

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Alenka ŠIFRAR

**PROTEOLIZA ŽITNIH PROTEINOV MED
SPONTANO FERMENTACIJO KISLEGA TESTA IZ
RAZLIČNIH VRST MOKE**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Alenka ŠIFRAR

**PROTEOLIZA ŽITNIH PROTEINOV MED SPONTANO
FERMENTACIJO KISLEGA TESTA IZ RAZLIČNIH VRST MOKE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij- 2. stopnja

**PROTEOLYSIS OF CEREAL PROTEINS DURING SPONTANEOUS
SOURDOUGH FERMENTATION FROM DIFFERENT TYPES OF
FLOUR**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2017

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

Študijska komisija je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Polono Jamnik, za somentorja prof. dr. Tomaža Požrla in za recenzenta prof. dr. Blaža Cigića.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof.dr. Mojca Narat
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Somentor: prof. dr. Tomaž Požrl
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzent: prof.dr. Blaž Cigić
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 2.2.2017

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

Alenka Šifrar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 664.641/.642:602.3:579.864:579.67(043.2)
KG bioaktivni peptidi/ antioksidativni peptidi/ žitni proteini/ kislo testo/
mlečnokislinska fermentacija/ antioksidativna učinkovitost/ kvasovka/
Saccharomyces cerevisiae
AV ŠIFRAR, Alenka, dipl. bioteh. (UN)
SA JAMNIK, Polona (mentorica)/ POŽRL, Tomaž (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrski
študijski program 2. stopnje Biotehnologija
LI 2017
IN PROTEOLIZA ŽITNIH PROTEINOV MED SPONTANO FERMENTACIJO
KISLEGA TESTA IZ RAZLIČNIH VRST MOKE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XII, 59, [20] str., 18 pregl., 17 sl., 8 pril., 77 vir.
II sl
JI sl/en
AI V okviru magistrske naloge smo preučevali proteolitično razgradnjo proteinov
različnih vrst mok (amarantova, kamutova (khorasan), ovsena, ječmenova, prosena,
konopljina in pšenična moka tip 500) med fermentacijo kislega testa (KT). V prvem
sklopu raziskovalnega dela smo iz KT, pripravljenih s spontano fermentacijo
različnih vrst mok, izolirali mlečnokislinske bakterije (MKB) avtohtone mikroflore,
ki so pripadale vrstam *Weissella confusa* in *Pediococcus pentosaceus*. Z izoliranim
avtohtonim sevom smo inokulirali mešanice posamezne vrste moke in vode in
spremljali proteolitično aktivnost kislega testa. Ta se je s časom fermentacije
povečala. Po 24-urni fermentaciji je bila v primerjavi s časom 0 h najvišja v primeru
amarantove in ovsene moke. Celokupno hidrolizo žitnih proteinov smo nato
primerjali s proteolitično aktivnostjo predhodno zakisanih mešanic moke in vode in
tako ocenili dejanski prispevek MKB k razgradnji žitnih proteinov, ki je bil največji
v primeru amarantovega KT, sledilo je kislo testo iz ovsene moke. Frakcijam
vodnih ekstraktov (FVE) KT smo v nadalnjem koraku preverili antioksidativno
učinkovitost, pri čemer smo kot modelni organizem uporabili kvasovko vrste
Saccharomyces cerevisiae. Naraščajoča koncentracija amino skupin v FVE kislih
test tekom fermentacije se ni pokazala v časovno odvisnem znižanju oksidacije v
celicah kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Največje in hkrati statistično
značilno znižanje znotrajcelične oksidacije glede na kontolo smo določili v primeru
FVE mešanic amarantove moke in vode, sledijo FVE mešanice kamutove moke in
vode in FVE mešanice prosene moke in vode. V primeru kamutove in prosene
moke se je znižana oksidacija v celicah kvasovk vzdrževala tudi v primeru tretiranj
z vzorci kasnejših faz fermentacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 664.641/.642:602.3:579.864:579.67(043.2)
CX Bioactive peptides/antioxidative peptides/cereal proteins/sourdough /lactic acid fermentation/ antioxidant effectiveness / yeast/ *Saccharomyces cerevisiae*
AU ŠIFRAR, Alenka
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/ POŽRL, Tomaž (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2017
TI PROTEOLYSIS OF CEREAL PROTEINS DURING SPONTANEOUS SOURDOUGH FERMENTATION FROM DIFFERENT TYPES OF FLOUR
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XII, 59, [20] p., 18 tab., 17 fig., 8 ann., 77 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of the M. Sc Thesis was to determine proteolytic degradation of proteins during fermentation of sourdoughs made from various flours (amaranth, kamut (khorosan), oat, barley, millet, hemp and wheat flour type 500). In the first part we isolated autochthonous lactic acid bacteria from sourdoughs. The isolates were identified as *Weissella confusa* and *Pediococcus pentosaceus* and were used as inoculum to start the lactic acid fermentation of flour and water mixtures. During fermentation (0 h, 12 h, and 24 h) proteolytic activity of sourdough was measured. It increased in a time dependent mode. At 24 h proteolytic activity of amaranth and oat flour was the highest in comparison with non-fermented flour and water mixture (0 h). In the next step proteolytic activity of fermented sourdoughs and proteolytic activity of doughs, acidified in advance, were compared to estimate microbial contribution to the total proteolytic activity of fermented sordoughs. It was the highest in the case of amaranth flour, followed by sourdough made from oat flour. With proteolytic degradation of proteins probability of bioactive compounds (e.g. antioxidative peptide) production increases. Consequently we measured antioxidant effectiveness of sourdoughs water soluble extracts fractions using *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. Despite that increased amino groups content was proved, we did not notice a decrease in intracellular oxidation according to time of fermentation. After exposure of yeasts to sourdough water-soluble extracts fractions the highest decrease in intracellular oxidation compared to control was determined in the case of amaranth flour and water mixture (0 h), followed by kamut flour and water mixture and mixture of millet flour and water. In the case of kamut and millet flour the decreased intracellular oxidation was maintained also at cells treatment with samples of later stages of fermentation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI MAGISTRSKE NALOGE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ŽITA IN NEPRAVA ŽITA (PSEVDOŽITA)	3
2.1.1 Prava žita	3
2.1.2 Neprava žita (psevdožita)	3
2.2 ŽITNI PROTEINI	4
2.2.1 Sestava žitnega zrna	4
2.2.2 Delitev žitnih proteinov	5
2.2.2.1 Rezervni proteini	5
2.2.3 Pregled proteinske sestave zrn obravnavanih žit	7
2.2.3.1 Ječmen	7
2.2.3.2 Oves	8
2.2.3.3 Proso	8
2.2.3.4 Amarant	9
2.2.3.5 Khorasan pšenica (Kamut)	9
2.2.3.6 Konoplja	9
2.2.3.7 Pšenica	9
2.3 KISLO TESTO	10
2.3.1 Mlečnokislinske bakterije v kislem testu	10
2.3.2 Proteolitični sistem mlečnokislinskih bakterij	12
2.3.2.1 Membransko vezane proteinaze (ang. cell envelope associated proteinase activity)	12

2.3.2.2	Transportni sistemi za peptide	13
2.3.2.3	Znotrajcelične peptidaze	14
2.3.3	Akumulacija bioaktivnih peptidov tekom mlečnokislinske fermentacije	14
2.4	BIOAKTIVNI PEPTIDI	14
2.4.1	Definicija	14
2.4.2	Lastnosti bioaktivnih peptidov in njihovo delovanje	15
2.4.3	Delovanje antioksidativnih bioaktivnih peptidov	16
2.4.3.1	Oksidativni stres	16
2.4.4	Možnosti uporabe antioksidativnih bioaktivnih peptidov	17
3	MATERIALI IN METODE	19
3.1	POTEK DELA	19
3.1.1	Potek eksperimenta- shematski prikaz	19
3.2	MATERIALI	20
3.2.1	Moke kot vir žitnih proteinov	20
3.2.2	Avtohtone mlečnokislinske bakterije	20
3.2.3	Kvasovka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.2.4	Gojišča	21
3.2.4.1	Trdno gojišče MRS z dodatkom maltoze in cikloheksamida - mMRSAC	21
3.2.4.2	Tekoče gojišče MRS z dodatkom maltoze - mMRSB	21
3.2.4.3	Trdno gojišče YEPD	22
3.2.4.4	Tekoče gojišče YEPD	22
3.2.4.5	Gojišče za določanje proteolitične aktivnosti avtohtonih mlečnokislinskih bakterij	22
3.2.5	Raztopine in reagenti	23
3.2.5.1	Fiziološka raztopina	23
3.2.5.2	PBS pufer	23
3.2.5.3	50 mM Kalijev fosfatni pufer (pH 7,8)	24
3.2.5.4	100 mM Natrijev tetraboratni pufer ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	24
3.2.5.5	Shranjevanje izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij	25
3.2.5.6	Katalazni test	25
3.2.5.7	Določanje hidrolize žitnih proteinov tekom mlečnokislinske fermentacije	25
3.2.6	Aparature in naprave	26
3.2.6.1	Priprava gojišč, raztopin in reagentov in steklovine	26
3.2.6.2	Mlečnokislinska fermentacija kislih test	26
3.2.6.3	Izolacija in shranjevanje avtohtonih mlečnokislinskih bakterij	26

3.3.	METODE DELA	28
3.3.1	Izolacija, identifikacija, namnoževanje in shranjevanje avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij iz kislega testa po spontani fermentaciji	28
3.3.1.1	Izolacija avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij kislega testa po spontani fermentaciji	28
3.3.1.2	Katalazni test	28
3.3.1.3	Namnoževanje in shranjevanje avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij	28
3.3.1.4	Določanje proteolitične aktivnosti izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij	29
3.3.2	Mlečnokislinska fermentacija mešanice moke in vode z inokulirano kulturo avtohtone mlečnokislinske bakterije	29
3.3.2.1	Priprava inokuluma avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij	29
3.3.2.2	Mlečnokislinska fermentacija mešanice moke in vode	30
3.3.2.3	Inkubacija predhodno zakisane mešanice moke in vode	30
3.3.3	Merjenje vrednosti pH kislih test	30
3.3.4	Določanje hidrolize žitnih proteinov med mlečnokislinsko fermentacijo kislega testa	30
3.3.4.1	Ekstrakcija vodotopnih proteinov, peptidov in aminokislinskih ostankov iz vzorcev kislih test	30
3.3.4.2	Določanje hidrolize žitnih proteinov z metodo OPA	31
3.3.5	Določanje antioksidativne učinkovitosti frakcij vodnih ekstraktov kislih test	32
3.3.6.1	Povprečna vrednost	32
3.3.6.2	Standardni odklon	33
3.3.6.4	Duncan test	33
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	34
4.1	IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA SEVOV MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ AVTOHTONE MIKROFLORE KISLEGA TESTA	34
4.2	HIDROLIZA ŽITNIH PROTEINOV TEKOM MLEČNOKISLINSKE FERMENTACIJE KISLIH TEST V ODVISNOSTI OD ČASA	37
4.3	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI VODNIH EKSTRAKTOV KISLIH TEST V CELICAH KVASOVK VRSTE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
5	SKLEPI	52
6	POVZETEK	53
7	VIRI	54
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste mok uporabljeni v eksperimentih	20
Preglednica 2: Sestava nastavka za spontano mlečnokislinsko fermentacijo	20
Preglednica 3: Sestava trdnega gojišča MRS z dodatkom maltoze	21
Preglednica 4: Sestava tekočega gojišča MRS z dodatkom maltoze	21
Preglednica 5: Sestava trdnega gojišča YEPD	22
Preglednica 6: Sestava tekočega gojišča YEPD	22
Preglednica 7: Priprava hrnilnega agarja	22
Preglednica 8: Priprava posnetega mleka v prahu	23
Preglednica 9: Razmerje komponent v gojišču za določanje proteolitične aktivnosti avtohtonih sevov mlečno-kislinskih bakterij	23
Preglednica 10: Priprava fiziološke raztopine	23
Preglednica 11: Sestava PBS pufra	24
Preglednica 12: Sestava 50mM K ₂ HPO ₄	24
Preglednica 13: Sestava 50 mM KH ₂ PO ₄	24
Preglednica 14: Sestava 100 mM Na-tetraboratnega pufra	24
Preglednica 15: Zamrzovanje avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij	25
Preglednica 16: Priprava reagenta OPA	25
Preglednica 17: Karakteristike izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij	34
Preglednica 18: Sevi mlečnokislinskih bakterij identificirani s sekvenciranjem 16S rDNA	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Zrno ječmena v prerezu	4
Slika 2: Poenostavljen prikaz proteolitičnega sistema pri mlečnokislinskih bakterijah	13
Slika 3: Celokupni relativni prirast amino skupin pri amarantovi moki.	38
Slika 4: Celokupni relativni prirast amino skupin pri ječmenovi moki.	39
Slika 5: Celokupni relativni prirast amino skupin pri kamutovi moki.	39
Slika 6: Celokupni relativni prirast amino skupin pri konopljini moki.	40
Slika 7: Celokupni relativni prirast amino skupin pri ovseni moki.	40
Slika 8: Celokupni relativni prirast amino skupin pri proseni moki.	41
Slika 9: Celokupni relativni prirast amino skupin pri pšenični moki tip 500.	41
Slika 10: Primerjava rezultatov spremeljanja celokupne hidrolize proteinov z rezultati hidrolize proteinov predhodno zakisanih mešanic moke in vode po 24-urni inkubaciji.	44
Slika 11: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa amarantove moke (0 h, 12 h in 24 h).	46
Slika 12: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa ječmenove moke (0 h, 12 h in 24 h).	46
Slika 13: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa ovsene moke (0 h, 12 h in 24 h).	47
Slika 14: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa kamutove moke (0 h, 12 h in 24 h).	47
Slika 15: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa konopljine moke (0 h, 12 h in 24 h).	48
Slika 16: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa prosene moke (0 h, 12 h in 24 h).	48
Slika 17: Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa pšenične moke tip 500 (0 h, 12 h in 24 h).	49

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Identifikacija avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij kislih test s sekvenciranjem 16S rDNA

PRILOGA B: Rezultati določanja celokupne hidrolize proteinov mok tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test v odvisnosti od časa

PRILOGA C: Izraženost rezultatov spremljanja hidrolize žitnih proteinov tekom mlečno kislinske fermentacije kislega testa

PRILOGA D: Umeritvena krivulja: Fluorescenza (F) v odvisnosti od koncentracije govejega serumskega albumina BSA

PRILOGA E: Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test

PRILOGA F: Določanje antioksidativne učinkovitosti frakcij vodnih ekstraktov kislih test v celicah kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*

PRILOGA G: Izraženost rezultatov pri določanju znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 po izpostavitvi frakcijam vodnih ekstraktov kislih test

PRILOGA H: Proteoliza žitnih proteinov predhodno zakisanih kislih test v odvisnosti od časa

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A _□	Absorbanca
AL	Aleuronska plast (ang. Aleuron Layer)
BLAST	Algoritem za primerjavo zaporedij in iskanje optimalnih lokalnih poravnava (ang. The Basic Local Alignment Search Tool)
BSA	Goveji serumski albumin (ang. Bovine Serum Albumin)
CEP	Membransko vezana proteinaza (ang. Cell Envelope Proteinase)
CSE	škrobní meljak - endosperm (ang. Central Starch Endosperm)
DCF	Dikloroflorescein (ang. diclorofluorescein)
ddH ₂ O	Bidestilirana voda
dH ₂ O	Destilirana voda
FVE	Frakcija vodnega ekstrakta
GRAS	Splošno prepoznano kot varno (ang. Generally Recognized As Safe).
H ₂ DCF	2',7'-diklorodihidrofluorescein
H ₂ DCFDA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
H ₂ O ₂	Vodikov peroksid
KDa	Kilodalton
KT	Kislo testo
MKB	Mlečnokislinske bakterije
MKF	Mlečnokislinska fermentacija
mMRSAc	de Man Rogosa in Sharpe bakterijsko gojišče (MRS, agar), z dodatkom maltoze in cikloheksamida
mMRSB	Tekoče de Man Rogosa in Sharpe bakterijsko gojišče (MRS, maltoza) z dodatkom maltoze

NCBI	Podatkovna zbirka, Nacionalni center za biotehnološko informacijo (ang. The National Center for Biotechnology Information)
obr./min	Obrati na minuto
OPA	Derivatizacijski reagent, za določanje primarnih biogenih aminov, ki ob prisotnosti 2-merkaptoetanola in boratnega pufra s pH vrednostjo 10,5 biogene amine pretvori v fluorescentne derivate.
Opp	Peptidni transporter pri mlečnokislinskih bakterijah
PCR	Verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti. Med ROS uvrščamo hidroksilne radikale ($\cdot\text{OH}$), peroksidne radikale ($\cdot\text{OOR}$), superoksidni anion (O_2^-) in peroksinitrite (ONOO^-).
SAL	Mejna plast celic v žitnem zrnu, ki škrobni meljak ločuje od aleuronske plasti (ang. Sub-Aleurone Layer)
SD	Standradni odklon (ang. Standard Deviation)
VE	Vodni ekstrakt
YEPD	Gojišče (glukoza, kvasni ekstrakt, pepton, agar)
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Raziskovalno delo temelji na uporabi spontanega fermentacijskega procesa, na osnovi katerega temelji tradicionalna tehnologija priprave kislega testa. Kislo testo je v osnovi mešanica moke in vode, fermentirana z mlečnokislinskimi bakterijami in kvasovkami. Mikroorganizmi predstavljajo avtohtono mikrobno populacijo moke in ostalih surovin, saj pred pričetkom procesa niso izpostavljeni topotni sterilizaciji.

V okvir raziskave smo vključili moke žit (pšenica, proso, oves, ječmen, kamut) in moke ostalih rastlinskih virov (konoplja, amarant). Kemijska sestava moke se razlikuje glede na sestavo žitnih zrn. Odvisna je od okoljskih in genetskih dejavnikov ter načina shranjevanja žita. Pomemben dejavnik za delež in sestavo beljakovin ter maščob sta sezona in sestava tal, izključujoča pa ni niti obdelava rastlinskega vira pred njeno končno uporabo (Cian in sod., 2014).

Tekom fermentacije v celicah avtohtonih mikroorganizmov potekajo različne katabolne reakcije. V magistrskem delu smo svojo pozornost usmerjali v spremljanje proteolitičnih reakcij. Mikroorganizmi tekom teh procesov proteine/peptide razgrajujejo na posamezne aminokisline ali kratka zaporedja aminokiselin. Strukturiranost aminokislinskih verig vpliva na funkcionalnost novonastalih peptidov, ki lahko izzovejo mnogotera pozitivna fiziološka učinkovanja, zato nekatere izmed njih imenujemo bioaktivni peptidi. Za bioaktivne peptide, ki izhajajo iz žitnih proteinov je še zlasti značilno protirakovo, antihipertenzisko, protimikrobno in antioksidativno delovanje (Udenigwe, 2014).

1.2 CILJI MAGISTRSKE NALOGE

Cilji magistrske naloge so bili :

- izolirati avtohtone mlečnokislinske bakterije iz kislih test pridobljenih s spontano fermentacijo različnih mok
- spremljati hidrolizo žitnih proteinov tekom mlečno-kislinske fermentacije kislih test, inokuliranih z izoliranim avtohtonim sevom mlečno kislinskih bakterij
- preveriti antioksidativno učinkovitost vodnih ekstraktov fermentiranih kislih test v celicah kvasovke.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

Uspeli bomo izolirati avtohtone mlečnokislinske bakterije (MKB) iz kislih test različnih vrst moke pridobljenih s spontano fermentacijo.

Akumulacija peptidov/aminokislin se bo večala z daljšim časom fermentacije kislih test. Med vzorci kislih test pripravljenih z različnih vrst mok se bo proteolitična aktivnost kislih test razlikovala.

Vodni ekstrakti kislih test pridobljeni s fermentacijo bodo pokazali antioksidativno učinkovitost v celicah kvasovke. Antioksidativna učinkovitost se bo povečevala glede na čas fermentacije, razlike med antioksidativno učinkovitostjo vodnih ekstraktov pa se bodo pokazale tudi glede na vrsto moke iz katere je pripravljeno kislo testo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŽITA IN NEPRAVA ŽITA (PSEVDOŽITA)

2.1.1 Prava žita

Žita lahko definiramo kot zrna oz. užitna semena trav, ki jih uvrščamo v družino Gramineae (Ortiz-Martinez in sod., 2014). So najpomembnejše, najbolj razširjene in najstarejše kulturne rastline, ki so omogočile stalen vir hrane prej nomadskim ljudstvom (Petauer, 1993). Gojimo jih zaradi visoke hranilne vrednosti žitnih zrn (Ortiz-Martinez in sod., 2014). Zrna omenjenih enokaličnic sestavlja kalček, ki ga obdajata škrobni meljak in semenska ovojnica (Fletcher, 2016). Čeprav so pretežno škrobna živila, vsebujejo dovolj beljakovin in drugih hranil, da omogočajo preživetje ljudem, ki se hranijo izključno z njimi (Petauer, 1993).

Že stoletja jih ljudje po vsem svetu uporabljajo kot surovino za pripravo fermentiranih napitkov in živil, kamor uvrščamo tudi kisla testa, pripravljena z mlečnokislinsko fermentacijo (Coda in sod., 2011). Najpomembnejša žita današnjega časa so pšenica, riž in koruza, v večjem deležu pa v prehrano vključujemo tudi oves, ječmen, rž, tritikalo, soržico, proso in ajdo (Ortiz-Martinez in sod., 2014).

Funkcionalna vrednost posameznega žita temelji na kakovosti in kvantiteti proteinov, škroba in lipidov v žitnih zrnih kar tudi definira uporabnost posameznega žita v prehrani ljudi in živali. Funkcionalna vrednost žita je odvisna od genetskih in okoljskih vplivov. Medtem, ko je razmerje med posameznimi deli žitnega zrna (kalček, meljak, semenski ovoj) določeno z genetskimi dejavniki, dejansko vsebnost proteinov, škroba ali lipidov pogojuje tudi vpliv okoljskih dejavnikov. Poleg rastnih pogojev med pomembne okoljske dejavnike uvrščamo način žetve, shranjevanje, obdelavo žita in prisotnost morebitnih nehranilnih faktorjev (npr.: tanini) (Fletcher, 2016).

Žita so bogat vir proteinov in peptidov in v tem kontekstu potencialen vir bioaktivnih peptidov z dokazanim funkcionalnim delovanjem (Ortiz-Martinez in sod., 2014).

2.1.2 Neprava žita (psevdožita)

Neprava žita so enokaličnice ali dvokaličnice, ki jih ne uvrščamo v družino trav (Gramineae). Gojimo jih zaradi njihovega užitnega semena, ki se uporablja za pripravo moke, kruha ali drugih osnovnih živil. V nasprotju z žitnimi zrni, semena psevdožitaric sestavlja perisperm, tj. plast hranilnega tkiva, ki obdaja kalček (Fletcher, 2016).

Neprava žita so v primerjavi s pravimi žiti relativno nepomembna v svetovnem merilu. V preteklosti so predstavljala temelj v prehrani ljudi posameznih regij, danes pa se omenjena

neprava žita uporabljajo zlasti v prehrani ljudi, ki jih pestijo alergije na konvencionalno uporabljana žita (Fletcher, 2016).

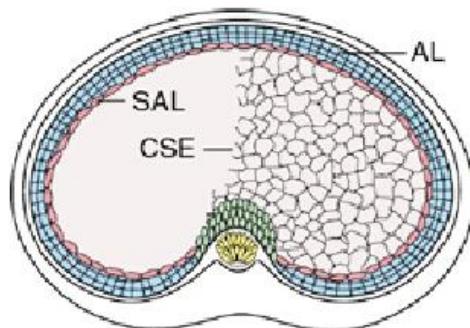
Med neprava žita uvrščamo semena amaranta, kvinoje in ajdo (Fletcher, 2016).

2.2 ŽITNI PROTEINI

2.2.1 Sestava žitnega zrna

Žitno zrno sestoji iz več plasti, ki jih sestavljajo različni tipi celic. Deloma so te plasti še žive in sposobne rasti, kot npr. celice kalčka, deloma pa zrno sestavljajo neaktivne plasti s hranilnimi snovmi za klijočo rastlino in plasti, ki kalček varujejo pred škodljivimi vplivi okolice (Knez, 1974).

Ob zrelosti seme žita sestavlja več celičnih tipov oz. tkiv (Slika 1). Osrednji del žitnega zrna predstavlja škrobeni meljak - endosperm (CSE; ang. Central Starch Endosperm). Obdaja ga mejna plast celic (SAL – ang. Sub-Aleurone Layer), ki škrobeni endosperm ločuje od aleuronske plasti (AL). Aleuronska plast celic pa obdaja endosperm žitnih zrn in igra pomembno vlogo v fazi kaljenja rastline, saj izloča hidrolaze, ki sproščajo založni škrob (Olsen in sod., 1999). Priraska je na lusko (otrobi), ki obdaja žitno zrno in ga varuje pred vdorom vode in patogenih mikroorganizmov (Šramkova in sod., 2009).



Slika 1: Zrno ječmena v prerezu (SAL – mejna plast celic (ang. Sub-Aleurone Layer), CSE – meljak (ang. Central Starch Endosperm), AL – aleuronska plast (ang. Aleurone Layer); Olsen in sod., 1999)

Na vsebnost proteinov v žitnih zrnih vplivajo genotip žita in rastni pogoji (prst, podnebje, gnojenje). Pomemben dejavnik, ki vpliva na količino proteinov v žitnem zrnu pa je tudi količina in obdobje dodajanja dušika v času rasti žit (Koehler in Wieser, 2013).

Žitna zrna vsebujejo relativno malo proteinov v primerjavi s semenami stročnic. Proteinska frakcija žitnih zrn v povprečju predstavlja od 10 % do 12 % suhe mase žitnega zrna (Shewry in Halford, 2002). Proteinji so prisotni v celotnem žitnem zrnu, kljub temu pa se

njihova koncentracija med posameznimi deli žitnega zrna razlikuje. Tako pri pšeničnem zrnu kalček in aleuronska plast vsebujeta več kot 30 % proteinov, škrobni meljak (endosperm) vsebuje približno 13 %, otrobi pa zgolj 7 % celokupnega deleža proteinov (Koehler in Wieser, 2013).

Z ozirom na razmerja proteinov v posameznih delih žitnih zrn se glede na končno uporabnost najpomembnejši delež proteinov žitnih zrn nahaja v meljaku, to je del, ki po mletju žitnih zrn in sejanju predstavlja neposreden vir proteinov v moki (Koehler in Wieser, 2013).

2.2.2 Delitev žitnih proteinov

Prve sistematične študije je izpeljal t.i. oče kemije rastlinskih proteinov – Thomas Burr Osborne. Osborne je osnoval klasifikacijo rastlinskih proteinov z ozirom na njihovo topnost v različnih topilih (Shewry in Halford, 2002). Tradicionalno se tako žitni proteini mok delijo na štiri skupine z ozirom na njihovo topnost: albumini, globulini, prolamini in glutelini. Med albumine uvrščamo vse proteine, ki so topni v vodi. Globulini so proteini, ki v vodi niso topni, njihovo topnost pa dosežemo v razredčinah solnih raztopin. Prolamini so definirani kot žitni proteini, topni v alkoholnih raztopinah (npr. 60 -70 % etanol), glutelini pa so bili originalno definirani kot proteini, ki niso topni v vodi, solnih raztopinah ali alkoholnih raztopinah, topni pa so v razredčinah kislin ali baz. Popolno topnost glutelinov je mogoče doseči v mešanici alkoholov (npr. 50 % propanol), reducirajočih reagentov in sredstev proti agregaciji (npr. urea) (Koehler in Wieser, 2013). Proteinskih frakcij ne sestavlja protein ene vrste, temveč vsako frakcijo sestavlja kompleksna mešanica različnih proteinov. Določen delež proteinov ostaja netopen, zato ga ne moremo uvrstiti v nobeno izmed frakcij. Tovrstni proteini v večini pripadajo lipo (membranskim) proteinom (Koehler in Wieser, 2013).

Razmerje med proteinskimi frakcijami se razlikuje glede na genotip in rastne pogoje. V določenih pogojih na razmerje proteinskih frakcij vplivajo tudi eksperimentalni pogoji, saj meje med posameznimi frakcijami včasih niso jasne. Posledično lahko najdemo razlike v literaturi, ki včasih delujejo celo protislovno (Koehler in Wieser, 2013).

Poleg delitve rastlinskih proteinov glede na njihovo topnost v različnih raztopinah (delitev po Osborne) proteine vse pogosteje delimo v tri skupine: rezervni proteini, strukturni in metabolni proteini ter zaščitni proteini (Shewry and Halford, 2002).

2.2.2.1 Rezervni proteini

Celice semen višjih rastlin tvorijo specifične rezervne proteine, ki jih skladiščijo kot vir ogljika, dušika in žvepla za kasnejši razvoj (Herman in Larkins, 1999). Proses shranjevanja rezervnih proteinov poteka tokom embriogeneze in je še zlasti izrazit pri stročnicah in žitih (Adeli in Altosaar, 1984). Rezervni proteini predstavljajo gradbene enote za hiter razvoj

kalčka tekom kalitve, obenem pa predstavljajo pomemben vir proteinov v prehrani ljudi in živali (Herman in Larkins, 1999).

Razvoj žitnega zrna pri pšenici je razdeljen na dva ključna koraka: 1) povečanje žitnega zrna in 2) polnjenje ter zorenje žitnega zrna. Prvi korak vključuje zgodnjo in hitro delitev zigote in triploidnega jedra, hitri celični delitvi pa sledi dotok vode, ki omogoča rast celic. Tekom polnjenja žitnega zrna se celična delitev upočasni in postopoma zaključi. V celicah se skladiščijo hranila, zlasti ogljikovi hidrati (Zhang in sod., 2013). Akumulacija rezervnih proteinov poteka v srednji in pozni fazi zorenja, ko se dušikove spojine pri višjih rastlinah kopijo v semenih (Müntz in sod., 2001).

