

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jana BERLEC

**UGOTAVLJANJE BIOAKTIVNIH PEPTIDOV S PROTIMIKROBNO
AKTIVNOSTJO V FERMENTIRANEM MLEKU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF BIOACTIVE PEPTIDES WITH
ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN FERMENTED MILK**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ireno Rogelj in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jana BERLEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn
 DK UDK 637.146 : 579.222 : 547.96 +604.2 (043)=163.8
 KG mlečni izdelki/fermentirano mleko/protimikrobne snovi/bioaktivni peptidi/protimikrobna aktivnost/*Lactobacillus helveticus* BGRA43/*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8
 AV BERLEC, Jana
 SA ROGELJ, Irena (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
 LI 2009
 IN UGOTAVLJANJE BIOAKTIVNIH PEPTIDOV S PROTIMIKROBNO AKTIVNOSTJO V FERMENTIRANEM MLEKU
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XI, 59 str., 21 pregl., 13 sl., 1 pril., 40 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali med fermentacijo mleka z izbranimi mlečnokislinskimi bakterijami nastajajo bioaktivni peptidi s protimikrobno aktivnostjo. Vzorce smo pripravili tako, da smo mleko fermentirali na klasičen način ali v bioreaktorju pri kontroliranih pogojih (pH, T). Peptide v supernatantu fermentiranega mleka smo ločevali z gelsko filtracijo oz. s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC), protimikrobno aktivnost peptidov pa smo preverili z metodo lise na agarju (MLA) oz. z metodo difuzije v agarju (MDA) in metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah. V analiziranih vzorcih smo določili tudi koncentracijo prostih amino skupin z *o*-ftalaldehidnim reagentom (OPA). Pri vzorcih mleka, fermentiranih z izbranimi bakterijskima sevoma *Lactobacillus helveticus* BGRA43 in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8, smo ugotovili boljšo protimikrobno aktivnost po fermentaciji v bioreaktorju kot pri klasični fermentaciji. Za sev BGRA43 smo ugotovili najvišjo proteolitično aktivnost med izbranimi sevi, po pripravi vzorca fermentiranega mleka z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) in frakcionacijo z RP-HPLC pa smo z MDA ugotovili protimikrobno aktivnost frakcij proti indikatorskemu sevu *Lactobacillus sakei* NCDO 2714. Protimikrobni učinek so imele frakcije s koncentracijami peptidov od 0,16 do 0,73 mg/ml. Prav tako smo ugotovili, da se je protimikrobna aktivnost peptidov zaradi delovanja proteolitičnih encimov tekom fermentacije zmanjšala, saj pri primerjavi frakcij 18-urne in 72-urne fermentacije mleka protimikrobnega delovanja pri slednji nismo ugotovili.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
 DC UDC 637.146 : 579.222 : 547.96 +604.2 (043)=163.8
 CX milk products/fermented milk/antimicrobials/bioactive peptides/antimicrobial activity/*Lactobacillus helveticus* BGRA43/*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8
 AU Berlec, Jana
 AA ROGELJ, Irena (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2009
 TI DETERMINATION OF BIOACTIVE PEPTIDES WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN FERMENTED MILK
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XI, 59 p., 21 tab., 13 fig., 1 ann., 40 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The purpose of the study was to establish whether bioactive peptides with antimicrobial activity are formed during the fermentation of milk with the selected lactic acid bacteria. Samples were prepared by fermenting milk with classical fermentation or with fermentation in a fermentor with controlled conditions (pH, T). Gel filtration or Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) were employed to separate the peptides of the supernatant of fermented milk, while the antimicrobial activity of peptides was examined with deferred agar spot assay (DSA) or agar well diffusion (AWD) method and critical dilution method on microtiter plates. The concentration of free amino groups in the analysed samples was determined by *o*-phthaldialdehyde (OPA) method. In milk samples, fermented with the selected bacterial strains, *Lactobacillus helveticus* BGRA43 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8, greater antimicrobial activity was discovered after the fermentation in fermentor than after classical fermentation. The highest proteolytical activity was established for the BGRA43 strain, while – following the preparation of the sample with solid phase extraction (SPE) and fractionation on RP-HPLC – antimicrobial activity of peptide fractions on indicator strain *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 was determined with AWD method. Inhibition was found in fractions with peptide concentrations between 0,16 mg/ml and 0,73 mg/ml. Furthermore, it has been discovered that due to the proteolytic enzymes the antimicrobial activity of peptides decreases during the fermentation, as with the comparison of fractions – after 18-hour and 72-hour milk fermentation – no antimicrobial activity was established in the latter.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 HIPOTEZI.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 FERMENTIRANO MLEKO IN PRODUKTI, KI PRI TEM NASTAJAJO	3
2.2 BIOAKTIVNI PEPTIDI	4
2.2.1 Bioaktivni peptidi s protimikrobno aktivnostjo in njihovi učinki	6
2.3 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE – MKB.....	9
2.3.1 <i>Lactobacillus helveticus</i> BGRA43	10
2.4 KROMATOGRAFSKE TEHNIKE SEPARACIJE PEPTIDOV	13
2.4.1 Gelska filtracija	13
2.4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP- HPLC)	14
2.5 EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)	14
3 MATERIAL IN METODE	17
3.1 POTEK POSKUSOV.....	17
3.2 MATERIAL.....	17
3.2.1 Reagenti in raztopine	17
3.2.1.1 Priprava pufrov	18
3.2.1.2 Priprava OPA-reagenta (Church in sod., 1983).....	18
3.2.1.3 Priprava SPE-mobilnih faz	19
3.2.2 Pribor in oprema	19
3.2.3 Gojišča	20
3.2.4 Bakterijski sevi	20
3.3 METODE DELA	22
3.3.1 Fermentacija mleka	22
3.3.2 Določanje koncentracije prostih amino skupin	23
3.3.3 Ugotavljanje proteolitične aktivnosti testnih sevov	25
3.3.4 Priprava vzorcev fermentiranega mleka	25
3.3.5 Ekstrakcija peptidov s SPE	26
3.3.6 Ločevanje vzorcev	26
3.3.6.1 Gelska filtracija.....	27
3.3.6.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC)	27
3.3.6.3 Selektivna SPE-elucija.....	27

