

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Hrana in zdravje

2. Šifra projekta:

V3-0366

3. Naslov projekta:

Termično stabilni antioksidanti in obstojnost hrane

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Termično stabilni antioksidanti in obstojnost hrane

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Thermally stable antioxidants and food stability

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

antioksidanti, lipidi, liposomi, termofilne arheje, obstojnost hrane

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

antioksidanti, lipidi, liposomi, termofilne arheje, obstojnost hrane

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

0106 Institut Jožef Stefan

6. Sofinancer/sofinancerji:

MKGOP

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

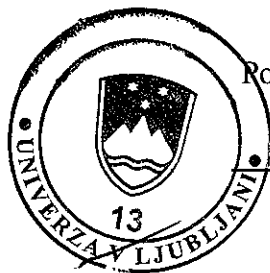
10873

Nataša Poklar Ulrih

Datum: 30.09.2008

Podpis vodje projekta:

prof. dr. Nataša Poklar Ulrih



Podpis in žig izvajalca:

Prof. dr. Andreja Kocijančič
rektorica

Po pooblastilu:
prof. dr. Janez Hribar
dekan

(Handwritten signatures of Nataša Poklar Ulrih and Prof. dr. Andreja Kocijančič)

(Handwritten signature of Prof. dr. Janez Hribar)

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

Projekt smo uspešno zaključili, več kot smo obljubljali, glede na sredstva, ki smo jih dobili.

Iz tega projekta, ki je bil zelo široko zastavljen, nadaljujemo, raziske v treh smereh:

- arheosmi, kot novi sistemi za vgrajevanje -patent v pripravi
- vgrajevanje koencima Q10 v arheosome/liposome - prijavljen kot aplikativni projekt
- nadaljujemo s študijem termično obstojnih antioksidantov in interakcij antioksidantov z različnimi membranami ter vpliv antioksidantov in drugih aditivov v hrani na procese fibrilacije alfa-sinukleina (Parkinsonova bolezen).

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

V 24 mesecih trajanja projekta smo realizirali predložen program dela v prijavi:

- Iz biomase arheje *A. pernix* gojene pri treh različnih pH 6,0, 7,0 in 8,0 smo izolirali celotne lipide. Lipide smo iz celic uspešno izolirali z Bligh in Dyer-jevo metodo ter jih ločili z adsorpcijsko kromatografijo. Uspešnost izolacije in ločbe smo preverjali s tankoplastno kromatografijo. Delo smo nadaljevali s polarno frakcijo lipidov, ter iz njih s soniciranjem pripravili male unilamelarne vezikle (SUV).

- Pripravili smo liposome (arheosome) in jih okarakterizirali s fluorimetrijo in EPR. Z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) smo primerjali lastnosti lipidov pridobljenih iz celic, ki smo jih gojili pri različnih pH vrednostih (6, 7 in 8) v temperaturnem območju od 10 do 90 °C. K veziklom smo dodali spinski označevalec MeFASL(10,3).

- Iz EPR spektrov smo odčitali maksimalni hiperfinski razcep (2A_{max}) ter empirični korelacijski čas, iz katerih smo sklepali na membransko fluidnost. Ugotovili smo, da se fluidnost s temperaturo povečuje, vendar so razlike med lipidi izoliranimi iz celic gojenih pri različnih pH neznatne.

- S spektrofluorimetrom smo merili anizotropijo in polarizacijo veziklov, katerim smo dodali fluorescentno sondo 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH), v temperaturnem območju od 10 do 98 °C. Ti dve metodi sta občutljivi na spremembe v rotacijskih gibanjih membranskih molekul. Višja vrednost polarizacije in anizotropije pomeni večjo urejenost membrane. Kot standard smo uporabili tudi SUV iz dipalmitoilfosfatidilholina (DPPC). Ugotovili smo, da se z višanjem temperature vrednosti polarizacije in anizotropije v vzorcih iz *A. pernix* postopoma nižajo. Ostrega faznega prehoda kakršen je opazen pri DPPC pri arheosomih nismo opazili. Sklepamo, da se z višanjem temperature urejenost membrane manjša in se povečuje fluidnost, pri čemer večjih razlik med lipidi iz celic gojenih pri različnih pH vrednostih nismo opazili.