Rezervni proteini se shranjujejo v založnih vakuolah za proteine (ang. Protein storage vacuoles) dokončno diferenciranih celic kalčka ali meljaka oz. v obliki proteinskih teles (ang. Protein bodies), ki s pomočjo endoplazmatskega retikuluma nastanejo ob zaključku celične delitve (Herman in Larkins, 1999). Tekom skladiščenja rezervnih proteinov ni mogoče zaslediti procesa hidrolize proteinov, zaradi česar lahko sklepamo, da so proteinska telesca zaščitena pred prezgodnjim proteolitično razgradnjo (Müntz in sod., 2001).

Glavne proteinske frakcije rezervnih proteinov v večini žit in stročnic so globulini in prolamini (Adeli in Altosaar, 1984). Globulini prevladujejo v stročnicah (več kot 50 %), prolamini pa so značilnejši za žita (Adeli in Altosaar, 1984).

Prolamini so skupina hidrofobnih rezervnih proteinov, ki v povprečju predstavljajo 40 - 60 %- delež celokupnih proteinov, prisotnih v semenih večine žit z izjemo ovsja in riže (Adeli in Altosaar, 1984). Biološka funkcija prolaminov se nanaša na oskrbovanje kalčka z dušikom in aminokislinami tekom kaljenja, obenem pa predstavlja 70 do 90 %- delež vseh proteinov prisotnih v moki (Koelher in Wieser, 2013). Prolaminsko frakcijo proteinov poimenujemo različno glede na vrsto žita: gliadini in glutenini (pšenica), sekalin (rž), hordein (ječmen), avenin (oves), zein (koruza), kafirin (proso, soržica) in orzenin (riž) (Koelher in Wieser, 2013).

Preostali delež rezervnih proteinov pripada albuminom in globulinom (Zhang in sod., 2013). Rezervne globuline najdemo v embriju in zunanjih aleuronskih plasti endosperma. Pri nekaterih žitih (oves in riž) se rezervni globulini nahajajo v meljaku v obliki proteinskih teles in služijo izključno kot rezervni proteini (Shewry and Halford, 2002). Pri ovsu in rižu rezervni globulini predstavljajo kar 70 - 80 % vseh proteinov.

Čeprav aleuronska plast in embrio vsebuje veliko več proteinov kot škrobni meljak, imajo proteini teh tkiv omejen vpliv glede na končno uporabo žitnega zrna. Pri žitih z majhnim semenom (npr. pšenica) aleuronska plast in embrio predstavlja zgolj 10 % suhe mase zrn. V večini primerov sta odstranjena pri obdelavi zrna tj. mletju (pšenica) (Shewry and Halford, 2002).

2.2.1.2 Metabolni proteini

Med metabolne proteine uvrščamo albuminske in globulinske frakcije. Sestavlja jih množica različnih proteinov, pri čemer velik delež zavzemajo encimi in encimski inhibitorji. Metabolni proteini se v največji meri nahajajo v embriju in aleuronski plasti, manjši delež proteinov pa je razporejen tudi po celotnem endospermu (Koehler in Wieser, 2013).

Funkcija metabolnih proteinov v žitnih zrnih se nanaša na hidrolizo rezervnih substratov in oskrbovanje kalčka s potrebnimi hranili tekom kalitve. Medenje uvrščamo hidrolazne encime, ki jih glede na substrat katerega razgrajujejo, delimo na hidrolitične encime za ogljikove hidrate, proteolitične encime in druge hidrolitične encime (Koehler in Wieser, 2013).

Proteolitični encimi so skupina encimov, kamor uvrščamo proteinaze, proteaze ali peptidaze. Način delovanja tovrstnih encimov je osnovan na cepitvi peptidne vezi med aminokislinskimi ostanki. Razlikujemo endo- oz. eksopeptidaze, glede na način delovanja pa jih razvrščamo med karboksipeptidaze (cepijo na C-terminalnem delu peptida) in aminopeptidaze (cepijo na N-terminalnem delu) (Koehler in Wieser, 2013). Z vidika žitnih zrn najpomembnejšo vlogo zavzemajo kislinske peptidaze. To so proteolitični encimi, ki se v naravi pojavljajo v najrazličnejših oblikah in najbolje delujejo pri pH 4,4 do 5,2. Z ozirom na katalitično delovanje jih razvrščamo med serinske, metalo- in aspartatne proteaze. Njihova biološka funkcija je oskrba kalčka z aminokisinami, zato je njihova aktivnost največja tekom kalitve žitnega zrna (Koehler in Wieser, 2013).

Encimske inhibitorje v žitnih zrnih zasledimo v kalčku in endospermu. Vezani so v aktivnem mestu hidrolaznih encimov, saj na ta način preprečujejo, da bi v zrnu prišlo do razgrajevanja rezervnih snovi pred pričetkom kalitve, poleg tega pa delujejo kot zaščita pred živalskimi ali mikrobnimi encimi (Koehler in Wieser, 2013).

2.2.3 Pregled proteinske sestave zrn obravnavanih žit

2.2.3.1 Ječmen

Ječmen je četrta najpomembnejša kulturna rastlina na svetu, za pšenico, rižem in koruzo (Day, 2013). Čeprav je ječmen v preteklosti predstavljal eno najpomembnejših žit v prehrani ljudi, se danes večinoma uporablja za krmljenje živali in pridobivanje ječmenovega slada (Mariotti in sod., 2014). Danes se le 2 % pridelanega ječmena uporabljava v direktni prehrani ljudi (Day, 2013). Posledično se ječmen le redko uporablja v pekarski industriji, zlasti zaradi negativnih učinkov na tehnološke lastnosti kruha. Kljub temu pa nedavne raziskave kažejo, da uporaba ječmenovega kislega testa značilno izboljša kakovost kruha (Mariotti in sod., 2014).

Čeprav ječmen večinoma služi kot vir energije, so ječmenova zrna dober vir proteinov (Schmidt in sod., 2016). Zrno ječmena je sestavljeno iz 10 do 17 % proteinov (Day, 2013). Proteini prolamini, pri ječmenu imenovani hordeini, imajo rezervno funkcijo in predstavljajo približno 50 %- delež vseh proteinov ječmenovega zrna (Schmidt in sod., 2016). Hordeini so bogati z Glu, Pro, Leu, Val, Phe in Tyr aminokislinskimi ostanki, ki pogosto kažejo antioksidativno učinkovitost, prosti ali vpeti v proteinska ali peptidna zaporedja (Ortiz-Martinez in sod., 2014).

2.2.3.2 Oves

Oves je dobro poznana kulturna rastlina zmernih podnebij, sestavljena iz večcvetnih klasov (Sterna in sod., 2016). V evrazijskem prostoru uspeva približno 30 vrst ovs, gojen oves pa izvira iz Bližnjega vzhoda (Cortese, 2007).

Oves se nekoliko razlikuje od ostalih žit z ozirom na njegove heterogene lastnosti in hranilni profil (Ortiz-Martinez in sod., 2014). Tako kot ostala žita se oves v prvi vrsti uživa kot vir ogljikovih hidratov, pretežno škroba, kljub temu pa je oves kvaliteten vir ostalih hranil kot npr. proteinov, mineralov, vitaminov in topne vlaknine (Menon in sod., 2016).

Delež proteinov v ovsenem zrnu se z ozirom na kultivar giblje med 12,4 % in 24,4 % (Menon in sod., 2016). Rezervni proteini ovs so globulini, ki predstavljajo 75 % celokupnih proteinov. Poleg globulinov se v zrnu žita nahajajo tudi prolamini (avenini) (10 %). Proteini pri ovsu se večinoma nahajajo v kalčku in otrobih, manj pa jih je v škrobnatem meljaku (Sterna in sod., 2016).

2.2.3.3 Proso

Proso je splošno poimenovanje za rastline, ki jih uvrščamo v različne rodove in vrste družine Poaceae. So enoletne kulturne rastline z majhnim okroglim zrnom (Shahidi in Chandrasekara, 2013). Proso izvira iz Azije, najverjetneje s Kitajske in iz vzhodne Indije, nekatere vrste pa izvirajo z afriškega ozemlja (Chandra in sod., 2016). Domneva se, da je bilo proso eno prvih gojenih kulturnih rastlin, udomačena pred tisočletji ob začetku človeške civilizacije (Shahidi in Chandrasekara, 2013). Danes letna pridelava prosa v svetovnem merilu obsega 27 milijonov ton (Shahidi in Chandrasekara, 2013), kar proso uvršča med šest najpomembnejših žit na svetu. V največjem obsegu se prideluje biserni tip prosoa (*Pennisetum glaucum*) (Shahidi in Chandrasekara, 2013).

Proseno zrno je sestavljeno iz semenskega ovoja, kalčka in meljaka (Chandra in sod., 2016). Prehranska vrednost prosoa je primerljiva s prehransko vrednostjo ostalih žit. Prosena zrna vsebujejo 60 do 70 % ogljikovih hidratov, 7 do 11 % proteinov, 1,5 do 5 % maščobe in 2 do 7 % vlaknin, mineralov in vitaminov (Shahidi in Chandrasekara, 2013).

2.2.3.4 Amarant

Amarant (*Amaranthus caudatus*) izvira z višje ležečih regij Bolivije, Peruja in Ekvadorja. Na omenjenih področjih so kulturno rastlino gojile že starodavne južnoameriške civilizacije, kasneje pa so gojenje amaranta nadomestili z gojenjem pravih žit (Fletcher, 2016). V zadnjih letih zanimanje za amarant znova narašča zlasti zaradi razmeroma visoke vsebnosti proteinov v zrnih (14 do 19 %) in zaradi prisotnosti esencialnih aminokislin kot npr. lizina in triptofana, ki jih v znatno nižjih koncentracijah najdemo v drugih vrstah žit (Fletcher, 2016). V amarantovih zrnih prevladuje rezervni protein amarantin, ki ga uvrščamo v razred globulinov (Luna-Suarez in sod., 2009).

2.2.3.5 Khorosan pšenica (Kamut)

Khorosan (Kamut) je tržno ime za starodavno egiptansko vrsto pšenice. Je tetraploidna vrsta pšenice (*Triticum turgidum ssp.turanicum*), sorodna durum pšenici, ki se pogosto uporablja za izdelavo testenin (Saa in sod., 2014). Nekateri viri poročajo, da je khorosan naravni hibrid vrst *T. durum* in *Triticum polonicum* (Balestra in sod., 2015).

Kamut vsebuje več proteinov (16 %) in vitamina E v primerjavi z durum pšenico. Spodbuja razvoj probiotičnih bakterij gastrointestinalnega trakta (Sofi in sod., 2013). Pred kratkim pa je bilo tudi dokazano, da kruh z dodatkom kamutove moke v večji meri ščiti laboratorijske podgane pred oksidativnim stresom kot običajen pšenični kruh (Saa in sod., 2014) pri čemer dodatek kislega testa še dodatno izboljša antioksidativno učinkovitost kamutovega kruha (Saa in sod., 2014).

2.2.3.6 Konoplja

Konoplja je visoka, zeljnata rastlina iz družine Cannabinaceae z dlanastimi listi. Goji se kot kulturna rastlina, zaradi vlaken in semen, ki se uporabljajo v industrijske namene, za pridobivanje olja, živil, živalske krme ali zdravilnih učinkovin (Teh in sod., 2016).

Konopljino seme poleg vlaknin sestavlja 30 % olja in 25 % proteinov (Wang in sod., 2008). Proteini konoplje so edestini (globulini) in albumini (Teh in sod., 2016), ki so lahko prebavljivi in vsebujejo številne esencialne aminokisline (Wang in sod., 2008).

2.2.3.7 Pšenica

Pšenica je kulturna rastlina, ki jo uvrščamo v rod *Triticum* in družino Poaceae (Kumagai, 2010). Je najpomembnejša kulturna rastlina za prehrano ljudi (Sofi in sod., 2013). Na globalni ravni predstavlja glaven vir ogljikovih hidratov, proteinov, vitaminov, mineralov in vlaknin (Sofi in sod., 2013).

Pšenično zrno z ozirom na kultivar v povprečju vsebuje med 8 in 15 % proteinov. Najpomembnejša skupina rezervnih proteinov pšeničnega zrna so prolamini in glutelni, pri

pšenici imenovani gliadini in glutenini (glutelini). Prolaminska in glutelinska frakcija proteinov pri pšenici predstavlja 85 % vseh proteinov in sta sestavna elementa glutena. Gluten je mešanica proteinov, ki ima sposobnost tvorbe kohezivne, visko-elastične proteinske mreže, ki jo tvorijo disulfidni mostički, vodikove vezi in hidrofobne interakcije, s čimer so omogočene dobre tehnološke lastnosti pekovskih izdelkov. Gluten je prisoten samo v škrobnatem meljaku, zato je prisoten tudi v pšenični moki. Delež posameznih proteinov v moki ustreza 46 % glutelina (glutenina), 40 % prolamina (gliadin), 9 % albumina in 5 % globulina. Aminokislinska sestava proteinov je bogata v glutaminu in prolinu, nizka pa je vsebnost lizinskih aminokislinskih ostankov (Kumagai, 2010). Stabilna proteinska struktura žitnih proteinov z močnimi disulfidnimi vezmi je relativno termostabilna, zato se pogosto ohranja pri procesiranju živil. Posledično nativna struktura proteinov v živilih pri alergijsko občutljivih ljudeh (1-2 % populacije) povzroča IgE vezan imunski odziv, kar vodi v pojav nekaterih vnetnih bolezni (celiakija) (Day, 2013). Znižanje vrednosti pH kislega testa vpliva na večjo topnost žitnih proteinov s čimer proteini postanejo dostopnejši encimski razgradnji, ki je posledica delovanja žitnih endogenih aspartatnih proteinaz in mikrobnih peptidaz (Gänzle, 2014).

2.3 KISLO TESTO

Kislo testo (KT) je mešanica moke in vode, fermentirana z mlečnokislinskimi bakterijami in kvasovkami, ki tekom svojega metabolizma testo vzhajajo in ga sočasno tudi zakisajo (Minervini in sod., 2014). Uporaba kislega testa za pripravo pečenega in parjenega kruha v zadnjih letih na globalni ravni izrazito narašča zlasti zaradi izboljšanih senzoričnih karakteristik in boljše hranilne vrednosti kruha (Gänzle in Ripari, 2016). Kislo testo se uporablja kot alternativno vzhajalno sredstvo (Minervini in sod., 2014) ali kot nadomestilo aditivom (Gänzle in Ripari, 2016).

Ekologija mikroorganizmov kislega testa je odvisna od okoljskih parametrov. Mikrobiološke študije so pokazale, da se v kislih testih lahko nahaja več kot 80 vrst mlečnokislinskih bakterij, predvsem bakterije družin *Lactobacillaceae* in *Leuconostocaceae* ter več kot 20 vrst kvasovk, zlasti kvasovke iz rodov *Saccharomyces* in *Candida* (De Vuyst in Neysens, 2005).

2.3.1 Mlečnokislinske bakterije v kislem testu

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so grampozitivne, nesporulirajoče, katalaza-negativne in fakultativno anaerobne bakterije s fermentativnim metabolizmom. Med mlečnokislinske bakterije uvrščamo robove *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* (Savijoki in sod., 2006) in *Oenococcus* (Chapot-Charzier in Kulakauskas, 2014). Mlečnokislinske bakterije delimo glede na morfologijo, način glukozne fermentacije, temperaturo rasti, sposobnost rasti pri visokih koncentracijah soli in toleranco na kisline. So različnih oblik. Lahko imajo obliko kokov, palčk ali kokobacilov

(Ray in Bhunia, 2007). Mlečnokislinske bakterije za uspešno rast in delovanje zahtevajo specifična hranila, zlasti ogljikove hidrate, aminokisline, vitamine skupine B, nukleinske kisline in minerale (Pallin in sod., 2016). Žita v tem kontekstu zaradi ugodnih makro in mikroelementov predstavljajo ugodno hrnilno okolje za rast številnih vrst bakterij iz rodu *Lactobacilil* (Peyer in sod., 2016).

Pri anaerobnih pogojih mlečnokislinske bakterije vršijo mlečnokislinsko fermentacijo: fermentirajo različne sladkorje, največkrat glukozo preko piruvata v mlečno kislino (Ray in Bhunia, 2007). Glede na metabolizem ločimo homofermentativne in heterofermentativne mlečnokislinske bakterije. Homofermentativne mlečnokislinske bakterije večino sladkorjev razgradijo do mlečne kisline, heterofermentativne mlečnokislinske bakterije pa poleg kisline proizvajajo še ogljikov dioksid, etanol, ocetno kislino, metanojsko kislino, jantarjevo kislino, različne aldehyde in vodikov peroksid (Salvucci in sod., 2016).

Mlečnokislinske bakterije se v pripravi fermentiranih živil, pijač in krme uporabljajo že tisočletja. S produkti metabolizma sooblikujejo in pomembno vplivajo na okus in varnost živil, poleg tega pa izboljšajo tudi njihovo obstojnost. Z ozirom na njihovo tradicionalno rabo so si bakterije pridobile status GRAS-Splošno prepoznanata kot varna (ang. Generally Recognized As Safe) (Salvucci in sod., 2016). Danes jih uvrščamo med najbolje preučene mikroorganizme, pri čemer je bil pod drobnogled številnih študij vzet proteolitični sistem mlečnokislinskih bakterij, ki bakterijam zagotavlja potrebno oskrbo z esencialnimi aminokislinami, potrebnimi za rast bakterij, nezanemarljiv pa je tudi industrijski vidik proteolize, ki prispeva k razvoju senzoričnih lastnosti fermentiranih izdelkov (Savijoki in sod., 2006). Poleg tega se vse pogosteje izkoriščajo pozitivni vplivi mlečnokislinskih bakterij na zdravje ljudi. Nekatere mlečnokislinske bakterije naseljujejo prebavni trakt človeka (Chapot-Charzier in Kulakauskas., 2014), zato se nekatere bakterije iz rodu *Lactobacillus* poznane kot probiotične bakterije, nekateri sevi laktobacilov pa domnevno pripomorejo k nastanku bioaktivnih peptidov z raznovrstnim pozitivnim vplivom na zdravje človeka (Savijoki in sod., 2006).

MKB so številčno in metabolno prevladujoči mikroorganizmi kislih test (Gänzle in sod., 2008). Kljub temu, da je bilo iz kislih test izoliranih veliko vrst mlečnokislinskih bakterij, so le nekatere vrste prilagojene na specifično okolje kislega testa. Med najpogosteje zastopanimi vrstami mlečnokislinskih bakterij v kislih testih so *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus rossiae* (Gänzle in sod., 2008). V industrijskem merilu se bakterije rodu *Lactobacillus* uporabljajo kot starterske kulture za pripravo kislih test, saj so prav te bakterije odgovorne za zakisanje, proteolizo, dobro teksturo, okus in obstojnost pšeničnih kislih kruhov (Gobbetti in sod., 1996).

2.3.2 Proteolitični sistem mlečnokislinskih bakterij

Za večino mlečnokislinskih bakterij velja, da imajo omejene zmožnosti sinteze esencialnih aminokislin, zato jih morajo za nemoteno rast in delovanje pridobiti iz okolice (Pot in Tsakalidou, 2009). Kljub temu, da v primerjavi z ostalimi skupinami mikroorganizmov mlečnokislinske bakterije uvrščamo med šibke proteolitične mikroorganizme, večina mlečnokislinskih bakterij poseduje kompleksen proteolitični sistem, ki je sposoben hidrolize žitnih proteinov do peptidov ali posameznih aminokislin. (Pot in Tsakalidou, 2009). Najobširnejše raziskave proteolitičnega sistema so bile v preteklih letih izvedene na proteolitičnem sistemu bakterije *Lactococcus lactis*, zato bakterija velja kot modelni organizem za vse mlečnokislinske bakterije (Pot in Tsakalidou, 2009).

Proteolitični sistem mlečnokislinskih bakterij temelji na i) membransko vezanih proteinazah CEP (ang. Cell Envelope Proteinase), ki zunajcelično cepijo kompleksne proteine substrata do peptidov, ii) peptidnem transporterju (Opp), ki omogoča prenos peptidov v celico in iii) seriji znotrajceličnih peptidaz, ki razgradijo peptide v še krajše peptide in aminokisline (Gänzle in sod., 2008).

2.3.2.1 Membransko vezane proteinaze (ang. cell envelope associated proteinase activity)

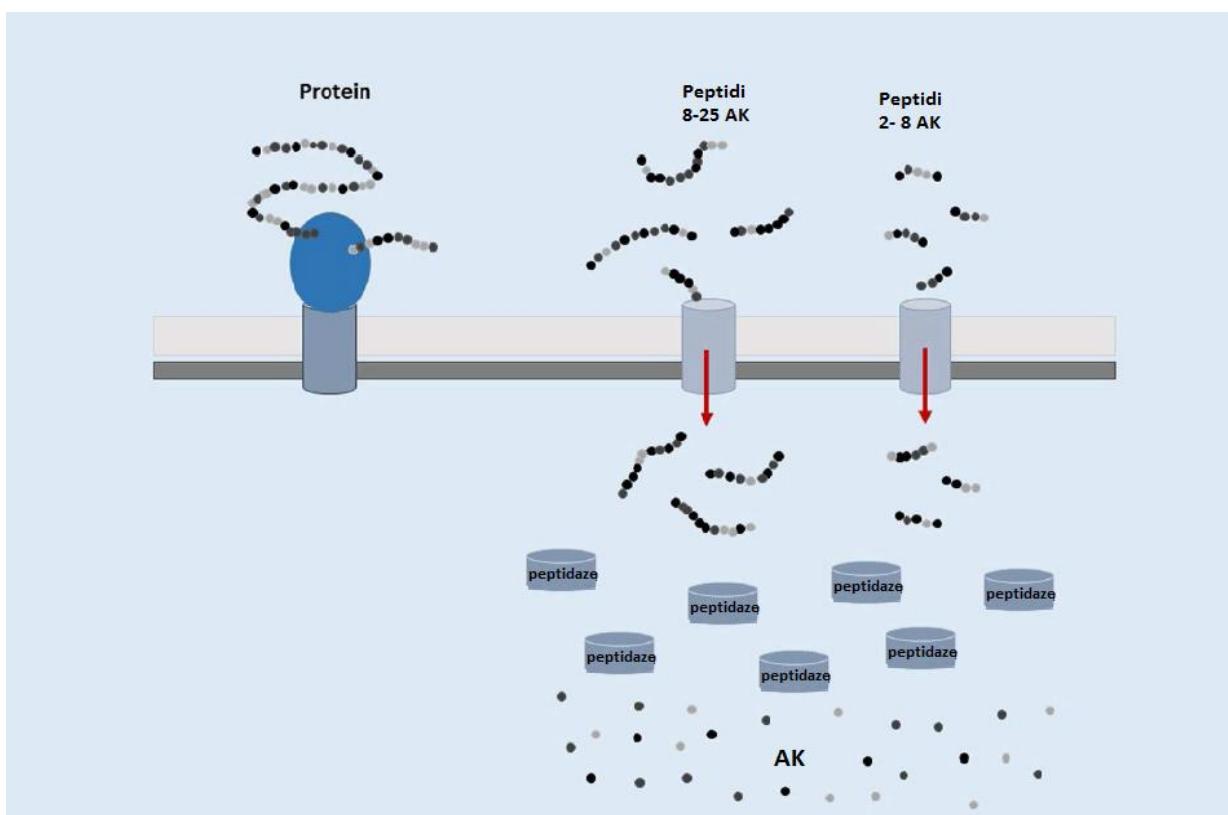
Na zunanji membrani številnih grampozitivnih bakterij se nahajajo serinske proteinaze (PrtP), ki predstavljajo eno pomembnejših komponent proteolitičnega sistema mlečnokislinskih bakterij (Pot in Tsakalidou, 2009). Bakterije preko transportnih sistemov privzemajo peptide, ki jih s pomočjo znotrajceličnih peptidaz razgradijo do posameznih aminokislin ali krajših peptidov (Gänzle in sod., 2008). Kljub temu nekatere mlečnokislinske bakterije, izolirane iz kislih test ne vsebujejo proteinaz vezanih na celično steno bakterij (Gänzle in sod., 2008). Proteinazna aktivnost mlečnokislinskih bakterij v substratih s povišano koncentracijo peptidov je pogosto utišana na nivoju genoma (Gänzle in sod., 2008) Viri poročajo, da bakterija vrste *L. sanfranciscensis*, ključna bakterija mlečnokislinske fermentacije kislih test, poseduje najmanjši genom med vsemi MKB, saj se bakterija zanaša na aktivnost encimov prisotnih v kompleksnem substratu KT (Gänzle in sod., 2008).

Zakisanje kislega testa namreč vzpostavi optimalno pH okolje za potek primarne proteolize (proteini do peptidov), ki je posledica delovanja žitnih aspartatnih proteinaz. Razgradnja in depolimerizacija žitnih proteinov kislih test je odvisna od aktivnosti bakterijskega metabolizma in delovanja žitnih encimov (Gänzle, 2014). Metabolizem mikroorganizmov kislega testa in aktivnost žitnih encimov delujejo soodvisno. Zakisanje modulira aktivnost žitnih encimov, neposredno pa vpliva tudi na topnost substratov zlasti glutenskih polimerov in fitatov. Zakisanje in kopičenje nizko-molekularnih tiolov poveča topnost žitnih proteinov in posledično poveča njihovo dostopnost za encimsko razgradnjo (Gänzle, 2014). Proteolitični sistem pšeničnih in rženih mok v večini vključuje aspartatne

proteinaze in karboksipeptidaze, za katere je značilno izrazitejše delovanje v kislem okolju (Gänzle in sod., 2008).

2.3.2.2 Transportni sistemi za peptide

Prvi korak proteolize je razgradnja proteinov, ki je posledica delovanja membransko vezanih proteinaz (CEP) ali pa je rezultat delovanja substratnih proteinaz prisotnih v okolini MKB. Peptidi predstavljajo osnovni vir organskega dušika za številne mlečnikislinske bakterije (Gänzle in sod., 2008). Viri navajajo, da proteolitični sistem mlečnikislinskih bakterij v celico prednostno privzema krajše peptide (pred aminokislinami) (Vermeulen in sod., 2004), kar kaže na dobro razvitost celičnih transportnih sistemov za privzem peptidov. Opaženi so bili trije transportni sistemi za privzem peptidov: Opp, DtpT in Dpp (Vermeulen in sod., 2004). DtpT in Dpp sta proteina, ki privzemata hidrofilne di- in tripeptide, Opp pa je kompleks petih proteinov, ki se uporablja za privzemanje oligopeptidov, sestavljenih tudi iz 18 aminokislinskih ostankov (Vermeulen in sod., 2004).



Slika 2: Poenostavljen prikaz proteolitičnega sistema pri mlečnikislinskih bakterijah
 (Pessione in Cerrincione, 2016)

2.3.2.3 Znotrajcelične peptidaze

Znotrajcelični proteolitični sistem mlečnokislinskih bakterij obsega endo- in eksopeptidaze. Peptidazne encime delimo glede na mesto hidrolize peptidne vezi v polipeptidni verigi. Eksopeptidaze pa nadalje delimo tudi glede na mesto delovanja in glede na velikost odcepljenih fragmentov (Vozelj in sod., 2007).

Med znotrajcelične endopeptidaze seva *L.sanfranciscensis* uvrščamo tri tipe peptidaz, ki jih razlikujemo glede na preferenčno katalitično aktivnost do substrata (PepO, PepF, PepE) (Gänzle in sod., 2008).

Med eksopeptidaze uvrščamo štiri tipe aminopeptidaz (PepN, PepA, PepC, PepL), tripeptidazo (PepT) in splošno dipeptidazo (PepV) (Gänzle in sod., 2008). Za hidrolizo peptidov, ki vsebujejo Pro-aminokislinski ostanek pa imajo mlečnokislinske bakterije vrsto specifičnih peptidaz: X-prolil dipeptidil aminopeptidaza PepX, prolidaza PepQ, prolinaza PepR, prolin iminopeptidaza PepI in aminopeptidaza PepP (Gänzle in sod., 2008).

2.3.3 Akumulacija bioaktivnih peptidov tekom mlečnokislinske fermentacije

Številne mlečnokislinske bakterije, najpogosteje prisotne v mlečnokislinskih fermentacijah imajo aktiven transportni sistem za prevzem aminokislin in krajših peptidov (8-10 aminokislin) (Pessione in Cirrincione, 2016).

Daljši peptidi in proteini, ki se nahajajo v okolini mikroorganizma, so podvrženi razgradnji s strani peptidaz in proteinaznih encimov, ki so pogosto pripeti na celičnih stenah nekaterih vrst mikroorganizmov. Krajši peptidi in aminoksiline se ponavadi prenesejo preko aktivnih transportnih sistemov v celico. Znotraj celice se peptidi razgradijo do aminokislin, aminoksiline pa kot prekurzorji vstopajo v različne metabolne poti, po katerih nastajajo spojine, ki jih mikroorganizmi lahko izločajo v okolje. (Ray in Bhunia, 2007). Posledica proteolitične aktivnosti mlečnokislinskih bakterij v različnih substratih so bioaktivne spojine, ki pa se v večini primerov v okolico sprostijo, kadar celice bakterij preidejo v avtolizo (Pessione in Cirrincione, 2016).

