

DERIVATI CIMETNE KISLINE IN LIGNIN: VSEBNOST, STRUKTURA IN LASTNOSTI

Andrej LAVRENČIČ^{a)} in Vekoslava STIBILJ^{ab)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale, Slovenija, doc., dr.

^{b)} Institut Jožef Stefan, Odsek za kemijo okolja, Jamova 39, 1000 Ljubljana, Slovenija, doc., dr.

Received June 06, 1998, accepted July 05, 1999.

Delo je prispelo 1998-06-21, sprejeto 1999-07-05.

IZVLEČEK

V prispevku navajamo pregled literature o vsebnosti, kemični sestavi in strukturi derivatov cimetne kisline, predvsem p-kumarne (PKK) in ferulne kisline (FK) ter lignina, njihovo porazdelitev v rastlinah in znotraj rastlinske celične stene. Opisane so tudi povezave lignina in derivatov cimetne kisline z različnimi strukturnimi ogljikovimi hidrati ter osnovne značilnosti strukturno in kemično spremenjenega lignina pri mutantih z rjavo osrednjo žilo (*brown midrib*; BMR) in mutantih z lomljivim stebлом (*brittle culm*).

Ključne besede: lignin / cimetna kislina / derivati cimetne kisline / rastline / vsebnost / struktura / lastnosti

CINNAMIC ACID DERIVATIVES AND LIGNIN: CONTENT, STRUCTURE AND PROPERTIES

ABSTRACTS

This review article deals with the descriptions of contents, chemical composition and structure of cinnamic acid derivatives, especially p-coumaric (PCA) and ferulic acid (FA) and lignin, together with their distribution within plants and cell walls. Furthermore, chemical linkages between lignin and cinnamic acid derivatives with structural carbohydrates are also described and basic characteristics of structurally and chemically altered lignins of *brown midrib* (BMR) and *brittle culm* mutants are mentioned.

Key words: lignin / cinnamic acid / cinnamic acid derivatives / plants / content / structure / properties

UVOD

Ena najpomembnejših prilagoditev rastlin za življenje na kopnem je razvoj različnih specializiranih tkiv, ki zagotavljajo rastlinam mehansko trdnost, omogočajo prenos vode, hranilnih snovi in presnovnih produktov ter dajejo zaščito pred kemičnimi in biološkimi stresnimi dejavniki okolja. Skupna značilnost teh specializiranih tkiv, mehanskega, prevodnega in krovnega tkiva, je močno odebeljena sekundarna celična stena, ki se nalaga v več plasteh na notranji strani primarne celične stene (Niklas, 1989; Wilson, 1994). Najpomembnejše fenolne spojine, ki so sekundarni produkt presnove in so značilne za vse kopenske rastline, so derivati cimetne kisline in lignin. Te spojine dodatno utrjujejo strukturo celične stene, njihova koncentracija pa je v večini specializiranih tkiv lahko zelo visoka.

Vsebnosti derivatov cimetne kisline in lignina so močno povezane s hranilno vrednostjo voluminozne krme, predvsem z razkrojljivostjo v vampu in s prebavljivostjo energetske bogatih

strukturnih ogljikovih hidratov (Van Soest in Wine, 1967; Jung in Casler, 1991; Lavrenčič in sod, 1997). Drugi raziskovalci (Ford in Elliott, 1987; Reeves, 1993; Jung in Deetz, 1993; Chesson, 1993) menijo, da na hranilno vrednost voluminozne krme vplivajo tudi struktura in prostorska porazdelitev lignina in derivatov cimetne kisline v organih, tkivih in posameznih rastlinskih celičnih stenah. Ti raziskovalci so porazdelitvi kemičnih vezi med ligninom, derivati cimetne kisline in strukturnimi ogljikovimi hidrati v rastlinah pripisali večji vpliv na hranilno vrednost kot sami njihovi vsebnosti.

Za boljše razumevanje vpliva derivatov cimetne kisline in lignina na procese razkroja v vampu in prebave rastlinske celične stene je dobro poznati sestavo, strukturo in porazdelitev teh spojin v rastlinah in njihovih celičnih stenah, poleg tega pa bomo v članku opisali še kemične vezi med derivati cimetne kisline, ligninom in strukturnimi ogljikovimi hidrati.

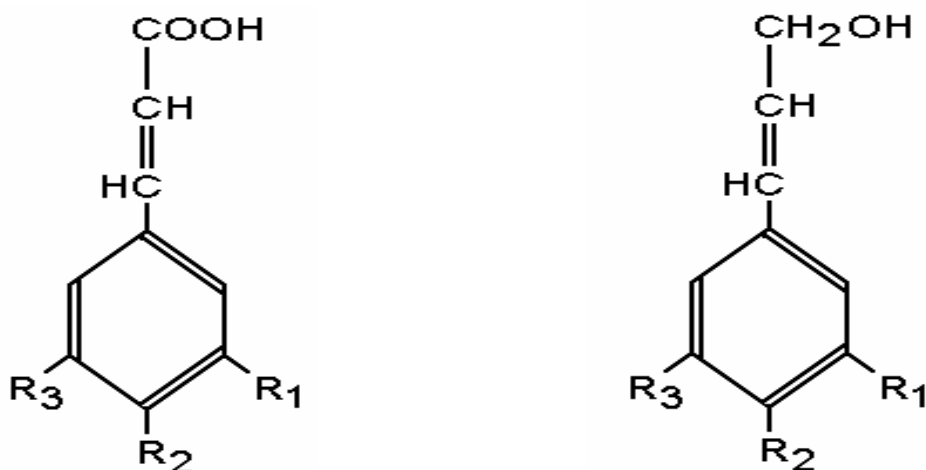
DERIVATI CIMETNE KISLINE

Porazdelitev

Derivate cimetne kisline vsebujejo celične stene večine rastlin. Z njimi so še posebej bogate kritosemenke (*Angiospermae*), predvsem trave (*Poaceae*) (Wallace in Fry, 1994). V izvlečkih, dobljenih s hidrolizo celičnih sten s NaOH, prevladujeta dva derivata cimetne kisline, p-kumarna (PKK) in ferulna (FK) kislina, poleg njiju pa je moč zaslediti še sinapilno kislino (SK; slika 1 in legenda 1) in različne derivate benzojske kisline in benzaldehida (slika 2 in legenda 2), predvsem p-hidroksibenzojsko, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojsko in vanilinsko kislino, p-hidroksibenzaldehid, 4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid in vanilin, vendar ne več kot 0,26 mg g⁻¹ suhe snovi celične stene.

Ker so derivati benzojske kisline in benzaldehida količinsko manj pomembni, so Besle in sod. (1994) zaključili, da so razkrojni produkti PKK in FK, najverjetneje nastali med postopki ekstrakcije iz celičnih sten. Zato bomo v nadaljevanju opisali predvsem značilnosti PKK in FK.

Poglavitni delež PKK in FK je v obliki *trans* izomer. *Cis* izomere najverjetneje nastajajo iz *trans* izomer med ekstrakcijo iz celičnih sten, lahko pa so tudi njihov sestavni del.



Slika 1. Formula derivatov cimetne kisline in cinamil alkohola (glej legendo 1).

Figure 1. Formulae cinnamic acid and cinnamyl alcohol derivatives (see Legend 1).

Legenda 1. Poimenovanje derivatov cimetne kisline in cinamil alkohola
 Legend 1. Nomenclature of cinnamic acid and cinnamyl alcohol derivatives

Radikali Radicals	IUPAC nomenklatura IUPAC nomenclature	Trivialno ime Trivial name	
		slovensko Slovene	angleško English
Derivati cimetne kisline – Derivatives of cinnamic acid			
R ₁ , R ₂ , R ₃ = H	3-fenilpropenojska kislina	cimetna kislina	cinnamic acid
R ₁ , R ₃ = H R ₂ = OH	4-hidroksicimetna kislina	p-kumarna kislina (PKK)	p-coumaric acid (PCA)
R ₁ , R ₂ = OH R ₃ = H	3,4-dihidroksicimetna kislina	kavna kislina	caffeic acid
R ₁ = OCH ₃ R ₂ = OH R ₃ = H	4-hidroksi-3-metoksicimetna kislina	ferulna kislina (FK)	ferulic acid (FA)
R ₁ , R ₃ = OCH ₃ R ₂ = OH	4-hidroksi-3,5-dimetoksicimetna kislina	sinapilna kislina (SK)	sinapic acid (SA)
Derivati cinamil alkohola – Derivatives of cinnamyl alcohol			
R ₁ , R ₂ , R ₃ = H	3-fenil-2-propen-1-ol	cinamil alkohol	cinnamyl alcohol
R ₁ , R ₃ = H R ₂ = OH	3-(4-hidroksifenil)-2-propen-1-ol	p-kumaril alkohol	p-coumaryl alcohol
R ₁ = OCH ₃ R ₂ = OH R ₃ = H	3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-2-propen-1-ol	koniferil alkohol	coniferyl alcohol
R ₁ , R ₃ = OCH ₃ R ₂ = OH	3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-2-propen-1-ol	sinapil alkohol	sinapyl alcohol

Na osnovi fluorescence derivatov cimetne kisline lahko ugotavljamo prisotnost teh kislin v rastlinskih celicah, tkivih in organih (Wallace in Fry, 1994). Fluorescenca je še posebno izrazita pri specializiranih celicah krovnega (epidermis), prevodnega (ksilem) in podpornega (sklerenhim) tkiva. FK je večinoma enakomerno porazdeljena po celotni celični steni. He in Terashima (1991) sta ugotovila, da se v poganjkih riža (*Oryza sativa*) tudi PKK porazdeli po celičnih stenah vseh tkiv. Zanimivo pa je, da se del PKK spremeni v FK in SK, katere vsebnost pa je bolj ali manj enaka vsebnosti FK.