3.3.7	Koncentriranje frakcij	28
3.3.8	Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti	28
3.3.8.1	Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti z liso na agarju – MLA	28
3.3.8.2	Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti z metodo difuzije v agarju – MDA	29
3.3.8.3	Ugotavljanje proteinske narave protimikrobne snovi (bakteriocini) z liso na agarju	29
3.3.8.4	Metoda kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah	30
4	REZULTATI	31
4.1	UGOTAVLJANJE PROTEOLITIČNE AKTIVNOSTI IZBRANIH TESTNIH SEVOV.....	31
4.2	UGOTAVLJANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI IZBRANIH TESTNIH SEVOV.....	32
4.3	PROTIMIKROBNA AKTIVNOST SUPERNATANTOV MLEKA, FERMENTIRANEGA S SEVI L7, L8, L12, L89, Biofank IN BGRA43.....	34
4.4	GELSKA FILTRACIJA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA IN UGOTAVLJANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NASTALIH FRAKCIJ	35
4.4.1	Klasična fermentacija	35
4.4.1.1	Ugotavljanje koncentracije peptidov	35
4.4.1.2	Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti	36
4.4.2	Priprava fermentiranega mleka v bioreaktorju	38
4.4.2.1	Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z L8 in BGRA43.....	39
4.5	REVERZNO FAZNA KROMATOGRAFIJA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA IN UGOTAVLJANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NASTALIH FRAKCIJ	41
4.5.1	Ugotavljanje masne koncentracije peptidov v vzorcih mleka, fermentiranega z L8 in BGRA43 po ločevanju na RP-HPLC	41
4.5.2	RP-HPLC kromatogram	43
4.5.3	Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti frakcij vzorcev mleka, fermentiranega z <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L8 in <i>L. helveticus</i> BGRA43, proti indikatorskemu sevu <i>L. sakei</i> NCDO 2714	43
4.5.3.1	Metoda z difuzijo v agarju (MDA)	43
4.5.3.2	Ugotavljanje protimikrobnega delovanja frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43 (18 ur), z metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah.....	47
5	RAZPRAVA	49
5.1	SKLEPI.....	54
6	POVZETEK	55
7	VIRI	56
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Protimikrobna aktivnost fragmentov α_{s2} -kazeina, pripravljenih z RP-HPLC (Recio in Visser, 1999).....	7
Preglednica 2:	Zaporedja aminokislinskih ostankov protimikrobnih peptidov v primarni strukturi kazeinov kravjega mleka (Silva in Malcata, 2005)	7
Preglednica 3:	Protimikrobna aktivnost seva <i>Lactobacillus helveticus</i> BGRA43 proti različnim sevom bakterij (Topisirović in sod., 2006)	12
Preglednica 4:	Priprava raztopin (za 500 ml) za SPE	19
Preglednica 5:	Testni sevi, gojišča, kjer smo jih gojili, temperatura gojenja in vir.....	21
Preglednica 6:	Indikatorski sevi, gojišča kjer smo jih gojili, temperatura gojenja in vir	22
Preglednica 7:	Postopek izvedbe SPE.....	26
Preglednica 8:	Testni sevi, vrednosti pH mleka po 18-urni fermentaciji, izmerjene absorbance, molarne koncentracije prostih amino skupin in stopnje proteolitične aktivnosti.....	32
Preglednica 9:	Rezultati ugotavljanja inhibicije indikatorskih sevov z izbranimi testnimi sevi in ugotavljanja proteinske narave inhibitorne snovi z encimi na gojišču MRS; metoda MLA	33
Preglednica 10:	Protimikrobna aktivnost 10-krat koncentriranih supernatantov mleka, fermentiranega s sevi <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (L7, L8, L12, L89, Biofank) in <i>L. helveticus</i> BGRA43 (18-urna klasična fermentacija); metoda MLA	34
Preglednica 11:	Masne koncentracije peptidov v supernatantih nefermentiranega mleka in 18-urne klasične fermentacije mleka z <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L8 ali <i>L. helveticus</i> BGRA43.....	35
Preglednica 12:	Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega z <i>L. helveticus</i> BGRA43, proti posameznemu indikatorskemu sevu (50 mM fosfatni pufer; pH 7,5).....	36
Preglednica 13:	Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega z <i>L. helveticus</i> BGRA43, proti posameznemu indikatorskemu sevu (50 mM Tris-HCl; pH 7,5).....	37
Preglednica 14:	Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L8, proti posameznemu indikatorskemu sevu	39
Preglednica 15:	Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z <i>L. helveticus</i> BGRA43, proti posameznemu indikatorskemu sevu	40
Preglednica 16:	Masna koncentracija peptidov v supernatantu fermentiranega mleka v bioreaktorju, nefiltriranem in filtriranem vzorcu po ekstrakciji s SPE, pred frakcionacijo z RP-HPLC (<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L8 in <i>L. helveticus</i> BGRA43)	41
Preglednica 17:	Masna koncentracija peptidov v frakcijah vzorcev mleka, fermentiranega v bioreaktorju z <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L8 (18 ur) in <i>L. helveticus</i> BGRA43 (18 in 72 ur), dobljenih po RP-HPLC	42

Preglednica 18:	Protimikrobna aktivnost frakcij mleka po 18- in 72-urni fermentaciji v bioreaktorju z <i>L. helveticus</i> BGRA43 (indikatorski sev <i>L. sakei</i> NCDO 2714).....	45
Preglednica 19:	Protimikrobna aktivnost zbrane frakcije, pridobljene s selektivno SPE-elucijo	47
Preglednica 20:	Rast indikatorskega seva <i>L. sakei</i> NCDO 2714 ob prisotnosti različnih koncentracij frakcij 1, 27, 28, 29 in 30 mleka, fermentiranega 18 ur s sevom <i>L. helveticus</i> BGRA43, merjena kot optična gostota (620 nm) z metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah	48
Preglednica 21:	Izračuni inhibicije rasti (I) indikatorskega seva <i>L. sakei</i> NCDO 2714 ..	48

KAZALO SLIK

Slika 1:	Funkcije bioaktivnih peptidov, ki izvirajo iz kazeina (Silva in Malcata, 2005) ..6	
Slika 2:	Produkt reakcije med OPA-reagentom in prosto amino skupino je 1-alkiltio-2-alkilizoindol (Church in sod., 1983).....23	
Slika 3:	Umeritvena krivulja za določanje prostih amino skupin31	
Slika 4:	Razgradnja bakteriocinov seva <i>L. gasseri</i> K7 (K) s tripsinom (T) in proteinazo K (P); indikatorski sev <i>L. sakei</i> NCDO 2714, metoda MLA.....33	
Slika 5:	Umeritvena krivulja za določanje koncentracije peptidov.....35	
Slika 6:	Protimikrobno delovanje 7. in 8. frakcije vzorca mleka, fermentiranega z <i>L. helveticus</i> BGRA43 (indikatorski sev <i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻ (levo) in <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (desno)); frakciji 6 in 9 nista bili protimikrobno aktivni; P pufer Tris-HCl37	
Slika 7:	Gelska filtracija permeata (<10 kDa) mleka, fermentiranega v bioreaktorju z <i>L. helveticus</i> BGRA43 (18 ur), na Sephadex-u G-25; hitrost pretoka 3 ml/min; UV detektor $\lambda = 280$ nm; vhodni signal detektorja 5 mV; hitrost pisala 1 mm/min. Protimikrobno aktivnost frakcij smo ugotavljali z metodo MLA.....38	
Slika 8:	Protimikrobno delovanje 6., 7. in 8. frakcije vzorca mleka, fermentiranega z <i>L. helveticus</i> BGRA43 (indikatorski sev <i>L. sakei</i> NCDO 2714 (levo) in <i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻ (desno)); frakciji 9 in 10 nista bili protimikrobno aktivni; P fosfatni pufer40	
Slika 9:	RP-HPLC kromatogram supernatanta mleka, fermentiranega v bioreaktorju z <i>L. helveticus</i> BGRA43, po SPE-ekstrakciji in prikaz aktivnih frakcij.....43	
Slika 10:	Protimikrobno delovanje 1. frakcije mleka, po 18-urni fermentaciji z <i>L. helveticus</i> BGRA43 v bioreaktorju; frakcije 2, 3 in 4 niso bile protimikrobno aktivne; indikatorski sev <i>L. sakei</i> NCDO 271446	
Slika 11:	Protimikrobno delovanje frakcij 27, 28, 29 in 30, po 18-urni fermentaciji mleka z <i>L. helveticus</i> BGRA43 v bioreaktorju; frakcije 25, 26, 31 in 32 niso bile protimikrobno aktivne; indikatorski sev <i>L. sakei</i> NCDO 271446	
Slika 12:	Protimikrobno delovanje 1. frakcije mleka, po 72-urni fermentaciji z <i>L. helveticus</i> BGRA43 v bioreaktorju; frakcije 2, 3 in 4 niso bile protimikrobno aktivne; indikatorski sev <i>L. sakei</i> NCDO 271446	
Slika 13:	Protimikrobna aktivnost zbrane frakcije po selektivni SPE-eluciji supernatanta mleka, fermentiranega v bioreaktorju z <i>L. helveticus</i> BGRA43, s koncentracijo peptidov 13,80 mg/ml (B1) in 1,53 mg/ml (B2) in supernatanta seva K7 kot kontrola; indikatorski sev <i>L. sakei</i> NCDO 2714.....47	