2.4 BIOAKTIVNI PEPTIDI

2.4.1 Definicija

Proteini v hrani običajno služijo kot vir energije in esencialnih aminokislin, ki jih naše telo potrebuje za rast in ohranjanje normalnega delovanja metabolnih funkcij v telesu (Bahareh in Amin, 2010). Skozi leta je postalo vse bolj očitno, da sta prehrana in zdravje neposredno povezana (Agyei in sod., 2016), zato se v zadnjem času tako vse bolj poudarja vloga proteinov v prehrani, kot vir bioaktivnih peptidov s pozitivnim vplivom na zdravje ljudi (Ortiz-Martinez in sod., 2014).

Bioaktivni peptidi so specifični deli proteinov (Bahareh in Amin, 2010), ki so kot del matičnega proteina biološko neaktivni in posledično nefunkcionalni. Šele s sprostivijo, ki je posledica razgradnje starševskega proteina, se peptidni deli sprostijo v okolje (Agyei in sod., 2016). Običajno so sestavljeni iz dveh ali več aminokislinskih ostankov, ki so med seboj povezani s peptidno vezjo (Udenigwe, 2014). Gre za krajše peptide, ki se običajno nahajajo v obliki primarnega zaporedja. Posledično se večina raziskav osredotoča na sestavo, dolžino in zaporedje aminokislin v bioaktivnih peptidih (Xiong, 2010).

Za sprostitev bioaktivnih peptidov iz starševskih proteinov obstaja več različnih načinov (Cavazos in Mejia, 2013). Razpad proteina je lahko posledica mikrobne fermentacije proteinov s proteolitičnimi encimi mikroorganizmov, proteolize z encimi rastlinskega ali živalskega izvora, potencialno pa se lahko bioaktivni peptidi sprostijo v gastrointestinalnem traktu tekom delovanja prebavnih encimov, kot sta npr. tripsin in pepsin (Agyei in sod., 2016). Poslužujemo se lahko kemične hidrolize, pri kateri za razgradnjo proteinov uporabljamo kislino (Cavazos in Mejia, 2013). V določenih primerih pa lahko razgradnjo proteinov pospešimo s povisano temperaturo, a je potrebno paziti, da tekom postopka ne izgubimo funkcionalne vrednosti proteina. V določenih primerih se za pridobivanje bioaktivnih peptidov poslužujejo *de novo* sinteze bioaktivnih peptidov, pogostejšo rabo tovrstnega postopka pa omejuje visoka cena in potreba po specializirani opremi (Cavazos in Mejia, 2013).

2.4.2 Lastnosti bioaktivnih peptidov in njihovo delovanje

Bioaktivni peptidi kot produkti hidrolize proteinov ohranijo nekatere fizikalne in kemijske značilnosti starševskega proteina, ki posledično vplivajo na lastnosti nastalih bioaktivnih peptidov. Tekom encimske hidrolize se spreminja molekulska masa proteinskih frakcij, razporeditev naboja, izoelektrična točka, kislota oz. bazičnost peptida, ionizacija in hidrofobnost oz. hidrofilnost proteinskih fragmentov (Agyei in sod., 2016).

Biološke lastnosti bioaktivnih peptidov izhajajo iz narave starševskega proteina, specifičnosti proteinaz in dejavnikov okolja (Udenigwe, 2014). Neposredno jih določajo tip, število, lastnosti in zaporedje aminokislin, ki gradijo peptid (Agyei in sod., 2016).

Zaporedje in tip aminokislin neposredno določata strukturo peptida, ki je odgovorna za funkcionalnost bioaktivnih peptidov (Udenigwe, 2014). Na primer, večina kratkih, hidrofobnih in kationskih peptidov izraža protimikrobnno delovanje, peptidi, ki vsebujejo veliko prolinskih in valinskih aminokislinskih ostankov pa pogosto učinkujejo antihipertenzijsko (Agyei in sod., 2016).

Uporabnost bioaktivnih peptidov se nanaša na njihove multifunkcionalne bioaktivne lastnosti, ki pozitivno vplivajo na zdravje ljudi (Udenigwe, 2014). *In vitro* in *in vivo* študije so pokazale obsežne pozitivne učinke, tj. opioidno delovanje, sposobnost vezave mineralov, imunomodulatorno, protimikrobnno in antioksidativno delovanje. Poleg tega

preprečujejo strjevanje krvi, znižujejo krvni tlak in nivo holesterola v krvi (Coda in sod., 2011). Značilnost učinkovitega delovanja bioaktivnih peptidov se je pokazala pri preprečevanju nekaterih bolezenskih stanj npr. pri povišani vsebnosti lipidov v krvi, hipertenziji, vnetjih, slatkorni bolezni, rakastih obolenjih, mikrobnih infekcij in imunski oslabelosti. Domneva se, da peptidi potencialno vplivajo na izražanje genov, ki so dogovorni za neobičajno signaliziranje metabolnih poti (Udenigwe, 2014).

2.4.3 Delovanje antioksidativnih bioaktivnih peptidov

Antioksidativne peptide običajno sestavlja 2 do 20 aminokislinskih ostankov (Coda in sod., 2011). Aminokislinska sestava peptida igra ključno vlogo pri določanju njegove funkcionalne učinkovitosti. Pri bioaktivnih peptidih s potencialnim antioksidativnim učinkovanjem tako najpogosteje zasledimo peptide z molekulsko maso manjšo od 5 kDa, ki jih sestavljajo histidin in hidrofobne aminokisline (Xiong, 2010).

Številni bioaktivni peptidi in peptidne mešanice, za katere je značilna izrazita antioksidativna učinkovitost, nastajajo z encimsko hidrolizo rastlinskih ali živalskih proteinov (Xiong, 2010). Rastlinski viri bioaktivnih peptidov vključujejo proteine žit (pšenica, koruza, ječmen, rž), psevdožit (ajda, amarant) oz. proteine drugih rastlinskih virov (stročnic, kapusnice idr.) (Ortiz-Martinez in sod., 2014). Žita že tisočletja predstavljajo osnovno živilo v prehrani ljudi (Cavazos in Mejia, 2013). Epidemiološke študije so potrdile, da redno uživanje živil, ki so osnovana na podlagi žit občutno zmanjšuje tveganje za pojav nekaterih vrst degenerativnih kroničnih bolezni (npr.: kardiovaskularnih bolezni, slatkorne bolezni tipa 2, nekaterih vrst raka itd.). V tem kontekstu študije predstavljajo proteine kot pomemben vir peptidov in aminokislin s funkcionalnim učinkovanjem (Ortiz-Martinez in sod., 2014). Rezervni proteini žitnih zrn namreč dokazano vsebujejo peptidne sekvene s protitumorskim, antitrombotskim in antioksidativnim delovanjem (Cavazos in Mejia, 2013).

Antioksidativni peptidi v splošnem delujejo kot lovilci prostih radikalov, donorji protonov ali kelatorji kovinskih ionov (Xiong, 2010) in tako preprečujejo oksidativni stres.

2.4.3.1 Oksidativni stres

Po definiciji je oksidativni stres neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine reaktivnih zvrsti na celice in tkiva v organizmu (Osredkar, 2011). Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) nastajajo tekom aerobnega metabolizma. Zaradi visoke reaktivnosti je vsem ROS skupno, da lahko oksidirajo katero koli organsko molekulo v organizmu (Osredkar, 2011). Ker ob nastanku oksidacijskega stresa pride do poškodb ali inaktivacije celičnih komponent, kot na primer encimov, membran in DNA molekule (Young in Mine, 2010) oksidativni stres predstavlja neposredni povod za razvoj nekaterih kroničnih bolezni, kot so npr. srčno-žilna obolenja, vnetja, rak oz. slatkorna bolezen (Young in Mine, 2010).

Zdrav organizem je pri normalnih pogojih sposoben preprečiti škodljivo delovanje ROS preko encimskih (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza, glutation reduktaza) ali neencimskih antioksidantov (vitamini, elementi v sledovih, koencimi in kofaktorji) (Sarmadi in Ismail, 2010). V določenih okoliščinah endogeni antioksidativni obrambni sistem ne more samostojno obvarovati celic pred škodljivimi vplivi ROS. Posledično se pojavi oksidativni stres (Sarmadi. in Ismail, 2010). ROS lahko nastajajo med normalno presnovno aktivnostjo celic, tekom celičnega dihanja pri aerobnih organizmih (Sarmadi in Ismail, 2010) ali pa na njihov nastanek vplivajo zunanjji dejavniki (Osredkar, 2011). Med zunanje vire oksidantov uvrščamo onesnažila v zraku ali oksidante, ki nastajajo pri kajenju, (Sarmadi in Ismail, 2010) oksidante, ki nastanejo kot posledica uživanja nekakovostne hrane ali alkohola, ali pa so posledica telesnega prepričevanja (Young in Mine, 2010). Uživanje antioksidantov in hrane, ki spodbuja delovanje endogenih obrambnih mehanizmov je ključno za preprečevanje nastajanja ROS in za ohranjanje stabilnega redoks potenciala (Young in Mine, 2010). Aminokisline, peptidi in proteini dokazano pozitivno vplivajo na splošno antioksidativno kapaciteto celic in tako posredno ščitijo celične komponente pred oksidativnimi poškodbami (Xiong , 2010).

2.4.4 Možnosti uporabe antioksidativnih bioaktivnih peptidov

V zadnjih dveh desetletjih je na trgu prišlo do eksponentnega povečanja produktov, ki vsebujejo prehranske dodatke s poudarkom na njihovi antioksidativni učinkovitosti. Poleg tradicionalno uporabljenih antioksidantov tj. vitamina C in vitamina E, se je v zadnjih letih na trgu pojavila nova družina antioksidativnih učinkovin, ki temeljijo na antioksidativnih peptidih in proteinskih hidrolizatih (Xiong, 2010). Za razliko od ne-peptidnih antioksidantov, bioaktivni peptidi v večini primerov kažejo multi-funkcionalno učinkovanje. Poleg antioksidativnega učinkovanja so proteinski hidrolizati potencialno sposobni protimikrobnega, opioidnega, protitumorskega in imunomodulatornega delovanja. Širok nabor funkcionalnih lastnosti vpliva na njihovo uporabnost v različnih industrijah (Agyei in sod., 2016).

Živilska panoga je področje najpogosteje uporabe proteolitičnih encimov in starterskih kultur, ki se uporabijo z namenom encimske hidrolize proteinov, pri čemer nastajajo bioaktivni peptidi (Agyei in sod., 2016). V živilih oksidativni radikali napadajo maščobe in olja, kar je najpogosteji razlog kvara tovrstnih živil. Oksidirani lipidi so pogosto brezbarvni in imajo neprijeten okus po kovini ali žveplu (Coda in sod., 2011), zato so antioksidativni peptidi v živilski industriji uporabni za namene kasnejšega razbarvanja in staranja živil. Vse pogosteje se bioaktivni peptidi omenjajo tudi v kontekstu načrtovanja funkcionalnih živil (Agyei in sod., 2016).

Bioaktivni peptidi se značilno tvorijo tekom mlečnokislinske fermentacije živil živalskega izvora, nezanemarljiv pa je tudi njihov delež v fermentiranih živilih rastlinskega izvora (Pessione in Cirrincione, 2016).

Bioaktivni peptidi imajo ugodne lastnosti, kar vpliva na njihovo uporabnost v kontekstu terapevtskih učinkovin. Njihova tarčna specifičnost, visoka učinkovitost, širok spekter delovanja, nizka toksičnost in majhna molekulska masa, so lastnosti, ki pripomorejo k hitrejši absorbciji in večji učinkovitosti delovanja (Agyei in sod., 2016).

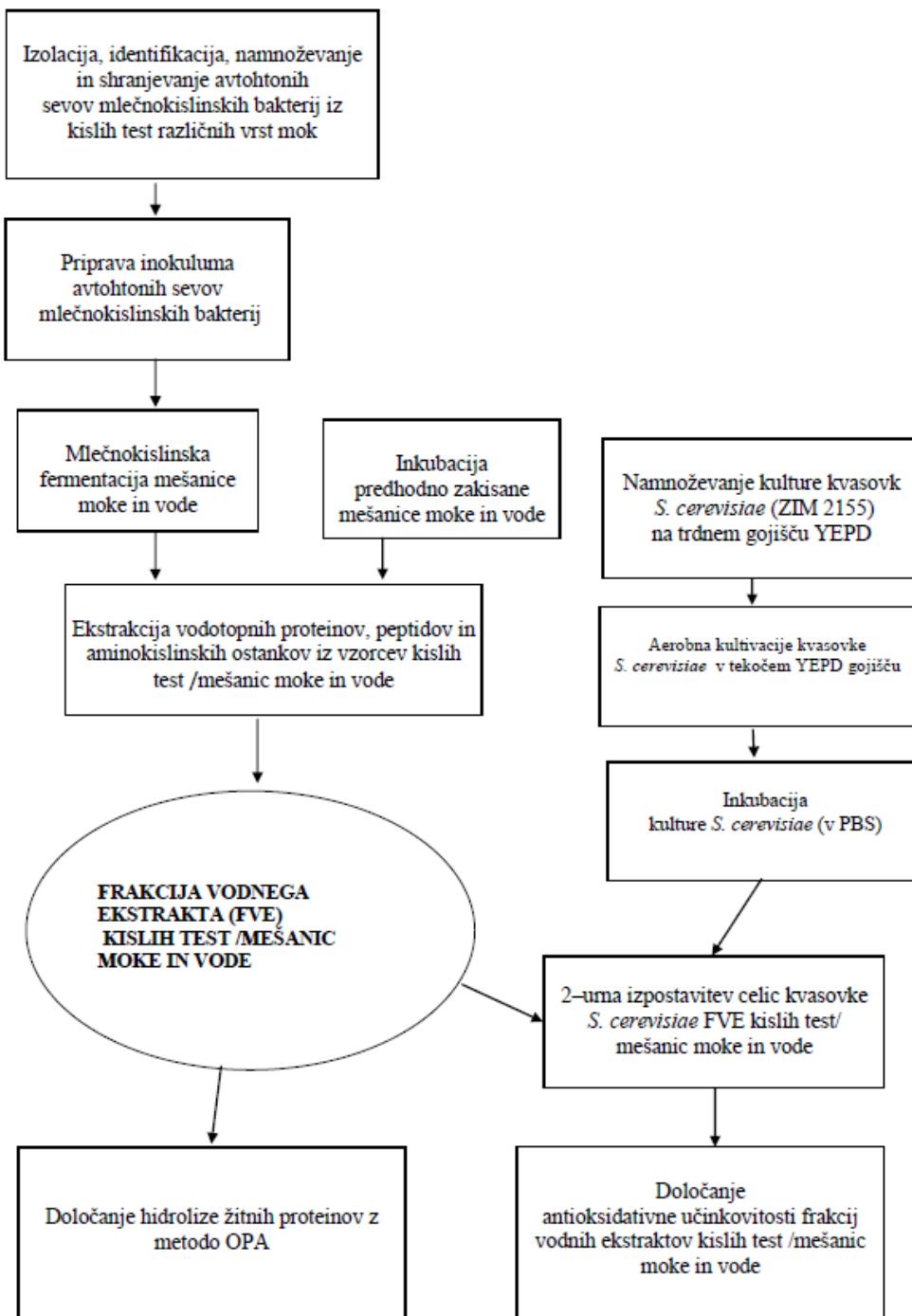
Nekateri bioaktivni peptidi delujejo na zdravje kože, zato so posledično uporabni v kozmetičnih in dermatoloških pripravkih (Agyei in sod., 2016).

Uporaba antioksidantov je pod okriljem regulatornih institucij na nacionalnih nivojih in temelji na sodobnih zakonsko predpisanih podlagah. Kljub temu, da so v uporabi številni sintetični antioksidanti, pa le nekaterim izmed njih pripisujejo status GRAS za uporabo v živilskih proizvodih. Mednarodne korporacije namreč vse večjo pozornost posvečajo ne-sintetičnim antioksidantom, predvsem z ozirom na težnje potrošnikov po uživanju varne in zdrave hrane (Coda in sod., 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA

3.1.1 Potek eksperimenta- shematski prikaz



Slika 1: Potek eksperimenta- shematski prikaz

3.2 MATERIALI

3.2.1 Moke kot vir žitnih proteinov

Za izhodiščni material določanja hidrolize žitnih proteinov tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test in določanja antioksidativne učinkovitosti vodnih ekstraktov kislih test smo uporabili moke ekološko pridelanih žit. Z izjemo amarantove moke, so bile vse moke, uporabljenе v eksperimentih, mlete na mlinskem kamnu podjetja Bio Mlin Stražar d.o.o.

Moke so bile do uporabe hranjene v suhem in hladnem prostoru.

Preglednica 1: Vrste mok uporabljenе v eksperimentih

VRSTA MOKE	PROIZVAJALEC	POREKLO
Bio ovsena moka	Bio Mlin Stražar d.o.o	Kmetijstvo Slovenije
Bio ječmenova moka	Bio Mlin Stražar d.o.o	Kmetijstvo Slovenije
Bio khorosan moka	Bio Mlin Stražar d.o.o	Kmetijstvo Slovenije
Bio pšenična bela moka	Bio Mlin Stražar d.o.o	Kmetijstvo Slovenije
Bio prosena moka	Bio Mlin Stražar d.o.o	Kmetijstvo Slovenije
Bio konopljina moka	Bio Mlin Stražar d.o.o	Kmetijstvo Slovenije
Eko amarant moka	Mok'ca d.o.o	Kmetijstvo izven EU

3.2.2 Avtohtone mlečnokislinske bakterije

Za inokulacijo mešanice moke in vode smo uporabili avtohtone mlečnokislinske bakterije, ki smo jih predhodno izolirali iz vzorcev kislih test posamezne vrste moke, pridobljenih s spontano fermentacijo. Spontana fermentacija je tekla 24 ur na stresalniku (Tehnica Vibromix 403) pri 30 °C in stalnem mešanju pri 150 obr./min.

Preglednica 2: Sestava nastavka za spontano mlečnokislinsko fermentacijo

Sestavina	Količina
Moka	37,5 g
ddH ₂ O	70 mL

3.2.3 Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*

Za določanje antioksidativne učinkovitosti vodnih ekstraktov kislih test smo uporabili celice kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 v stacionarni fazи. Kvasovka vrste *S. cerevisiae* ZIM 2155 izvira iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

3.2.4 Gojišča

3.2.4.1 Trdno gojišče MRS z dodatkom maltoze in cikloheksamida - mMRSAC

Trdno gojišče mMRSAC smo uporabili pri izolaciji avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij.

Preglednica 3: Sestava trdnega gojišča MRS z dodatkom maltoze

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
MRS agar (Merck)	17,05 g	6,8 % (w/v)
D(+)-Maltoza monohidrat (Riedel-deHaën)	2,63 g	1,1 % (w/v)
Dodamo dH ₂ O do 250 mL		

Gojišče smo sterilizirali v parnem sterilizatorju (Sutjeska) 15 min pri 121 °C in tlaku 1,1 bar.

Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na 50 °C. Gojišču smo dodali določen volumen založne raztopine antibiotika cikloheksamid, da smo v gojišču dosegli koncentracijo 100 mg/L. Založno raztopino antibiotika (15 mg/mL) smo predhodno sterilizirali s filtracijo skozi 0,2 µm filter.

Homogeno gojišče mMRSAC smo razlili na petrijeve plošče in jih do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.4.2 Tekoče gojišče MRS z dodatkom maltoze - mMRSB

Gojišče mMRSB smo uporabljali za namnoževanje avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij do pozne eksponentne faze.

Preglednica 4: Sestava tekočega gojišča MRS z dodatkom maltoze

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
MRS bujon (Merck)	5,22 g	5,2 % (w/v)
D(+)-Maltoza monohidrat (Riedel-deHaën)	0,74 g	0,7 % (w/v)
Dodamo dH ₂ O do 100 mL		

Gojišče smo sterilizirali v parnem sterilizatorju (Sutjeska) 15 min pri 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.2.4.3 Trdno gojišče YEPD

Trdno gojišče YEPD smo uporabljali za kultivacijo kvasovk vrste *S. cerevisiae*.

Preglednica 5: Sestava trdnega gojišča YEPD

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
Glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
Kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
Pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
Agar (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
Dodamo dH ₂ O do 1000 mL		

Gojišče smo sterilizirali v parnem sterilizatorju (Sutjeska) 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Sterilizirano gojišče smo ohladili do 50 °C in ga sterilno razlili na petrijeve plošče.

3.2.4.4 Tekoče gojišče YEPD

Tekoče gojišče YEPD smo uporabili za kultivacijo kvasovk vrste *S. cerevisiae* do stacionarne faze rasti.

Preglednica 6: Sestava tekočega gojišča YEPD

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
Glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
Kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
Pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
Agar (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
Dodamo dH ₂ O do 1000 mL		

Gojišče smo sterilizirali v parnem sterilizatorju (Sutjeska) 20 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.2.4.5 Gojišče za določanje proteolitične aktivnosti avtohtonih mlečnokislinskih bakterij

Preglednica 7: Priprava hrnilnega agarja

SESTAVINA	KOLIČINA
Hrnilni agar (Biolife)	2,1 g
dH ₂ O	90 mL

Preglednica 8: Priprava posnetega mleka v prahu

SESTAVINA	KOLIČINA
Posneto mleko v prahu (Pomurske mlekarne)	9 g
dH ₂ O	91 mL

Hranilni agar in posneto mleko v prahu smo ločeno pripravili v infuzijskih steklenicah. Komponenti gojišča smo nato ločeno sterilizirali v parnem sterilizatorju 15 min pri 121 °C in tlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo komponenti gojišča ohladili na 50 °C in jih zmešali v razmerju, ki ga prikazuje preglednica 9.

Preglednica 9: Razmerje komponent v gojišču za določanje proteolitične aktivnosti avtohtonih sevov mlečno-kislinskih bakterij

SESTAVINA	KOLIČINA
Hranilni agar (Preglednica 7)	90 mL
Posneto mleko v prahu (Preglednica 8)	10 mL

Gojišče smo razlili v sterilne petrijevke in ga do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.5 Raztopine in reagenti

3.2.5.1 Fiziološka raztopina

Fiziološko raztopino smo uporabili pri postopku izolacije avtohtonih mlečnokislinskih bakterij, za pripravo matične raztopine kislih test in pripravo redčitev po Kochu.

Preglednica 10: Priprava fiziološke raztopine

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
NaCl	0,9 g	0,9 % (w/v)
Dodamo dH ₂ O do 100 mL		

Fiziološko raztopino smo sterilizirali v parnem sterilizatorju 20 minut pri 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.2.5.2 PBS pufer

PBS pufer smo uporabili:

- pri dvakratnem spiranju namnožene kulture mlečnokislinskih bakterij pred postopkom inokulacije moke in vode (priprava kislega testa),
- za vzdrževanje kulture kvasovk *S. cerevisiae* v stacionarni fazи.

Preglednica 11: Sestava PBS pufra

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
Natrijev klorid (NaCl)	0,8 g	0,8 % (w/v)
Kalijev klorid (KCl)	0,2 g	0,2 % (w/v)
Di-natrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4)	1,15 g	1,15 % (w/v)
Kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)	0,2 g	0,2 % (w/v)
Dodamo dH_2O do 100 mL		

PBS pufer smo pripravljali z raztplavljanjem ene tabletke PBS (Oxoid) v 100 mL bidestilirane vode, pri čemer smo dobili sestavo pufra, ki je prikazana v preglednici 11. PBS pufer smo pred uporabo sterilizirali v parnem sterilizatorju 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar.

3.2.5.3 50 mM Kalijev fosfatni pufer (pH 7,8)

50 mM kalijev-fosfatni pufer sestavlja kislá (KH_2PO_4) in bazična (K_2HPO_4) raztopina. Komponeti smo pripravili ločeno, nato pa jih zmešali v določenem razmerju, tako da smo vrednost pH kalijevega-fosfatnega pufra umerili na pH 7,8.

Pufer smo uporabljali pri določanju antioksidativne učinkovitosti.

Preglednica 12: Sestava 50mM K_2HPO_4

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
K_2HPO_4 (Sigma Aldrich)	4,35 g	0,87 % (w/v)
Dodamo ddH_2O do 500 mL		

Preglednica 13: Sestava 50 mM KH_2PO_4

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
KH_2PO_4 (Sigma)	3,40 g	0,68 % (w/v)
Dodamo ddH_2O do 500 mL		

3.2.5.4 100 mM Natrijev tetraboratni pufer ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

100 mM Natrijev tetraboratni pufer smo uporabljali pri pripravi reakcijskega reagenta OPA pri določanju hidrolize žitnih proteinov.

Preglednica 14: Sestava 100 mM Na-tetraboratnega pufra

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ (Sigma)	3,81 g	3,8 % (w/v)
Dodamo ddH_2O do 100 mL		

3.2.5.5 Shranjevanje izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij

Po kultivaciji avtohtonega seva mlečnokislinskih bakterij do pozne eksponentne faze (12 ur pri 30 °C in mešanju 150 obr./min) v mMRSB smo kulturo razporedili v Eppendorf centrifugirke, dodali 100 % glicerol (Preglednica 15) in jo zamrznili v tekočem dušiku.

Preglednica 15: Zamrzovanje avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij

SESTAVINA	VOLUMEN
Namnožena kultura avtohtone mlečnokislinske bakterije	800 µL
100 % glicerol	200 µL

Po zamrzovanju v tekočem dušiku smo kulture do uporabe shranili v zamrzovalni skrinji pri -80 °C.

3.2.5.6 Katalazni test

Za izvedbo katalaznega testa smo pripravili 5 % raztopino H₂O₂.

3.2.5.7 Določanje hidrolize žitnih proteinov tekom mlečnokislinske fermentacije

Hidrolizo žitnih proteinov smo določali s spektrofotometrično metodo OPA.

Preglednica 16: Priprava reagenta OPA

SESTAVINA	KOLIČINA	KONČNA KONCENTRACIJA
100 mM Natrijev-tetraboratni pufer	5 mL	50 % (v/v)
20 % (w/v) Natrijev dodecil sulfat	0,5 mL	5 % (v/v)
β-merkapto etanol (Sigma)	20 µL	0,2 % (v/v)
8 mg o-ftalaldehyda (Sigma) v 200 µL metanola (Merck)	200 µL	20 % (v/v)
Dodamo ddH ₂ O do 10 mL		

Reagent OPA smo pripravili neposredno pred uporabo (Preglednica 16). Hranili smo ga na ledu v temi.

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili goveji serumski albumin BSA (Molecular Sigma biology) in pripravili raztopine v sledečih koncentracijah: 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2500, 3000, 3500 µg/mL.

3.2.6 Aparature in naprave

3.2.6.1 Priprava gojišč, raztopin in reagentov in steklovine

- Tehnica PS 1200/C/2 (Radwag)
- Magnetno mešalo (Tehnica)
- Parni sterilizator (Sutjeska)
- pH meter (Mettler Toledo SevenEasy)
- Tehnica (Sartorius)
- pipete (Eppendorf Research plus)
- 0,45 µm filter (MINISART RC Sartorius Hydrophilic)
- ultracentrifugirke (Amicon Ultra MILLIPORE)

3.2.6.2 Mlečnokislinska fermentacija kislih test

- Brezprašna komora LFVP 15 (Iskra Pio)
- Tehnica (Sartorius)
- Digestorij
- Stresalnik Vibromix 403 (Tehnica)

3.2.6.3 Izolacija in shranjevanje avtohtonih mlečnokislinskih bakterij

- Stresalnik Vibromix 403 (Tehnica)
- Brezprašna komora LFVP122 (Pio)
- Zamrzovalna skrinja (Heto ULTRA FREEZE)
- Lonec za tekoči dušik
- Toplotna komora (Kambič)
- Anaerobni lonec (Oxoid)

3.2.6.4 Spiranje avtohtone mikroflore

- Centrifuga CENTRIC 200 (Tehnica)
- Vortex TTS 2 (Yellow line)
- Spektrofotometer MA 9510 (Iskra)

3.2.6.5 Določanje proteolitične aktivnosti izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij

- Laminarij LFVP122 (Pio)
- Komora 37 °C (Kambič)

3.2.6.6 Določanje suhe mase kislih test

- Tehnica (Sartorius)
- Sušilnik 105 °C

3.2.6.7 Ekstrakcija vodotopnih peptidnih komponent iz vzorcev kislih test

- Tehnica PS1200 C/2 (Radwag)
- Hladilnik 4 °C
- Centrifuga s hlajenjem (Sigma)

3.2.6.8 Določanje hidrolize žitnih proteinov tekom mlečnokislinske fermetacije

- Čitalec Safire² (Tecan)

3.2.6.9 Določanje antioksidativne učinkovitosti vodnih ekstraktov kislih test

- Spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- Stresalnik Multitron (Infors HT)
- Komora IG150 (Jouan)
- Centrifuga Centric 322A (Tehnica)
- Brezprašna komora LFVP122 (Pio)
- Čitalec Safire² (Tecan)

3.2.6.10 Shranjevanje gojišč, raztopin, vzorcev in reagentov

- Hladilnik 4 °C
- Hladilnik -20 °C (LTH)
- Hladilna skrinja -80 °C (Heto ULTRA FREEZE)

3.3. METODE DELA

3.3.1 Izolacija, identifikacija, namnoževanje in shranjevanje avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij iz kislega testa po spontani fermentaciji

3.3.1.1 Izolacija avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij kislega testa po spontani fermentaciji

V sterilne 250-mL infuzijske steklenice smo natehtali 37,5 g posamezne vrste moke in ji dodali 70 mL sterilne bidestilirane vode. Stekleničke smo postavili na stresalnik in jih 24 ur stresali pri 150 obr./min in temperaturi 30 °C. Pri danih pogojih je stekla spontana fermentacija kislega testa.