Slika 2. Formula derivatov benzojske kisline in benzaldehida (glej legendo 2).
 Figure 2. Formulae benzoic acid and benzaldehyde derivatives (see Legend 2).

Legenda 2. Poimenovanje derivatov benzojske kisline in benzaldehida
 Legend 2. Nomenclature of benzoic acid and benzaldehyde derivatives

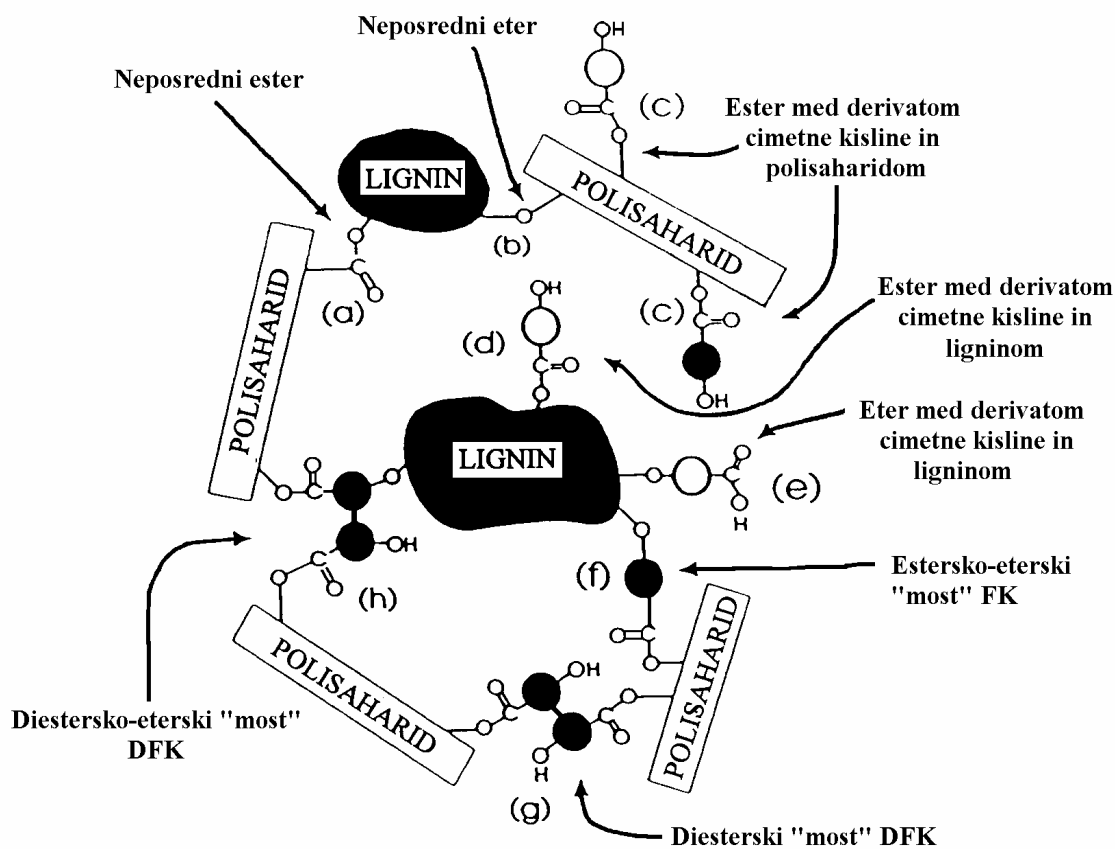
Radikali Radicals	IUPAC nomenklatura IUPAC nomenclature	Trivialno ime Trivial name	
		slovensko Slovene	angleško English
Derivati benzojske kisline – Benzoic acid derivatives			
R ₁ , R ₂ , R ₃ = H	Benzenkarboksilna kislina	benzojska kislina	benzoic acid
R ₁ , R ₃ = H R ₂ = OH	4-hidroksibenzojska kislina	p-hidroksibenzojska kislina (PHBK)	p-hydroxy benzoic acid (PHBA)
R ₁ , R ₂ = OH R ₃ = H	3,4-dihidroksibenzojska kislina	protokatehujška kislina	protocatechuic acid
R ₁ , R ₂ , R ₃ = OH	3,4,5-trihidroksibenzojska kislina	galna kislina	gallic acid
R ₁ = OCH ₃ R ₂ = OH R ₃ = H	4-hidroksi-3-metoksibenzojska kislina	vanilinska kislina (VK)	vanilic acid (VA)
R ₁ , R ₃ = OCH ₃ R ₂ = OH	4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojska kislina	siringilna kislina	syringic acid (SYA)
R ₁ , R ₂ = OCH ₃ R ₃ = H	3,4-dimetoksibenzojska kislina	veratrojska kislina	veratric acid
Derivati benzaldehida – Benzaldehyde derivatives			
R ₁ , R ₂ , R ₃ = H	Benzaldehid	benzaldehyd	Benzaldehyde
R ₁ , R ₃ = H R ₂ = OH	4-hidroksibenzaldehid	p-hidroksi-benzaldehid (PHBAL)	p-hydroxy benzaldehyde (PHBAL)
R ₁ = OCH ₃ R ₂ = OH R ₃ = H	4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid	vanilin (VAN)	vanillin (VAN)
R ₁ , R ₃ = OCH ₃ R ₂ = OH	4-hidroksi-3,5-dimetoksi-benzaldehid	siringaldehid	syringaldehyde (SYAL)

Vezi med p-kumarno in ferulno kislino in polimeri celične stene

Yamamoto in sod. (1989) in Cherney in sod. (1989) so z uporabo različnih topil (voda, metanol, etanol, nevtralni detergent in umetna slina) določili vsebnost prostih derivatov cimetne kisline ter ugotovili, da je njihova količina v veliki meri odvisna od uporabljenega topila. Ne glede na uporabljeno topilo je skupna vsebnost derivatov zelo nizka (med 0,3 in 13,6 mg kg⁻¹ suhe snovi), kar pomeni, da je večina tako ali drugače vezana v celični steni, predvsem na lignin, nevtralne monosaharide hemiceluloz, predvsem na arabinozo, ter na uronske kisline pektina, kot so galakturonska, glukuronska in O-metil-galakturonska kislina.

Derivati cimetne kisline lahko tvorijo tako estre kot etre z ligninom oziroma strukturnimi ogljikovimi hidrati (slika 3) (Whetten in sod., 1998), vendar neposrednih dokazov za njihov obstoj nimamo, saj jih določamo na osnovi lastnosti, da se estri razkrojijo v alkalnem okolju. Tako vsebnost estrov posredno določamo z 1 ali 2 M natrijevim hidroksidom (Jung in Shalita-Jones, 1990), medtem ko moramo za določanje vsebnosti etrov uporabiti bolj agresivne postopke, kot je raztapljanje z 4 M natrijevim hidroksidom pri visokih temperaturah (>165°C)

(Akin in sod., 1993), z dioksanom-HCl (Kondo in sod., 1991) in z reakcijo z nitrobenzenom (Amjed in sod., 1992).



Slika 3. Shematski prikaz možnih kovalentnih vezi med strukturnimi ogljikovimi hidrati in ligninom v celičnih stenah. ○, PKK; ●, FK; ●●, DFK. a, neposredni ester; b, neposredni eter; c, ester med derivatom cimetine kisline in strukturnim ogljikovim hidratom; d, ester med derivatom cimetine kisline in ligninom; e, eter med derivatom cimetine kisline in ligninom; f, estersko-eterski "most" FK; g, diesterski "most" DFK; h, diestersko-eterski "most" DFK (Iiyama in sod., 1994)

Figure 3: Schematic diagram showing possible covalent cross links between structural carbohydrates and lignin in cell walls. ○, PCA; ●, FA; ●●, DDFA. a, direct ether linkage; b, direct ester linkage; c, cinnamic acid derivative esterified to polysaccharides; d, cinnamic acid derivative esterified to lignin; e, cinnamic acid derivative etherified to lignin; f, FA ester-ether bridge; g, DDFA diester bridge; h, DDFA diester-ether bridge (Iiyama *et al.*, 1994)

Vsebnost estrov s PKK in FK je odvisna od rastlinske družine, vrste, zrelosti, organa in tkiva (preglednica 1). Razlike so tudi med enakimi tkivi v različnih organih pa tudi med enakimi organi na različnih delih rastline (npr. listi rastoči višje ali nižje na stebelu) in znotraj posameznih organov (npr. med različnimi deli stebela trav, ki so bodisi višje ali nižje na rastlini ali deli med dvema kolencema glede na oddaljenost od spodnjega kolenca).