- Meritve z diferenčnim dinamičnim kalorimetrom v temperaturnem območju od 10 °C do 180 °C za arheosome niso pokazale značilnega faznega prehoda. Pokazali smo, da obstajajo razlike v fluidnosti celičnih membran celic *A. pernix* gojenih pri različnih pH-vrednostih. Izolirani in očiščeni lipidi iz arhej pa med sabo ne kažejo bistvenih razlik v lastnostih membran, ki smo jih pripravili in vitro. Sklepamo, da so za različno urejenost membran in vivo odgovorne druge membranske komponente in ne lipidi.

- V ekstraktu iz biomase *A. pernix* določili 4.8 mg fenolnih spojin (izraženih v ekvivalentih klorogenske kisline) na g suhe biomase. Ker test za določanje fenolnih spojin zajema tudi spojine z antioksidativno učinkovitostjo, smo z DPPH testom v metanolnem ekstraktu iz biomase dokazali antioksidativno učinkovitost, čeprav sorazmerno majhno. Prvi rezultati TLC in HPLC-MS analize so pokazali na prisotnost kavne in p-kumarne kisline. Pri nadaljnem delu smo na osnovi TLC dokazali prisotnost stirena, ki se lahko tvori iz p-kumarne kisline po dekarboksilaciji te kisline. Ugotovili smo, da termofilna arheja *A. pernix* ne vsebuje encimov iz skupine dekarboksilaz (npr. dekarboksilaza felurne kisline, ki pri rastlinah pretvarja felurno kislino v stiren). Pri termofilnih arhejah predvidevamo, da se ta proces zgodi spontano zaradi visoke temperature, pri kateri ta arheja uspeva.

- Te študije smo nadaljevali s proučevanjem vpliva kavne, p-kumarne in felurne kisline ter njihovih stirenov na lastnosti liposomov (unilamelarnih ter multilamelarnih). Vpliv teh

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

antioksidantov smo proučevali z elektronsko paramagnetno resonanco ter z merjenjem fluorescenčne polarizacije in anizotropizma. Naše najnovejši rezultati polarizacije in EPR kažejo, da ima stiren felurne kisline največjo sposobnost urejanja membran ki se nahajajo v tekočen neurejenem stanju, manjši vpliv imata stiren p-kumarne in kavne kisline.

- V zadnjem obdobju smo z metodo fluorimetrije (polarizacija/anizotropizem) in EPR nadaljujemo študije interakcij nekaterih antioksidantov z modelnimi lipidnimi membranami. V tem obdobju proučujemo interakcije kamferola in epigalaktehina (galata) z modelnimi membranami. Rezultati so zanimivi, merjenje polarizacije/anizotropizma z uporabo membranske sonde DPH pokaže večje spremembe na membrani (urejanje membrane) v prisotnosti kamferola, medtem ko za enake spremembe na membrani potrebujemo precej visje koncentracije galata. EPR tehnika pa pokaže nekoliko drugačne rezultate. Z uporabo teh dveh tehnik smo proučevali tudi interakcije stirena kavne, kumarne in felurne kisline, ki smo jih detektrirali v arhejah. Zanimivo je, da ti antioksidanti nimajo velikega vpliva na membrane.

- Raziskave nadaljujemo s študijem učinka koencima Q na urejenost membran. Proučevali smo koencim Q topen v vodi in primerjali njegov učinek z dvema koenimoma Q topnima v vodi in poskušamo ga vgraditi v arheosome - nadaljevane projekta.

- V zadnjem letu smo tudi nadaljevali z delom na študiju vgrajevanja izbranih, po hidrofobnosti različnih, fenolnih spojin v modelne celične membrane in na spremembe prepustnosti le-teh. Spremembe smo spremljali s fluorescenčno in EPR spektroskopijo. Pri obeh smo morali najprej ponoviti nekatere eksperimente, da bi tako preverili dobljene rezultate. Za spremljanje antimikrobnega delovanja izbranih fenolnih spojin na bakterije, ki so znani kvarljivci hrane, smo preverili primernost metode difuzije na trdem in metodo razredčevanja v tekočem gojišču, vpliv različnih topil in izbranih fenolnih spojin na rast 2 vrst bakterij.