Po 24 urah smo v demetrijevih stekleničkah pripravili matično raztopino, tako da smo aseptično odvzeli 10 g kislega testa in ga dodali k 90 mL sterilne fiziološke raztopine. Sledila je priprava redčitvene vrste po Kochu. Po 10 µL posamezne redčitve (10^{-2} do 10^{-6}) smo nacepili na trdna MRS gojišča z dodatkom maltoze in cikloheksamida (mMRSAC). Nacepljene plošče smo inkubirali v anaerobnem loncu v inkubatorju pri 30 °C 24 ur.

Zrasle kulture smo v nadalnjem koraku precepili do posameznih kolonij (čista kultura) na mMRSAC gojišča in jih pri enakih pogojih inkubirali 24 ur.

3.3.1.2 Katalazni test

Za pripravo katalaznega testa smo na objektno stekelce s kapalko nanesli 5-% H₂O₂. S plastično ezo smo zajeli delec kolonije mlečnokislinskih bakterij in ga prenesli na objektno stekelce, tako da bakterije pridejo v stik s 5-% H₂O₂. Opazovali smo potek reakcije. Če reakcija steče burno (se pojavi mehurčki), je kultura katalaza-pozitivna, v nasprotnem primeru (ni mehurčkov) pa so bakterije katalaza-negativne, torej bakterije ne vsebujejo encima katalaze, ki bi dodani H₂O₂ razgradil do H₂O in O₂.

3.3.1.3 Namnoževanje in shranjevanje avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij

Eno kolonijo mlečnokislinskih bakterij (točka 3.3.1.1) smo prenesli v 20 mL tekočega gojišča mMRSB (Preglednica 4). V aerobnih pogojih smo kulturo stresali pri 150 obr./min do pozne eksponentne faze, tj. 12 ur pri 30 °C. Uspešnost rasti kulture smo ugotavljali spektrofotometrično z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm (OD₆₅₀). Spektrofotometer smo predhodno umerili z neinokuliranim gojiščem mMRSB.

800 µL kulture v pozni eksponentni fazi smo razporedili v sterilne 2 mL-Eppendorf centrifugirke. Za uspešno zamrzovanje smo dodali 200 µL 100 % sterilnega glicerola. Centrifugirke smo temeljito premešali na vrtinčniku, nato pa smo jih zamrznili v tekočem dušiku. Zamrznjeno kulturo smo do uporabe hranili v zamrzovalni skrinji pri -80 °C.

3.3.1.4 Določanje proteolitične aktivnosti izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij

Z namenom določitve proteolitične aktivnosti izoliranih sevov avtohtonih mlečnokislinskih bakterij smo naredili hiter kvalitativen test na trdnem gojišču.

V gojišča (Preglednica 9) smo s sterilno slamico naredili vdolbinici. V eno izmed vdolbin smo inokulirali $50 \mu\text{L}$ namnožene kulture avtohtonega seva mlečnokislinskih bakterij v pozni eksponentni fazi. Druge vdolbine nam je služila kot negativna kontrola. Plošče smo inkubirali pri 37°C .

Po zaključeni inkubaciji smo opazovali cono zbistrivte okoli vdolbine, kamor smo inokulirali kulturo mlečnokislinskih bakterij. Pojav bistre cone okrog vdolbine ponazarja proteolitično aktivnost izoliranega seva v nasprotju z ne-inokulirano vdolbino, kjer se cona zbistrivte ni pojavila.

3.3.1.5 Identifikacija izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij s sekvenciranjem gena 16S rDNA

Identifikacija izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij je potekala v sodelovanju z Inštitutom za mlekarstvo in probiotike Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Avtohtonim sevom mlečno-kislinskih bakterij je bila izolirana DNA molekula z uporabo kompleta »Wizard® Genomic DNA Purification kit«. Prečiščeni pomnožki 16S rDNA so bili poslani podjetju Microsynth, kjer so določili njihovo nukleotidno zaporedje. Za določitev identitete mikroorganizma so bila dobljena zaporedja primerjana z zaporedji genske banke NCBI (ang: National Center for Biotechnology Information) s pomočjo programa BLAST (ang: The Basic Local Alignment Search Tool).

3.3.2 Mlečnokislinska fermentacija mešanice moke in vode z inokulirano kulturo avtohtone mlečnokislinske bakterije

3.3.2.1 Priprava inokuluma avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij

$50 \mu\text{L}$ izolirane kulture mlečnokislinskih bakterij smo inokulirali v 20 mL sterilnega gojišča mMRSB. Inokulirano gojišče smo v aerobnih pogojih inkubirali 12 ur na stresalniku pri 30°C s stresanjem pri 150 obr./min.

Uspešnost namnoževanja smo določali s spektrofotometričnim merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm . V sterilno 2- mL Eppendorf centrifugirko smo prenesli 1 mL namnožene kulture avtohtone mlečnokislinske bakterije v pozni eksponentni fazi rasti. Kulturo smo centrifugirali 5 minut pri 12000 obr./min. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 1 mL sterilnega PBS pufra. Eppendorf centrifugirko smo ponovno centrifugirali 5 min pri 12000 obr./min, odstranili supernatant

in peletu dodali 1 mL sterilnega PBS pufra. Celice smo resuspendirali in jih dobro premešali na vrtinčniku.

3.3.2.2 Mlečnokislinska fermentacija mešanice moke in vode

V sterilne 250- mL-infuzijske stekleničke smo natehtali 37,5 g moke. V brezprašni komori smo moki dodali 69 mL sterilne bidestilirane vode. Mešanico moke in vode smo nato inokulirali z 1 mL namnožene kulture izoliranega avtohtonega seva mlečnokislinskih bakterij v PBS. Inokulirano mešanico moke, bidestilirane vode in mlečnokislinskih bakterij smo dobro premešali in zatesnili. Infuzijske stekleničke smo prenesli na stresalnik z mešanjem pri 150 obr./min in temperaturi 30 °C za 12 oz. 24 ur.

3.3.2.3 Inkubacija predhodno zakisane mešanice moke in vode

Pripravili smo mešanico 90 % mlečne kisline in 98 % ocetne kisline, v razmerju 4:1.

V sterilnih pogojih smo v infuzijske stekleničke natehtali 37,5 g posamezne vrste moke in ji dodali 70 mL sterilne bidestilirane vode. Mešanico moke in vode smo zakisali z mešanico mlečne in ocetne kisline tako, da je bila končna vrednost pH mešanic med pH 3,5 in 4,5. Vrednost pH smo določali s pH metrom.

Mešanici moke in vode smo dodali tudi antibiotik eritromicin, s čimer smo preprečili delovanje bakterij avtohtone mikroflore. Infuzijske stekleničke smo prenesli na stresalnik s stalnim mešanjem pri 150 obr./min in temperaturi 30 °C za 24 ur.

Morebitno prisotnost bakterij avtohtone mikroflore v predhodno zakisanih testih smo preverjali z inokulacijo trdnih gojišč mMRSAC. Plošče smo inkubirali v inkubatorju 24 ur, pri 30 °C ob anaerobnih pogojih.

3.3.3 Merjenje vrednosti pH kislih test

Med fermentacijo v določenih časih (0, 12 ali 24 ur) smo v čaše natehtali 30 g kislega testa posameznega vzorca in mu dodali 10 g bidestilirane vode. Merjenje vrednosti pH smo opravili s pH metrom.

3.3.4 Določanje hidrolize žitnih proteinov med mlečnokislinsko fermentacijo kislega testa

3.3.4.1 Ekstrakcija vodotopnih proteinov, peptidov in aminokislinskih ostankov iz vzorcev kislih test

Po določenih časih fermentacije (0, 12 in 24 ur) smo izvedli ekstrakcijo vodotopnih proteinov, peptidov in aminokislinskih ostankov iz vzorcev kislih test. V 50-mL plastične epruvete - falkonke smo zatehtali 5 g kislega testa in mu dodali 7,5 mL bidestilirane vode.

Plastične epruvete - falkonke smo pretresli in jih 60 minut inkubirali v hladilniku pri 4 °C. Da bi bila ekstrakcija vodotopnih proteinov, peptidov in aminokislin še učinkovitejša, smo falkonke temeljito pretresli vsakih 15 minut tekom inkubacije.

Po inkubaciji smo plastične epruvete - falkonke centrifugirali v centrifugi s hlajenjem (4 °C) pri 20000 g, 20 minut. Po zaključenem centrifugiranju smo odvzeli supernatant in ga filtrirali skozi 0,45 µm filter. 3,5 mL filtrata smo nato prestavili v ultra-centrifugirke (MWCO 10 kDa). Sledilo je 30- minutno centrifugiranje v centrifugi s hlajenjem pri 7500 g.

Dobljeni filtrat (FVE) smo uporabili v nadaljnjem določanju hidrolize žitnih proteinov in za določanje antioksidativne učinkovitosti.

3.3.4.2 Določanje hidrolize žitnih proteinov z metodo OPA

V Eppendorf centrifugirkah smo pripravili reakcijsko mešanico. 20 µL vodnega ekstrakta kislega testa, dobljenih po ultrafiltraciji, smo zmešali s 400 µL OPA reagenta (Preglednica 16). Reakcijsko mešanico smo dobro premešali in jo inkubirali v temi 2 minuti. 200 µL reakcijske mešanice smo v nadalnjem koraku prenesli na črno mikrotitersko ploščico in na čitalcu pomerili fluorescenco. Valovna dolžina vzbujanja je bila 360 nm, valovna dolžina emisije pa 460 nm.

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili goveji serumski albumin BSA v sledečih koncentracijah: 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2500, 3000, 3500 ug/mL. Posamezne raztopine smo zmešali z reagentom OPA v razmerju 1:20 in izmerili fluorescenco pri vzbujevalni svetlobi 360 nm in valovni dolžini emisije 460 nm. Z dobljenimi rezultati smo pripravili umeritveno krivuljo - fluorescensa v odvisnosti od koncentracije govejega serumskega albumina (BSA).

S pomočjo enačbe umeritvene krivulje (Priloga C št 4) smo izračunali vsebnost amino skupin v vzorcih kislih test.

Rezultate preoteolitične aktivnosti kislih test smo izrazili v vsebnosti amino skupin glede na suho maso kislega testa (Priloga B), uporabljenega za ekstrakcijo in jih prikazali kot relativni prirast amino skupin glede na čas fermentacije 0 ur.

Za določanje suhe mase kislega testa smo uporabljali lončke, narejene iz alu-folije. V lončke smo natehtali določeno količino redčenega kislega testa po zaključeni ekstrakciji vodotopnih aminov vzorcev KT in jih sušili v sušilniku 180 minut pri temperaturi 105 °C. Po zaključenem sušenju smo alu lončke prenesli v eksikator in določili maso kislega testa po sušenju.

3.3.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti frakcij vodnih ekstraktov kislih test

Za določanje znotrajcelične oksidacije smo 10 mL suspenzije kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v pufru PBS izpostavili 50 µL frakcij vodnega ekstrakta (FVE) kislih test. Inkubacija je potekala 120 minut na stresalniku pri konstantni temperaturi 28 °C in mešanju 220 obr./min.

Po zaključenem tretiranju je sledilo centrifugiranje pri 4000 obr./min, 5 min in 1x spiranje biomase s 50 mM kalijevim-fosfatnim pufrom. Po zaključku centrifugiranja smo ponovno odstranili supernatant in celični pelet resuspendirali v 5 mL sterilnega 50 mM kalijevega-fosfatnega pufra.

V nadalnjem koraku smo suspenzijo kvasovk 10 minut inkubirali pri 28 °C v inkubatorju. Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovk smo določili z barvilm 2'7'-diklorodihidrofluorescein (H₂DCF). Suspenziji kvasovk smo dodali 50 µL barvila v nepolarni obliki kot 2'7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA), ki prehaja skozi celično membrano kvasovk (Jakubowski in sod., 2000). Suspenzijo kvasovk z dodatkom barvila smo 15 minut inkubirali na stresalniku v temi pri 220 obr./min in temperaturi 28 °C.

Po zaključku inkubacije smo po 200 µL posameznega vzorca v dveh paralelkah prenesli na črno mikrotitersko ploščo in merili fluorescenco 120 minut (30 minutni interval) pri vzbujevalni svetlobi 488 nm in emisijski svetobi 520 nm.

Meritve smo izvajali v dveh bioloških ponovitvah, obe biološki ponovitvi pa smo izvedli v dveh tehničnih ponovitvah. Dobljene vrednosti fluorescence smo podali kot povprečne vrednosti vseh meritev. Povprečne vrednosti smo normalizirali s povprečno vrednostjo optične gostote (OD₆₅₀) in jih izrazili kot relativne vrednosti znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* glede na kontrolo (netretirana kultura) (Priloga F).

3.3.6 Statistična analiza rezultatov

3.3.6.1 Povprečna vrednost

Rezultate meritev znotraj posamezne metode smo podali kot povprečne vrednosti vseh meritev, na način, ki ga prikazuje enačba 1 (Košmelj, 2007)

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

\bar{x}povprečna vrednost

n.....število vrednosti

x.....vrednost i-te meritve

3.3.6.2 Standardni odklon

Variabilnost rezultatov smo ocenili z vrednostmi standardnega odklona aritmetične sredine (SD), ki smo ga izračunali s pomočjo enačbe 2.

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

s.....standardni odklon

n.....število meritev

x.....vrednost i-te meritve

\bar{x}povprečna vrednost

3.3.6.3 Statistična značilnost rezultatov meritev

S Studentovo t-porazdelitijo smo preverili domneve o enakosti dveh povprečij. Razlika med aritmetičnima sredinama je bila statistično značilna, če je bila vrednost $p \leq 0,05$ (Košmelj, 2007). t-test smo izvedli s programom Origin 6.1.

3.3.6.4 Duncan test

Statistično značilne razlike med različnimi vzorci tretiranj s FVE kislih test (0 h, 12 h in 24 h) za posamezno moko smo ugotavljali z Duncanovim testom mnogoterih primerjav s 95-% intervalom zaupanja.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

V okviru eksperimentalnega dela smo pozornost usmerjali v preučevanje proteolitične razgradnje proteinov različnih vrst mok med fermentacijo kislega testa. V prvem sklopu raziskovalnega dela smo izolirali mlečnokislinske bakterije avtohtone mikroflore kislih test (KT), pripravljenih s spontano fermentacijo različnih vrst mok (amarantova moka, kamutova moka - khorasan, ovsena moka, ječmenova moka, prosena moka, konopljina moka in pšenična moka tip 500). Karakteristike izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij (MKB) smo določili z nekaterimi kvalitativnimi testi in jih identificirali.

Celokupna hidroliza proteinov mok tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test je posledica delovanja endogenih žitnih proteinaz v kislem okolju in peptidaz bakterijskega metabolizma. Da bi preverili hidrolizo žitnih proteinov tekom mlečnokislinske fermentacije KT, smo pripravili mešanice moke in vode in jih inokulirali z izoliranimi avtohtonimi sevi MKB, s čimer smo pospešili proces mlečnokislinske fermentacije (MKF) kislega testa. Proteolizo žitnih proteinov smo določali v treh časovnih točkah (0 h, 12 h in 24 h) fermentacije in jo primerjali s hidrolizo proteinov predhodno zakisanih mešanic moke in vode. Tako smo ocenili doprinos proteolitične aktivnosti MKB.

Frakcijam vodnih ekstraktov (FVE) fermentiranih in nefermentiranih vzorcev kislih test smo določali tudi antioksidativno učinkovitost posredno preko merjenja znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA SEVOV MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ AVTOHTONE MIKROFLORE KISLEGA TESTA

Kislo testo je mešanica moke in vode, v katerem prevladujejo metabolno aktivne mlečnokislinske bakterije in kvasovke v razmerju 100:1 (Iacumin in sod., 2009). Z mikrobiološkega vidika je kislo testo kompleksen ekosistem, kjer sposobnost preživetja mikroorganizmom omejujejo nizek pH, visoke koncentracije ogljikovih hidratov in nizka vsebnost kisika (De Vuyst in sod., 2013). Na biodiverzitetu mikroorganizmov v kislem testu neposredno vpliva sestava avtohtone mikroflore žitnih zrn in mok. Ta je odvisna od številnih dejavnikov, kot npr. okolja in podnebja v katerem rastlina raste in načina obdelave ter shranjevanja žita in moke. Ti dejavniki vplivajo na vsebnost in kakovost hrani v žitnem zrnu, hraniila pa neposredno določajo okolje v katerem prevladajo najbolje prilagojene vrste mikroorganizmov (Coda in sod., 2014).

V prvem sklopu magistrskega dela smo izolirali mlečnokislinske bakterije avtohtone mikroflore kislih test, ki smo jih pripravili s spontano fermentacijo mešanic različnih vrst moke in vode. Po pridobitvi čiste kulture avtohtonih mlečnokislinskih bakterij kislih test smo izvedli kvalitativna testa: katalazni test in preverjanje proteolitične aktivnosti (Preglednica 17).

Preglednica 17: Karakteristike izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij

VRSTA MOKE	Avtohtoni sev mlečnokislinskih bakterij	Katalazni test	Proteolitična Aktivnost
Ovsena moka	Sev 1	Negativen	+
Prosena moka	Sev 2	Negativen	+
Kamutova moka	Sev 3	Negativen	+
Pšenična moka tip 500	Sev 4	Negativen	+
Ječmenova moka	Sev 5	Negativen	+
Konopljina moka	Sev 6	Negativen	+
Amarantova moka	Sev 7	Negativen	+

Pri katalaznem testu smo vsem izoliranim sevom določili negativno reakcijo, saj v nobenem primeru ni prišlo do vidnega poteka reakcije. Mlečnokislinske bakterije so po Gramu pozitivne, nesporulirajoče, katalaza-negativne bakterije s fermentativnim metabolizmom (Savijoki in sod., 2006). Prevladujoče vrste MKB kislega testa so heterofermentativne bakterije rodu *Lactobacillus*, pogosto pa avtohtonu mikrofloro kislih test tvorijo tudi bakterije rodov *Lactococcus*, *Weissella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* in *Streptococcus* (Corsetti in Settanni, 2007).

Izoliranim sevom KT smo s hitrim kvalitativnim testom določili zmožnost proteolitične aktivnosti na trdnem gojišču s posnetega mleka (Preglednica 17). Po inkubaciji izoliranih sevov avtohtonih mikroflor smo v primeru vseh vzorcev zaznali cono zbistritve, s čimer lahko sklepamo na sposobnost proteolitične aktivnosti izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij. Glede na rezultate delne fenotipske karakterizacije sevov bakterij avtohtonih mikroflor domnevamo, da izolirane seve lahko uvrstimo v skupino mlečnokislinskih bakterij.

Številne mlečnokislinske bakterije imajo podobne prehranske in rastne zahteve, zato je identifikacija MKB z biokemijskimi metodami pogosto težka in nezanesljiva (Moraes in sod., 2013). Moderni koncept določanja vrst temelji na genetskih razlikah, zato med najpogosteje uporabljeni tehnike določanja vrst mlečnokislinskih bakterij sodi sekvenciranje 16S rDNA regije, pri čemer velja, da so pripadniki iste vrste osebki, ki imajo značilno ohranjeno zaporedje in nizko variabilnost v tej regiji. Dokončno identifikacijo sevov smo izvedli v sodelovanju z Inštitutom za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Izolirana DNA molekula avtohtonih sevov MKB je služila kot matrica za PCR pomnoževanje segmenta 16S rDNA. Prečiščeni pomnožki so bili poslali podjetju Microsynth, kjer so določili nukleotidno zaporedje. Dobljena zaporedja so primerjali z zaporedji v genski banki NCBI (ang: National Center for Biotechnology Information) s pomočjo programa BLAST (ang: The Basic Local Alignment Search Tool) in na podlagi primerjave identificirali avtohtoni sev MKB. Rezultate identifikacije prikazuje preglednica 18.

Preglednica 18: Sevi mlečnokislinskih bakterij identificirani s sekvenciranjem 16S rDNA

VRSTA MOKE	REZULTAT IDENTIFIKACIJE S SEKVENCIRANJEM 16S rDNA
Ovsena moka	<i>Weissella confusa</i>
Prosena moka	<i>Weissella confusa</i>
Kamutova moka	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Pšenična moka tip 500	<i>Weissella confusa</i>
Ječmenova moka	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Konopljina moka	<i>Weissella confusa</i>
Amarantova moka	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

V splošnem mikrobioto mok pogosto sestavlja širok nabor avtohtonih mikroorganizmov, ki poleg grampozitivnih MKB, bakterij iz rodov *Pseudomonas* sp.in *Bacillus* sp., zajema tudi druge aerobne bakterije, kvasovke in plesni. Z dodatkom vode k moki redoks potencial testa upade, zaradi česar se poveča intenzivnost razmnoževanja fakultativnim anaerobnim mikroorganizmom (kvasovke in *Enterobacteriaceae*) in MKB (Minervini in sod., 2014). Ključne lastnosti metabolizma, ki pripomorejo k prednosti bakterijske kulture tekom mlečnokislinske fermentacije kislega testa, so: sposobnost katabolizma maltoze, tvorba eksopolisaharidov, uporaba alternativnih končnih prejemnikov elektronov in toleranca na nizek pH (Gänzle in Ripari, 2016). Mlečnokislinske bakterije so prilagojene na katabolizem mono- in di-saharidov, kar vodi v sintezo mlečne in acetne kisline in posledično pride do zakisanja mešanice moke in vode (Minervini in sod., 2014).

V kislih testih pogosto prevladujejo fakultativni in obligativni heterotrofni laktobacili, kot npr: *Lactobacillus. plantarum*, *Lactobacillus alimentarius*, *L. sanfranciscensis*, *L. pontis*, *L. brevis* in *L. reuteri* (Coda in sod., 2014). Poleg dobro poznanih skupin laktobacilov različni viri poročajo tudi o identifikaciji drugih bakterijskih vrst iz skupine MKB: *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus equinus*, *Weissella viridescens*, *Weissella confusa* idr. (Corsetti in sod., 2007).

Prrevladujoči avtohtoni mlečnokislinski bakterijski sevi KT, pripravljenih iz ovsene, prosene, pšenične in konopljine moke, so bili identificirani kot bakterije vrste *Weissella confusa*. Mlečnokislinske bakterije vrste *Weissella confusa* (sinonimno ime- *Lactobacillus confusus*) so po Gramu pozitivne, katalaza negativne, nesporulirajoče bakterije z deloma kokoidno in paličasto obliko celic. Uvrščamo jih v red Lactobacillales in družino Leuconostocaceae (Fusco in sod., 2015). Najpogosteje pa je bakterijo mogoče najti v fermentiranih živilih, zlasti v zelenjavi in žitih (Amari in sod., 2012).

Zrna žit so kontaminirana s številnimi evkariontskimi in prokariontskimi organizmi, ki se zlahka ohranajo skozi vse faze procesiranja žitnega zrna, zato jih je mogoče zaslediti tudi v kislih testih. Mikrobiološka diverziteta kislih testov je odvisna od tipa priprave kislega testa. Corsetti in sod. (2007) navajajo, da vrste enterokokov, pediokokov in redke vrste laktobacilov pogosteje najdemo v sveži pripravljenih kislih testih, v zrelih in mikrobiološko stabilnih KT pa v večini primerov prevladajo MKB rodu *Lactobacillus*. V okviru raziskave smo preučevali sveži pripravljeni kisla testa, zato ni presenetljivo, da smo v primeru identifikacije avtohtonih sevov amarantovega, ječmenovega in kamutovega kislega testa identificirali fakultativne heterofermentativne bakterije vrste *Pediococcus pentosaceus*. Za omenjene je značilna kroglasta oblika celic (Celano in sod., 2016). V zrelih KT pripomorejo k hitremu zakisanju testa, najpogosteje pa so del t.i. dopolnilne mikroflore, zlasti v primerih, kjer prevladujeta kvasovka *S. cerevisiae* in MKB *L. sanfranciscensis* (Corsetti in sod., 2007).

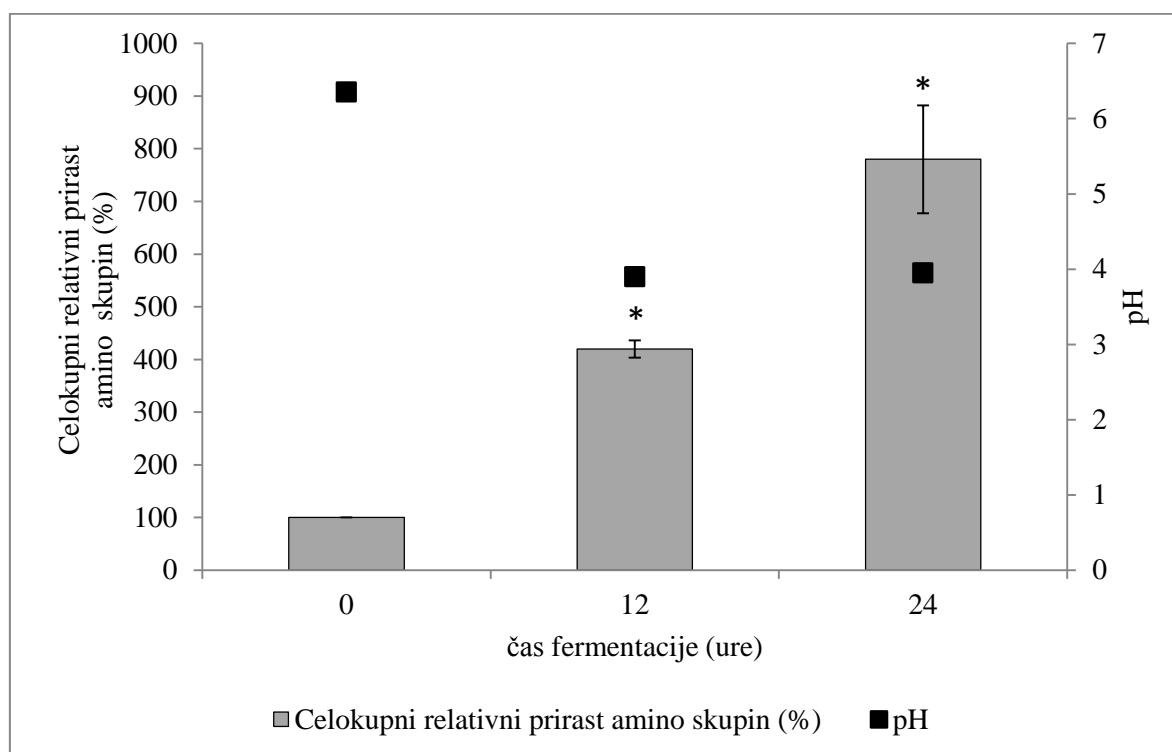
4.2 HIDROLIZA ŽITNIH PROTEINOV TEKOM MLEČNOKISLINSKE FERMENTACIJE KISLIH TEST V ODDISNOSTI OD ČASA

Med mlečnokislinsko fermentacijo KT potečejo številne encimske reakcije in pretvorbe bakterijskega metabolizma, ki med seboj delujejo soodvisno. Zakisanje, poraba kisika in akumulacija nizko molekularnih tiolnih spojin v kislem testu so posledice metabolizma mlečnokislinskih bakterij, ki neposredno pozitivno vplivajo na aktivnost endogenih žitnih proteinaz (Gänzle, 2014). Zakisanje kislega testa vzpostavi optimalno pH okolje za potek primarne proteolize (proteini do peptidov), ki je posledica delovanja žitnih aspartatnih proteinaz. Primarni proteolizi sledi privzem peptidov z mlečnokislinskimi bakterijami in njihova nadaljnja hidroliza z znotrajceličnimi peptidazami (Coda in sod., 2014).

Tekom raziskovalnega dela smo spremljali celokupno hidrolizo žitnih proteinov mlečnokislinske fermentacije KT v odvisnosti od časa, ki je odvisna od aktivnosti endogenih žitnih proteinaz in proteolitičnih encimov mlečnokislinskih bakterij. Številne študije kažejo, da je antioksidativna učinkovitost pogosto posledica mikrobne razgradnje proteinov med fermentacijo kislih testov (Hur in sod., 2014). Kisla testa smo vzorčili pred fermentacijo, po 12-urni in 24-urni fermentaciji. Po zaključeni fermentaciji smo pripravili vodne ekstrakte kislih testov, ki smo jih filtrirali s centrifugiranjem preko 10 kDa-filtra. S tem smo za potrebe nadaljnje analize iz ekstrakta kislega testa izločili molekule večje od 10 kDa. Znano je namreč, da pri bioaktivnih peptidih z opaženim antioksidativnim delovanjem najpogosteje zasledimo peptide z molekulsko maso manjšo od 5 kDa (Xiong, 2010).