Metuljnice (*Fabaceae*) večinoma vsebujejo manj p-kumaroil in feruloil estrov kot trave (*Poaceae*). Pogosto jih ni več kot 10 odstotkov tistih, izmerjenih pri travah (Eraso in Hartley,

1990; Jung in sod., 1990). Za lucerno (*Medicago sativa*) Bittner (1984) navaja, da je koncentracija teh estrov višja v listih kot v steblih, medtem ko je pri travah ravno obratno.

Preglednica 1. Vsebnost estrov p-kumarne in ferulne kisline v nekaterih krmnih rastlinah
Table 1. Contents of esterified p-coumaric and ferulic acid in some forage species

Vrsta Species	Opis vzorca Sample description	p-kumarna kislina p-coumaric acid	Ferulna kislina Ferulic acid	Vir Reference
		mg kg ⁻¹ suhe snovi – mg kg ⁻¹ dry matter		
<i>Medicago sativa</i>	mlada – immature	571	1040	Jung in sod., 1983
	zrela – mature	628	979	
<i>Festuca arundinacea</i>	mlada – immature	1834	1786	
	zrela – mature	3026	2395	
Pšenična slama – Wheat straw	kolenca – nodes	2318	832	Lavrenčič, 1994
	stebila – stems	1828	927	
	listi – leaves	407	650	
		mg g ⁻¹ suhe snovi celičnih sten – mg g ⁻¹ cell wall dry matter		
<i>Lolium perenne</i>	poganjek – shoot	0,78 (0,17)*	6,65 (0,47)	Eraso in Hartley, 1990
<i>Hordeum vulgare</i>	slama – straw	3,54 (0,30)	3,53 (0,17)	
<i>Medicago sativa</i>				
<i>Trifolium pratense</i>	steblo – stem	1,64 (0,10)	0,50 (0,10)	
<i>Zea mays</i>	steblo – stem	0,52 (0,10)	0,29 (0,10)	
	steblo – stem	19,60 (0,67)	6,88 (0,54)	
<i>Sorghum</i> spp.	l. ploskev – l. blade	2,25 (0,19)	4,42 (0,40)	
	l. nožnica – l. sheath	7,37 (0,50)	9,94 (0,74)	
	steblo – stem	13,85 (0,57)	4,21 (0,16)	
	l. ploskev + nožnica – l. blade + sheath	9,26 (0,47)	4,10 (0,18)	

* v oklepaju so navedene vsebnosti cis-izomere – values in parenthesis are contents of cis-isomere

Z dozorevanjem rastlin se vsebnost p-kumaroil estrov povečuje hitreje kot vsebnost feruloil estrov, ker nalaganje PKK v celične stene poteka sočasno z lignifikacijo rastlinskih tkiv (Iiyama in sod., 1990; Müsel in sod., 1997). Whetten in sod. (1998) poročajo, da je pri travah okoli 90 odstotkov PKK zaestrene s stransko verigo lignina, predvsem s siringilno skupino, kjer se ester tvori z njenim γ C atomom.

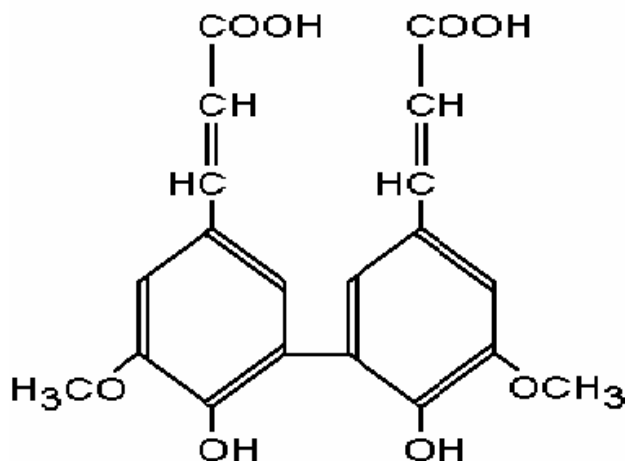
Z encimsko hidrolizo celične stene na fragmente z majhno molekularno maso ter ekstrakcijo in analizo strukture kompleksov med derivati cimetne kisline in ogljikovimi hidrati je mogoče ugotoviti, kateri monosaharidi so vpleteni v tvorbo estrov.

Metodo so uporabili predvsem pri travah (*Poaceae*) in metlikovkah (*Chenopodiaceae*). V špinači (*Spinacia oleracea*) in sladkorni pesi (*Beta vulgaris*) FK in PKK tvorita estre z galaktozo oziroma galaktani (4-O-(6-feruloil- β -D-galaktopiranozil)-D-galaktoza, FK-Gal₂ oziroma PKK-Gal₂) in z arabinozo oziroma arabinani (3-O-(3-O-feruloil- α -L-arabinopiranozil)-L-arabinoza, FK-Ara₂ oziroma PKK-Ara₂). Na podlagi teh rezultatov je Fry (1986) zaključil, da sta oba derivata cimetne kisline vezana na pektin. Izračunal je tudi, da pri sladkorni pesi ena molekula FK tvori ester približno z vsakim 250. monosaharidom in poudaril, da sta število estrov in razmik med njimi genetsko pogojena. Pri travah (*Poaceae*) FK in PKK tvorita estre z arabinozo, ki je sestavni del arabinoksilanov (hemiceluloza): FK-Ara-Xyl (3-O-(5-O-feruloil- α -L-

arabinofuranozil)-D-ksiloza; FAX) in PKK-Ara-Xyl (PAX) ter FK-Ara-Xyl₂ (4-O-(3-O-(5-O-feruloil- α -L-arabinofuranozil)- β -D-ksilopiranozil)-D-ksiloza; FAXX) in PKK-Ara-Xyl₂ (PAXX) (Mueller-Harvey in sod., 1986). Za celične stene ječmenove slame (*Hordeum vulgare*) so izračunali, da ena molekula PKK tvori ester s približno vsako 31. molekulo arabinoze oziroma z vsako 243. pentozo. Feruloil estri so pogostejši, saj je zaestrena približno vsaka 15. arabinoza oziroma vsaka 121. pentozo. To razmerje je pri pšeničnih otrobih nekoliko širše, ena molekula FK je namreč zaestrena z vsakim 150. pentozo.

V nastajanje estrov s strukturnimi ogljikovimi hidrati (arabinozo) je vpletena predvsem FK. Wende in Fry (1997) in Hosny in Rosazza (1997) poročajo, da pri koruzi (*Zea mays*) in trstikasti bilnici (*Festuca arundinacea*) prevladuje predvsem molekula 2-O-(5-O-feruloil- α -L-arabinozil)- β -D-ksiloze. Ishii (1997) v svojem preglednem članku navaja še številne druge estre med FK (PKK) in arabinozo, ki so jih izolirali iz pšeničnih otrobov (*Triticum aestivum*), sladkornega trsta (*Saccharum officinarum*), poganjkov koruze (*Zea mays*), ječmenove slame (*Hordeum vulgare*) in poganjkov bambusa (*Phyllostahys edulis*).

Na podlagi redkih raziskav o vsebnosti etrov, ki ji tvorita PKK in FK, sta Jung in Deetz (1993) zaključila, da med metuljnicami in travami ni bistvenih razlik. Nasprotno pa so Akin in sod. (1993), Jung in Vogel (1992) in Jung in sod. (1994) ugotovili, da že znotraj rastlinskih družin obstajajo precejšnje razlike v vsebnosti, ki so odvisne od rastlinske vrste, genotipa, zrelosti in načina ekstrakcije. Pri najpogosteje uporabljenima metodama, kot sta ekstrakcija z 4 M NaOH pri visoki temperaturi in reakcija z nitrobenzenom, obstaja velika verjetnost, da se del PKK in FK razkroji. Iiyama in sod. (1990) ter Jung in Vogel (1992) menijo, da je vsebnost etrov med FK in ligninom (slika 3f) podobna vsebnosti estrov FK. Scalbert in sod. (1985) so ugotovili, da 35 do 75 odstotkov FK v pšenični slami (*Triticum aestivum*) tvori etre z ligninom, preostanek pa estre s strukturnimi ogljikovimi hidrati. V tej raziskavi so še ugotovili, da je vsebnost etrov PKK precej manjša (slika 3e).