KAZALO PRILOG

Priloga A: Analiza PCR: sev *L. helveticus* 481NCK228 Hlv+ in *L. helveticus* BGRA43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kratica, okrajšava	Pomen
ACN	acetonitril
Ak	aminokislina
BGRA43	<i>Lactobacillus helveticus</i> BGRA43
BHI	ang. Brain Heart Infusion: gojišče za gojenje indikatorskih sevov rodov <i>Bacillus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Biofank	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Biofank
EPS	eksopolisaharidi
GRAS	splošno spoznano kot varno (ang. Generally Recognized as Safe)
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
L7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L7
L8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L8
L12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L12
L89	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L89
<i>L. sakei</i>	<i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714
MDA	metoda difuzije v agarju
MLA	metoda z liso na agarju
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	de Man, Rogosa in Sharpe: gojišče za laktobacile
OPA	<i>o</i> -ftalaldehid
PCA	ang. Plate Count Agar: osnovno gojišče za ugotavljanje skupnega števila bakterij
RP-HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo
SDS	natrijev dodecil sulfat
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (ang. Solid Phase Extraction)
TFA	trifluoroctna kislina

1 UVOD

Mleko vsebuje veliko proteinov, ki so vir energije in esencialnih aminokislin, potrebnih za rast in ohranjanje različnih telesnih funkcij. V zadnjih letih pa so mlečni proteini vedno bolj zanimivi kot vir fiziološko aktivnih peptidov. Ti peptidi so neaktivni, dokler se ne sprostijo ali aktivirajo med prebavo v prebavnem traktu ali med fermentacijo mleka. Aktivni so potencialni modulatorji mnogih regulatornih procesov v organizmu. Učinkujejo na srčnožilni, prebavni, imunski in živčni sistem organizma. Potencialni biološki učinki peptidov, ki se sprostijo iz mlečnih proteinov, so trenutno predmet intenzivnih raziskav po vsem svetu (Korhonen in Pihlanto, 2006).

Na nastanek bioaktivnih peptidov med fermentacijo mleka zelo vplivajo izbrani bakterijski sevi. Tu so pomembne mlečnokislinske bakterije (MKB), ki s proteolitičnimi encimi cepijo beljakovine mleka do peptidov s specifičnim zaporedjem aminokislin. Mednje sodijo tudi peptidi s protimikrobnim delovanjem.

Bioaktivne peptide s protimikrobno aktivnostjo so našli v številnih fermentiranih izdelkih (jogurt, kisló mleko in sir). Pozitivno vplivajo na prebavni in imunski sistem živega organizma. Inhibirajo lahko širok spekter patogenih bakterij rodov: *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* in *Staphylococcus* pa tudi kvasovke in nitaste glive. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) peptidov, ki je potrebna za inhibicijo tarčnega mikroorganizma, je odvisna od mikroorganizma samega, pri čemer so grampozitivne bakterije bolj občutljive od gramnegativnih. Peptidi s protimikrobno aktivnostjo delujejo tako, da v membrani bakterijske celice ustvarijo ionske kanale. Ti povečajo prepustnost membrane, kar povzroči propad celice, vendar natančen mehanizem njihovega delovanja še ni popolnoma raziskan. Medtem, ko obstaja veliko *in vitro* študij o njihovih številnih učinkih na mikroorganizme, je podatkov o njihovih učinkih na človeški organizem bolj malo. Razlog je namreč v tem, da bi morali peptidi, ki jim je bila dokazana aktivnost *in vitro*, za učinek *in vivo* skozi želodec do tankega črevesa preiti nespremenjeni, oz. jih prebavni encimi ne bi smeli razgraditi. Rešitev, ki jo navajajo nekateri viri, je predvsem mikroenkapsulacija protimikrobnih peptidov, danes že precej uveljavljena tehnika v farmacevtski industriji (Hildebrand in Tack, 2000; Champagne in Fustier, 2007).

Na trgu so dostopni številni funkcionalni izdelki, ki vsebujejo bioaktivne peptide. Eden takih izdelkov je t. i. BioPURE-GMP. Ta sicer vsebuje glikomakropeptid, ki ima multifunkcijske učinke, kot so: antikariogeni, antitrombogeni ter protimikrobni. Za proizvodnjo takih, ki vsebujejo protimikrobne peptide, pa bi bilo potrebno še veliko raziskav. Predvidevajo pa, da bi se ti izdelki lahko uporabljali v proizvodnji varne hrane ter v farmaciji.

1.1 NAMEN NALOGE

Znano je, da med fermentacijo mleka z ustreznimi sevi lahko nastajajo bioaktivni peptidi. Narejenih je bilo kar nekaj raziskav, kjer so proučevali bioaktivne peptide, vendar primanjkuje takih, ki preučujejo bioaktivne peptide s protimikrobnim delovanjem.

Namen naše naloge je bil poiskati tak sev, ki bo med fermentacijo mleka proizvajal bioaktivne peptide s protimikrobno aktivnostjo, ki niso mikrobiološkega izvora, ampak izvirajo iz mlečnih proteinov.

1.2 HIPOTEZI

V diplomskem delu smo postavili sledeči hipotezi:

- Izbrani sevi MKB tvorijo ekstracelularne proteinaze, zato predvidevamo, da bodo med fermentacijo mleka proizvajali tudi bioaktivne peptide s protimikrobno aktivnostjo.
- Pri fermentaciji mleka v bioreaktorju (kontrolirana vrednost pH, T) bo nastalo več protimikrobnih peptidov kot pri klasični fermentaciji (kontrolirana T).