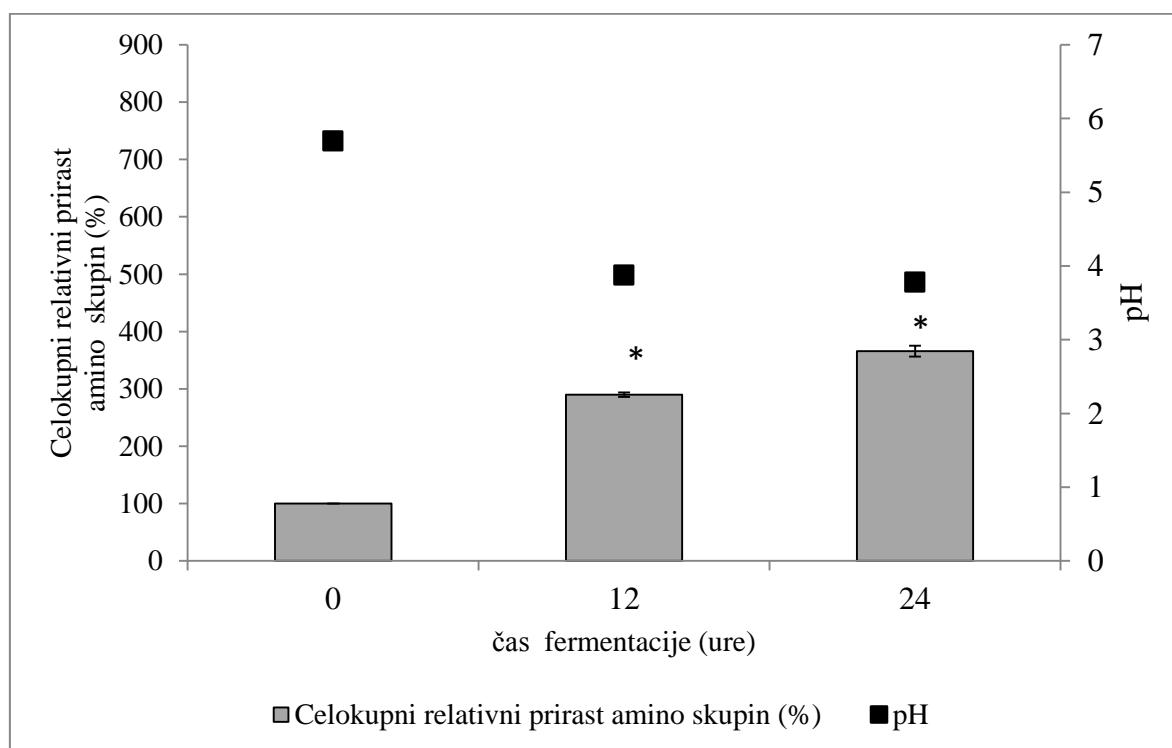
Proteolitično aktivnost KT smo spremljali s spektrofotometrično metodo OPA, ki temelji na reakciji orto-ftalaldehida (OPA) in β-mercaptopetanola s primarnimi amini pri vrednosti pH 10,5 (Dorresteijn in sod., 1996).

Rezultati na slikah 3-8 prikazujejo spremembo vrednosti pH v odvisnosti od časa fermentacije in celokupno hidrolizo proteinov mok (endogeni žitni encimi + encimi MKB), ki je prikazana kot relativni prirast amino skupin posameznih vrst KT glede na čas 0 ur.

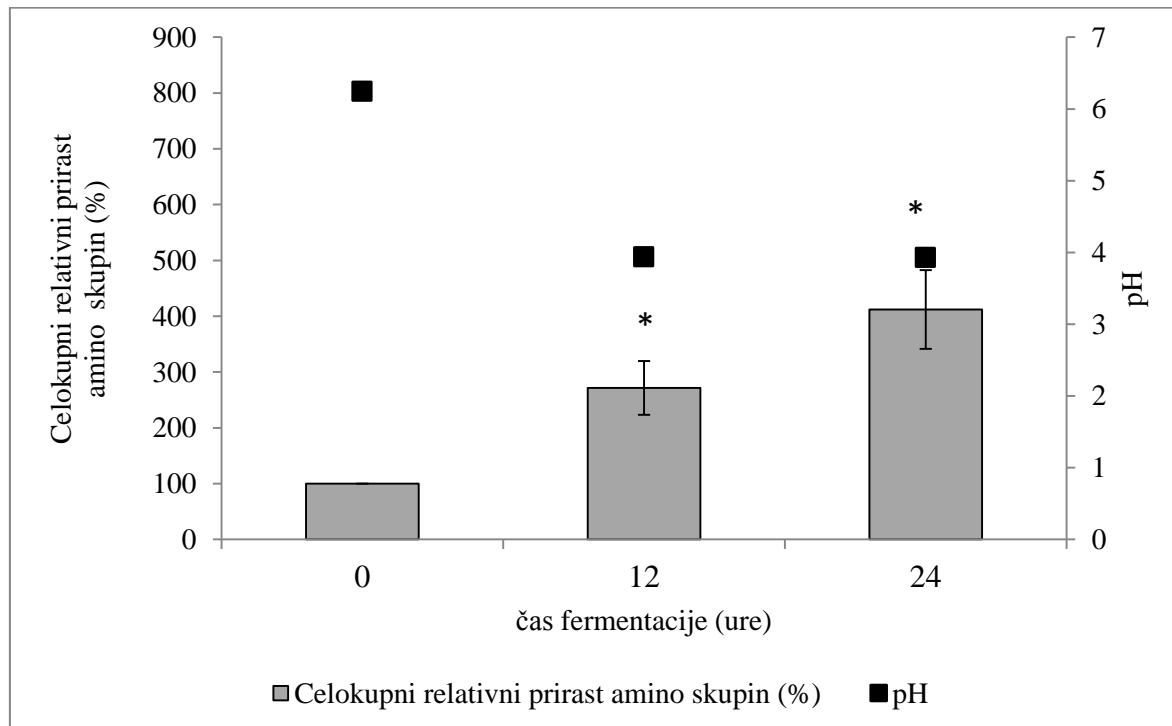


Slika 3: Celokupni relativni prirast amino skupin pri amarantovi moki. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti \pm SD glede na čas fermentacije 0 h (100 %). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti nefermentiranega vzorca (čas 0 h) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

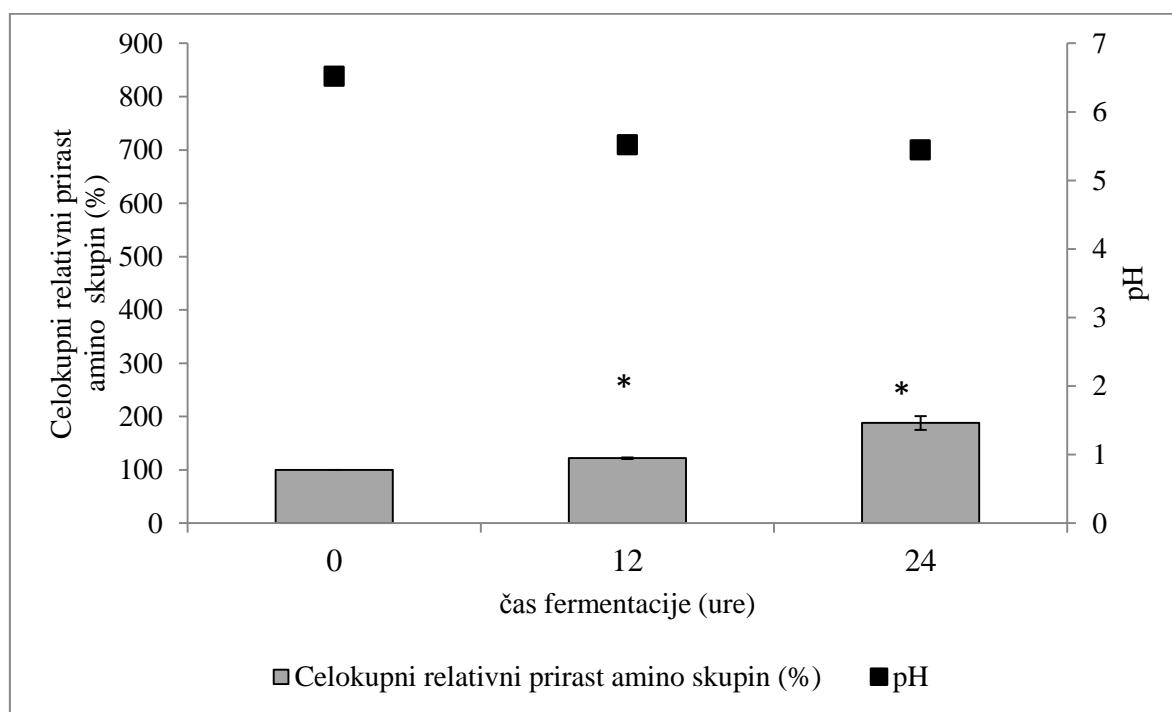
Šifrar A. Proteoliza žitnih proteinov med spontano fermentacijo kislega testa iz različnih vrst moke.
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2017



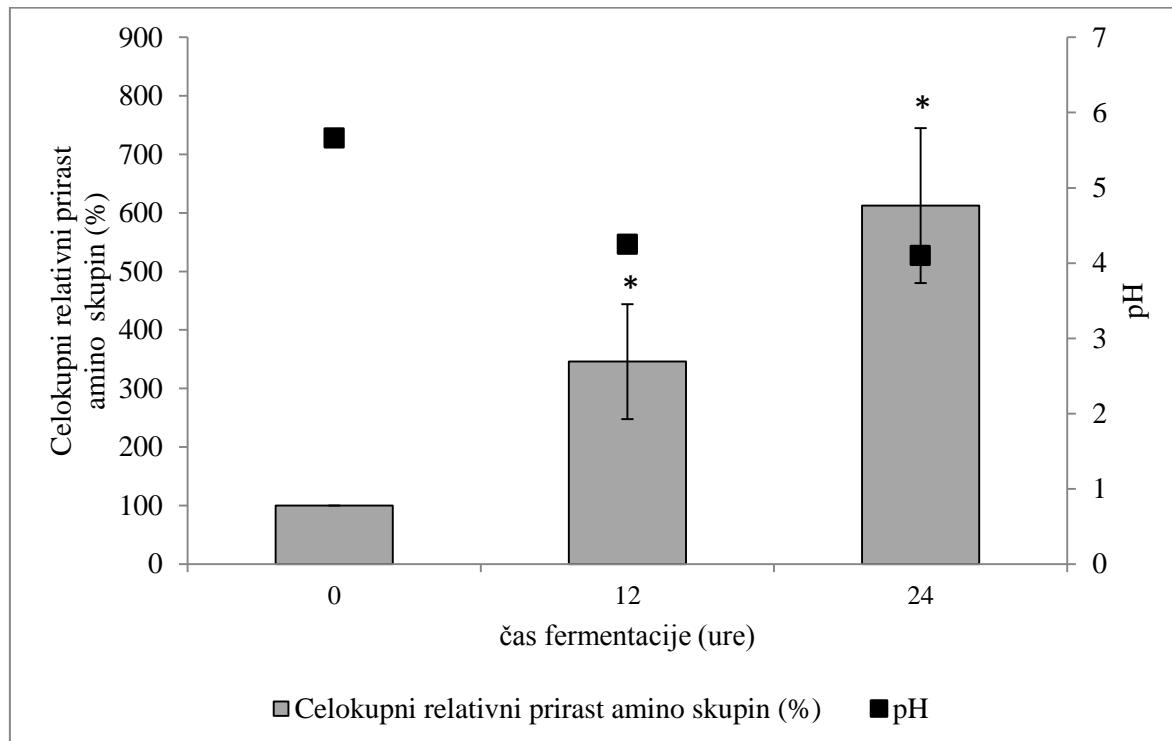
Slika 4: Celokupni relativni prirost amino skupin pri ječmenovi moki. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti \pm SD glede na čas fermentacije 0 h (100 %). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti nefermentiranega vzorca (čas 0 h) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 4$).



Slika 5: Celokupni relativni prirost amino skupin pri kamutovi moki. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti \pm SD glede na čas fermentacije 0 h (100 %). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti nefermentiranega vzorca (čas 0 h) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

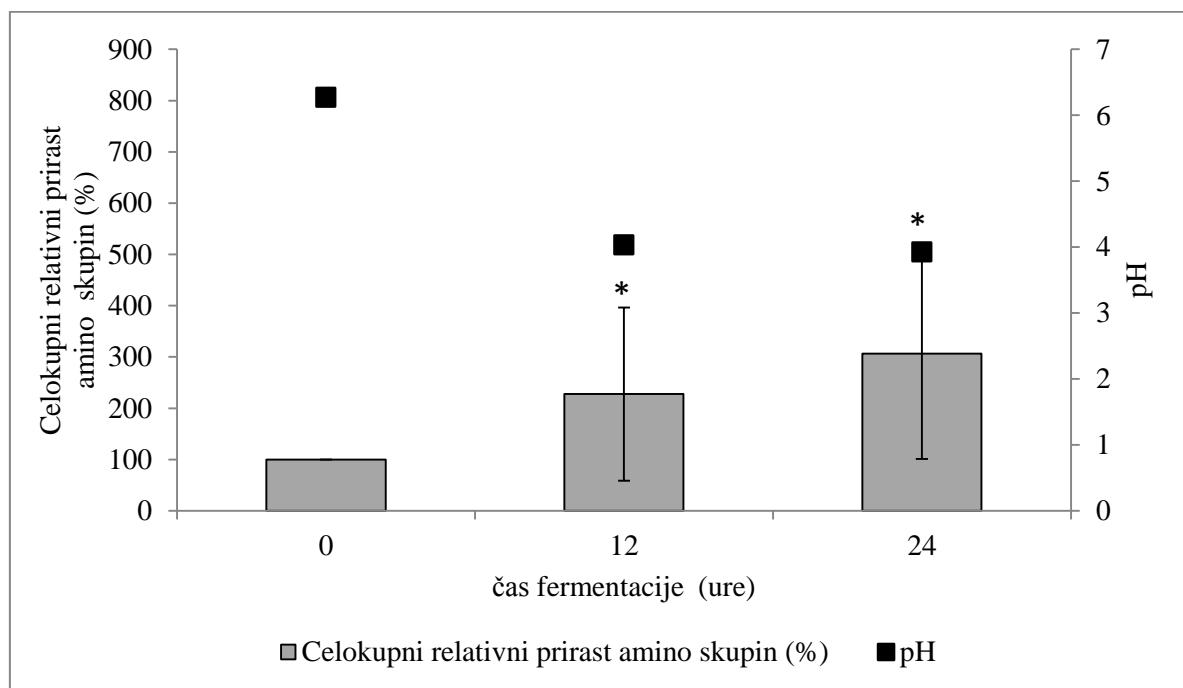


Slika 6: Celokupni relativni prirast amino skupin pri konopljnini moki. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti \pm SD glede na čas fermentacije 0 h (100 %). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti nefermentiranega vzorca (čas 0 h) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

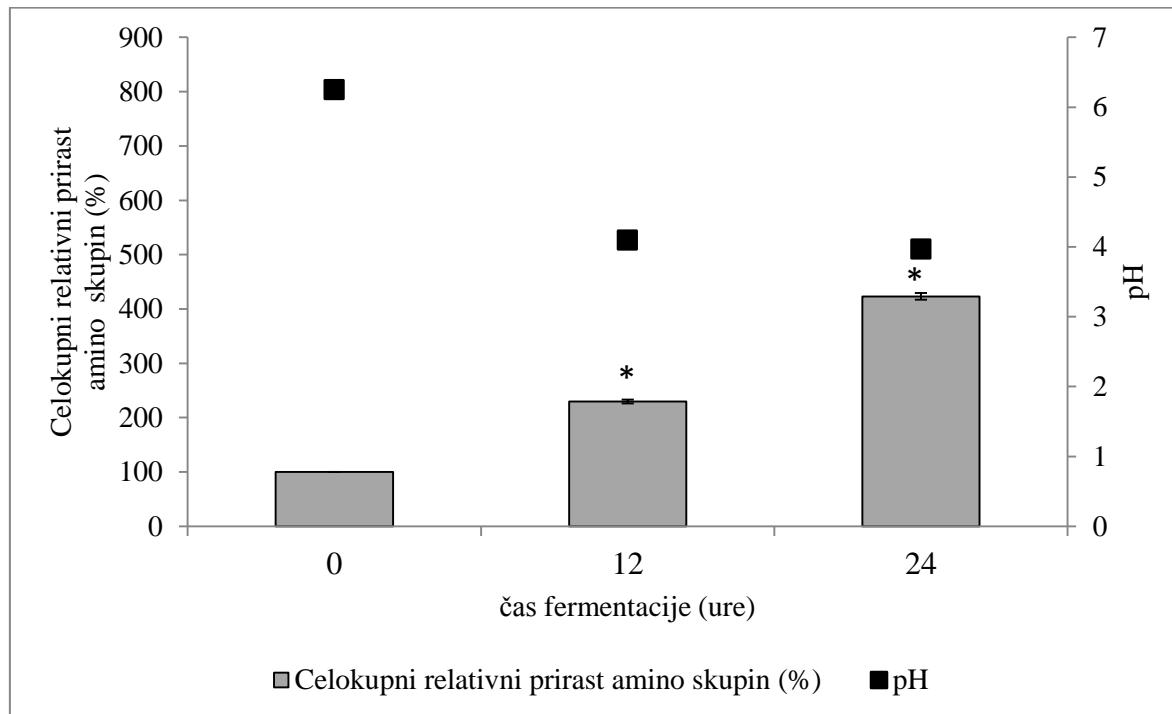


Slika 7: Celokupni relativni prirast amino skupin pri ovseni moki. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti \pm SD glede na čas fermentacije 0 h (100 %). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti nefermentiranega vzorca (čas 0 h) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Šifrar A. Proteoliza žitnih proteinov med spontano fermentacijo kislega testa iz različnih vrst moke.
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2017



Slika 8: Celokupni relativni prirast amino skupin pri proseni moki. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti \pm SD glede na čas fermentacije 0 h (100 %). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti nefermentiranega vzorca (čas 0 h) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 4$).



Slika 9: Celokupni relativni prirast amino skupin pri pšenični moki tip 500. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti \pm SD glede na čas fermentacije 0 h (100 %). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti nefermentiranega vzorca (čas 0 h) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 4$).

Celokupna proteolitična aktivnost kislega testa v odvisnosti od časa fermentacije se kaže v akumulaciji aminokislin in krajših peptidov, zaradi česar je mogoče opaziti naraščajoči trend v koncentraciji prostih amino skupin, ki smo jih določili v frakcijah vodnih ekstraktov kislih test. Prirast amino skupin statistično značilno naraste že v prvih 12-urah fermentacije KT pri vseh obravnavanih vzorcih, najizraziteje pri amarantu, in sicer za faktor 4,2, najmanjši relativni prirast pa smo opazili v primeru konopljinega kislega testa, in sicer za faktor 1,3.

Po 24-urni fermentaciji se prirast amino skupin glede na čas 0 ur še poveča in je statistično značilen ($p \leq 0,05$) za vse obravnavane vzorce (Slike 3-9). Največjo proteolitično aktivnost po 24-urni MKF kislega testa je mogoče zaznati v primeru MKF amarantove moke (Slika 3), kjer se prirast amino skupin v primerjavi z nefermentiranim vzorcem poveča za faktor 7,8. Absolutna vsebnost proteinov v moki neposredno vpliva na delež proteinov v vzorcih kislega testa, zaradi česar lahko pride do razlik v izmerjenih vrednostih celokupne hidrolize proteinov med posameznimi vzorci KT. Amarant botanično uvršamo med psevdožitarice. Za to skupino rastlin je značilno, da si delijo lastnosti žitaric in stročnic, kar se med drugim odlikuje tudi v visoki vsebnosti proteinov (14-19 %) (Fletcher, 2016).

Izrazitejša proteolitična aktivnost kislih test, pripravljenih z mokami pravih žit, se kaže v primeru ovsenega KT, kjer je po 24-urni fermentaciji KT moč opaziti 7,3x prirast amino skupin v primerjavi z nefermentiranim vzorcem (Slika 7). Oves se od ostalih žit razlikuje v hranilnem profilu žitnega zrna, saj v primerjavi z ostalimi preučevanimi žiti vsebuje večjo vsebnost proteinov (12-24 %). Razlika je prisotna tudi v proteinski sestavi ovsenega žitnega zrna. Medtem, ko v zrnih drugih žit (ječmen, rž, pšenica) prevladujejo prolamini, topni v alkoholnih raztopinah, večinski delež proteinov ovsenega žitnega zrna predstavlja globulini topni v slanih vodnih raztopinah (Klose in Arendt, 2011). Domnevamo lahko, da je k aktivnejši hidrolizi proteinov ovsenega KT, poleg večje koncentracije proteinov, vplivala tudi boljša topnost žitnih proteinov, tako med samim procesom MKF kislega testa, kot tudi v koraku priprave vodnega ekstrakta KT (Točka 3.3.4.1).

V primeru kislega testa pripravljenega z MKF konopljine moke smo opazili, da je bila celokupna hidroliza proteinov KT v primerjavi z ostalimi vzorci najslabša, saj se je prirast amino skupin v 24 urah glede na čas 0 h povečal zgolj za faktor 1,9. Kljub temu, da konopljina moka vsebuje razmeroma visok odstotek proteinov (25 %) (Hruškova in sod., 2013), v frakcijah vodnih ekstraktov KT po 24-urni fermentaciji z metodo OPA nismo izmerili bistveno višje koncentracije amino skupin v primerjavi z nefermentiranim vzorcem (čas 0 h) (Slika 6). Za konopljino moko je značilno, da poleg proteinov (edestini, globulini), maščob in škroba vsebuje značilne koncentracije betakarotena, železa in cinka (Hruškova in sod., 2013). Možno je torej, da avtohtonji sev MKB, izoliran iz konopljinega KT, sam ne vsebuje specifičnih proteinaz in peptidaz za razgradnjo proteinov konopljine moke, omejena je lahko že sama rast mikrobov ali pa so proteolitični encimi mikroorganizma inhibirani s sekundarnimi metaboliti konopljine moke. K slabši razgradnji

proteinov KT konopljine moke nedvomno prispeva tudi manjša sprememba v vrednosti pH KT po 24-urni fermentaciji (Slika 10). Hur in sod. (2014) navajajo, da vrednost pH sodi med najpomembnejše okoljske faktorje, ki neposredno vplivajo na sposobnost rasti MKB in sočasno vplivajo na potek fermentacije živil. Znižanje vrednosti pH kislega testa namreč vpliva na večjo topnost žitnih proteinov, s čimer proteini postanejo dostopnejši procesu hidrolize proteinov (Gänzle, 2014). V splošnem velja, da je topnost proteinov v vodnih raztopinah odvisna od številnih faktorjev, kot so: vrednost pH, ionska jakost, in temperatura. Proteini so najmanj topni pri pH vrednostih izoelektrične točke, njihova topnost pa se poveča v raztopinah kislin, baz ali solnih raztopin (Day, 2013).

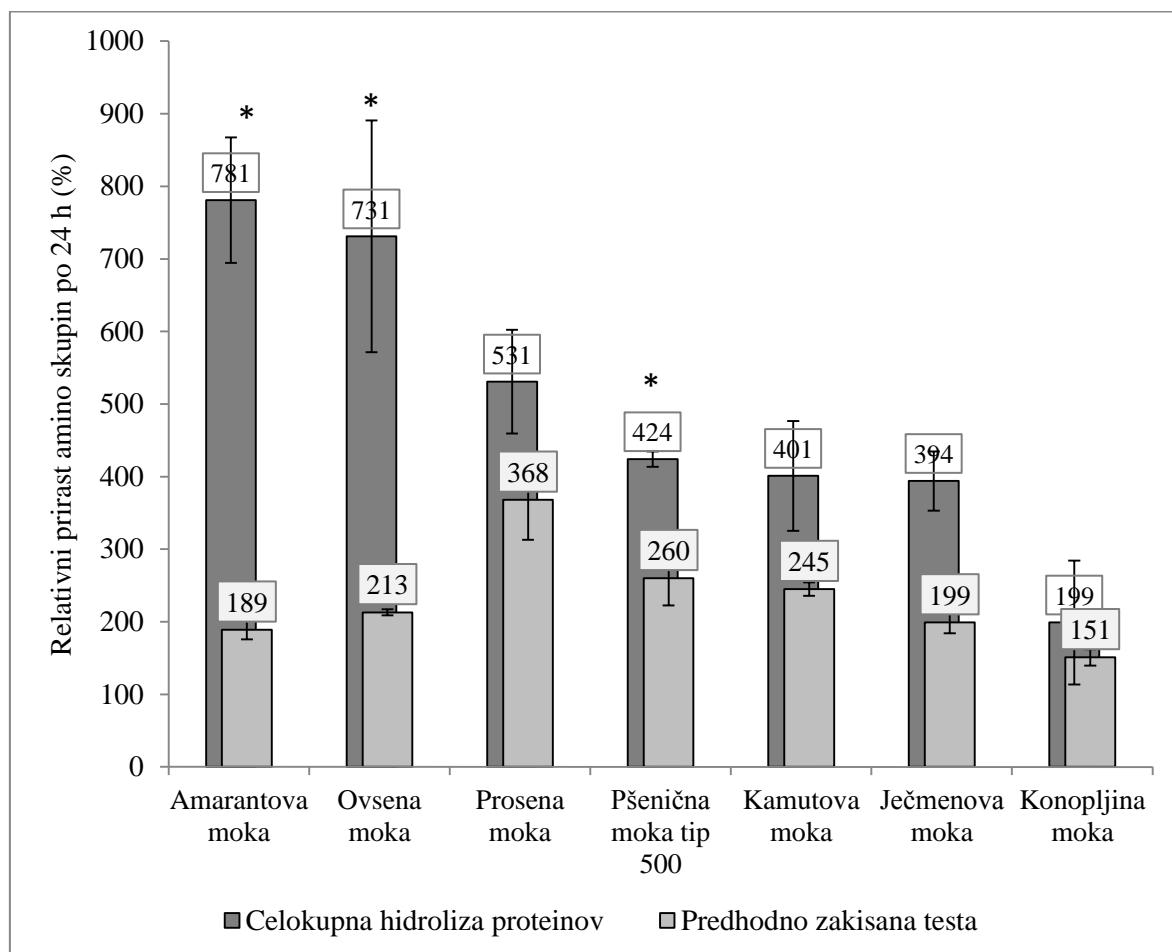
Znižanje vrednosti pH KT je posledica kopičenja mlečne in ocetne kisline v vzorcih kislih test, kar je posledica metabolizma MKB. Te bakterije pri anaerobnih pogojih vršijo mlečnokislinsko fermentacijo, pri čemer sladkorje preko piruvata pretvorijo v mlečno kislino (Ray in Bhunia, 2007). S tem pride do hitrega zakisanja, saj je puferska kapaciteta kislih test razmeroma nizka (Narvhuis in Sorhaug, 2012).

S spremeljanjem vrednosti pH KT smo pri eksperimentalnem delu preverjali uspešnost poteka MKF mešanic moke in vode. Vrednosti pH KT smo določali v treh časovnih točkah: po 12- in 24-urni fermentaciji KT, izmerili pa smo ga tudi mešanici moke in vode pred pričetkom fermentacije. Meritve kažejo, da vrednost pH pri vseh vzorcih, razen konopljinem, izrazito upade po 12-urni MKF kislega testa, v nadaljnjih 12 urah, pa se vrednost pH KT ustali med pH 3,9 in 4,1. V primeru konoplje je upad vrednosti pH KT veliko manjši. Iz začetne pH 6,5 se po 24-urni fermentaciji vrednost pH zniža do pH 5,4. Predvidevamo, da so razlike v upadu vrednosti pH KT med posameznimi vzorci posledica slabše rasti bakterij, (Slika 10) deloma pa se razlike lahko pojavijo kot posledica razlik v puferski kapaciteti KT. Razlike v puferski kapaciteti mešanic moke in vode namreč določajo padec pH vrednosti KT, ta pa neposredno vpliva na aktivnost endogenih žitnih proteinaz (Gänzle in Ripari, 2016). Endogeni proteolitični encimi mok najbolje delujejo pri vrednostih pH med pH 4,4 do 5,2. (Koehler in Wieser, 2013), zaradi česar pride do pospešene proteolitične razgradnje proteinov KT sorazmerno s potekom MKF.

Da bi preverili dejanski doprinos MKB k celokupni hidrolizi žitnih proteinov, smo izvedli kontrolni poskus, pri katerem smo zmes moke in vode zakisali z mešanico 90 % mlečne kisline in 98 % ocetne kisline, v razmerju 4:1, tako da je končna vrednost pH mešanice znašala med pH 3,5 in 4,5. Z dodatkom mlečne in ocetne kisline smo simulirali pogoje okolja, ki nastanejo tekom mlečnokislinske fermentacije heterofermentativnih mlečnokislinskih bakterij. Mešanicam moke in vode smo dodali tudi antibiotik eritromicin, s čimer smo preprečili razvoj bakterij avtohtone mikroflore.

Hidrolizo proteinov predhodno zakisane mešanice moke in vode smo tako kot pri fermentirani mešanici preverili v dveh časovnih točkah: pred zakisanjem in po 24-urni inkubaciji na stresalniku pri temperaturi 30 °C. Po zaključeni inkubaciji smo pripravili

vodne ekstrakte KT in jih filtrirali preko 10 kDa-filtra ter tako v nadaljnjo raziskavo vključili le krajše peptide in aminokisline s potencialnim bioaktivnim učinkovanjem.



Slika 10: Primerjava rezultatov spremjanja celokupne hidrolize proteinov z rezultati hidrolize proteinov predhodno zakisanih mešanic moke in vode po 24-urni inkubaciji. Rezultati so prikazani kot povprečne relativne vrednosti \pm SD glede na rezultate nefermentiranih vzorcev KT (čas 0 h). Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se med seboj (celokupna hidroliza in hidroliza predhodno zakisanih test) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$.

Pri predhodno zakisanih mešanicah moke in vode smo z metodo OPA v primeru vseh vzorcev določili prirast v vsebnosti amino skupin po zaključeni 24-urni inkubaciji (Priloga H). Dobljene rezultate smo v nadalnjem koraku primerjali z rezultati celokupne hidrolize proteinov med MKF kislega testa tako kot prikazuje Slika 10. Primerjava dobljenih vrednostih kaže na dejanski prispevek MKB, ki je bil največji in hkrati statistično značilen ($p \leq 0,05$) glede na predhodno zakisana testa v primeru amarantovega (4,1x), ovsenega (3,4x) in pšeničnega(1,6x) kislega testa, pri ostalih vzorcih pa se vrednosti niso statistično značilno razlikovale.