Slika 4. 5,5'-diferulna kislina (5-5' DFK).

Figure 4. 5,5'-diferulic acid (dehydrodiferulic acid; DDFA).

V zadnjih letih pa so ugotovili, da rastlinske celične stene poleg 5-5' DFK vsebujejo še druge DFK (Ralph in sod., 1994; Ralph in sod., 1995; Ishii, 1997). Grabber in sod. (1995) trdijo, da so z določitvijo samo 5-5' DFK redno podcenili pomembnost DFK v povezovanju polimerov celične stene. Ugotovili so, da je 15 odstotkov vseh ferulatov pri celicah koruze, gojenih v kulturi, v obliki DFK ter da 5-5' DFK predstavlja samo 5 do 15 % vseh DFK. Največji delež DFK zavzemajo 8-5' DFK (45 odstotkov), medtem ko 5-5', 8-8', 8-O-4' DFK skupaj

predstavljajo 10 do 25 odstotkov vseh DFK. Nasprotno pa Pena in sod. (1997) navajajo, da v koleoptili koruze od vseh DFK pripada največji delež 8-8' DFK (35,6 %), medtem ko 8-5' DFK predstavlja samo 21,8 odstotka, 5-5' DFK pa 25,3 odstotka vseh DFK. Analognih kislin s PKK do sedaj še niso izolirali (Wallace in Fry, 1994), prav tako kot še ni bil izoliran analogni produkt med PKK in FK.

Hartley in Ford (1989) sta iz celičnih sten tropskih trav izolirala tudi različne dimerizirane derivate cimetne kisline, kot so PKK-PKK, FK-FK in PKK-FK (slika 5 in legenda 3). Nastajajo pod vplivom UV svetlobe na PKK in FK.

Vsaka od teh dimer lahko teoretično tvori 12 stereoizomer. Najpogostejša oblika PKK-PKK dimere je dimerizacija glava-glava, medtem ko je dimerizacija glava-rep značilna za dimeri PKK-FK in FK-FK. Eraso in Hartley (1990) in Hartley in sod. (1990) pa so njihovo prisotnost dokazali tudi v travah zmernega podnebja, medtem ko so iz nekaterih metuljnic izolirali samo PKK-PKK dimero.

Preglednica 2. Vsebnost DFK in dimeriziranih derivatov cimetne kisline pri nekaterih krmnih rastlinah

Table 2: Contents of DFA and dimerised cinnamic acid derivatives in some forage species

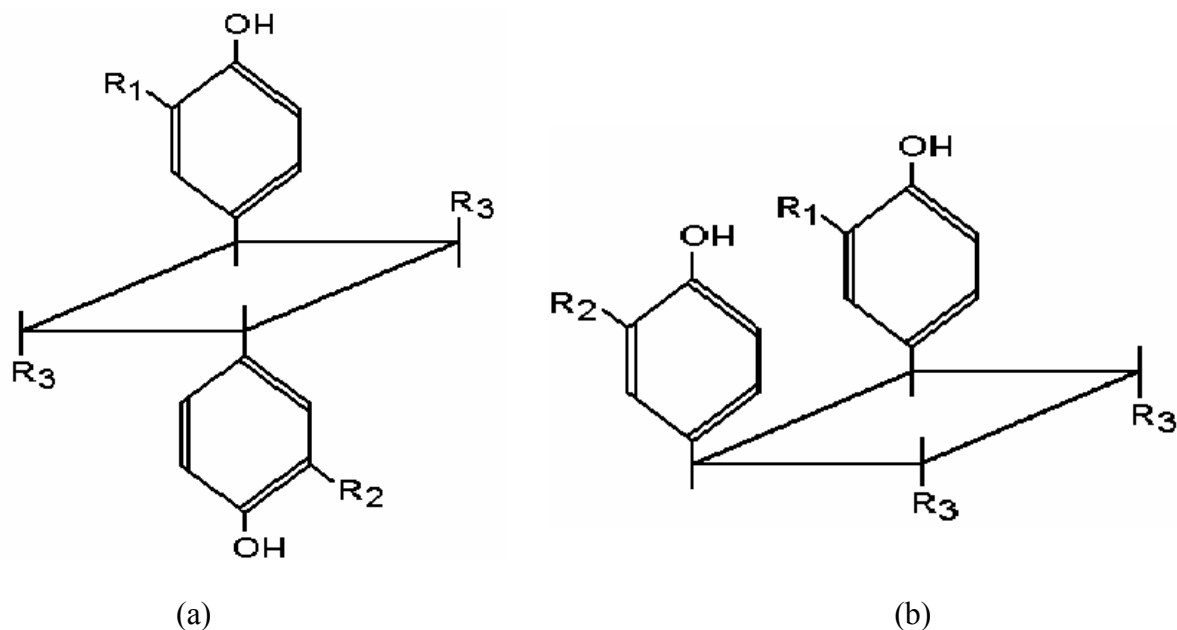
Vrsta Species	Opis vzorca Sample description	DFK [†]	PKK-PKK	FK-FK	PKK-FK	Vir Reference
		DFA	PCA-PCA	FA-FA	PCA-FA	
		mg g ⁻¹ SS celičnih sten – mg g ⁻¹ cell wall DM				
<i>Digitaria decumbens</i> <i>Setaria anceps</i> <i>Heteropogon contortus</i>	steblo – stem		0,16	0,35		Ford in Hartley, 1990
	list – leaf		0,27	0,64	0,44	
	steblo – stem		0,30	0,16	0,08	
	list – leaf		0,21	1,41	0,81	
	steblo – stem		3,24	0,37	0,77	
	list – leaf					
<i>Lolium perenne</i>	poganjek – shoot	0,18 (0,10)*	0,11	0,21	0,56	Eraso in Hartley, 1990
<i>Hordeum vulgare</i>	slama – straw	0,35 (0,10)	0,10			
<i>Medicago sativa</i>	steblo – stem	0,10	0,10			
<i>Trifolium pratense</i>	steblo – stem	0,10	0,10			
<i>Zea mays</i>	steblo – stem	0,92 (0,57)	0,10	0,17		
	l. ploskev – l. blade	0,33 (0,19)	0,28		0,20	
	l. nožnica – l. sheath	1,36 (0,55)	0,27		0,15	
<i>Sorghum</i> spp.	steblo – stem	0,44 (0,29)	0,10	0,10	0,10	
	l. ploskev + nožnica – l. blade + sheath	1,44 (0,50)	0,24	0,29	0,18	

[†] Kratice: glej sliko 3 – Abbreviations: see figure 3

* v oklepaju so navedene vsebnosti cis, trans izomere – in parenthesis are contents of cis, trans isomere

Te dimere (PKK-PKK, FK-FK in PKK-FK) lahko, podobno kot DFK, učinkovito povezujejo strukturne ogljikove hidrate in s tem utrjujejo strukturo celičnih sten (Ishii, 1997). Skupna količina vseh dimer v travah je odvisna od podnebnih razmer in variira med 0,5 in 4,4 mg g⁻¹ celične stene (Hartley in Ford, 1989). Wallace in Fry (1990) navajata, da je vsebnost dimer v pasjem repu (*Cynodon dactylon*), rastočem v tropskem podnebju, 3,9 mg g⁻¹ celične stene, medtem ko jih italijanska ljujka (*Lolium multiflorum*) in ječmenova slama (*Hordeum vulgare*),

rastoča v zmernem podnebjju, vsebujeta samo 1,1 oziroma 0,5 mg g⁻¹. Vsebnost posameznih dimer navajamo v preglednici 2.



Slika 5. Formuli (a) glava-rep in (b) glava-glava dimer derivatov cimetne kisline (glej legendo 3).
Figure 5. Formulae of (a) head-to-tail (dihydroxytruxillic acid derivatives) and (b) head-to-head dimers of cinnamic acid derivatives (dihydroxytruxinic acid derivatives) (see Legend 3).

Legenda 3. Radikali dimeriziranih derivatov cimetne kisline

Legend 3. Radicals of dimerised cinnamic acid derivatives

Radikali Radicals	Dimera Dimer of
R ₁ , R ₂ = H; R ₃ = COOH	p-kumarnih kislin (PKK-PKK) p-coumaric acids (PCA-PCA)
R ₁ , R ₂ = OCH ₃ ; R ₃ = COOH	Ferulnih kislin (FK-FK) ferulic acids (FA-FA)
R ₁ (R ₂)= H; R ₂ (R ₁)= OCH ₃ ; R ₃ = COOH	p-kumarne in ferulne kisline (PKK-FK) p-coumaric and ferulic acid (PCA-FA)

LIGNIN

Porazdelitev

Lignin vsebujejo vse rastline, tako praprotnice (*Pteridophyta*) kot tudi semenke (*Spermatophyta*). Izjema so le nekatere vodne rastline. Lignin lahko zavzema tudi do 40 odstotkov celotne mase rastlin ter je za celulozo najbolj razširjen biopolimer na svetu.