2 PREGLED OBJAV

2.1 FERMENTIRANO MLEKO IN PRODUKTI, KI PRI TEM NASTAJAJO

Fermentirano mleko je mlečni izdelek, ki ga dobimo s pomočjo tipičnih mikroorganizmov, predvsem mlečnokislinskih bakterij, v mleku (Mavrin in Oštir, 2002). Fermentacijo mleka povzročijo naravno prisotni ali pa dodani mikroorganizmi (starterske kulture). Največkrat so to mlečnokislinske bakterije, ki med svojo rastjo razgradijo ogljikove hidrate in proteine, ki jih imajo na razpolago (Korhonen in sod., 1998). MKB dajo fermentirani hrani značilno aromo in teksturo, preprečujejo njeno kvarjenje in preprečujejo razmnoževanje patogenih mikroorganizmov. MKB so tudi del avtohtone mikroflore humanega in živalskega prebavnega in urogenitalnega trakta, kjer imajo podobno vlogo, saj uravnavajo črevesno mikrofloro in preprečujejo razmnoževanje patogenih bakterij. Tekmovanje z ostalo mikrofloro v fermentiranih izdelkih in prebavnem traktu, dveh, z mikroorganizmi gosto naseljenih ekosistemih, jim omogočajo številni metaboliti s protimikrobno aktivnostjo, kot so organske kisline, vodikov peroksid, acetaldehid, diacetil in bakteriocini (Rogelj in Perko, 2003).

MKB so koristne predvsem pri predelavi mleka v fermentirane mlečne izdelke in v primeru, da jih obvladujemo in usmerjamo njihovo delovanje. V obratnem primeru lahko postanejo pomembni kvarljivci. Razmnoževanje in delovanje bakterij v mleku je torej lahko ali nezaželeno in ga preprečujemo (kvarjenje, rast patogenih bakterij, tvorba toksinov) ali pa je zaželeno in ga pospešujemo (vodeni fermentacijski procesi). Poleg številnih vplivov, ki jih ima mleko na rast mikroorganizmov, pa vsebuje tudi različne protimikrobne snovi, ki oblikujejo tako imenovani protimikrobni sistem mleka. Protimikrobne snovi so lahko naravno prisotne, lahko jih tvorijo mikroorganizmi ali pa so mleku dodane snovi s protimikrobnim delovanjem (Rogelj, 2003).

Mleko vsebuje vrsto bioaktivnih komponent s specifičnimi učinki. Mednje sodijo lizocim, laktoferin, imunoglobulini, rastni faktorji in hormoni, ki se v aktivni obliki izločajo iz mlečne žleze. V mleku je celoten protibakterijski učinek večji kakor seštevek posameznega prispevka imunoglobulinov in neimunoglobulinskih obrambnih proteinov in peptidov. To lahko pripišemo sinergističnemu učinku naravno nastalih proteinov in peptidov (razen peptidov, ki so nastali iz neaktivnih proteinskih prekurzorjev) (Muralidhara in sod., 2007).

Mleko je bogat vir proteinov, ki jih delimo v dve skupini: kazeini in sirotkini proteini. Kazeine, ki predstavljajo 80 odstotkov vseh proteinov kravjega mleka, sestavljajo α -, β - in κ -kazeini. Ostalih 20 odstotkov proteinov so sirotkini proteini, ki jih v glavnem sestavljajo albumini in globulini (Haque in Chand, 2006). Do nedavnega je bila glavna fiziološka vloga kazeina v mleku vir aminokislin, ki so bile potrebne za rast novorojenčkov. V zadnjem času pa so postali zelo zanimivi peptidi, ki nastanejo s proteolizo kazeinske micele in naj bi imeli bioaktivne lastnosti (Silva in Malcata, 2005).

Bioaktivni peptidi pravimo peptidom, ki nastanejo *in vivo* ali *in vitro* z encimsko hidrolizo prehranskih proteinov in imajo biološke funkcije ali fiziološke učinke. Nastanejo lahko iz

proteinov rastlinskega ali živalskega izvora, predvsem iz mlečnih proteinov (Gill in sod., 1996).

Proteolitični sistem MKB je zelo kompleksen. Sestavljajo ga ekstracelularna serinska proteinaza, transportni sistem (specifičen za di-, tri- in ostale oligopeptide) in več intracelularnih peptidaz. Proteinaze MKB lahko hidrolizirajo več kot 40 odstotkov peptidnih vezi α_{s1} - in β -kazeina ter tako proizvedejo peptide s 4 do 40 aminokislinskimi ostanki. Med temi pa so jih v mlečnih izdelkih kar nekaj identificirali kot bioaktivne peptide (Minervini in sod., 2003). Funkcionalni peptidi, ki izvirajo iz kazeina, mleka ali mlečnih izdelkov učinkujejo na srčnožilni sistem, saj imajo antitrombogeni in antihipertenzijski učinek (Silva in Malcata, 2005).

Veliko pozornost raziskovalci v zadnjem času posvečajo tudi bakteriocinom MKB. Bakteriocini so po definiciji proteini ali proteinski kompleksi mikrobiološkega izvora s protimikrobnim delovanjem proti bakterijam iste ali sorodnih vrst (Rogelj, 2003). Nekateri bakteriocini MKB lahko inhibirajo rast grampozitivnih kvarljivcev in patogenih bakterij tako dobro kot kvasovke, inhibirajo pa lahko tudi rast nekaterih gramnegativnih bakterijskih vrst (Topisirović in sod., 2006). Ker imajo MKB status GRAS (za zdravje varni organizmi), se tudi bakteriocini lahko varno uporabljajo kot dodatki živilom. V celoti ali vsaj delno lahko nadomestijo uporabo kemičnih konzervansov in nekaterih tehnoloških postopkov, ki živilom zmanjšujejo biološko vrednost. Prvi bakteriocin, ki je dobil status dovoljenega aditiva, je bil nizin in je še danes najpomembnejši bakteriocinski biokonzervans, ki ga uspešno uporabljamo v različnih živilih (Rogelj, 2003).

