinek kavne kisline, sledi ferulna kislina, najmanjši pa je učinek p-kumarne kisline.

Rezultati DSC meritev učinka posameznih hidroksicimetnih kislin na ULV narejene iz DPPC se ujemajo z rezultati dobljenimi z merjenjem polarizacije in anizotropije DPH.

Stireni vplivajo na reverzibilnost faznega predprehoda.

6 POVZETEK

Hidroksicimetne kisline so fenilpropanoidni metaboliti rastlin in rastlinskih proizvodov. Nahajajo se v sadju, zelenjavi, čaju in zeliščih in imajo pomemben vpliv na organoleptične lastnosti teh živil. Da bi primerjali vpliv teh spojin na stopnjo urejenosti lipidnega dvosloja smo izvedli meritve polarizacije in anizotropije fluorescence DPH v prisotnosti lipidov. Ugotovili smo, da prisotnost ferulne, kavne in p-kumarne kisline poveča urejenost in zmanjša dinamiko alkilnih verig fosfolipidov lipidnih membran ULV in MLV pripravljenih iz mešanice lipidov v okolici DPH. Dodatek stirenov ferulne, kavne in p-kumarne kisline pa urejenost membrane zmanjša.

Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) smo spremljali fazne prehode ULV liposomov iz DPPC ob prisotnosti kislin oz. njihovih stirenov. Iz prvih meritev smo odčitali temperature in entalpije faznih prehodov. Drugo meritev smo uporabili za oceno reverzibilnosti faznega prehoda iz gel v tekoče neurejeno stanje. Iz DSC termogramov (slike 23, 24, 25, 26, 27 in 28) vidimo, da dodatek kavne, ferulne in p-kumarne kisline oz. njihovih stirenov povzroči znižanje temperature predprehoda (T_m') in temperature glavnega prehoda (T_m) in znižanje entalpije faznega prehoda (ΔH_{cal}). Rezultati DSC meritev učinka posameznih hidroksicimetnih kislin in njihovih stirenov na ULV narejene iz DPPC se ujemajo z rezultati dobljenimi z merjenjem polarizacije in anizotropije DPH.

SUMMARY

The hydroxycinnamic acids are phenylpropanoid metabolites commonly found in plants and plant products. They are present in fruits, vegetables, tea and herbs and have a significant effect on the organoleptic characteristics of plant-based foods. The steady-state DPH polarisation and anisotropy measurements were performed to compare the level of order in the lipid bilayer. Addition of ferulic, caffeic and p-coumaric acid increases effect of phenolic compounds on the ordering and decreases the dynamics of phospholipid alkyl chains of lipid membranes ULV and MLV prepared from mixture of lipids in DPH environment. Addition of styrenes of ferulic, caffeic and p-coumaric acid decreases the ordering of lipid bilayer.

Differential scanning calorimetry (DSC) measurements were performed in order to track phase transitions of DPPC ULV liposomes in the presence of ferulic, caffeic and p-coumaric acid and their styrenes. The first DSC scan was used to obtain values for temperature and the enthalpy of the phase transition. The second scan was used to assess the reversibility of the phase transition. DSC thermograms (figure 23, 24, 25, 26, 27 in 28) show a decrease in temperature of phase pretransitions (T_m') and temperature of phase transition (T_m) as well as a decrease of phase transition enthalpy (ΔH_{cal}) in the presence of ferulic, caffeic and p-coumaric acid and their styrenes. The results of DSC measurements of the effect of individual hydroxycinnamic acids and their styrenes on ULV liposomes from DPPC correspond with the results obtained by measuring the polarisation and anisotropy of DPH.

7 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 živilstvo: 23-32

Adam A., Crespy V., Levrat-Verny M.-A., Leenhardt F., Leuillet M., Demigné C., Rémésy C. 2002. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *Journal of Nutrition*, 132: 1962-1968

Atkins P., de Paula J. 2002. *Atkin`s physical chemistry*. 7th ed. Oxford, Oxford University Press Inc.: 30-72

Barthelmebs L., Davies C., Cavin J.-F. 2000. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus planarum* reveals the existene of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8: 3368-3375

Bengoechea L., Hernández T., Quesada C., Bartolomé B., Estrella I., Gómez-Cordovés C. 1995. Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia*, 41: 94-98

Cavin J.-F., Barthelmebs L., Diviès C. 1997. Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus planarum*: Gene cloning, transcriptional analysis, overexpresion in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Applied and Enviromental Microbiology*, 63, 5: 1939-1944

Chan Y.-H.M., Boxer S.G. 2007. Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11: 1-7

Cheng J.-C., Dai F., Yang L., Liu Z.-L. 2007. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: Mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 104: 132-139.

Cokan M. 2006. Temperaturna odvisnost delovanja alkilpiridinijevih polimerov na različne membranske sisteme. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 48 str.