Hagerman in Butler (1991), Wallace in Fry (1994), Fineran (1997) in Whetten in sod. (1998) ugotavljajo, da ima lignin pomembno vlogo predvsem:

1. v strukturi rastline (celice, tkiva, organa), saj z različnimi vezmi s strukturnimi ogljikovimi hidrati in oskorjanjem (inkrostacijo) strukturnih ogljikovih hidratov zagotavlja mehansko trdnost rastline. Takšno vlogo imajo celice podpornega tkiva (predvsem sklerenhim, deloma tudi parenhim stebel), ki so lahko močno lignificirane;

2. pri transportu hranilnih snovi, vode in presnovnih produktov. Ob nalaganju lignina se znižuje prepustnost celičnih sten za vodo, lignifikacija pa poteka v specializiranih prevodnih tkivih z izrazito sekundarno celično steno (ksilem, traheje in traheide);
3. v preprečevanju bakterijskih in virusnih okužb rastlinskih tkiv in organov kot tudi pri zaščiti pred kemičnimi stresnimi dejavniki okolja. Pri bakterijskih ali virusnih okužbah tvorijo lahko tudi celice s samo primarno celično steno (npr. mezofil) lignin. V normalnih pogojih te celice lignina ne vsebujejo.

Fizikalni lastnosti lignina sta predvsem netopnost v vodi in "neprepustnost" za mikroorganizme. V bazičnih spojinah se lignin delno razkroji, razkrajujejo pa ga tudi glive bele trohnobe iz rodov *Phanerochaete*, *Scytinostroma*, *Phlebia*, *Phellinus* in *Pholiota* (Jung in sod., 1992). Lignin je tudi optično neaktiven, oksidira na zraku, medtem ko je v kislem okolju relativno obstojen. Splošno razširjeno prepričanje je, da je lignin v celični steni naložen kot amorfni polimer, vendar Terashima in sod. (1993) to trditev zavračajo. Menijo, da se lignin med plasti celuloznih vlaken vriva tako, da je površina fenolnih obročev vedno vzporedna (komplanarna) s površino celuloznega vlakna in s površino celične stene.

Prisotnost in porazdelitev lignina v rastlinskih tkivih in organih ugotavljamo s histološkimi barvili, med katerimi najpogosteje uporabljamo Wiesnerjev (floroglucinol-HCl) in Cross in Bevanov (KMnO₄/HCl/NH₃) reagent (Akin in Chesson, 1989; Hagerman in Butler, 1991; Fineran, 1997). Vsak od teh dveh reagentov specifično obarva določene fenolne skupine v ligninu, vendar pa intenzivnost obarvanja ni merilo vsebnosti. Zato z njimi lahko določimo samo prisotnost in porazdelitev lignina v rastlinskih tkivih in organih (Wallace in Fry, 1994). Prisotnost fenolnih skupin pa lahko določamo tudi na podlagi avtofluorescence, vendar je intenzivnost fluorescence odvisna od strukture lignina in celične stene.

Preglednica 3. Vsebnost lignina (g kg⁻¹ SS) v listih in steblih lucerne in navadne pasje trave (Hatfield in sod., 1994)

Table 3. Lignin contents (g kg⁻¹ DM) in leaves and stems of lucerne and orchardgrass (Hatfield et al., 1994)

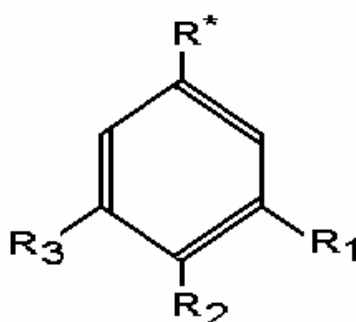
Vrsta – Species	Metoda Method	Listi Leaves	Zrelost stebel – Stem maturity		
			Nezrela Immature	Srednje zrela Intermed. matur.	Zrela Mature
<i>Medicago sativa</i>	Klason lignin	32	110	148	152
	KDL	29	82	107	117
<i>Dactylis glomerata</i>	Klason lignin	41	58	111	132
	KDL	27	15	41	45

Za določanje vsebnosti lignina v rastlinah je na voljo več metod, ki jih delimo na gravimetrične: ekstrakcija s 72 % H₂SO₄ (Klason lignin), v kislem detergentu netopen lignin (KDL), oksidacija s KMnO₄, oksidacija z NaClO₃, topnost v trietilenglikolu in kolorimetrične metode: z uporabo acetil bromida. Vsebnosti lignina se glede na uporabljeno metodo precej razlikujejo, razlike pa lahko pripišemo nepopolni hidrolizi strukturnih ogljikovih hidratov in beljakovin, nastanku Maillardovih kompleksov, taninom, voskom in hidrolizi dela lignina (Klason lignin, KDL) oziroma nepopolni oksidaciji lignina in oksidaciji beljakovin celične stene (oksidacija s KMnO₄, oksidacija z NaClO₃) (Giger, 1985; Hagerman in Butler, 1991; Flint in Camire, 1992; Reeves, 1993). Za ponazoritev razlik v vsebnosti lignina so v preglednici 3 navedene vsebnosti Klason lignina in KDL (Hatfieldu in sod., 1994). Iz preglednice 3 vidimo

tudi razlike med vrstami, organi in zrelostjo rastlin, na vsebnost pa vplivajo še genotip rastline in dejavniki okolja, kot so temperatura, količina padavin in trajanje sončnih dni (Lewis in sod., 1989).

Sestava in raznolikost lignina

Ferulna, p-kumarna in sinapilna kislina so prekurzorji treh glavnih gradbenih elementov lignina, koniferil, p-kumaril in sinapil alkohola (slika 1) (Lewis in sod., 1989, Whetten in sod., 1998). V ligninu so fenolni obroči teh prekurzorjev imenovani gvajacil (G; 4-hidroksi-3-metoksifenil), p-hidroksifenil (H; 4-hidroksifenil) in siringil (S; 4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil) (slika 6, legenda 4), na njihov delež pa vplivajo dejavniki, kot so rastlinska vrsta, genotip, organ in tkivo ter zrelost rastline, ki je v neposredni povezavi z dejavniki okolja (Chesson in Forsberg, 1988; Lam in sod., 1990; Besle in sod., 1994; Whetten in sod., 1998).



Slika 6. Formula funkcionalnih enot lignina (glej legendo 4).

Figure 6. Formulae of lignin functional units (see Legend 4).

Legenda 4. Poimenovanje funkcionalnih enot lignina

Legend 4. Nomenclature of lignin functional units

Radikali Radicals	IUPAC nomenklatura IUPAC nomenclature	Trivialno ime Trivial name	
		slovensko Slovene	angleško English
R* = propen-1-ol, propenal, propenojska kislina, -CHO, -COOH, ...			
R ₁ , R ₃ = H R ₂ = OH	4-hidroksifenil	p-hidroksifenil (H)	p-hydroxyphenyl (H)
R ₁ = OCH ₃ R ₂ = OH R ₃ = H	4-hidroksi-3-metoksifenil	gvajacil (G)	guaiacyl (G)
R ₁ , R ₃ = OCH ₃ R ₂ = OH	4-hidroksi-3,5-dimetoksifenil	siringil (S)	syringyl (S)

Bacic in sod. (1988) navajajo, da so deleži posameznih fenolnih enot odvisni tudi od rastlinskih hormonov, okužbe z domnevno patogenimi mikroorganizmi ter lege rastlinskih organov in tkiv. Vsi ti dejavniki vplivajo tudi na vrste kemičnih vezi med posameznimi gradbenimi elementi lignina.

Ne glede na variabilnost, ki jo povzročajo naštetih dejavniki v deležu posameznih enot, lahko rastline na splošno delimo na (Van Soest, 1983):

1. rastline, kjer v ligninu prevladuje gvajacil (G). To so predvsem golosemenke (*Gymnospermae*), ki imajo v povprečju okoli 80 odstotkov G;
2. rastline, kjer v ligninu prevladujeta G in siringil (S). To je lignin vseh kritosemenk (*Angiospermae*), z izjemo trav. V povprečju je G okoli 56 odstotkov in S okoli 40 odstotkov;
3. trave (*Poaceae*), kjer so v ligninu prisotni G, S in hidroksifenil (H). G je okoli 60, S okoli 34 in H okoli 22 odstotkov.

Vendar pa ne smemo pozabiti, da lignin golosemenk vsebuje tudi okoli 14 odstotkov H enot in okoli 6 odstotkov S enot, medtem ko lignin kritosemenk vsebuje tudi okoli 4 odstotke H enot (Van Soest, 1983; Barcelo, 1997).