2.2 BIOAKTIVNI PEPTIDI

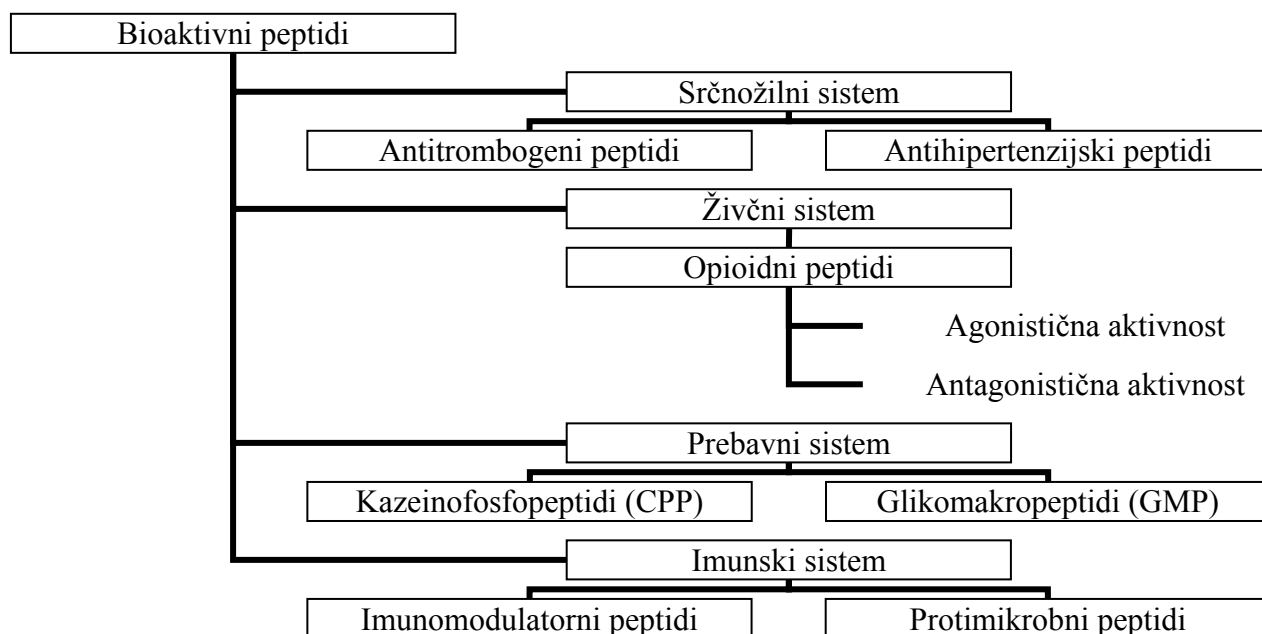
Bioaktivni peptidi so definirani kot specifični proteinski fragmenti, ki imajo pozitiven vpliv na telesne funkcije in lahko v končni meri vplivajo tudi na zdravje. Bioaktivni peptidi učinkujejo na več telesnih sistemov: na srčnožilni, prebavni, imunski in živčni sistem, odvisno od njihovega zaporedja aminokislin. Znotraj proteinske molekule so ti peptidi neaktivni, aktivni pa postanejo, ko se sprostijo: ali s prebavo mleka v prebavnem traktu (po hidrolizi s prebavnimi encimi), s fermentacijo mleka (s proteolitičnimi sevi starterskih kultur) ali pa s hidrolizo s proteolitičnimi encimi, ki izvirajo iz drugih mikroorganizmov ali rastlin (Korhonen in Pihlanto, 2006). Silva in Malcata (2005) navajata, da je bila stopnja proteolize mleka, ki je bilo podvrženo prebavi s pepsinom ter s tripsinom, višja, nastali hidrolizati pa so imeli močnejše protimikrobno in antihipertenzijsko delovanje kot hidrolizati, ki so bili podvrženi samo enemu izmed encimov.

Številni peptidi kažejo tudi multifunkcijske lastnosti, npr: določene sekvence peptida imajo dve ali več različnih bioloških aktivnosti. V primarni strukturi kazeina se na nekaterih mestih sekvence peptidov prekrivajo, ti pa imajo tako različne biološke učinke. Na mestih, kjer pride do prekrivanja, ne pride do proteolize (Meisel, 1998). Ta mesta so imenovali »strateške cone«, pred proteolizo pa naj bi jih zavarovala prisotnost nemodificiranih prolinskih stranskih verig v peptidu in hidrofobnost peptida. Nekateri peptidi z več funkcijami so peptidi β -kazeina, fragment f60–70, z imunomodulatornim, opioidnim in

ACE-inhibitornim učinkom. Peptid α_{s1} -kazeina, f194–199, ima imunomodulatorne in ACE-inhibitorne učinke, opioidna peptida, α - in β -laktorfín, pa imata tudi ACE-inhibitorni učinek. Fosfopeptid, ki veže ione kalcija, ima tudi imunomodulatorne lastnosti (Haque in Chand, 2006).

Slika 1 prikazuje učinke bioaktivnih peptidov, ki naj bi izvirali iz kazeinov. Glede na učinke bioaktivnih peptidov so poznani (Silva in Malcata, 2005; Korhonen in Pihlanto, 2006; Meisel, 1998):

- antitrombogeni peptidi: ti so kazoplatelini, ki preprečujejo strjevanje krvi;
- antihipertenzijski peptidi: ACE-inhibitorni peptidi (kazokinini), ki uravnavajo krvni tlak s tem, da inhibirajo angiotenzinsko konvertazo (ACE) ter tako znižujejo krvni tlak;
- opioidni peptidi: vežejo se na opioidne receptorje na celicah ter imajo tako številne učinke: ugodno vplivajo na spanje, stimulirajo sproščanje inzulina in somatostatina, stimulirajo vnos hrane z uravnavanjem delovanja pankreasa. Delimo jih na:
 - tipične: imajo enak (tipičen) N-konec peptida (enkefalin, endorfin, dinorfin) in
 - netipične: imajo različen N-konec peptida ter imajo med sabo nasprotujoče si učinke. Ločimo peptide z agonistično aktivnostjo (β -kazomorfin, α -laktorfín, β -laktorfín, serorfín) in z antagonistično aktivnostjo (enkefalin, laktoferoksin);
- kazeinofosfopeptidi: fosfopeptidi, ki lahko vežejo ione kalcija in drugih mineralov (Mg, Fe, Zn, Ba, Cr, Ni, Co, Se) ter tako preprečujejo rahitična obolenja, nastanek kariesa, zdravijo anemijo, inhibirajo rast rakavih celic;
- glikomakropeptidi: so pomembni v prehrani ljudi, ki imajo okvare jeter, omogočajo absorpcijo ionov Ca, Fe in Zn;
- imunomodulatorni peptidi: vežejo se na receptorje celic imunskega sistema (makrofagi, limfociti) ter tako vplivajo na imunski odziv; zmanjševali naj bi obolenja za rakom na debelem črevesju ter povečali odpornost proti boleznim (vpliv na imunski sistem);
- protimikrobni peptidi: podroben opis je v poglavju 2.2.1.



Slika 1: Funkcije bioaktivnih peptidov, ki izvirajo iz kazeina (Silva in Malcata, 2005)

2.2.1 Bioaktivni peptidi s protimikrobno aktivnostjo in njihovi učinki

Bioaktivni peptidi s protimikrobno aktivnostjo so v prehrani pomembni funkcionalni peptidi. Pomagajo pri obrambnem sistemu človeškega organizma tako, da inhibirajo rast patogenih bakterij (Silva in Malcata, 2005).

Protimikrobni peptidi lahko izvirajo iz različnih proteinov, ki jih vsebujejo živila kot so: jajca, špinaja, matični mleček in morske ribe, a največ protimikrobni peptidov izvira prav iz mlečnih proteinov (López-Expósito in sod., 2006).

Protimikrobne peptide so identificirali v številnih hidrolizatih mlečnih proteinov (preglednica 2). Peptidi, ki izvirajo iz α_{s1} - in α_{s2} -kazeina so protimikrobno aktivni proti grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam iz rodov *Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* in *Staphylococcus*, proti kvasovkam ter nekaterim glivam (Korhonen in Pihlanto, 2006). Prvi taki znani peptidi so bili kazeicidini. Kazeicidini so bazični, glikozilirani polipeptidi, z molekularno maso ~5 kDa in nastanejo med prebavo kazeina kravjega mleka s kimozinom. Inhibirajo vrste *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* in *Streptococcus pyogenes*. Antibiotični peptid kazocidin-I, kationski fragment (f165–203) α_{s2} -kazeina, pa inhibira rast bakterij *Escherichia coli* in *Staphylococcus carnosus*, kar naj bi mu omogočal visok delež bazičnih aminokislinskih ostankov. Druga dva peptida α_{s2} -kazeina, f183–207 in f164–179, imata podoben hemolitičen učinek, a ima prvi boljšo protimikrobno aktivnost (Silva in Malcata, 2005, Rizzello in sod., 2005). Njuni protimikrobni učinki so prikazani v preglednici 1, kjer so podane minimalne inhibitorne koncentracije za inhibicijo testnih bakterij.