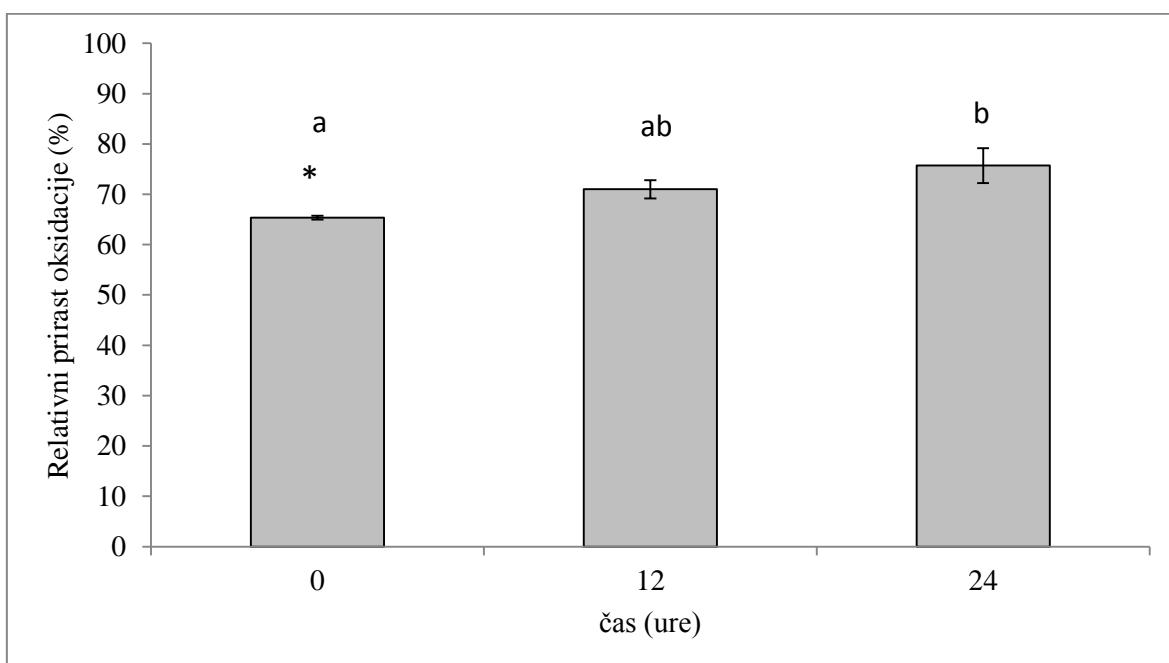
4.3 DOLOČANJE ANTOOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI VODNIH EKSTRAKTOV KISLIH TEST V CELICAH KVASOVK VRSTE *Saccharomyces cerevisiae*

S hidrolizo žitnih proteinov nastajajo kraši peptidi, med katerimi nekateri izmed njih kažejo pozitivno biološko učinkovanje (Maestri in sod., 2016). Bioaktivni peptidi, definirani kot kraši peptidi ali zaporedja aminokislin s funkcionalnim delovanjem, se dokazano tvorijo med mlečnokislinsko fermentacijo živil živalskega ali rastlinskega izvora (Pessione in Cirrincione, 2016), pri čemer med najučinkovitejše fermentativne mikroorganizme uvrščamo MKB, zlasti zaradi njihove dobre prilagodljivosti zahtevnemu okolju kislega testa in učinkovitega proteolitičnega sistema (Rizzello in sod., 2016).

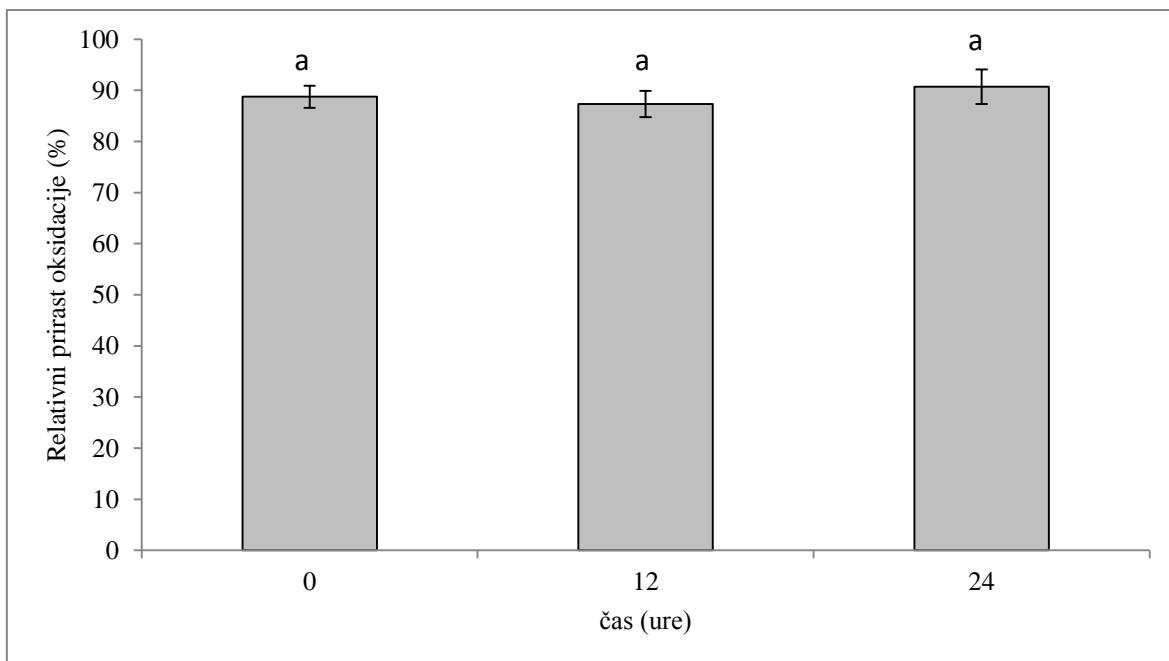
Žita so bogat vir proteinov in peptidov in v tem kontekstu potencialen vir bioaktivnih peptidov z dokazanim funkcionalnim delovanjem na človeka (Ortiz-Martinez in sod., 2014). Človeški organizem je izpostavljen vplivom najrazličnejših oblik stresa, ki ob prekomerni izpostavljenosti vodijo v izbruh določenih kroničnih bolezni, kot so: ateroskleroza, slatkorna bolezen, srčni infarkt, možganska kap, nekatere vrste raka in druge (Osredkar, 2011). Poleg peptidov, ki potencialno znižujejo krvni pritisk, delujejo protitumorsko, antitrombotično ali imunomodulatorno, se med hidrolizati proteinov žit vse pogosteje omenjajo bioaktivni peptidi z dokazanim antioksidativnim učinkovanjem (Sarmadi in Ismail, 2010). Antioksidativni peptidi so v splošnem zaporedja aminokislin, ki so sposobna preprečiti oksidacijo drugih molekul (Chu in Chen., 2006). Najpogosteje delujejo kot lovilci radikalov, kelatorji kovinskih ionov ali odstranjevalci prekurzorskih molekul za nastanek radikalov (Pessione in Cirrincione, 2016).

Frakcijam vodnih ekstraktov (FVE) KT smo preverili antioksidativno učinkovitost. Kot modelni organizem smo uporabili kvassovko vrste *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti, saj so stresni odgovori in osnovni celični procesi v tej fazi primerljivi s humanimi celicami (Sigler in sod., 1999). Antioksidativno učinkovitost FVE KT smo določali posredno preko spremljanja znotrajcelične oksidacije celic kvassovk z uporabo barvila H₂DCF v deacetilirani obliki. Barvilo, ki se celicam doda kot H₂DCFDA, zaradi nepolarnosti namreč lahko prehaja v celice kvassovk, se hidrolizira, ob stiku z oksidanti pa se oksidira do fluorescentne oblike DCF (Jakubowski in Bartosz, 1997). Fluorescanca, ki je merilo znotrajcelične oksidacije, je obratnosorazmerna antioksidativni učinkovitosti vodnih ekstraktov kislih test. Nižja kot je fluorescanca, boljša je antioksidativna učinkovitost in obratno.

Slike 11–17 prikazujejo primerjavo znotrajcelične oksidacije kvassovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* tretiranih s FVE mešanic posameznih vrst moke in vode (čas 0 h) in FVE kislih test iz posamezne vrste moke (12- in 24-urna fermentacija).

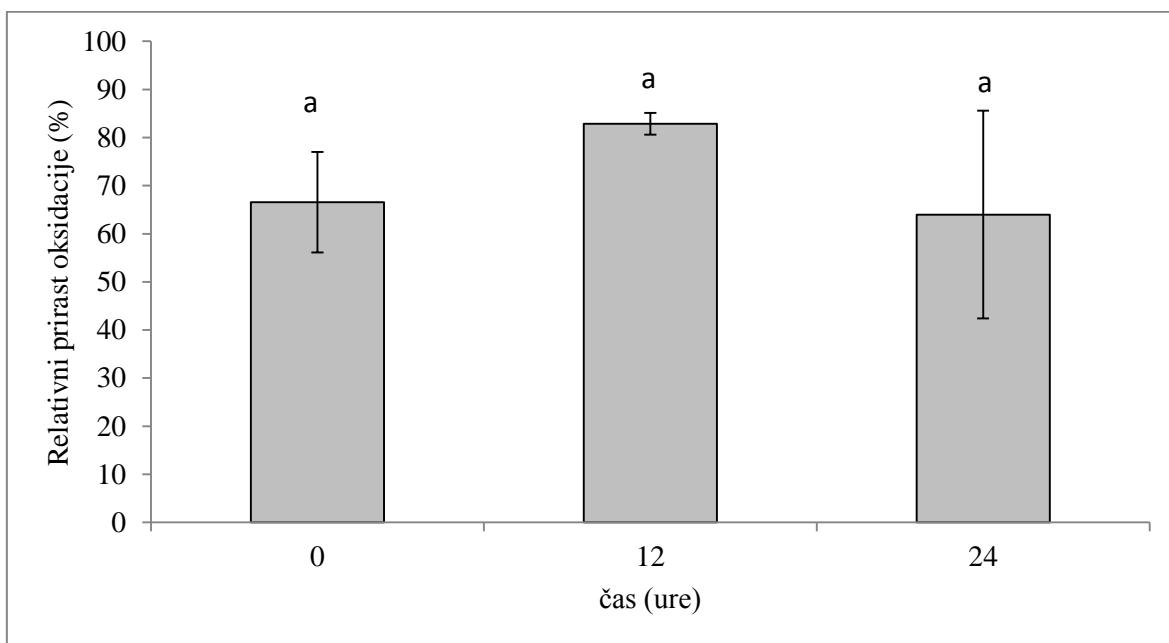


Slika 11: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitev frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa amarantove moke (0 h, 12 h in 24 h). Rezultati so predstavljeni kot povprečni prirast oksidacije \pm SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 2$). Vrednosti z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.

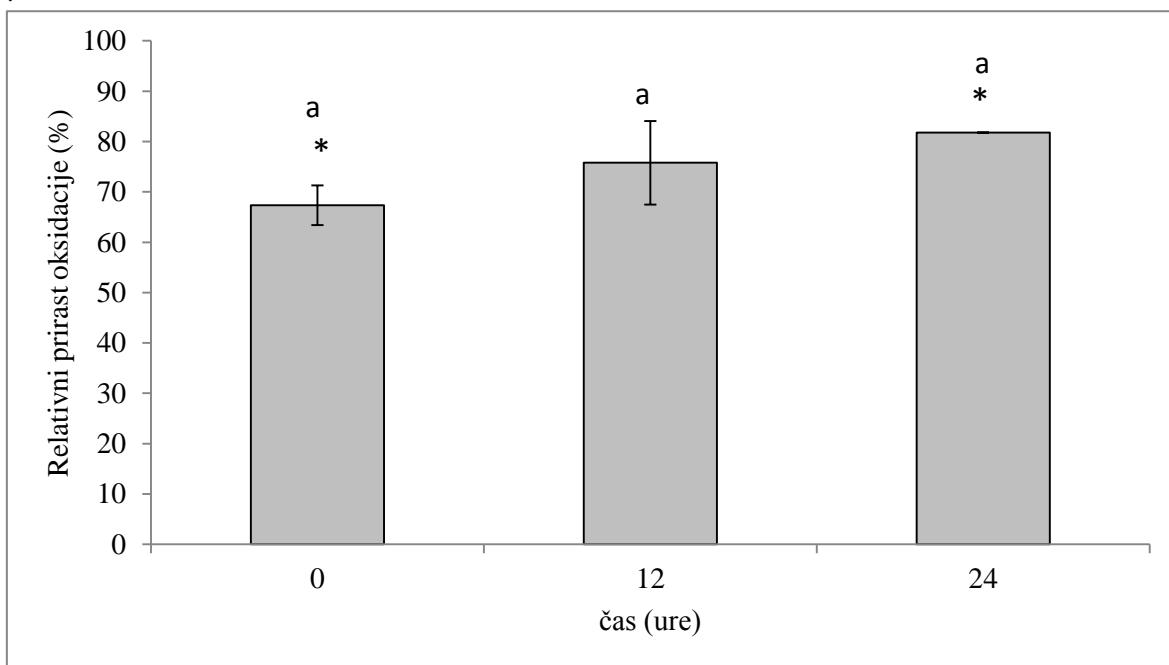


Slika 12: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitev frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa ječmenove moke (0 h, 12 h in 24 h). Rezultati so predstavljeni kot povprečni prirast oksidacije \pm SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 2$). Vrednosti z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.

Šifrar A. Proteoliza žitnih proteinov med spontano fermentacijo kislega testa iz različnih vrst moke.
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2017

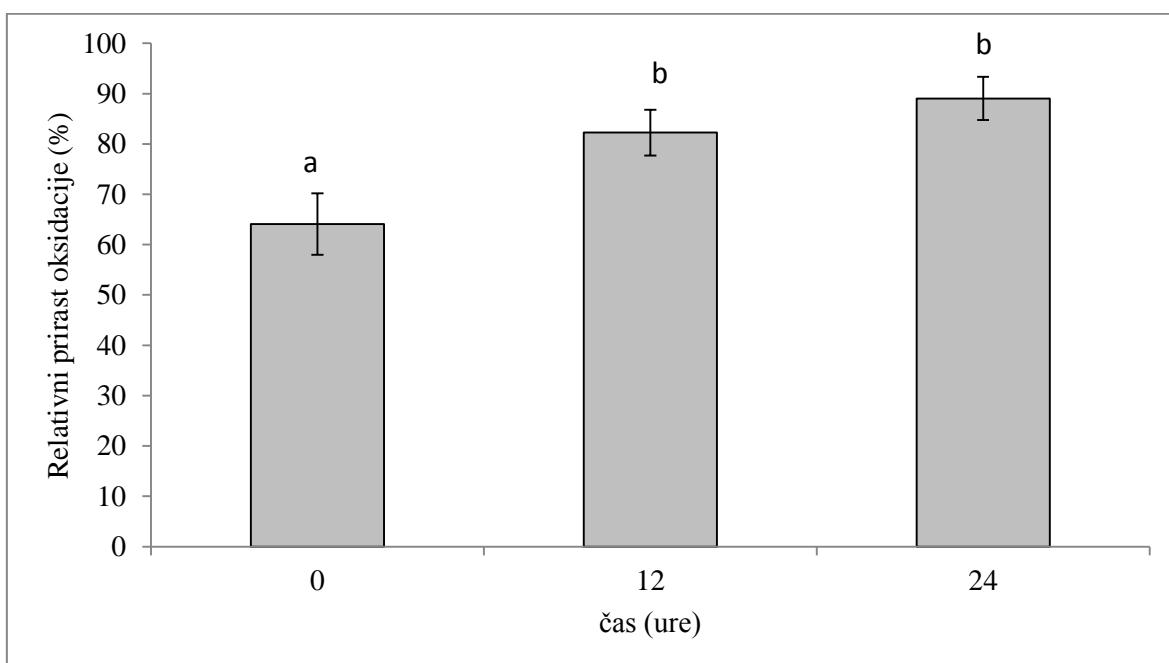


Slika 13: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitev frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa ovsene moke (0 h, 12 h in 24 h). Rezultati so predstavljeni kot povprečni prirast oksidacije \pm SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 2$). Vrednosti z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.

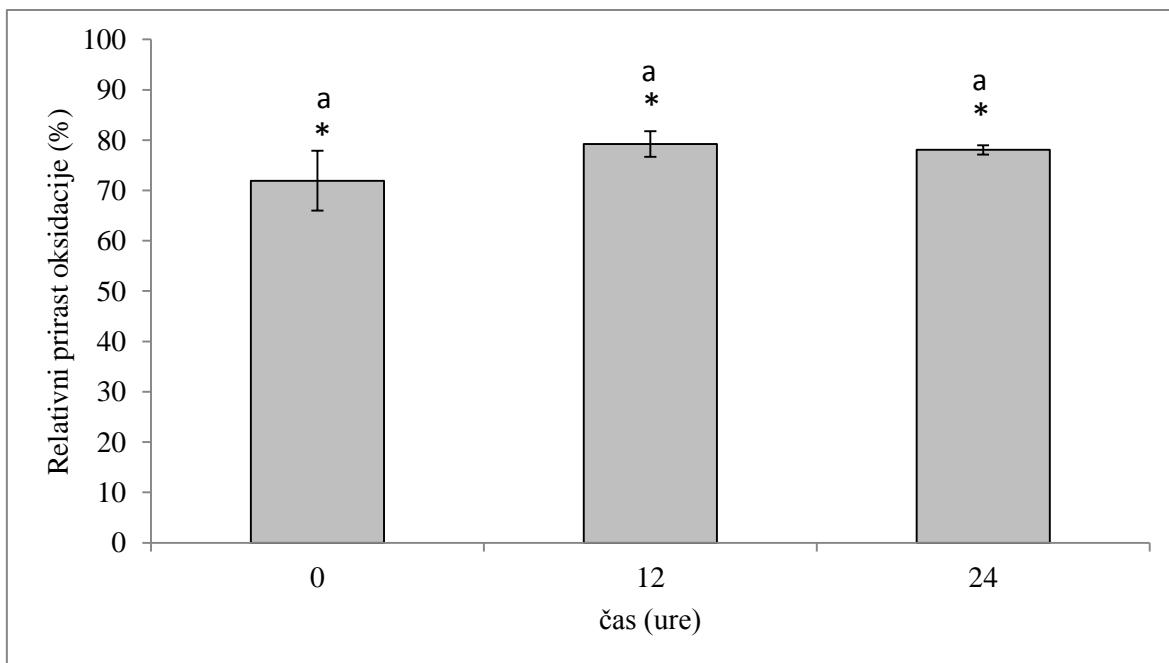


Slika 14: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitev frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa kamutove moke (0 h, 12 h in 24 h). Rezultati so predstavljeni kot povprečni prirast oksidacije \pm SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 2$). Vrednosti z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.

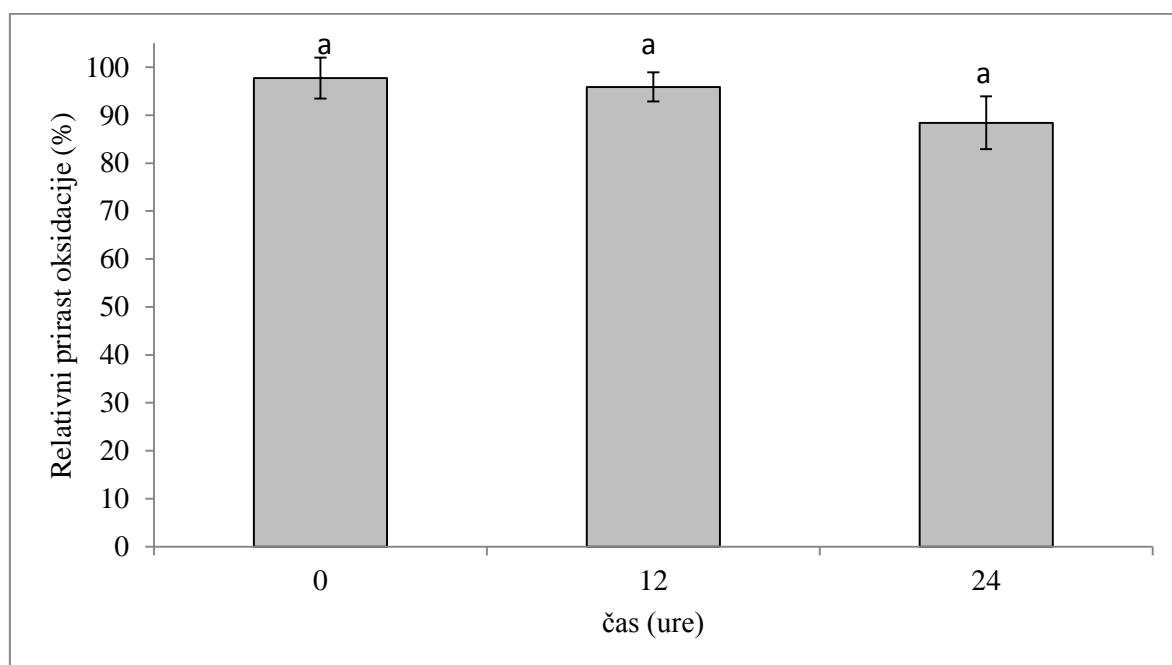
Šifrar A. Proteoliza žitnih proteinov med spontano fermentacijo kislega testa iz različnih vrst moke.
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2017



Slika 15: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitev frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa konopljine moke (0 h, 12 h in 24 h). Rezultati so predstavljeni kot povprečni prirast oksidacije \pm SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 2$). Vrednosti z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.



Slika 16: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitev frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa prosene moke (0 h, 12 h in 24 h). Rezultati so predstavljeni kot povprečni prirast oksidacije \pm SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 2$). Vrednosti z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.



Slika 17: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitev frakcijam vodnih ekstraktov kislega testa pšenične moke tip 500 (0 h, 12 h in 24 h). Rezultati so predstavljeni kot povprečni prirast oksidacije \pm SD glede na kontrolo. Vrednosti, ki so označene z zvezdico (*) se od vrednosti kontrole (100 %) statistično značilno razlikujejo pri $p \leq 0,05$ ($n = 2$). Vrednosti z različnim indeksom (a, b) se med seboj razlikujejo.

Intenziteta encimske hidrolize žitnih proteinov je posledica hitrega zakisanja kislih test, kar spodbudi hidrolitično aktivnost endogenih žitnih encimov. Dostopnost hranil v KT okrepi intenziteto razmnoževanja prilagojenih vrst MKB, ki s tem preidejo v eksponentno fazo rasti. Metabolizem mikroorganizmov je v tej fazi v največjem razponu, kar se kaže tudi v pospešeni proteolitični aktivnosti, zaradi česar pride do akumulacije peptidov in aminokislin v vzorcih kislih test (Slika 3 - 8). Sorazmerno s koncentracijo peptidov narašča verjetnost za prisotnost bioaktivnih peptidov, kot denimo peptidov s potencialnim antioksidativnim učinkovanjem.

Kljub dokazani naraščajoči koncentraciji amino skupin v ekstraktih KT (Slike 3-9), pri tretiranju celic kvasovk s FVE kislih test (12 h in 24 h) in FVE mešanice moke in vode (0 h) v večini primerov ni prišlo do statistično značilnega znižanja nivoja oksidacije v celicah kvasovk glede na kontrolo (Slike 11 – 17). Izjema so bili vzorci prosene (0 h, 12 h, in 24 h), kamutove (0 h, 24 h) in amarantove moke (0 h), kjer je bilo znižanje znotrajcelične oksidacije statistično značilno, v ostalih primerih pa se vrednosti niso statistično značilno razlikovale od kontrole. Največje in hkrati statistično značilno znižanje znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo smo določili v primeru tretiranja celic kvasovke s FVE mešanice amarantove moke in vode (34,6-% znižanje), sledi FVE mešanice kamutove moke in vode (0 h) (32-% znižanje) in FVE mešanice prosene moke in vode (28,1-% znižanje). Z ozirom na rezultate je potrebno v obzir vzeti dejstvo, da k antioksidativni učinkovitosti FVE lahko prispevajo tudi druge komponente, ki sestavljajo vodni ekstrakt

KT, kot so: razgradni produkti fenolnih spojin kot tudi razgradni produkti celic. Zanemarljivo ni niti dejstvo, da imajo MKB lasten encimski in neencimski antioksidativni sistem, ki celice varuje pred škodljivimi vplivi ROS in se sprosti po lizi celic v okolje KT (Hur in sod., 2014).

V primeru amarantove in konopljine moke smo določili rahel, statistično značilen dvig nivoja znotrajcelične oksidacije med FVE mešanice moke in vode (0 h) in FVE kislih test po 24-urni fermentaciji. Glede na naraščajoči trend koncentracije amino skupin, ki v FVE kislih test narašča s časom fermentacije domnevamo, da je v vzorcih kislih test prišlo do nadaljne hidrolize peptidov s potencialnim antioksidativnim učinkovanjem. Avtorja Sarmadi in Ismail (2010) poročata, da je antioksidativna učinkovitost aminokisl in z dokazanim antioksidativnim učinkovanjem večja v primeru, kadar je aminokislina vezana v peptidnem zaporedju, zato predvidevamo, da je s proteolizo prišlo do izničenja antioksidativne aktivnosti potencialnih bioaktivnih peptidov z antioksidativnim učinkovanjem. Pri peptidih z opaženo antioksidativno učinkovitostjo sicer pogosto zasledimo peptide, ki jih sestavljajo histidin, tirozin, triptofan, metionin, cistein in prolin, vsaka sprememb v zaporedju aminokisl in peptidu pa se kaže kot razlika v antioksidativni učinkovitosti peptida (Pessone in Cirrincione, 2016). Hur in sod. (2014) navajajo, da na nastanek peptidov z antioksidativno učinkovitostjo neposredno vplivata tudi vrsta mikroorganizma in tip fermentacije.

S stališča spremjanja celokupne hidrolize proteinov po 12-urni in 24-urni fermentaciji lahko sklepamo, da prilagojeni mikroorganizmi zaradi upada koncentracije dostopnih hranil in zaostrovanja pogojev okolja kislega testa preidejo v stacionarno fazo rasti. V tej fazi celice mikroorganizmov praviloma spremenijo svojo fiziologijo, upočasnijo metabolizem in delitev (Danevčič in Mulec, 2007). V kislih testih se kopijo odpadni produkti presnove, ki potencialno lahko delujejo oksidativno, kar se posledično izraža v razultatih znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovke. Pri normalnih pogojih endogeni antioksidativni obrambni sistemi v celicah kvasovk preprečuje škodljivo delovanje ROS preko encimskih in neencimskih antioksidantov, v določenih pogojih pa endogeni antioksidativni obrambni sistemi ne zmore obvarovati celice pred škodljivimi vplivi ROS, kar se kaže v zvišanem nivoju oksidacije v celicah kvasovk.

Z rezultati eksperimentalnega dela smo potrdili hipoteze o pomembnem prispevku proteolitične aktivnosti izoliranih avtohtonih sevov MKB k celokupni hidrolizi proteinov kislega testa. V okviru določanja koncentracije prostih amino skupin v vzorcih vodnih ekstraktov kislih test smo opazili naraščajoči trend sorazmerno s časom fermentacije. V vseh primerih je med posameznimi vzorci KT prihajalo do razlik, ki so domnevno posledica razpona proteolitične aktivnosti MKB ali pa izvirajo iz razlik v biokemijski sestavi mok.

Kljub dokazani naraščajoči koncentraciji amino skupin v vodnih ekstraktih kislih test predvidoma aminokislin in krajših peptidov, tekom fermentacije nismo dokazali značilnega časovno odvisnega znižanja oksidacije v celicah kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Rezultati ne izključujejo možnosti za prisotnost antioksidativnih peptidov v FVE kislih test v posameznih časih fermentacije, saj se je v primeru znižanja oksidacije glede na kontrolo ta nivo vzdrževal tekom fermentacije. V nadalnjih raziskavah bi bilo potrebno izvesti nadaljnjo frakcionacijo FVE in preučiti antioksidativen prispevek posameznih peptidnih frakcij ter posledično izolirati in identificirati potencialne antioksidativne peptide.

5 SKLEPI

- Iz kislih test pripravljenih s spontano fermentacijo mešanic različnih vrst moke in vode smo izolirali avtohtone MKB vrste *Weissella confusa* in *Pediococcus pentosaceus*.
- Proteolitična aktivnost KT pripravljenih iz posameznih vrst mok se je povečala v odvisnosti od časa fermentacije. Po 24-urni fermentaciji je bila proteolitična aktivnost KT v primerjavi s časom 0 ur najvišja v primeru amarantove in ovsene moke, najnižja pa v primeru konopljine moke.
- Vrednost pH se je pri vseh vzorcih razen konopljinega, izrazito znižala po 12-urni MKF kislega testa, v nadalnjih 12 urah pa se je vrednost ustalila med pH 3,9 in 4,1. Pri KT iz konopljine moke je bil upad veliko manjši vrednost pH se je spremenila iz začetne pH 6,5 na pH 5,4.
- Po 24-urni fermentaciji je bil prispevek k proteolizi s strani MKB največji v primeru amarantovega kislega testa, sledilo je kislo testo iz ovsene moke.
- Naraščajoča koncentracija amino skupin v FVE kislih test tekom fermentacije se ni pokazala v časovno odvisnem znižanju oksidacije v celicah kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*.
- Največje in hkrati statistično značilno znižanje znotrajcelične oksidacije glede na kontolo smo določili v primeru FVE mešanic amarantove moke in vode, sledijo FVE mešanice kamutove moke in vode in FVE mešanice prosene moke in vode. V primeru kamutove in prosene moke se je znižana oksidacija v celicah kvasovk vzdrževala tudi v primeru tretiranj z vzorci kasnejših faz fermentacije.