Klasična kemična metoda za določanje vsebnosti posameznih enot v ligninu in njihovega deleža je reakcija z nitrobenzenom. Lapiere in sod. (1991) in Rolando in sod. (1992) so zaradi različnih pomankljivosti te metode, predvsem zaradi velike variabilnosti v vsebnosti enot med paralelkami in nepoznavanja poteka reakcije, razvili novo metodo, imenovano tioacidoliza, to je obdelava z C_2H_5SH/BF_3 , ki večinoma cepi le vezi β -O-4 (Lapiere, 1993; Müsel in sod., 1997). Čeprav je ponovljivost te metode mnogo boljša, pa je število analiziranih vzorcev premajhno, da bi z njo lahko zanesljivo ovrednotili razlike v sestavi lignina med različnimi rastlinskimi družinami in vrstami. Vendar pa nobena od kemičnih metod ni popolna, ker so nekatere vezi v molekuli lignina zelo težko cepljive (Whetten in sod., 1998).

Poleg kemičnih metod pa lahko strukturo lignina določamo tudi z zelo obetavnimi in vedno bolj uporabljanimi fizikalnimi metodami, na primer z UV in IR spektrometrijo ter nuklearno magnetno resonanco (NMR) (Bacic in sod., 1988; Wallace in Fry, 1994; Joseleau in Ruel, 1997).

Vezi med derivati cinamil alkohola v makromolekuli lignina

Med derivati cinamil alkohola pri sintezi makromolekule lignina lahko nastaja več kot 20 različnih kovalentnih vezi. Zaradi treh prekursorjev, velikega števila mest za nastanek vezi in možnosti nastanka velikega števila različnih kovalentnih vezi je praktično nemogoče določiti natančno strukturo lignina (Whetten in sod., 1998). Še najboljše so te vezi preučili pri dveh drevesnih vrstah: pri smreki (*Picea abies*) in brezi (*Betula* sp.), kjer prevladujeta predvsem dva etra, β -O-4 (med 40 in 50 % vseh kovalentnih vezi pri smreki in okoli 60 % pri brezi) in 4-O-5' (3,5 do 8 % pri smreki in 6,5 % pri brezi), manj pa je posameznih neposrednih povezav med ogljikovimi atomi, na primer 5-5' (bifenil; <17 % pri smreki in <5 % pri brezi), β -1 (diarilpropan; <10 % pri smreki in brezi), β -5 (fenikumaran; <12 % pri smreki in okoli 6 % pri brezi). Najverjetneje podobne vezi nastajajo tudi v ligninu krmnih rastlin, le da so deleži posameznih vezi različni. Barcel (1997) navaja, da je v ligninu trav samo okoli 30 odstotkov vezi v tipu β -O-4, medtem ko podatkov za druge krmne rastline v strokovni literaturi ni zaslediti.

Dolgo časa je veljalo prepričanje, da lignin polimerizira popolnoma naključno in da so jedra lignifikacije razporejena naključno po celični steni. Nasprotno pa Terashima in sod. (1993) in Houtman in Atalla (1995) trdijo, da je proces lignifikacije natančno voden. Ker lignina v medceličnih prostorih ni, ti avtorji menijo, da je pričetek lignifikacije možen samo v tesni povezavi s specifičnimi strukturnimi ogljikovimi hidrati. Še več, dokazali so, da posamezni prekursorji lignina lahko tvorijo vezi samo s točno določenimi strukturnimi ogljikovimi hidrati. Obstoje tako selektivnih interakcij predstavlja pomembno osnovo za razumevanje prostorske zgradbe lignina (Jung in Deetz, 1993; Terashima in sod., 1993). Lignifikacija se pri večini tkiv prične v primordijalni in/ali v primarni celični steni in se šele kasneje razširi na sekundarno celično steno. Izjema je ksilem, kjer se lignifikacija prične šele v sekundarni celični steni (McCann, 1997). Ravno nasprotno pa Vallet in sod. (1996) navajajo, da se v ksilemu lucerne

(*Medicago sativa*) lignifikacija prične v primarni celični steni, lignifikacija sklerenhimskih celic pa v sekundarni celični steni.

Običajno se lignin začne nalagati predvsem v kotih primordijalne in/ali primarne celične stene, nalaganje pa poteka sočasno s prenehanjem sinteze pektina ter pričetkom sinteze S₁ sloja sekundarne celične stene. V tem obdobju lignifikacije lignin nastaja predvsem iz p-kumaril alkohola (H enote). Za nastanek naslednjega (S₂) sloja sekundarne celične stene je značilno nalaganje celuloznih vlaken in ksilanov, pri tem pa nastaja lignin, v katerem prevladujejo G enote, iz koniferil alkohola. Temu obdobju sledi še tretje, zadnje obdobje lignifikacije, za katero je značilen nastanek S₃ sloja sekundarne celične stene in lignina pretežno iz sinapil alkohola (S enot). Takšna porazdelitev fenolnih enot pa ne vpliva samo na kemično sestavo lignina, temveč tudi na njegovo strukturo. Vse tri skupine lahko tvorijo etre in vezi med ogljikovimi atomi z α , β in γ ogljikovimi atomi propena, medtem ko je možnost nastanka vezi na samem fenolnem obroču odvisna od vsakega posameznega prekursorja. H enota lahko tvori vezi s hidroksi skupino na C-4 ogljikovem atomu, kot tudi z atomoma C-3 in C-5. Za razliko od H enote pa G in S enoti ne moreta tvoriti vezi na fenolnem C-3 atomu, slednja pa niti na C-5 atomu ne, ker je na ta mesta vezana metoksi skupina (H₃CO-). Zato je lignin, v katerem prevladuje H skupina, za razliko od tistega, kjer prevladujeta G in S skupini, močno razvejan. Ker metoksi skupine povečujejo intermolekularne razdalje, je lignin v H tipu tudi bolj razvejan, medtem ko imata ostala dva tipa lignina (G in S) bolj odprto strukturo (Jung in Deetz, 1993). Takšna struktura lignina je shematično prikazana na sliki 7.

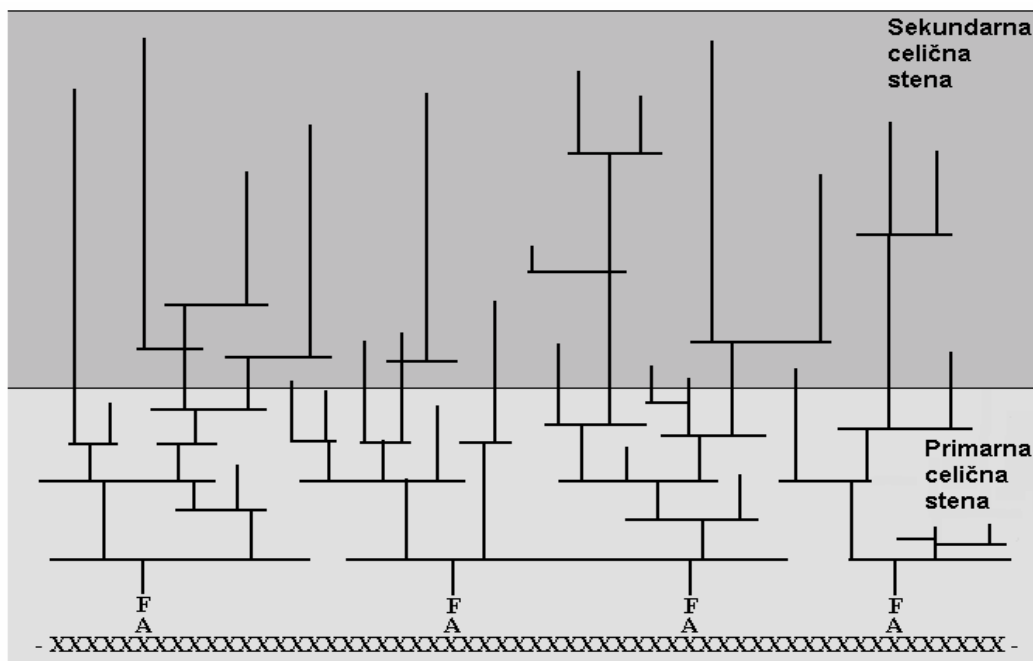
Mutanti z rjavo osrednjo žilo (brown midrib mutants – BMR) in mutanti z lomljivim stebлом (brittle culm mutants)

Posledica nekaterih naravnih ali povzročenih mutacij koruze (*Zea mays*), sirka (*Sorghum bicolor*), prosa (*Pennisetum americanum*) in riža (*Oryza sativa*) so rastline, ki vsebujejo strukturno in kemično spremenjen lignin. Mutanti koruze in sirka, ki imajo rjavo osrednjo žilo (brown midrib; BMR) in mutanti riža, katerih steblo je lomljivo (brittle culm mutants), so pomembni za spoznavanje strukture, sinteze in pomena lignina v rastlinah (Bacic in sod., 1988) ter vpliva lignina na prebavne procese pri živalih (Jung in Deetz, 1993). BMR mutanti sirka vsebujejo primerjavi z normalnimi rastlinami za 5 do 51 odstotkov manj lignina v steblih in za 5 do 25 odstotkov manj v listih. Vsebujejo tudi manj estrov PKK, vsebnost estrov FK pa pri tem ni bistveno spremenjena. Za lignin BMR mutantov je značilna prevlada G skupine, kjer še posebej izstopa povečana količina 5-hidroksi gvajacila. To kaže na moteno sintezo SK iz njenega intermediarnega produkta 4,5-dihidroksi-3-metoksicimetne kisline. Zaradi prej opisanih lastnosti posameznih skupin pri nastanku vezi in strukture je lignin BMR mutantov zelo razvejan, njegova porazdelitev pa omejena predvsem na primordijalno in primarno celično steno (Jung in Deetz, 1993).