Preglednica 1: Protimikrobna aktivnost fragmentov α_{s2} -kazeina, pripravljenih z RP-HPLC (Recio in Visser, 1999)

Mikroorganizem	MIC* (μ M)	
	α_{s2} -kazein f(164–179)	α_{s2} -kazein f(183–207)
gramnegativne bakterije		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25	16
<i>E. coli</i> MC 1061	99	16
grampozitivne bakterije		
<i>L. innocua</i>	50	16
<i>B. cereus</i> P7	75	16
<i>M. flavus</i> DSM 1790	75	16
<i>St. thermophilus</i> Rs	50	8

*MIC = minimalna inhibitorna koncentracija, ki je potrebna za inhibicijo rasti bakterij (merjenje absorbance pri 630 nm)

Silva in Malcata (2005) sta ugotovila, da je protimikrobni peptid izracidin (f1–23), ki pripada N-terminalnemu delu α_{s1} -kazeina, inhibiral vrsti *S. aureus* in *Candida albicans*. Izkazalo se je, da ima izracidin antibiotični tip aktivnosti in lahko prepreči mastitična obolenja pri ovcah in kravah. Sandre in sod. (2001) so odkrili peptid β -kazeina, f193–209, znan tudi kot imunomodulatorni peptid, ki je povečal protimikrobno aktivnost mišjih makrofagov. Študija je bila narejena na živalih, ki so jim vbrizgali peptide, vendar ni znanih raziskav kakšne protimikrobne učinke bi imeli peptidi, ki bi jih živali zaužile oralno (Silva in Malcata, 2005). Malkoski in sod. (2001) pa so potrdili protimikrobno aktivnost kapacina, f(106–169), ki pripada kazeinomakropeptidu (del κ -kazeina). Zaporedja aminokislinskih ostankov nekaterih protimikrobnih peptidov so prikazana v preglednici 2.

Preglednica 2: Zaporedja aminokislinskih ostankov protimikrobnih peptidov v primarni strukturi kazeinov kravjega mleka (Silva in Malcata, 2005)

Tip kazeina	Fragment (f)	Zaporedja aminokislinskih ostankov peptida
α_{s1}	1–23	RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF
α_{s2}	164–179	LKKISQRYQKFALPQY
	165–203	KKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPY
	183–207	VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
β	193–209	YQEPVLGPVRGPFPIIV

Najbolj raziskani protimikrobni peptidi so laktofericini. Laktofericin (f17–41) je produkt encimske razgradnje laktoferina s pepsinom. Laktoferin je glikoprotein (sirotkin protein), ki veže ione železa in je prisoten v večini bioloških tekočin sesalcev, tudi v mleku. Leta 1992 pa so Bellamy in sod. odkrili protimikrobno sekvenco blizu N-konca laktoferina, ki se razlikuje od mest, kamor se vežejo ioni železa. Delni vzrok za porušenje normalne prepustnosti bakterijske membrane naj bi bil prav protibakterijski mehanizem laktofericinov, ki pa je veliko bolj kompleksen kot vezava ionov železa. Laktofericin ima boljše protibakterijske lastnosti kot nerazgrajeni laktoferin. Vzrok za to naj bi bila velikost laktofericina, ki je manjša molekula kot laktoferin in ima tako lažji dostop do tarčnih mest

na mikrobni membrani. Posebnost laktofericina je relativno visok delež bazičnih aminokislinskih ostankov, ki so razporejeni asimetrično ter se nagibajo k strukturi α -vijačnice (Silva in Malcata, 2005; Korhonen in Pihlanto, 2006; Meisel, 1998).

Protimikrobni peptidi delujejo tako, da na celični membrani tvorijo ionske kanale. Protimikrobno aktivnost jim omogočajo kationske amfipatske strukture α -vijačnic, tako da porušijo normalno prepustnost celične membrane občutljivih mikroorganizmov, kar povzroči njihov propad (Rizzello in sod., 2005; Korhonen in Pihlanto, 2006; Meisel, 1998).

Na splošno naj bi protimikrobni peptidi vsebovali visok delež bazičnih aminokislinskih ostankov z amfipatskimi lastnostmi. Te karakteristike naj bi olajšale interakcije med pozitivno nabitim peptidom in negativno nabito bakterijsko membrano (Muralidhara in sod., 2007).

Tudi peptidi, ki sta jih preiskovala Dathe in Wieprecht (1999), so imeli kationski karakter, kar nakazuje na to, da je pozitiven naboj pomemben pokazatelj protibakterijske aktivnosti. Ugotovila pa sta tudi, da hidrofobni ostanki v peptidu prav tako vplivajo na protimikrobno aktivnost (López-Expósito in sod., 2006).

Še vedno ni jasno, ali in kako dolžina peptida vpliva na njegovo aktivnost. López-Expósito in sod. (2006) so preiskovali sekvence peptidov α_{s2} -kazeina iz ovčjega mleka. Ugotovili so, da je za protibakterijsko aktivnost peptida f(165–181), bolj kot celoten peptid, pomemben krajši del peptida f(165–170). Peptid f(203–208), ki je krajši del peptida f(184–208), pa je kazal boljše protimikrobne lastnosti kot daljši del tega peptida.

V primerjavi z antibiotiki lahko protimikrobni peptidi hitro uničijo tarčno celico. Imajo širok spekter aktivnosti, s tem da lahko inhibirajo rast pomembnih patogenih mikroorganizmov, ki so odporni proti antibiotikom (Rizzello in sod., 2005). Hancock in Lehrer sta leta 1998 ugotavljala protibakterijsko aktivnost peptidov iz mlečnih proteinov proti različnim grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam. Izkazalo se je, da so grampozitivni mikroorganizmi bolj občutljivi za delovanje teh peptidov kot gramnegativni. Gramnegativne bakterije naj bi pred peptidi štela bolj kompleksna struktura celične stene.

Muralidhara in sod. (2007) so v supernatantu fermentiranega mleka preverili protibakterijsko aktivnost proti patogenim mikroorganizmom *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. Dva protimikrobna peptida, ki vsebujeta 14 in 15 aminokislinskih ostankov, so izolirali in očistili z gelsko filtracijo in RP-HPLC. Za potrditev velikosti peptidov so frakcije preiskovali s SDS-PAGE (natrijev dodecil sulfat-poliakrilamid gelska elektroforeza, denaturacijska gelska elektroforeza). Oba peptida sta pokazala širok spekter bakteriocidne aktivnosti proti grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam, z minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) od 120 do 200 $\mu\text{g/ml}$. Peptid, ki je vseboval več pozitivno nabitih aminokislin, je kazal tudi večjo protimikrobno aktivnost.

Roberts in sod. (1999) so z raziskavo, ki je bila narejena na podganah, ugotovili, da se manjši (di- in tripeptidi) in večji (10–51 aminokislin) peptidi, ki nastanejo med prebavo,

lahko celi absorbirajo skozi stene črevesja ter učinkujejo v tkivih. Ni pa znano, kaj se zgodi z večjimi peptidi in manjšimi proteini. Prav tako pa se ne ve, kakšno količino peptidov bi morali zaužiti, da bi ti peptidi zagotavljali biološke učinke (Roberts in sod., 1999).