6 POVZETEK

Žita so bogat vir proteinov in peptidov in v tem kontekstu potencialen vir bioaktivnih peptidov z dokazanim funkcionalnim delovanjem. Že stoletja jih ljudje po vsem svetu uporabljajo kot surovino za pripravo fermentiranih napitkov in ostalih živil, kamor uvrščamo tudi kisla testa. V okviru magistrske naloge smo preučevali proteolitično razgradnjo proteinov različnih vrst mok (amarantova, kamutova (khorasan), ovsena, ječmenova, prosena, konopljina in pšenična moka tip 500) med fermentacijo kislega testa (KT). V prvem sklopu raziskovalnega dela smo iz KT, pripravljenih s spontano fermentacijo različnih vrst mok izolirali mlečnokislinske bakterije (MKB) avtohtone mikroflore, ki so pripadale vrstam *Weissella confusa* in *Pediococcus pentosaceus*. Z izoliranim avtohtonim sevom smo nato inokulirali mešanice posamezne vrste moke in vode s čimer smo pospešili proces mlečnokislinske fermentacije kislega testa. Proteolizo žitnih proteinov smo spremljali s spektrofotometrično metodo OPA, jo določali v treh časovnih točkah (0 h, 12 h in 24 h) fermentacije in jo izrazili kot relativni prirast amino skupin v vzorcih KT. Proteolitična aktivnost KT posameznih vrst mok se je povečala v odvisnosti od časa fermentacije. Po 24-urni fermentaciji je bila v primerjavi s časom 0 ur najvišja v primeru amarantove (7,8x) in ovsene moke (7,4x), najmanjša pa pri konopljnini moki (1,9x). Celokupno hidrolizo žitnih proteinov po 24 urah smo v naslednjem koraku primerjali s proteolitično aktivnostjo predhodno zakisanih mešanic moke in vode. Primerjava dobljenih vrednosti kaže na dejanski prispevek MKB, ki je bil največji v primeru amarantovega (4,1x), ovsenega (3,4x) in pšeničnega (1,6x) kislega testa, pri ostalih vzorcih pa se vrednosti niso statistično značilno razlikovale. Med fermentacijo kislega testa smo spremljali tudi vrednost pH, ki se je pri vseh vzorcih, razen konopljnega, izrazito znižal po 12-urni MKF kislega testa, v nadaljnjih 12 urah pa se je vrednost ustalila med 3,9 in 4,1. Pri KT iz konopljine moke je bil upad pH vrednosti manjši. Vrednost pH se je iz začetne pH 6,5 znižala na pH 5,4. Frakcijam vodnih ekstraktov (FVE) KT smo v nadalnjem koraku preverili antioksidativno učinkovitost, pri čemer smo kot modelni organizem uporabili kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Kljub naraščajoči koncentraciji amino skupin v ekstraktih KT, pri tretiranju celic kvasovk s FVE kislih test (12 h in 24 h) in FVE mešanice moke in vode (0 h) ni prišlo do časovno odvisnega znižanja oksidacije v celicah kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Največje in hkrati statistično značilno znižanje znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo smo določili v primeru FVE mešanic amarantove moke in vode, sledijo FVE mešanice kamutove moke in vode in mešanice prosene moke in vode. V primeru kamutove in prosene moke se je znižana oksidacija v celicah kvasovk vzdrževala tudi v primeru tretiranj z vzorci kasnejših faz fermentacije. Rezultati merjenja znotrajcelične oksidacije v celicah kvasovk ne izključujejo možnosti za prisotnost antioksidativnih peptidov v FVE kislih test, v nadaljevanju raziskave pa bi bilo potrebno izvesti frakcionacijo FVE, določiti antioksidativen prispevek posameznih peptidnih frakcij in posledično izolirati in identificirati potencialne antioksidativne peptide.

7 VIRI

- Adeli K., Altosaar I. 1984. Compartmentalization of seed reserve proteins proposed discriminatory factors. Federation of European Biochemical Societies, 178: 193-197
- Agyei D., Ongkudon C.W., Wei Y.C., Chan A.S., Danquah M.K. 2016. Bioprocess challenges to isolation and purification of bioactive peptides. Food and Bioproducts Processing, 98: 244-256
- Amari M., Laguerre S., Vuilemin M., Robert H., Loux V., Klopp C., Morel S., Gabriel B., Remaud-Simeon M., Gabriel V., Moulis C., Fontagne-Faucher C. 2012. Genome sequence if *Weissella confusa* LBAR c39-2, isolated from a wheat sourdough. Journal of Bacteriology, 194, 6: 1608-1609
- Bahareh H.S., Amin I. 2010. Antioxidative peptides from food proteins:a review. Peptides, 31: 1949-1956
- Balestra F., Laghi L., Saa T.D., Gianotti A., Rocculi P., Pinnavaia G. 2015. Physico-chemical andmetabolomic characterization of kamut khorasan and durum wheat fermented dough. Food Chemistry, 187: 451-459
- Carnevali A., Gianotti A., Benedetti S., Tagliamonte M.C., Primiterra M., Laghi L., Danesi F., Valli V., Ndaghijimana M., Capozzi F. 2014. Role of kamut brand khorasan wheat in the counteraction of non-celiac wheat sensitivity and oxidative damage. Food Research International, 63: 218-226
- Cavazos A., De Mejia E.G. 2013. Identification of bioactive peptides from cereal storage proteins and their potential role in prevention of chronic diseases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12: 364-380
- Celano G., De Angelis M., Minervini F., Gobbetti M. 2016. Different flour microbial communities drive to sourdoughs characterized by diverse bacterial strains and free amino acid profiles. Frontiers in Microbiology, 7, 1770: 1-12
- Chandra D., Chandra S., Pallavi A., Sharma A.K. 2016. Review of finger millet (*Eleusine ciracana* (l.) gaerth): a power house of health benefiting nutrients. Food Science and Human Wellness, 5, 3: 149-155
- Cian E.R., Vioque J., Drago R.S. 2014. Structure-mechanism relationship of antioxidant and ace I inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate fractioned by pH. Food Research International, 69: 216-223
- Chapot-Chartier MP., Kulakauskas S. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. Microbial Cell Factories, 13: 1-23
- Chu S.C., Chen C. 2006. Effect of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. Food Chemistry, 98, 3: 502-507

- Coda R., Rizzello G.C., Pinto D., Gobbetti M. 2011. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 4: 1087-1096
- Coda R., Di Cagno R., Gobbetti M., Rizzello G.C. 2014. Sourdough lactic acid bacteria exploitation of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology*, 37: 51-58
- Corsetti A., Settani L., Valmorri S., Mastrangelo M., Suzzi G. 2007. Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiology*. 24: 592-600
- Cortese D. 2007. Semena tretje moči. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 220 str.
- Day L. 2013. Proteins from land plants-potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science&Technology*, 32: 25-42
- Danevčič T., Mulec-Mandić I. 2007. Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 74 str.
- De Vuyst L., Neysens P. 2005. The sourdough microbiota:biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science&Technology*, 16: 43-56
- Dorrestein R.C., Bernwals L.G., Zomer G., Gooijer C. D., Wieten G. 1996. Determination of amino acids using o-phthalaldehyde - 2-mercaptoethanol derivatization: effect of reaction conditions. *Journal of Chromatography*, 724: 159-167
- Fletcher R.J. 2016. Pseudocereals overview. *Reference Module in Food Sciences*, 1, 2: 1-6
- Fusco V., Quero M.G., Cho G.S., Kabisch J., Meske D., Neve H., Boeckelmann W., Franz C.M.A.P. 2015. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 155: 1-22
- Gänzle G.M., Laponen J., Gobbetti M. 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science&Technology*, 19: 513-521
- Gänzle M., Ripari V. 2016. Composition and function of sourdough microbiota:from ecological theory to bread quality. *International Journal of Food Microbiology*, 239: 19-25
- Gänzle G.M. 2014. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food Microbiology*, 37: 2-10
- Gobbetti M., Smacchi E., Fox P., Stepaniak L., Corsetti A. 1996. The sourdough microflora cellular localization and characterization of proteolytic enzymes in lactic acid bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 29: 561-569
- Gobbetti M., Rizzello C.G., Di Cagno R., De Angelis M. 2014. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology*, 37: 30-40

- Helm C.V., De Francisco A., Gaziola S.A., Fornazier R.F., Pompeu G.B., Azevedo R.A. 2005. Hull less barley varieties: storage proteins and amino acid distribution in relation to nutritional quality. *Food Biotechnology*, 18: 327- 341
- Herman E.M., Larkins B.A. 1999. Protein storage bodies and vacuoles. *The Plant Cell*, 11: 601-613
- Hruškova M., Švec I., Jurinova I. 2013. Chemometrics of wheat composites with hemp, teff and chia flour: chomarison on rheological features. *International Journal of Food Science*, 2013, ID 968020, doi: 10.1155: 6 str.
- Hur S.J., Lee S.Y., Kim Y.C., Choi I., Kin GB. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160: 346-356
- Iacumin L., Cecchini F., Manzano M., Osualdini M., Boscolo D., Orlic S., Comi G. 2009. Description of the microflora of sourdough by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 26, 2: 128-135
- Jakubowski W., Bilinski T., Bartosz G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 5: 659-664
- Klose C., Arendt E.K. 2012. Proteins in oats; their synthesis and changes during germination: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52: 629-639
- Knez M. 1977. Tehnologija pekarstva. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 243 str.
- Koehler P., Wieser H. 2013. Chemistry of cereal grains. V: *Handbook on sourdough biotechnology*. Gobetti M., Gänzle M. (ur.). New York, Springer: 11-45
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. Druga dopolnjena izdaja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 230-239 str.
- Kumagi H. 2010. Wheat proteins and peptides. V: *Bioactive proteins and peptides as functional foods and neutraceuticals*. Mine Y., Li-Chan E., Jiang B. (ur.). Iowa, Willey-Blackwell: 289-299
- Luna Suarez S., Lopez V.E., Lopez Y., Lopez-Valdez F. 2009. Modification of an amaranth seed protein and its effect in the expression into *E.coli*. *New Biotechnology*, 25: 295
- Mariotti M., Garofalo C., Aquilanti L., Osimani A., Fongaro L., Tavoletti S., Hager A.S., Clementi F. 2014. Barley flour exploitation in sourdough bread-making: a technological nutritional and sensory evaluation. *Food Science and Tecnology*, 59: 973-980
- Menon R., Gonzalez T., Ferruzzi M., Jackson E., Winderl D., Watson J. 2016. Oats-from farm to fork. *Advances in Food and Nutrition Research*, 77: 1-55

- Minervini F., De Angelis M., Di Cagno R., Gobbetti M. 2014. Ecological parameter influencing microbial diversity and stability od traditional sourdough. International Journal of Food Microbiology, 171: 136-146
- Moraes P.M., Perin L.M., Junior A.S., Nero L.A. 2013. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, 44, 1: 109-112
- Müntz K., Belozersky M.A., Dunaevsky Y.E., Schlereth A., Tiedemann J. 2001. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seed during germination and seedling growth. Journal of Experimental Botany, 52: 1741-1752
- Narvhus J. A., Sorhaug T. 2012. Backery and Cereal Products. V: Food biochemistry and food processing. 2nd ed. Simpson B.K. (ur.), Nollet L.M., Toldora F., Benjakul S., Paliyath G., Hui Y.H. Quebec, Willey-Blackwell: 594-613
- Olsen O.A., Linnestad C., Nichols S.E. 1999. Developmental biology of the cereal endosperm. Trends in Plant Science, 4: 253-256
- Ortiz-Martinez M., Winkler R., Garcia-Lara S. 2014. Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. Jurnal of Proteomics, 111: 165-183
- Osredkar J. 2012. Oksidativni stres. Zdravstveni vestnik, 81: 393-406
- Pallin A., Agback P., Jonsson H., Roos S. 2016. Evaluation of growth metabolism and productionof potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*. Food Microbiology, 57: 159-171
- Pessione E., Cirrincione S. 2016. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines. Frontiers in Microbiology, 7: 1-19
- Petauer T. Leksikon rastlinskih bogastev. 1993. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 684 str.
- Peyer C.P., Zannini E., Arendt K.E. 2016. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. Trends in Food Science and Technology, 54: 17-25
- Pot B.D.F., Tsakalidou E. 2009. Taxonomy and metabolism of lactobacillus. V: *Lactobacillus Molecular Biology*. Ljungh A., Wadstrom T. (ur.). Wareham, Caister Academic Press: 3-58
- Ricci D., Giamperi L., Buccini A., Fraternale D. 2006. Antioxidant activity of punica granatum fuits. Fitoterapia, 77, 4: 310-312
- Ray B., Bhunia A. 2007. Fundamental food microbiology. 4th ed. Boca Raton, CRC Press: 536 str.

- Rizzello C.G., Tagliazucchi D., Babini E., Rutella S.G., Taneyo-Saa L.D., Gianotti A. 2016. Bioactive peptides from vegetable food matrices: research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. *Journal of Functional Foods*, 27: 549-569
- Saa D.T., Turroni S., Serrazanetti D.I., Rampelli S., Maccaferri S., Candela M., Severgnini M., Simonetti E., Brigidi P., Gianotti A. 2014. Impact of kamut khorosan in gut microbiota and metabolome in healthy volunteers. *Food Research International*, 63: 227-232
- Salvucci E., LeBlanc J.G., Perez G. 2016. Technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT-Food Science and Technology*, 70: 185-191
- Savijoki K., Ingmer H., Vaemanen P. 2006. Proteolytic system of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394-406
- Sarmadi B.H., Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins:a review. *Peptides*, 31: 1949-1956
- Schmidt D., Gaziola S.A., Boaretto F.L., Azevedo R.A. 2016. Proteomic analysis of mature barley grains from C-hordein antisense lines. *Phytochemistry*, 125: 14-26
- Shahidi F., Chandrasekara A. 2013. Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion:a review. *Journal of Functional Foods*, 5: 570-581
- Shewry R.P., Halford G.N. 2002. Cereal seed storage proteins:structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53: 947-958
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms-I. Microbial vs. higher cells-damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiol*; 44: 587– 624
- Sofi F., Whittaker A., Cesari D., Gori A.M., Fiorillo C., Becatti M., Marotti I., Vinelli G., Casini A., Abbate R., Gensini G.F., Benedettelli S. 2013. Characterization of khorosan wheat (kamut) and impact of a replacement diet on cardiovascular risk factors:cross-over dietary intervention study. *European Jurnal of Clinical Nutrition*, 67: 190-197
- Sterna V., Zute S., Brunava L. 2016. Oat grain composition and its nutrition benefice. *Agricultureand Agricultural Science Procedia*, 8: 252-256
- Šramkova Z., Gregova E., Šturdik E. 2009. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2: 115-138
- Teh S.S., El-Din A., Bekhit A.E.A., Carne A., Birch J. 2016. Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinin and zingibain. *Food Chemistry*, 203: 199-206

- Thiele C., Gänzle M., Vogel R.F. 2003. Flourescence labeling of wheat proteins for determination of gluten hydrolysis and depolymerisation during dough processing and sourdough fermentation. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 51: 2745-2752
- Udenigwe C.C. 2014. Bioinformatics approaches prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology*, 36: 137-143
- Vensel W.H., Tanaka C.K., Cai N., Wong J.H., Buchanan B.B., Hurkman W.J. 2005. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics*, 5: 1594-1611
- Vermeulen N., Pavlovic M., Ehrmann M.A., Gänzle M.G., Vogel R.F. 2005. Functional characterization of proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451 during growth in sourdough. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6260-6266
- Vozelj S., Obermajer N., Kos J. 2007. Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. *Farmacevtski vestnik*, 58: 133-138
- Wang X.S., Tang CH., Yang X.Q., Gao W.R. 2008. Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestability of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry*, 107: 11-18
- Xiong Y.L. 2010. Antioxidant peptides. V: *Bioactive Proteins and peptides as functional foods and neutraceuticals*. Mine Y., Li-Chan E., Jiang B. (ur.). Iowa, Willey-Blackwell: 29-42
- Young D., Mine Y. 2010. Anti-inflammatory/oxidative stress proteins and peptides. V: *Bioactive proteins and peptides as functional foods and neutraceuticals*. Mine Y., Li-Chan E., Jiang B. (ur.). Iowa. Willey-Blackwell: 15-29
- Zhang W., Sangtong V., Peterson J., Scott M.P., Messing J. 2013. Divergent properties of prolamins in wheat and maize. *Planta*, 237: 1465-1473

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. Poloni Jamnik za prevzem mentorstva in ponujeno možnost opravljanja magistrske naloge na področju, ki me zanima. Zahvaljujem se ji za vso strokovno pomoč, nasvete, vzpodbudne besede in prijaznost tekom nastajanja magistrske naloge. Hvala tudi za vse sproščene klepete in hitro organizacijo zagovora.

Zahvaljujem se somentorju prof. dr. Tomažu Požrl za pomoč in nasvete pri pripravi magistrske naloge. Hvala za pripravljenost in hiter pregled magistrskega dela.

Hvala prof. dr. Blažu Cigic za recenzijo in kritično presojo magistrske naloge.

Najlepše se zahvaljujem osebju Inštituta za mlekarstvo in probiotike Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, zlasti dr. Bojani Bogovič Matijašić in dr. Petri Mohar Lorbeg za strokovno svetovanje, pomoč in izvedbo identifikacije izoliranih sevov mlečnokislinskih bakterij.

Hvala dr. Karmen Stopar za pregled skladnosti magistrske naloge z navodili.

Hvala Tajdi Klobučar za pomoč pri eksperimentalnem delu magistrske naloge in prijetno sodelovanje v laboratoriju.

Nenazadnje hvala mojim domačim, fantu in prijateljem za razumevanje, podporo in vzpodbude v času študija, predvsem pa staršem, da so mi omogočili študij in mi stali ob stani vsa leta šolanja. Hvala vsem, ki so verjeli vame, tudi ko sama nisem.

PRILOGA A

Identifikacija avtohtonih sevov mlečnokislinskih bakterij kislih test s sekvenciranjem 16S rDNA

Nukleotidna zaporedja pomnožkov 16S rDNA so bila primerjana z zaporedji genske banke NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information) s pomočjo programa BLAST (ang. The Basic Local Alignment Search Tool).

Pril. A1: Rezultati sekvenciranj 16S rDNA in identifikacija sevov MKB avtohtone mikroflore kislih test (Inštitut za mlekarstvo in probiotike Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani)

Amarantovo kislo testo

Pediococcus pentosaceus

```
AMTGCAGTCGAACGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTACTTGACTGATTGAGATTAAACACGAAGTGAGTGGCGA  
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAG  
AGAAAACCGATGGTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGT  
GAGGTAAGGCTACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA  
AAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTAAAGAAGAACGTTGGTAAGAGTA  
ACTGTTACCCAGTGACGGTATT  
TAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATT  
GCGTAAAGCGAGCGCAGGGCGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTG  
CATTGGAAACTGGAGACTGAGTGCAGTAGATATGGAAAGAACACCA  
GGAGACTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGAGGGTGA  
AATGCGTAGATATGGAAAGAACACCA  
GGCGAAGGGCGGCTGTTCTGCAACTGACGCTGAGGGCTCGAAAGCATGGTAKCG  
AACAGGATTAGATACCC  
TAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGAGGGTTCCGCCCT  
CAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTA  
CCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTG  
ACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT  
TTAATTGAGCTACGCGAANAACCTTACAGGTCTGACATCTTGACAGTCTAAG
```

Ječmenovo kislo testo

Pediococcus pentosaceus

```
ANGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTACTTGACTGATTGAGATTAAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTA  
ACACGTGGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGA  
TGGTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAAAGGC  
TCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACMTTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA  
CSGGAGGCAGTAGGGAATCTTCCAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTG  
AAGAAGGGTT  
CGGCTCGTAAAGCTCTGTTAAAGAAGAACGCTGGTAAGARTAACTGTTACCCAGTGACGGTATT  
TAACCGAAGAACGCTGTTAAAGCCTCGGCTCAACCGAAGAAGTG  
CATTGGGCGTAAAGCGA  
GCGCARGCGGTCTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTCGGCTCAACCGAAGAAGTG  
CATTGGGAAACTGGGAGACTTGAG  
TGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGAGGGTGA  
AATGCGTAGATATGGAAAGAACACCA  
GAGTGGCGAAGGCG  
GCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGGCTCGAAAGCATGGTAGCG  
AACAGGATTAGATACCC  
GTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGAGGGTTCCGCC  
CTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTA  
ATCCGCC  
GGAGTGGTTAATT  
GTACGACCGCAGGGTTGAAACTCAAAGAATTG  
ACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT  
CTACGCGAAGAACCTTACCA  
GAGTCTGACATCTTGACAGTCTAAGAGA
```

Konopljino kislo testo

Weissella confusa

GTCGAACGCTTGTGGTTCAACTGATTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGGAAACCTACCTCTAGCAGGGATAACWTTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATGAC
AACCGCATGGTTATTTAAAAGATGGCTCTGCTACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGG
TAATGGCTTACCAAGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGATGAA
GGGTTTGGCTCGTAAACACTGTTGAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACGTGTCATGTGACGGTATCTTAC
AGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTATGTTCAAGCGTTATCCGGATTGGCGTA
AAGCGAGCGCAGACGGTTATTAAGTCTGAAGTGAAGGCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTAGATATGGAA
CTTGAAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGAGCGGTAAATGCGTAGATATGGAA
AGCGGGCTTCTGGACTGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCC
ACACCGTAAACGATGAGTCTAGGTGTTGAGGGTTCCGCCNTTAAGTGCCTCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
TGGGNAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTA
TCGAAGCAACCGCAGAACCTTACCAAGGTTGACATCCCTGACAACCTCAGAAATGGAGCGTCCCTSGGGGACAA
GGT

Kamutovo kislo testo

Pediococcus pentosaceus

GANGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTACTGTACTGATTGAGATTAAACAGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGC
ATGGTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTACTCTGGATGGACCCGCGGTATTAGCTAGKTGGTAGGTTAAAGG
CTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTA
CSGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGTAAGAAGGTTT
CGGCTGTAAGCTGTTAAAGAAGAACGTGGTAAGARTAACTGTTACCCAGTGACGGTATTTAACAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTAGGTGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGCGTAAAGCGA
GCGCAGGGCGGTCTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTCCGGCTAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGAGACTTGAG
TGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGAGCGGTAAATGCGTAGATATGGAAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG
GCTGCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCC
GTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGTGCAAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCTGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGC
TACCGAAGAACYTTACCAAGGTTGACATCTGACAGTCTAAGAA

Proseno kislo testo

Weissella confusa

NGCTTGTGGTTCAACTGATTGAAGAGCTTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGGAAACCTACCTCTAGCAGGGATAACATTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATGACAACCGCA
TGGTTTATTTAAAAGATGGCTCTGCTACTCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAAATGGC
TTACCAAGGCAGTGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGATGAAGGGTTT
GGCTGTTAAACACTGTTGAAGAGAAGAACATGGAGAGTAACGTGTTCAAGCGTTATCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAG
AACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCCGGTAAACGTATGTTCAAGCGTTATCCGGATTATTGGCGTAAAGCGAG
CGCAGACGGTTATTAAGTCTGAAGTGAAGGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTGGAAACTGGATGACTTGAGT
CAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTGAGCGTAGATATGGAAAGAACACCAKTGGCGAAGGCGCT
TTCTGGACTGTAACGTGCTGGTAGGGCTCGAAAGTGTGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACACCGTA
AACGATGAGTGTAGGTGTTGAGGGTTCCGCCCTAAGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGNNAGT
ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAAGGTTGACATCCCTGACAACCTCNGAGATGGAGCGTCCCTGGGGACAAGGTGACAG
GTGGTGCATGGTTGTC
ANGAACTTCCGTTAATTGATTATGACGTACTGTACTGATTGAGATTAAACAGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGT
ACACGTGGTAACCTGCCAGAAGTAGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCA
TGGTTTCTTTAAAAGATGGCTCTGCTACTCTGGATGGACCCGCGGTATTAGCTAGTTGGTAGGTTAAAGG
TCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACMTTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTA
CSGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGTAAGAAGGTTT

CGGCTCGAAAGCTCTGGTTAAAGAAGAACGTGGTAAGARTAACTGTTACCCAGTGACGGTATTAAACCAGAAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACSTAGGTGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGCGTAAAGCGA
GCGCARCGGGCTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAG
TGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCG
GCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTGAAAGCATGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATGCC
GTAAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTCAGTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCTGGGA
GTACGACCGCAGGGTTGAAACTAAAAGAATTGACGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAG
CTACGCGAACCTTACAGGTCTGACATCTCTGACAGTCTAAGAGA

Ovseno kislo testo

Weissella confusa

GTCGAACGCTTGTGGTCAACTGATTGAAGAGCTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGGAAACCTACCTTACGAGGGATAACWTTGGAAACAGATGCTAAACGATAAACATGAC
AACCGATGGTTTATTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCTTAGCTAGTTGGTAAGG
TAATGGCTTACCAAGGCATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGATGAA
GGGTTTGGCTGTTAAACACTGTTGAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACGTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTAC
AGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATCGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTATTGGCGTA
AAGCGAGCGCAGACGGTTATTAAAGTCTGAAGTGAAGGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTGGAAACTGGATGA
CTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGA
AGCGGGCTTCTGGACTGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGTAGCAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCC
ACACCGTAAACGATGAGTGTCTGGAGGGTTCCGCCCTAAGTGCCCGAGCTAACGCATTAAGCAACTCCGCT
GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATT
CKAAGCAACGCGAANAACCTTACCAAGGTCTGACATCCCTGACAACACTCCAGAGATGGAGCGTCCCTGGGACAA
GGTACAGGTGGTGCATGGTTGCKTCAGCTCGTGTCTGAGA

Pšenično kislo testo

Weissella confusa

GTCGAACGCTTGTGGTCAACTGATTGAAGAGCTGCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAAGAGTG
GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGAAACCTACCTTACGAGGGATAACWTTGGAAACAGATGCTAA
TACCGTATAACAATGACAACCGCATGGTTTATTAAAAGATGGTTCTGCTATCACTAAGAGATGGTCCC
GCGGTGCTTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACT
GATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA
ATGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGATGAAGGGTTCCGGCTCGTAAACACTGTTGT
AAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACGTGTTCAATGTGTGACGGTATCTTACCAAGAAAGAACGGCTAAAT
ACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTTCAAGCGTTATCCGGATTATTGGCGTAAGCGAGCG
CAGACGGTTATTAAAGTCTGAAGTGAAGGAAAGCCCTCAGCTCAACTGAGGAATTGCTTGGAAACTGGATGAC
TTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGGAACTCCATGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACC
AGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGACTGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGTAGCAACAGGATT
AGATACCCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGTAGGTGTTGAGGGTTCCGCCCTAAGTGGCG
CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCKAAGCAACGCGAANAACCTTACCAAGGTCTGACAT
CCCTGACAACACTCCAGAGATGGAGCGTCCCTGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCKTC
AGCTCGTGTCTGAGA

PRILOGA B

Rezultati določanja celokupne hidrolize proteinov mok tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test v odvisnosti od časa

Vrednost F predstavlja povprečno vrednost fluorescence dveh tehničnih ponovitev. F_0 označuje vrednost fluorescenčnega ozadja, ki smo ga odšteli povprečnim vrednostim za posamezno meritev. Prva in druga paralelna označujeta biološki ponovitvi. Oznaki I in II predstavljata dve tehnični ponovitvi za posamezno biološko ponovitev.

Meritve fluorescence (F) za določanje celokupne hidrolize proteinov z metodo OPA.