Vezi med ligninom in polimeri celične stene

Nastanek estrov (s PKK; sl. 3d) in etrov (s PKK in FK; sl. 3e,f) med ligninom in derivati cimetne kisline, zlasti PKK in FK, smo v tem sestavku že omenili. Scalbert in sod. (1985), Fry (1986) in Ralph in sod. (1995) navajajo, da lahko derivati cimetne kisline, ki tvorijo estre s strukturnimi ogljikovimi hidrati, tvorijo tudi etre z ligninom. To pomeni, da med posameznimi polimeri nastajajo mostovi iz derivatov cimetne kisline (sl. 3f). Iiyama in sod. (1994) trdijo, da FK, ki tvori etre z ligninom tvori tudi estre s strukturnimi ogljikovimi hidrati. Na ta način pa sta lahko povezani tudi dve makromolekuli lignina. Dosedanje raziskave kažejo, da PKK ne more povezovati lignina in strukturnih ogljikovih hidratov na podoben način. Med PKK in polisaharidi

nastajajo samo estri (sl. 3c), medtem ko z ligninom tvori bodisi estre (sl. 3d) bodisi etre (sl. 3e) (Jung in Deetz, 1993; Iiyama in sod., 1994; Ishii, 1997).



Slika 7. Shematski prikaz strukture lignina v primarni in sekundarni celični steni. X, ksilan; A, arabinoza, F, ferulna kislina. Lignin v celični steni predstavljajo ravne črte, ki ponazarjajo siringilne enote lignina, medtem ko so na mestih razvejitev gvajacijalne enote (Jung in Deetz, 1993)

Figure 7. Schematic representation of lignin structure in primary and secondary cell walls. X, xylan; A, arabinose; F, ferulic acid. Lignin in cell wall is represented by the straight lines where lignin is composed of syringyl units, while branching points are composed of guaiacyl units (Jung and Deetz, 1993)

Omenili smo že, da imajo estri med FK in strukturnimi ogljikovimi hidrati pomembno vlogo v dodatnem utrjevanju strukture celične stene, poleg tega pa v primordijalni in primarni celični steni najverjetneje služijo tudi kot jedra lignifikacije (Whetten in sod., 1998). Nasprotno pa sta Houtman in Atalla (1995) s pomočjo računalniške simulacije ugotovila, da se monomeri in oligomeri derivatov cimetne kisline lahko adsorbirajo na površino celuloznih vlaken, kar predstavlja še eno od možnih jeder lignifikacije.

Med ligninom in strukturnimi ogljikovimi hidrati obstajata vsaj dve različni neposredni kovalentni vezi. Na α ali γ C atomih propilne skupine lahko nastane neposredni ester (slika 3a) z uronsko kislino glukuronoksilanov, medtem ko se estri z ramnogalakturonani delajo med uronskimi kislinami in hidroksi skupinami derivatov cimetyl alkohola, ki ležijo na površini lignina (Iiyama in sod. 1994). Te vezi se pri obdelavi z bazičnimi reagenti cepijo, za dodaten dokaz obstoja pa služi redukcija s kalijevim tetrahidridoboratom (III) (KBH_4) in oksidacija z 2,3-dikloro-5,6-diciano-p-benzokinonom. Druga vrsta neposredne povezave med ligninom in strukturnimi ogljikovimi hidrati je nastanek etrov med radikali glukoze in manoze in hidroksi skupinami derivatov cimetyl alkohola, ležečimi na površini makromolekule lignina (slika 3b). Etri s primarnimi alkoholi se razkrojijo v bazičnih reagentih, medtem ko so etri z drugimi hidroksi skupinami v bazičnih reagentih obstojni (Iiyama in sod., 1994). To so najverjetneje najpogostejše vezi med ligninom in strukturnimi ogljikovimi hidrati.

Glikozidacija lignina z monosaharidi in manjšimi oligosaharidi predstavlja še eno od možnih povezav med ligninom in ogljikovimi hidrati (Bacic in sod., 1988). Iiyama in sod. (1994) menijo, da to ni prava kovalentna vez med polimeri celične stene, saj povezuje lignin samo z mono- in oligosaharidi ne pa s polisaharidi.

Bacic in sod. (1988) in Iiyama in sod. (1994) poročajo še o vezeh med ligninom in beljakovinami celične stene, vendar pa narava in možne poti biosinteze teh vezi še niso raziskane. Te beljakovine, ki vsebujejo povečane deleže hidroksiprolina (*hydroxyproline-rich proteins*; HRGPs), glicina (*glycine-rich proteins*; GRPs) in prolina (*proline-rich proteins*, PRPs), so najverjetneje vpletene tudi v procese polimerizacije lignina, saj se pogosto omenjajo kot možna jedra lignifikacije (Showalter, 1993; Müsel in sod, 1997; Cassab, 1998).

VIRI

- Akin, D.E./ Chesson, A. Lignification as the major factor limiting forage feeding value especially in warm conditions. XVI International Grassland Congress, Nice, France, 1989, 1753-1760.
- Akin, D.E./ Morrison, W.H. III/ Himmelsbach, D.S. Characterization of digestion residues of alfalfa and orchardgrass leaves by microscopic, spectroscopic and chemical analysis. J. Sci. Food Agric., 63(1993), 339-347.
- Amjed, M./ Jung, H.G./ Donker, J.D. Effect of alkaline hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugarcane residues and wheat straw. J. Anim. Sci., 70(1992), 2877-2884.
- Bacic, A./ Harris, P.J./ Stone, B.A. Structure and function of plant cell walls. The Biochemistry of Plants, 14(1988), 297-371.
- Barcelo, A.R. Lignification in plant cell walls. Internat. Rev. Cytol., 176(1997), 87-132.
- Besle, J.-M./ Cornu, A./ Jouany, J.-P. Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. J. Sci. Food Agric., 64(1994), 171-190.
- Bittner, A.S. Phenolic acid composition of alkali soluble fractions from maturing alfalfa. J. Anim. Sci., 59(1984)Suppl. 1, 303.
- Cassab, G.I. Plant cell wall proteins. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol., 49(1998), 281-309.
- Chesson, A./ Forsberg, C.W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. The rumen microbial ecosystem (ur.: Hobson, P.N.). London, New York, Elsevier Appl. Sci., 1988, 251-284.
- Chesson, A. Mechanistic models of forage cell wall degradation. V: Forage cell wall structure and digestibility (ur.: Jung, H.G. in sod.). Madison, Am. Soc. Agron., 1993, 347-376.
- Cherney, J.H./ Anliker, K.S./ Albrecht, K.A./ Wood, K.V. Soluble phenolic monomers in forage crops. J. Agric. Food Chem., 37(1989), 345-350.
- Eraso, F./ Hartley, R.D. Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant cell walls - possible factors influencing wall biodegradability. J. Sci. Food Agric., 51(1990), 163-170.
- Fineran, B.A. Cyto- and histochemical demonstration of lignins in plant cell walls: an evaluation of the chlorine water/ethanolamine-silver nitrate method of Coppick and Fowler. Protoplasma, 198(1997), 186-201.
- Flint, S.I./ Camire, M.E. Recovery of lignin during non starch polysaccharide analysis. Cereal Chem., 69(1992), 444-447.
- Ford, C.W./ Elliott, R. Biodegradability of mature grass cell walls in relation to chemical composition and rumen microbial activity. J. Agric. Sci., Cambridge, 108(1987), 201-209.
- Ford, C.W./ Hartley, R.D. Cyclodimers of p-coumaric and ferulic acids in the cell walls of tropical grasses. J. Sci. Food Agric., 50(1990), 29-43.
- Fry, S.C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Annu. Rev. Plant Physiol., 37(1986), 165-186.
- Giger, S. Revue sur les méthodes de dosage de la lignine utilisées en alimentation animale. Ann. Zootech., 34(1985), 85-122.
- Grabber, J.H./ Hatfield, R.D./ Ralph, J./ Zon, J./ Amrhein, N. Ferulate cross-linking in cell walls isolated from maize cell suspensions. Phytochem., 40(1995)4, 1077-1082.
- Hagerman, A.E./ Butler, L.G. Tannins and lignins. V: Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites (ur.: Rosenthal, G.A./ Berenbaum, M.R.). San Diego, Academic Press, 1991, 355-388.
- Hartley, R.D./ Ford, C.W. Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. V: Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation (ur.: Lewis, N.G./ Paice, M.G.). Washington, Am. Chem. Assoc., 1989, 137-145.
- Hartley, R.D./ Morrison, W.H./ Himmelsbach, D.S./ Borneman, W.S. Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. Phytochem., 29(1990), 3705-3709.