Korhonen in Pihlanto (2006) navajata, da je bilo narejenih več raziskav, kjer so razvili in vpeljali tehnologije, ki so primerne za komercialno proizvodnjo bioaktivnih peptidov iz beljakovin mleka. Te tehnologije temeljijo na novih metodah membranske separacije in ionske izmenjevalne kromatografije, ki so se začele uporabljati v mlekarški industriji. Odkrili so vrsto bioaktivnih peptidov, ki so nastali v fermentiranih mlečnih izdelkih, kot so jogurt, kisló mleko in sir. Njihovih zdravnih učinkov na ljudi do zdaj še niso dokazali. Obstajajo pa komercialni mlečni izdelki, ki so jim dodani bioaktivni peptidi iz mlečnih proteinov, koristni učinki izdelkov na zdravje pa so bili dokazani v kliničnih humanih študijah.

Predvidevajo, da protimikrobni peptidi, ki nastanejo med prebavo mleka *in vivo*, lahko uravnavajo črevesno mikrofloro, vendar pa bodo morali njihov fiziološki vpliv še dokazati. Po drugi strani pa bi se ti peptidi lahko uporabljali v proizvodnji varne hrane in v farmacevtski industriji (Korhonen in Pihlanto, 2006).

2.3 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE – MKB

Mlečnokislinske bakterije imajo že stoletja pomembno vlogo v fermentaciji hrane. Pomemben vpliv imajo na aromo, teksturo in v večih primerih tudi na prehransko vrednost produktov (Topisirović in sod., 2006).

MKB so tehnološko koristne bakterije. Po obliki razlikujemo okrogle mlečnokislinske bakterije ali koke in paličaste ali bacile. Pretežno se prehranjujejo z laktozo. Pri razgradnji in presnavljanju/fermentaciji laktoze nastaja mlečna kislina, poleg nje v manjši količini še: očetna kislina, etanol ter ogljikov dioksid (Mavrin in Oštir, 2002).

V zadnjem desetletju se v raziskavah MKB največ pozornosti posveča genetski raziskavi sevov MKB, ki se rutinsko uporabljajo v industrijskih procesih. Zanimive pa bi bile raziskave o genetski organizaciji MKB, ki so izolirane iz specifičnih naravnih niš (tradicionalni, doma izdelani fermentirani izdelki). Te MKB bi bile lahko potencialni vir genov, ki bi kodirali npr. bakteriocine, proteinaze ali eksopolisaharide (Topisirović in sod., 2006).

Zelo pomembna lastnost MKB je sposobnost sinteze ekstracelularnih proteinaz. Te proteinaze katalizirajo začetne stopnje v hidrolizi mlečnih proteinov in s tem priskrbijo celici aminokislino, ki so esencialne za rast MKB. Proteinaze, skupaj s peptidazami in transportnim sistemom za peptide, omogočijo učinkovito rast MKB v medijih, bogatih s proteini. Od aktivnosti proteinaz in peptidaz je odvisen tudi razvoj arome med zorenjem sira. Razgradnja kazeina s proteinazami in peptidazami se kaže v sproščanju tako zaželenih kot tudi nezaželenih arom peptidov (Fira in sod., 2001).

Mleko vsebuje prenizko koncentracijo prostih aminokislin za optimalno rast MKB. Zato izkoriščajo MKB kot primarni vir mlečne proteine, predvsem kazeine. MKB izločajo ekstracelularne proteinaze, ki razgradijo kazeinsko molekulo v oligopeptide; transportni sistem peptidov, ki omogoča prenos sproščenih oligopeptidov v notranjost MKB celice; in intracelularne peptidaze, ki hidrolizirajo oligopeptide v manjše peptide ali v aminokislino, ki jih lahko nato celica izkoristi. Transportni sistem omogoča MKB prenašati oligopeptide do velikosti 18 aminokislin, čeprav redko več kot 10 aminokislin. Tako so lahko daljši oligopeptidi, ki niso prišli v celice, vir bioaktivnih peptidov, ko jih kasneje razgradijo proteolitični encimi ali peptidaze razpadlih (liziranih) mlečno kislinskih bakterij (Muralidhara in sod., 2007).

Med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije spadajo bakterije rodu *Lactobacillus*. So grampozitivne dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene paličice. So homofermentativne ali heterofermentativne. So prehransko zahtevne bakterije, saj poleg fermentabilnih ogljikovih hidratov potrebujejo mnoge rastne dejavnike, kot so aminokislino, vitamini in organske baze. So aerotolerantno anaerobne in termofilne. Odvisno od vrste se lahko razmnožujejo pri temperaturah od 2 °C do 35 °C, optimum pa je med 30 °C in 40 °C. Rastejo pri vrednostih pH od 3,0 do 7,0. Naseljujejo številne živalske surovine rastlinskega in živalskega izvora (npr. mleko). So naravno prisotne v prebavnem traktu (Adamič in sod., 2003; Rogelj in Perko, 2003). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ki se tradicionalno uporablja pri proizvodnji jogurta, je grampozitivna paličasta bakterija. Celice oblikujejo v mleku kratke verižice. Laktozo fermentira po homofermentativni poti. Ima proteinaze za razgradnjo kazeina, predvsem β -kazeina, nima pa peptidazne aktivnosti (Rogelj in Perko, 2003).

2.3.1 *Lactobacillus helveticus* BGRA43

Banina in sod. so leta 1998 okarakterizirali humani izolat, sev *L. helveticus* BGRA43. Sev so najprej pomotoma okarakterizirali kot *L. acidophilus* BGRA43 (Banina in sod., 1998), leta 2006 pa so Topisirović in sod. potrdili, da pripada vrsti *Lactobacillus helveticus*. Sev je bil leta 2007 patentiran in je last Inštituta za molekularno genetiko in genetski inženiring (IMGGE), Univerze v Beogradu, Republika Srbija.

L. helveticus BGRA43 je grampozitivna, katalaza negativna, paličasta bakterija. Raste pri 37 °C in 42 °C v MRS tekočem gojišču. Sev BGRA43 ne fermentira fruktoze, ne proizvaja plina iz glukoze in je odporen proti NaCl (2 %, w/v) ter občutljiv za žolčne soli. Pri ugotavljanju hitrosti rasti in generacijskem času so ugotovili, da je med preiskovanimi temperaturami 30 °C, 37 °C in 42 °C optimalna temperatura za rast seva BGRA43 37 °C, generacijski čas pri optimalnih pogojih rasti pa 1,72 ure (Banina in sod., 1998).

Za sev *L. helveticus* BGRA43 velja, da med fermentacijo mleka povzroči hitro zakisanje ter visoko viskoznost, med skladiščenjem pa ohrani visoko živost bakterijskih celic. Zaradi teh lastnosti je primeren za proizvodnjo fermentiranih izdelkov (Banina in sod., 1998).