Pril. B1:Določanje relativnega prirasta amino skupin glede na čas 0 ur v primeru amarantovega KT

	Čas (h)		F	F-F0	Koncentracija amino skupin [g/L]	Masa amino skupin/ g suhe mase kislega testa	Relativni prirast amino skupin na čas 0h (%)
Prva paralelka	0	I	1249	1006	6,78	0,14	100 %
		II	1180	901	5,96	0,12	100 %
	12	I	5185	4942	37,15	0,51	380 %
		II	5330	5051	38,00	0,52	441 %
	24	I	9228	8985	68,35	0,93	692 %
		II	8586	8307	63,12	0,86	726 %
Druga paralelka	0	I	1120	877	5,78	0,11	100 %
		II	1109	830	5,42	0,10	100 %
	12	I	4161	3918	29,25	0,45	416 %
		II	4237	3958	29,56	0,45	448 %
	24	I	7801	7558	57,34	0,90	829 %
		II	7773	7494	56,84	0,89	877 %
Slepi vzorec	ddH ₂ O	I	243	0			
		II	279	0			

Pril. B2: Določanje relativnega prirasta amino skupin glede na čas 0 ur v primeru konopljinega KT

	Čas (h)	F	F-F0	Koncentracija amino skupin [g/L]	Masa amino skupin/g suhe mase kislega testa	Relativni prirast amino skupin na čas 0h (%)	
Prva paralelka	0	I	1915	1606,5	11,41	0,15	100 %
		II	1820	1327,5	9,26	0,12	100 %
	12	I	2317	2007,5	14,50	0,18	123 %
		II	2007,5	1728,5	12,35	0,15	129 %
	24	I	3402,5	3141,5	23,26	0,29	197 %
		II	3141,5	2862,5	21,10	0,26	221 %
	Druga paralelka	I	1926,5	1665,5	11,86	0,15	100 %
		II	1665,5	1386,5	9,71	0,13	100 %
		I	2256,5	1995,5	14,41	0,18	121 %
		II	1995,5	1716,5	12,26	0,16	126 %
	24	I	3154,5	2893,5	21,34	0,27	179 %
		II	2893,5	2614,5	19,19	0,25	197 %
Slepi vzorec	ddH ₂ O	I	261	0			
		II	279	0			

Pril. B3: Določanje relativnega prirasta amino skupin glede na čas 0 ur v primeru kamutovega KT

	Čas (h)	F	F-F0	Koncentracija amino skupin [g/L]	Masa amino skupin/g suhe mase kislega testa	Relativni prirast amino skupin na čas 0h (%)	
Prva paralelka	0	I	1457	1214	8,38	0,11	100 %
		II	1313	1034	6,99	0,09	100 %
	12	I	2871	2628	19,29	0,23	213 %
		II	2638	2359	17,22	0,21	228 %
	24	I	3871	3628	27,01	0,34	314 %
		II	3779	3500	26,02	0,33	362 %
	Druga paralelka	I	1295	1052	7,13	0,09	100 %
		II	1205	926	6,16	0,07	100 %
		I	3380	3137	23,22	0,28	332 %
		II	2972	2693	19,79	0,24	328 %
	24	I	4539	4296	32,16	0,39	450 %
		II	4213	3934	29,37	0,35	476 %
Slepi vzorec	ddH ₂ O	I	243	0			
		II	279	0			

Pril. B4: Določanje relativnega prirasta amino skupin glede na čas 0 ur v primeru prosenega KT

	Čas (h)		F	F-F0	Koncentracija amino skupin [g/L]	Masa amino skupin/g suhe mase kislega testa	Relativni prirast amino skupin na čas 0h (%)
Prva paralelka	0	I	822	615	3,76	0,04	100 %
		II	896	674	4,21	0,04	100 %
	12	I	2301	2094	15,17	0,19	432 %
		II	2336	2114	15,33	0,19	436 %
	24	I	3023	2816	20,74	0,25	578 %
		II	2833	2611	19,16	0,23	534 %
	Druga paralelka	I	600	393	2,04	0,04	100 %
		II	646	424	2,28	0,04	100 %
		I	1939	1732	12,38	0,16	352 %
		II	1947	1725	12,32	0,15	351 %
	24	I	2301	2094	15,17	0,19	430 %
		II	3023	2801	20,63	0,25	585 %
Slepi vzorec	ddH ₂ O	I	207	0			
		II	222	0			

Pril. B5: Določanje relativnega prirasta amino skupin glede na čas 0 ur v primeru ovsenega KT

	Čas (h)		F	F-F0	Koncentracija amino skupin [g/L]	Masa amino skupin/g suhe mase kislega testa	Relativni prirast amino skupin na čas 0h (%)
Prva paralelka	0	I	1081	805	5,22	0,06	100 %
		II	1059	802	5,20	0,06	100 %
	12	I	3280	3004	22,19	0,26	423 %
		II	3147	2890	21,31	0,25	408 %
	24	I	6430	6154	46,50	0,55	886 %
		II	5896	5639	42,53	0,51	814 %
Slepi vzorec	ddH ₂ O	I	276	0			
		II	257	0			

Pril. B6: Določanje relativnega prirasta amino skupin glede na čas 0 ur v primeru ječmenovega KT

	Čas (h)	F	F-F0	Koncentracija amino skupin [g/L]	Masa amino skupin/ g suhe mase kislega testa	Relativni prirast amino skupin na čas 0h (%)	
Prva paralelka	0	I	948	705	4,45	0,06	100 %
		II	837	558	3,18	0,04	100 %
	12	I	2051	1808	12,96	0,16	282 %
		II	1957	1678	11,96	0,15	349 %
	24	I	2490	2247	16,35	0,20	357 %
		II	2405	2126	15,42	0,19	452 %
	0	I	915	672	4,20	0,05	100 %
		II	903	624	3,83	0,05	100 %
Druga paralelka	12	I	1999	1756	12,15	0,16	299 %
		II	1946	1667	11,88	0,15	310 %
	24	I	2465	2222	16,16	0,20	380 %
		II	2346	2067	14,96	0,18	386 %
	Slepi vzorec	I	243	0			
		ddH ₂ O	279	0			

Pril. B7: Določanje relativnega prirasta amino skupin glede na čas 0 ur v primeru pšeničnega KT

	Čas (h)	F	F-F0	Koncentracija amino skupin [g/L]	Masa amino skupin/ g suhe mase kislega testa	Relativni prirast amino skupin na čas 0h (%)	
Prva paralelka	0	I	712	505	2,91	0,04	100 %
		II	682	460	2,56	0,03	100 %
	12	I	1188	981	6,58	0,08	229 %
		II	1092	870	5,73	0,07	226 %
	24	I	1906	1699	12,12	0,15	419 %
		II	1795	1573	11,15	0,13	437 %
	0	I	708	501	2,88	0,03	100 %
		II	680	458	2,55	0,03	100 %
Druga paralelka	12	I	1197	990	6,65	0,08	233 %
		II	1112	890	5,88	0,07	232 %
	24	I	1852	1645	11,71	0,14	412 %
		II	1737	1515	10,70	0,13	426 %
	Slepi vzorec	I	207	0			
		ddH ₂ O	222	0			

PRILOGA C

Izraženost rezultatov spremljanja hidrolize žitnih proteinov tekom mlečno kislinske fermentacije kislega testa

Primer izračuna:

Pril. C1.: Vrednosti merjenja fluorescence z metodo OPA v postopku določanja hidrolize žitnih proteinov tekom MKF kislega testa, na primeru 12 urne fermentacije kislega testa amarantove moke. Rezultati so podani kot absolutne vrednosti FI in FII.

		Fluorescenza			
	Čas fermentacije (h)	FI	FII	Fx	F
AMARANT 1 ponovitev	12	5185	5330	5258	4996,5
AMARANT 2 ponovitev	12	4161	4237	4199	3938
Slepi vzorec ddH ₂ O (F ₀)		243	279	261	0

$$Fx = \frac{(FI+FII)}{2}$$

Povprečna vrednost fluorescenc vzorca: ... (1)

$$F_0 = \frac{(FI+FII)}{2}$$

Povprečna vrednost florescenc slepega vzorca:

... (2)

Odštejemo slepi vzorec: $F = Fx - F_0$... (3)

S pomočjo enačbe umeritvene krivulje (Priloga D) smo izračunali koncentracijo peptidov/ aminokislin v vzorcih kislih test. Spremenljivka y predstavlja fluorescenco v odvisnosti od koncentracije amino skupin x:

$$\text{-Eračba umeritvene krivulje: } y = 2,5917x + 128 \quad \dots (4)$$

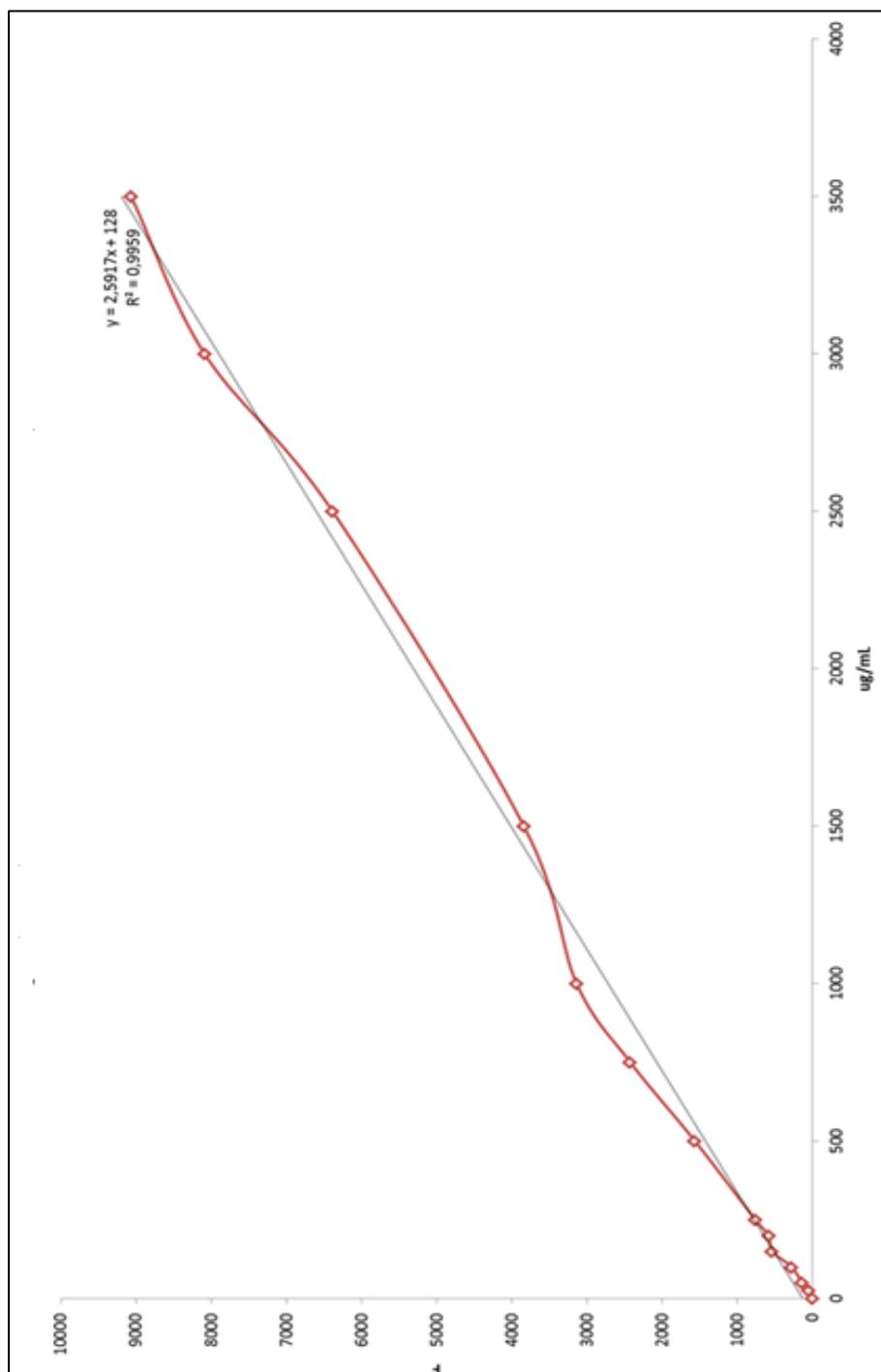
$$x = \frac{y-128}{2,5917}$$

$$\text{- Izračun koncentracije amino skupin: } \dots (5)$$

Maso amino skupin smo normalizirali na suho maso kislega testa. Rezultati celokupne hidrolize kislega testa so predstavljeni kot relativni prirast amino skupin v vzorcih kislih test glede na čas 0 ur.

PRILOGA D

Umeritvena krivulja: Fluorescenca (F) v odvisnosti od koncentracije govejega serumskega albumina BSA



PRILOGA E

Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test

Pril.: E1: Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test- amarantova moka

ČAS FERMENTACIJE (h)	VZOREC	pH	POVPREČJE	SD
0	1	6,34	6,36	0,02
	2	6,37		
12	1	3,89	3,90	0,01
	2	3,91		
24	1	3,97	3,95	0,03
	2	3,93		

Pril.: E2: Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test- konopljina moka

ČAS FERMENTACIJE (h)	VZOREC	pH	POVPREČJE	SD
0	1	6,40	6,52	0,17
	2	6,64		
12	1	5,54	5,52	0,03
	2	5,50		
24	1	5,46	5,45	0,02
	2	5,43		

Pril.: E3: Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test- kamutova moka

ČAS FERMENTACIJE (h)	VZOREC	pH	POVPREČJE	SD
0	1	6,22	6,25	0,04
	2	6,27		
12	1	3,89	3,94	0,07
	2	3,99		
24	1	3,89	3,93	0,06
	2	3,97		

Pril.: E4: Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test- ovsena moka

ČAS FERMENTACIJE (h)	VZOREC	pH	POVPREČJE	SD
0	1	5,65	5,66	0,01
	2	5,67		
12	1	4,24	4,25	0,01
	2	4,25		
24	1	4,07	4,10	0,04
	2	4,13		

Pril.: E5: Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test - prosena moka

ČAS FERMENTACIJE (h)	VZOREC	pH	POVPREČJE	SD
0	1	6,18	6,27	0,13
	2	6,36		
12	1	4,04	4,04	0,01
	2	4,03		
24	1	3,86	3,93	0,09
	2	3,99		

Pril.: E6: Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test- ječmenova moka

ČAS FERMENTACIJE (h)	VZOREC	pH	POVPREČJE	SD
0	1	5,67	5,70	0,04
	2	5,72		
12	1	3,91	3,88	0,05
	2	3,84		
24	1	3,78	3,78	0,00
	2	3,78		

Pril.: E7: Spremljanje vrednosti pH kislih test tekom mlečnokislinske fermentacije kislih test- pšenična moka

ČAS FERMENTACIJE (h)	VZOREC	pH	POVPREČJE	SD
0	1	6,20	6,25	0,01
	2	6,30		
12	1	4,08	4,10	0,02
	2	4,11		
24	1	3,91	3,97	0,08
	2	4,02		

PRILOGA F

Določanje antioksidativne učinkovitosti frakcij vodnih ekstraktov kislih test v celicah
kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*

P_{OD650} predstavlja prirast fluorescence normaliziran z optično gostoto OD_{650} . Oznaka SD predstavlja standardno deviacijo (Priloga G).

Pril.: F1: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi FVE kislih test amarantove moke

ČAS FERMENTACIJE (h)	P_{OD650}	Relativni prirast oksidacije (%)	SD
0	2,40	65,4	0,36
12	2,60	71,0	1,83
24	2,78	75,7	3,49
K	3,47		

Pril.: F2: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi FVE kislih test konopljine moke

ČAS FERMENTACIJE (h)	P_{OD650}	Relativni prirast oksidacije (%)	SD
0	3,60	64,06	6,11
12	4,62	82,25	4,53
24	5,00	89,05	4,28
K	5,61		

Pril.: F3: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi FVE kislih test kamutove moke

ČAS FERMENTACIJE (h)	P_{OD650}	Relativni prirast oksidacije (%)	SD
0	3,07	67,34	3,96
12	3,45	75,77	8,29
24	3,72	81,78	0,07
K	4,55		

Pril.: F4: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi FVE kislih test ovsene moke

ČAS FERMENTACIJE (h)	P _{OD650}	Relativni prirast oksidacije (%)	SD
0	3,12	66,58	10,46
12	3,88	82,86	2,26
24	3,00	63,97	21,59
K	4,69		

Pril.: F5: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi FVE kislih test prosene moke

ČAS FERMENTACIJE (h)	P _{OD650}	Relativni prirast oksidacije (%)	SD
0	1,61	71,92	5,94
12	1,77	79,22	2,53
24	1,75	78,05	0,90
K	2,24		

Pril.: F6: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi FVE kislih test ječmenove moke

ČAS FERMENTACIJE (h)	P _{OD650}	Relativni prirast oksidacije (%)	SD
0	1,69	88,75	2,15
12	1,66	87,33	2,58
24	1,73	90,70	3,38
K	1,90		

Pril.F7: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi FVE kislih test pšenične moke tip 500

ČAS FERMENTACIJE (h)	P _{OD650}	Relativni prirast oksidacije (%)	SD
0	1,91	97,74	4,26
12	1,88	95,89	3,04
24	1,73	88,42	5,52
K	1,96		

PRILOGA G

Izraženost rezultatov pri določanju znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 po izpostavitvi frakcijam vodnih ekstraktov kislih test

Pril. G1.: Meritve fluorescence (F) za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi frakcijam vodnih ekstraktov amarantovega kislega testa

		CIKEL 1 F0	CIKEL 2 F1	CIKEL 3 F2	CIKEL 4 F3	CIKEL 5 F4
	ČAS	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
1	0 h	3148,0	6277,0	12235,5	19613,0	30661,0
2	0 h	3411,5	6955,5	13965,0	24033,0	38430,0
1	12 h	3275,0	5978,5	12560,0	22115,0	35010,5
2	12 h	3370,5	6531,0	13983,5	25651,5	43050,0
1	24 h	2917,5	5803,0	12708,0	23488,5	39370,5
2	24 h	3253,5	6300,0	13723,0	25779,0	42237,0
1	Kontrola 1	3465,0	7189,5	16719,0	33334,5	53901,0
2	Kontrola 2	3446,0	7790,5	18399,5	35854,0	58366,0

Primer izračuna:

Prirast (P) fluorescence

$$P = \frac{F_2 - F_0}{F_0} \dots (1)$$

Prirast (P) flourescence normaliziramo z optično gostoto (OD650)

$$P_{OD650} = \frac{P}{OD650} \dots (2)$$

F2.....fluorescenza po 60 minutnem merjenju
F0.....fluorescenza na začetku merjenja (čas 0 minut)
P.....prirast
 P_{OD650}prirast normaliziran z OD_{650}

Relativni prirast (Pn):

$$P_n = \frac{P_{OD650}}{P_{OD650K}}$$

... (3)

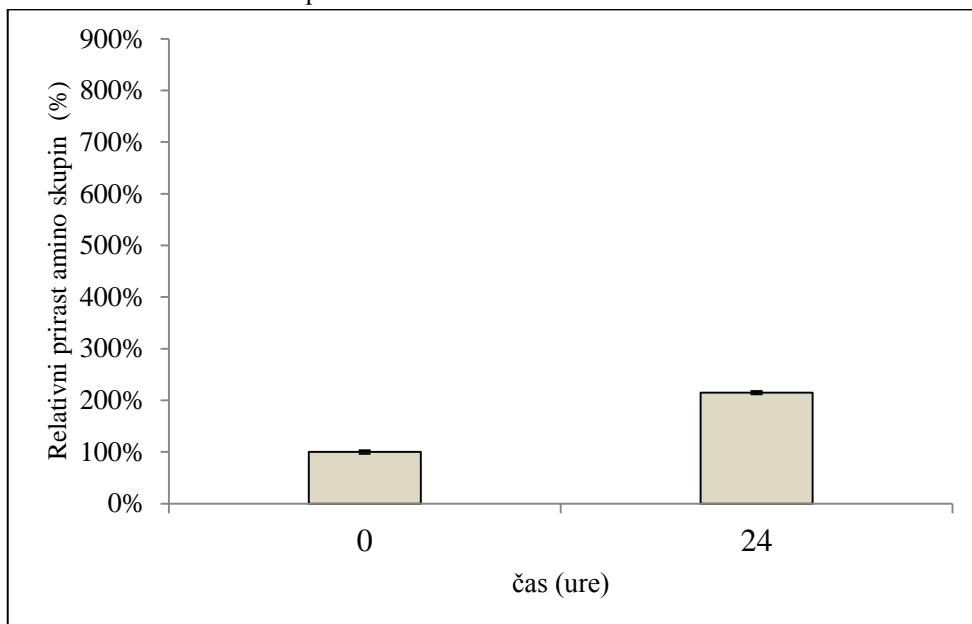
P_{OD650}prirast normaliziran z OD_{650} za vzorec
 P_{OD650K}prirast normaliziran z OD_{650} za kontrolni vzorec

PRILOGA H

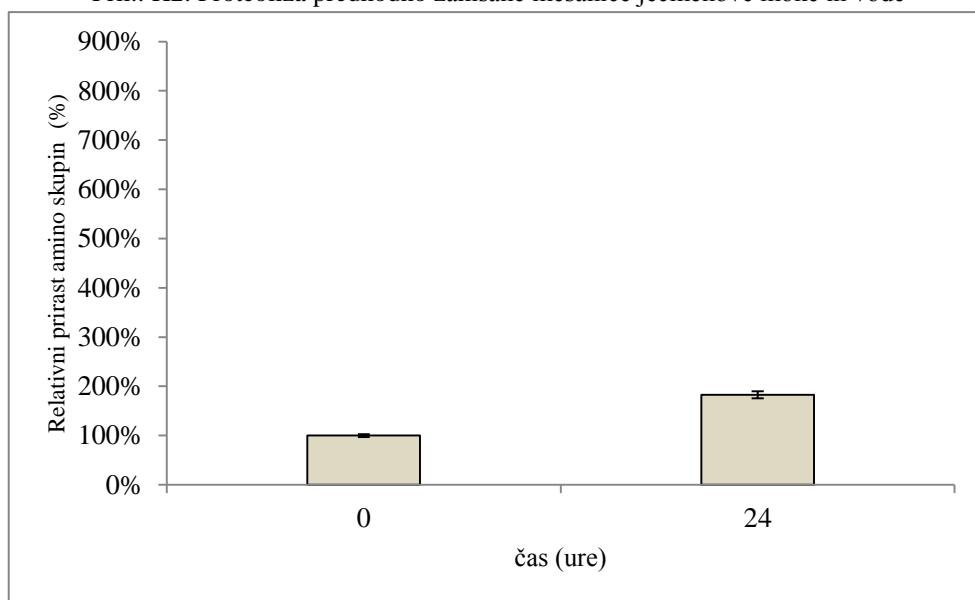
Proteoliza žitnih proteinov predhodno zakisanih kislih test v odvisnosti od časa

Rezultati proteolize žitnih proteinov predhodno zakisanih kislih test so prikazani kot relativni prirast amino skupin (%) glede na čas 0 ur.

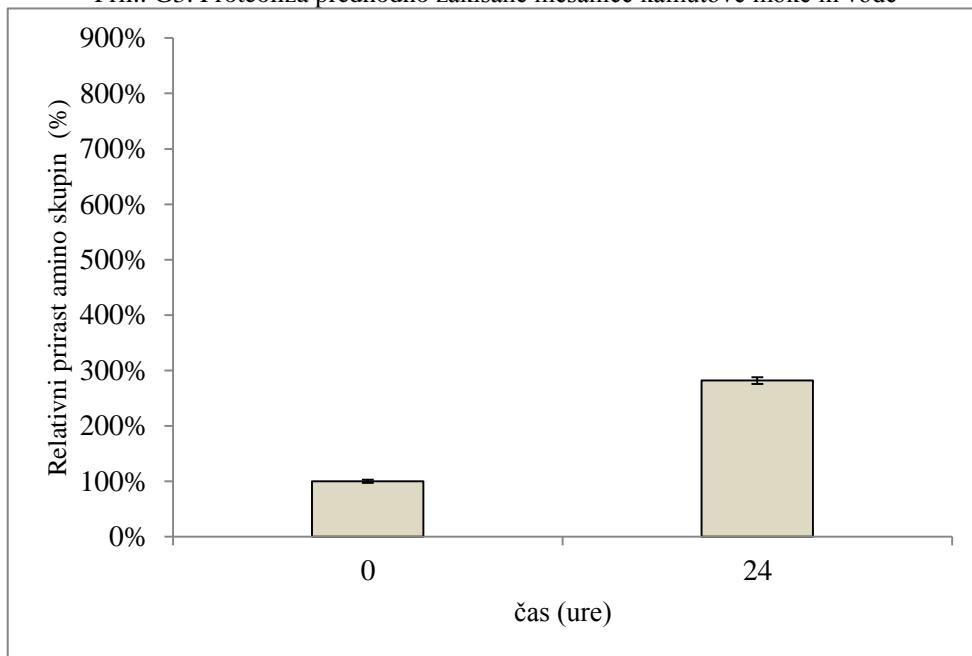
Pril.: H1: Proteoliza predhodno zakisane mešanice amarantove moke in vode



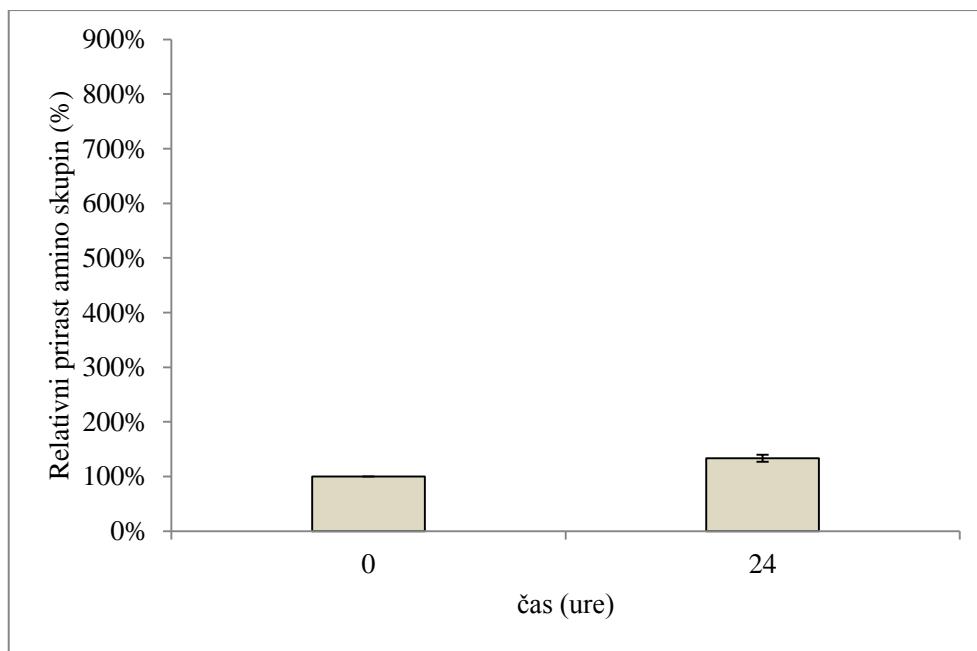
Pril.: H2: Proteoliza predhodno zakisane mešanice ječmenove moke in vode



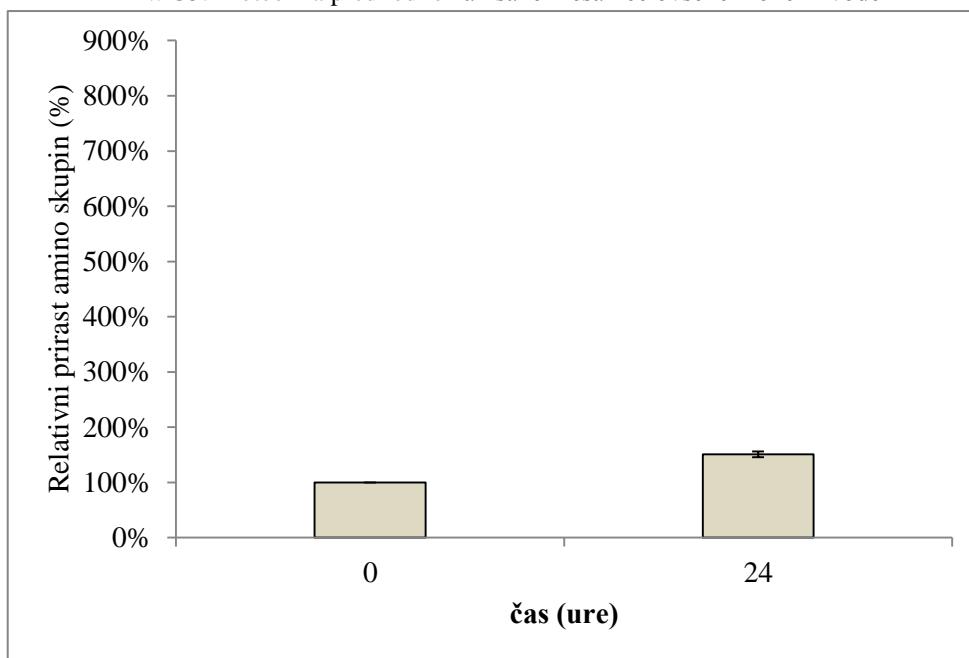
Pril.: G3: Proteoliza predhodno zakisane mešanice kamutove moke in vode



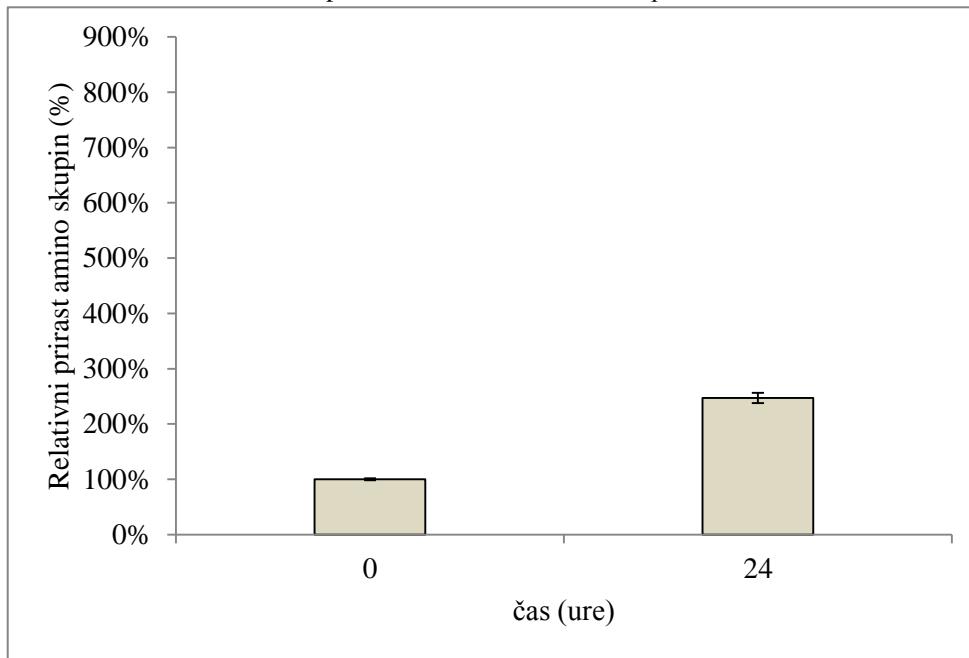
Pril.: G4: Proteoliza predhodno zakisane mešanice konopljine moke in vode



Pril.: G5: Proteoliza predhodno zakisane mešanice ovsene moke in vode



Pril.: G6: Proteoliza predhodno zakisane mešanice prosene moke in vode



Pril.: G7: Proteoliza predhodno zakisane mešanice pšeničnemoke (tip 500) in vode