- Hatfield, R.D./ Jung, H.G./ Ralph, J./ Buxton, D.R./ Weimer, P.J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.*, 65(1994), 51-58.
- He, L.-F./ Terashima, N. Formation and structure of lignin in monocotyledones. IV. Deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugarcane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectroscopy. *Holzforschung*, 45(1991), 191-198.
- Hosny, M./ Rosazza, J.P.N. Structures of ferulic acid glycoside esters in corn hulls. *J. Nat. Prod.*, 60(1997), 219-222.
- Houtman, C.J./ Atalla, R.H. Cellulose-lignin interactions. *Plant Physiol.*, 107(1995), 977-984.
- Iiyama, K./ Lam, T.B.T./ Stone, B.A. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin. *Phytochem.*, 29(1990), 733-737.
- Iiyama, K./ Lam, T.B.T./ Stone, B.A. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.*, 104(1994), 315-320.
- Ishii, T. Structure and function of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.*, 127(1997), 111-127.
- IUPAC nomenklatura organskih spojin. Sekcije A,B,C, D. Državna založba Slovenije, 1984, 454 s.
- Joseleau, J.-P./ Ruel, K. Study of lignification by noninvasive techniques in growing maize internodes. *Plant Physiol.*, 114(1997), 1123-1133.
- Jung, H.G./ Fahey, G.C. Jr./ Merchen, N.R. Effects of ruminant digestion and metabolism on phenolic monomers of forages. *Br. J. Nutr.*, 50(1983), 637-651.
- Jung, H.G./ Aman, P./ Graham, H. Profile of fibre composition in lucerne (*Medicago sativa*) and rumen digesta as influenced by particle size and time after feeding. *J. Sci. Food Agric.*, 51(1990), 411-416.
- Jung, H.G./ Valdez, F.R./ Abad, A.R./ Blanchette, R.A./ Hatfield, R.D. Effect of white rot basidiomycetes on chemical composition and in vitro digestibility of oat straw and alfalfa stems. *J. Anim. Sci.*, 70(1992), 1928-1935.
- Jung, H.G./ Casler, M.D. Relationship of lignin and esterified phenolics to fermentation of smooth bromegrass fibre. *Anim. Feed Sci Technol.*, 32(1991), 63-68.
- Jung, H.G./ Vogel, K.P. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum*) and big bluestem (*Andropogon gerardii*) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. *J. Sci. Food Agric.*, 59(1992), 169-176.
- Jung, H.G./ Deetz, D.A. Cell wall lignification and degradability. V: Forage cell wall structure and digestibility (ur.: Jung, H.G. in sod.). Madison, Am. Soc. Agron., 1993, 315-346.
- Jung, H.G./ Shalita-Jones, S.C. Variation in the extractability of esterified p-coumaric and ferulic acid from forage cell walls. *J. Agric. Food Chem.*, 38(1990), 397-402.
- Jung, H.G./ Smith, R.R./ Endres, C.S. Cell wall composition and degradability of stem tissue from lucerne divergently selected for lignin and in vitro dry matter disappearance. *Grass Forage Sci.*, 49(1994), 295-304.
- Kondo, T./ Ohshita, T./ Kyuma, T. Ester- and ether- linked phenolic acids in orchardgrass (*Dactylis glomerata*) and their digestion from cell walls when fed to sheep. *Can. J. Plant Sci.*, 71(1991), 1179-1182.
- Lam, T.B.T./ Iiyama, K./ Stone, B.A. Primary and secondary walls of grasses and other forage plants: Taxonomic and structural considerations. V: Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants (ur.: Akin, D.E. in sod.). New York, Elsevier, 1990, 43-69.
- Lapierre, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. V: Forage cell wall structure and digestibility (ur.: Jung, H.G. in sod.). Madison, Am. Soc. Agron., 1993, 133-166.
- Lapierre, C./ Pollet, B./ Monties, B. Thioacidolysis of spruce lignin: GC-MS analysis of the main dimers recovered after raney nickel desulphuration. *Holzforschung*, 45(1991), 61-68.
- Lavrenčič, A. 1994. Neobjavljeni rezultati.
- Lavrenčič, A./ Stefanon, B./ Susmel, P. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Anim. Sci.*, 64(1997): 423-431.
- Lewis, N.G./ Razal, R.A./ Yamamoto, E./ Bokelman, G.H./ Wooten, J.B. ¹³C specific labeling of lignin in intact plants. V: Plant cell wall polymers (ur.: Lewis, N.G./ Paice, M.G.). ACS Symposium Series 399, Washington, Am. Chem Assoc., 1989, 169-181.
- Lowry, J.B./ Conlan, L.L./ Schlink, A.C./ McSweeney, C.S. Acid dispersible lignin in tropical grasses. *J. Sci. Food Agric.*, 65(1994), 41-49.
- McCann, M. Tracheary element formation: building up to a dead end. *Trends Plant Sci.*, 2(1997)9, 333-338.
- Mueller-Harvey, I./ Hartley, R.D./ Harris, P.J./ Curzon, E.H. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.*, 48(1986), 71-85.
- Müsel, G./ Schindler, T./ Bergfeld, R./ Ruel, K./ Jaquet, G./ Lapierre, C./ Speth, V./ Schopfer, P. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta*, 201(1997), 146-159.
- Niklas, K.J. The cellular mechanism of plants. *Am. Sci.*, 77(1989), 344-349.
- Pena, M.J./ Sanchez, M./ Zarra, I./ Revilla, G. Sequential extraction of dehydrodiferulates shows heterogeneity in their degree of association with *Zea mays* coleoptile cell walls. *Phytochem. Analysis*, 9(1998), 141-144.
- Ralph, J./ Quideau, S./ Grabber, J./ Hatfield, R.D. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 3485-3498.

- Ralph, J./ Grabber, J.H./ Hatfield, R.D. Lignin-ferulate cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.*, 275(1995), 167-178.
- Reeves, J.B. III. Lignin composition and in vitro digestibility of feeds. *J. Anim. Sci.*, 60(1985), 316-322.
- Reeves, J.B. III. Chemical studies on the composition of fiber fractions and lignin determination residues. *J. Dairy Sci.*, 76(1993), 120-128.
- Rolando, C./ Lapierre, C./ Monties, B. Thioacidolysis. V: Methods in lignin chemistry (ur.: Lin, S.Y./ Dence, C.W.). Berlin, Springer Verlag, 1992, 334-349.
- Scalbert, A./ Monties, B./ Lallemand, J.Y./ Guittet, E./ Rolando, C. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochem.*, 24(1985), 1359-1362.
- Showalter, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, 5(1993), 9-23.
- Terashima, N./ Fukushima, K./ He, L.-F./ Takabe, K. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. V: Forage cell wall structure and digestibility (ur.: Jung, H.G. in sod.). Madison, Am. Soc. Agron., 1993, 247-270.
- Vallet, C./ Chabbert, B./ Czaninski, Y./ Monties, B. Histochemistry of lignin deposition during sclerenchyma differentiation in alfalfa stems. *Annals Botany*, 78(1996), 625-632.
- Van Soest, P.J. Refractory and inhibitory substances. V: Nutritional ecology of the ruminant. Corvallis, O & B Books, 1983, 118-138.
- Van Soest, P.J./ Wine, R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *Journal AOAC*, 50(1967), 50-55
- Wallace, G./ Fry, S.C. Phenolic components of the plant cell wall. *International Rev. Cytol.*, 151(1994), 229- 267.
- Wende, G./ Fry, S.C. 2-O- β -D-xylopiranosyl-(5-O-feruloyl)-L-arabinose, a widespread component of grass cell walls. *Phytochem.*, 44(1997)6, 1019-1030.
- Whetton, R.W./ MacKay, J.J./ Sederoff, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49(1998), 585-609.
- Wilson, J.R. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. *J. Agric. Sci., Cambridge*, 122(1994), 173-182.
- Yamamoto, E./ Bokelman, G.H./ Lewis, N.G. Phenylpropanoid metabolism in cell walls - an overview. V: Plant cell wall polymers (ur.: Lewis, N.G./ Paice, M.G.). Washington, Am. Chem. Soc., 1989, 68-88.