- Askorbinska kislina, ki jo poskušamo vgraditi v liposome pripravljene iz lipidov arhej, je kinetično nestabilna molekula, ki se v prisotnosti kisika encimsko in nenencimsko oksidira v dehidroaskorbinsko kislino. Slednje predstavlja velik problem pri določevanju vitamina C, saj se že med homogenizacijo in/ali termično obdelavo v kompleksnih matriksih oksidira del askorbinske kisline, kar pogostokrat vodi do napak v določitvi skupnega vitamina C. Da bi zmanjšali možnosti napak in olajšali določevanje skupnega vitamina C, smo razvili metodo s katero smo nastalo dehidroaskorbinsko kislino reducirali v kislem pH-ju, kjer sta obe obliki vitamina C najbolj stabilni, nazaj v askorbinsko kislino. V okviru raziskovalnega projekta.

- Na seriji komercialno dostopnih nerafiniranih (oljčno, bučno) in rafiniranih (sončnično, sojino, repično) olj smo ugotavljali oksidativno stabilnost olj z Rancimat testom, kjer določimo čas, v katerem naraste vsebnost hlapnih sekundarnih produktov oksidacije v olju, ki smo ga izpostavili temperaturi 110 oC. Ugotovili smo, da je v primeru bučnega olja, kljub primerljivi vsebnosti skupnih tokoferolov z ostalimi preiskovanimi olji, ta čas najdaljši. Visoko oksidativno stabilnost omenjenega olja lahko pojasnimo z dejstvom, da se med praženjem bučnih semen, ki jo opravimo pred ekstrakcijo olja, tvorijo produkti Maillardove reakcije, ki so dokaj toplotno stabilni in naj bi po mnenju nekaterih avtorjev imeli antioksidativni učinek.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvo, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjevanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Na osnovi dobljenih rezultatov smo na letošnjem razpisu ARRS za projekte prijavi aplikativni projekt z naslovom Vodotopni koencim Q10 in arheosomi.

Sofinancer je tuji industrijski partner, ki se zanima za naše raziskave in jih želi tudi finančno podpreti. (Zakłady Farmaceutyczne Polfa - Łódź S.A.) - podpisana pogodba o soedlovanju in sofinanciranju.

Prišli smo do veliko novih temeljnih znanj, nekaj diplomantov je dobilo diplomo, en doktorat ter še dva študenta delata doktorat iz te teme. Nekaj rezultatov smo že objavili, ne pa vse, ker imamo patent v pripravi - arheosomi, kot novi sistemi za vgrajevanje.

Vabljen predavanje na kongresu:

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Dolgoročni rezultati so:

patentiranje izuma

podpis licenčne pogodbe in industrijska aplikacija arheosomov.

vzgajanje novih kadrov

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Nekatere tuje farmacevtske firme, vendar pod pogojem, da rezultate patentiramo.

Že vzpostavljeno sodelovanje: Zakłady Farmaceutyczne Polfa - Łódź S.A. - podpisana pogodba o soedlovanju in sofinanciranju.

Domača farmacevtska industrija (Lek, Krka) ni kazala zanimanja.