Godoy L., Martínez C., Carrasco N., Ganga M.A. 2008. Purification and characterization of a p-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. International Journal of Food Microbiology, 127: 6-11

Gumul D., Korus J. 2006. Polyphenol content and antioxidant activity of rye bran extrudates produced at varying parameters of extrusion process. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 9, 4: 1-11

<http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue4/art-11.html> (10. jun. 2009)

Gülçin İ. 2006. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology, 217: 213-220

Hatziantoniou S., Demetzos C. 2008. Lipids of membranes: chemistry, biological role and applications as drug carriers. V: Studies in natural products chemistry. Rahman A.U. (ed.). New York, Elsevier, 34: 173-202

Kadoma Y., Fujisawa S. 2008. A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method. Molecules, 13: 2488-2499

Karamać M., Buciński A., Pegg R.B., Amarowicz R. 2005. Antioxidant and antiradical activity of ferulates. Czech Journal of Food Sciences, 23: 64-68

Kure S. 2006. Fenolne spojine in fluidnost celičnih membran. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 69 str.

Lakowicz J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York, Springer: 954 str.

Laranjihna J. 2002. Caffeic acid and related antioxidant compounds: Biochemical and cellular effect. V: Handbook of antioxidants. 2nd ed. Cadenas E., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 279-302

Li X., Yang J., Li X., Gu W., Huang J., Zhang K.-Q. 2008. The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Anterobacter sp.* Px6-4 isolated from *Vanilla* root. Process Biochemistry, 43: 1132-1137

Marinova M.E., Toneva A., Yanishlieva. 2009. Comparison of the antioxidative properties of caffeic and chlorogenic acids. Food Chemistry, 114: 1498-1502

Manach, C., Schalkert, A., Morand, C., Rémésy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition, 79: 727-747

Max B., Torrado A.M., moldes A.B., Converti A., Domínguez J.M. 2009. Ferulic acid and p-coumaric acid solubilization by alkaline hydrolysis of the solid residue obtained after acid prehydrolysis of vine shoot prunings: Effect of the hydroxide and pH. Biochemical Engineering Journal, 43: 129-134

Miller N.J., Rice-Evans C.A. 1997. Cinnamates and hydroxybenzoates in the diet: antioxidant activity assessed using the ABTS radical cation. British Food Journal, 99, 2: 57-62

Munteanu D., Csunderlik C., Tincul I. 1991. Synthesis of the monomeric antioxidant. Journal of Thermal Analysis, 37: 411-426

Nomura E., Hosoda A., Mori H., Taniguchi H. 2005. Rapid base-catalyzed decarboxylation and amide-forming reaction of substituted cinnamic acids via microwave heating. Green Chemistry, 7: 863-866

Ou S., Kwok K.-C. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84: 1261-1269

Oelofse A., Lonvaud-Funel A., du Toit M. 2008. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology*, 26, 4: 377-385

Peppercorn M.A., Goldman P. 1971. Caffeic acid metabolism by bacteria of the human gastrointestinal tract. *Journal of Bacteriology*, 108, 3: 996-1000

Pinches S.E., Apps P. 2007. Production in food of 1,3-pentadiene and styrene by *Trichoderma* species. *International Journal of Food Microbiology*, 116:182-185

Rijken J.P., Wiseman S.A., Wesgerber, U. M., van Mierlo C.A.J., Quinlan P. T., van de Put F., Balentine D. A., Paetau-Robinson I. 2002. Antioksidant and other properties of green and black tea. V: *Handbook of antioxidants*. 2nd ed. Cadenas E., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 371-399

Robbins R.J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866-2887

Rodríguez H., Landete M., de las Rivas B., Muñoz R. 2008. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chemistry*, 107: 1393-1398

Rosazza J.P.N., Huang Z., Dostal L., Volm T., Rousseau B. 1995. Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *Journal of Industrial Microbiology*, 15: 457-471

Takemoto M., Achiwa K. 2001. Synthesis of styrenes through the biocatalytic decarboxylation of trans-cinnamic acids by plant cell cultures. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49, 5: 639-641

Vanbeneden N., Delvaux F., Delvaux F.R. 2006. Determination of hydroxycinnamic acid and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1136: 237-242

Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F.R. 2008. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolics flavour compounds in beer and distribution of Pad 1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107: 221-230

Zhu H., Zhao H., Zhang Z., Wang W., Yao S. 2006. Laser flash photolysis study on antioxidant properties of hydroxycinnamic acid derivatives. *Radiation and Environmental Biophysics*, 45: 73-77

Xu X., London E. 2000. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *Biochemistry* 39: 844–849

ZAHVALA

Za kvalitetno vodstvo, vsestransko pomoč in spodbudo se zahvaljujem mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich.

Hvala vsem sodelavcem Katedre za biokemijo in živilsko kemijo, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete za pomoč in prijetno vzdušje v laboratoriju.

Na koncu pa hvala moji družini, ki mi je vsa ta leta stala ob strani.