3.7. Število diplomantov, magistrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

4 diplomantje

1 doktor

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

1. prof. dr. Anthony Fink, Department of Chemistry and Biochemistry University of California at Santa Cruz (Fulbrightova štipendija N. Poklar Ulrich 2006/2007). Proučevanje vzrokov fibrilacije alfa-sinukleina (Parkinsonova bolezen) in vpliv antioksidantov (nutrientov) na razvoj bolezni.
2. Študij interakcije liposomov z aminokislinami in peptidi za usmerjen prenos v organizem z metodami elektronske spinske resonance. SLO-HR medvladni program sodelovanja (M. Šentjerc)
3. Vloga EPR oksimetrije in vivo pri študiju vpliva topikalne aplikacije vazodilatorja na učinkovitost obsevanja v radioterapiji tumorjev. SLO-ZDA medvladni program sodelovanja (M. Šentjerc).
4. EPR raziskave interakcije površinsko aktivnih antidepresivov z membranami. Slovensko-Turški medvladni program (M. Šentjerc)

Z Evropsko unijo sodelujemo na programih COST:

1. D22 "Protein-lipid interaction"
2. D27 »Origin of life and early evolution«: Preparation and properties of functionalized vesicles as protocel models.

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

Prenos znanja v naš laboratorij in novega področja, ki je zelo aktualno - vpliv aditivo v hrani na razvoj neurodegenerativnih bolezni. Skupne publikacije, izmenjava študentov in raziskovalcev.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani: <http://www.izum.si/>

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

--

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije. Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.

POVZETEK

V3-0366: Termično obstojni antioksidanti in obstojnost hrane

Termofilna arheja *Aeropyrum pernix* je, zaradi svoje prilagoditve na visoke temperature, biotehnoško zelo zanimiva, saj predstavlja vir številnih termično obstojnih molekul. Iz biomase *A. pernix*, gojene pri različnih pH smo izolirali celokupne polarne lipide (TPL), za katere je značilno, da vsebujejo etrsko vez in ne esterske kot lipidi ostalih živih bitij. Z uporabo fluorimetrije, elektronske paramagnetne spektroskopije (EPR) in diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) smo ugotovili, da imajom liposomi/arheosomi pripravljene iz TPL številne edinstvene lastnosti: fluidni postanejo šele pri temperaturah nad 60°C, toda kljub povečani fluidnosti, ne prepuščajo kalceina niti pri 95°C. V te liposome, ki niso citotoksični, poskušamo vgraditi vitamin C in koencim Q. V ekstraktu iz biomase *A. pernix* smo detektirali tudi fenolne spojine in določili njihovo antioksidativno učinkovitost. Z uporabo TLC in HPLC-MS analize smo pokazali prisotnost kavne in p-kumarne kisline ter njunih stirenov. Pri višji temperaturi se pretvorba kislin v stirene zgodi spontano. Vpliv kavne in kumarne kisline ter njunih stirenov na membrane smo proučevali z EPR, fluorescenčno polarizacijo in anizotropizmom. Antimikrobno delovanje izbranih fenolnih spojin (kamferol in epigalokatehin) smo testirali na bakterij, ki so znani kvarljivci hrane. Preverjali smo tudi oksidativno stabilnost različnih komercialnih olj in ugotovili, da ima bučno olje najvišjo oksidativno stabilnost.

SUMMARY

V3-0366: Thermally stable antioxidants and food stability

Thermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* is biotechnologically very interesting, since it is adapted to high temperatures and represents the source of many thermally stable molecules. From biomass of *A. pernix* grown at different pH we isolated the total polar lipids (TPL), which have ether and not ester bonds compared to other living creatures. By using the combination of different techniques such as fluorimetry, electron paramagnetic spectroscopy (EPR) and differential scanning calorimetry (DSC) we determined that the liposomes/archaeosomes prepared from TPL have some unique properties: they become fluid at temperatures higher than 60°C, despite the increased fluidity they are not permeable for calcein even at 95°C. Into the liposomes, which are not cytotoxic, the vitamin C and Coenzyme Q will be encapsulated. Additionally, in the total extract of *A. pernix* the phenolic compounds were detected and their antioxidative potential were determined. By TLC and HPLC-MS methods we identify the p-cumaric and caffeic acids and their styrene. The effect of p-cumaric and caffeic acids and their styrene to the membrane were investigated by EPR and fluorimetry. Antimicrobial action of selected phenol compounds (kampherole, epigalocatechine) was tested on the selected bacterial strains known as food pathogens. The oxidative stability of different commercially available oils was investigated. Surprisingly, it was found that the pumpkin's oil has the highest oxidative stability.