Lactobacillus helveticus je termofilna MKB, z učinkovito proteinazno in peptidazno aktivnostjo do mlečnih proteinov. Banina in sod. (1998) so ugotovili, da

L. helveticus BGRA43 popolnoma hidrolizira frakcije α - in β -kazeina pri temperaturah 30 °C, 37°C in 42 °C. Hidroliza κ -kazeina naj bi bila le delna (Banina in sod., 1998). Odkrili pa so tudi prisotnost, na celično steno vezane, proteinaze. Proteinaza seva BGRA43 je v eni uri inkubacije, pri optimalni vrednosti pH 6,5 in temperaturi 45 °C, razgradila celotni kazein. Glede na ostale preiskovane laktobacile so ugotovili, da tvori največ mlečne kisline oz. se je po 6-ih in 24-ih urah inkubacije vrednost pH najbolj znižala. Proteinaza BGRA43 naj bi imela podobno delovanje kot na celično steno vezane proteinaze laktokokov. Preverjali so podobnost med gensko sekvenco proteinaze rodu *L. helveticus* in drugimi znanimi proteinazami. Hibridizacija celotne DNA, izolirane iz *L. helveticus*, z gensko sondo proteinaze laktokokov, ni pokazala nobenih signalov, ne glede na pogoje hibridizacije. Zato so sklepali, da sev BGRA43 proizvaja drugo vrsto proteinaze. Ugotavljanje vpliva ionov na proteinazno aktivnost seva BGRA43 pa je pokazalo, da ioni Ca^{2+} , K^{+} in Na^{+} nimajo vpliva (Banina in sod., 1998; Fira in sod., 2001).

Sev BGRA43 med fermentacijo mleka tvori protimikrobne spojine. Banina in sod. (1998) so odkrili, da supernatanti fermentiranega mleka (24 ur) inhibirajo nekatere vrste rodov *Lactococcus* in *Lactobacillus* in prav tako *S. aureus*, *E. coli*, *B. mycoides* in *Pseudomonas* sp. Pri teh indikatorskih bakterijah so preverili še možnost nastanka inhibicijskih con zaradi morebitno prisotnih bakteriocinov. A ker dodatek pronaze E ni razgradil nastale cone, prisotnosti bakteriocinov niso potrdili. Za nastanek cone pri indikatorskem sevu *C. sporogenes* pa naj bi bila poleg vodikovega peroksida kriva tudi nastala mlečna kislina (vrednost pH preiskovanih kultur je bila 5) (Banina in sod., 1998; Topisirović in sod., 2006). *L. helveticus* BGRA43 inhibira rast različnih bakterijskih vrst: *Cl. perfringens*, *S. aureus*, *E. coli* C600, *B. mycoides*, *Pseudomonas* spp., *Lactococcus plantarum* A112, *casei* NCDO393, *lactis* NCDO712, *cremoris* NS1. Znano je, da (poleg proizvodnje bakteriocinov in antibiotikov) znižanje vrednosti pH, zaradi nastanka kislin, močno zavira rast mikroorganizmov v mleku. Sev hitro doseže visoko raven mlečne kisline v začetni fazi fermentacijskega procesa, pride do padca vrednosti pH, s tem pa je popolna inhibicija rasti klostridijev in drugih mikroorganizmov zlahka dosežena (Banina in sod., 1998).

Za sev BGRA43 so ugotovili, da zelo dobro raste v mleku (6 h, pH 4,5) in prav tako v tekočem gojišču MRS ($A_{600 \text{ nm}}$; 0,858, 10 h). Ugotovili so tudi pomembne lastnosti produktov seva BGRA43, kot so okus, aroma in viskoznost. V mešanici s *S. thermophilus* (3 : 1) je BGRA43 proizvedel manj mlečne kisline, po 6-ih urah pri 37 °C je bila vrednost pH fermentiranega mleka 4,60. Izdelki iz fermentiranega mleka so imeli blago kislo aromo in visoko viskoznost. Viskoznost mleka bi lahko nastala zaradi eksopolisaharidov (EPS), ki jih proizvajajo MKB ali pa je sluzast in viskozen material prisoten na površini celic, ki so nastale kasneje, v stacionarni fazi rasti. Najverjetneje pa je, bolj kot zaradi nastanka EPS, visoka viskoznost fermentiranih izdelkov, ki jih proizvede *L. helveticus* BGRA43, posledica delnega razpada kazeina. Ugotovili so tudi, da se je viskoznost proizvodov fermentiranega mleka, ki temeljijo na fermentaciji z *L. helveticus* BGRA43, po mehanski obdelavi zmanjšala (Banina in sod., 1998).

Sposobnost hidrolize proteinov je ena najpomembnejših značilnosti MKB, ki vpliva na njihovo stopnjo rasti. *L. helveticus* BGRA43 proizvaja zelo učinkovito proteinazo. Visoka stopnja rasti seva BGRA43 v mleku, najverjetneje zaradi sinteze učinkovite proteinaze, se

je pokazala v visoki proizvodnji mlečne kisline, za katero je znano, da ima probiotični učinek. Zato je uporaba humanega izolata *L. helveticus* BGRA43 v tradicionalnih mlečnih izdelkih kot sta sir in sladoled ter v drugi hrani, kot so klobase, pijače, kislo testo itd. vredna raziskav (Banina in sod., 1998).

Sev BGRA43 je v raziskavah Topisirovića in sod. (2006) pokazal protimikrobno aktivnost proti *Clostridium sporogenes* ter številnim drugim bakterijskim vrstam, ki so prikazane v preglednici 3. Kljub pozitivnim rezultatom protimikrobne aktivnosti seva BGRA43 pa s standardnimi postopki niso mogli dokazati, da bi ta sev proizvajal kak bakteriocin, zato so protimikrobne učinke pripisali kislini (Topisirović in sod., 2006).

Preglednica 3: Protimikrobna aktivnost seva *Lactobacillus helveticus* BGRA43 proti različnim sevom bakterij (Topisirović in sod., 2006)

Indikatorski sev	BGRA43
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NS1	+
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NP45	+
<i>Lactobacillus casei</i> NCDO393	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> A112	+
<i>Escherichia coli</i> C600	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	+++
<i>Staphylococcus</i> sp. ATCC Met ^f	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC496	+++
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC276	+++
<i>Pseudomonas</i> sp.	+++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC8	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC11778	+
<i>Bacillus mycoides</i>	+++
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC10240	-
<i>Salmonella</i> sp. Torlak collection	-

Legenda: - ni inhibicijske cone, + inhibicijska cona do 4 mm, +++ inhibicijska cona večja od 8 mm

2.4 KROMATOGRAFSKE TEHNIKE SEPARACIJE PEPTIDOV

2.4.1 Gelska filtracija

Kromatografske metode so vse tiste metode, ki ločujejo snovi med seboj na podlagi njihove porazdelitve med stacionarno in mobilno fazo. Do porazdelitve pride zaradi različno močnih vezi topljencev na stacionarno fazo oziroma zaradi različne topnosti snovi v stacionarni in mobilni fazi. Porazdelitev med fazama kvantitativno opišemo s porazdelitvenim koeficientom (PK), ki je za določen sistem pri določeni temperaturi, za vsako snov konstanten in predstavlja razmerje med množino snovi v stacionarni in mobilni fazi. Snov z višjim PK tako počasneje potuje z mobilno fazo, snov z nižjim PK pa hitreje. Tako morajo imeti snovi, ki jih želimo ločiti, različen PK. Pri gelski kromatografiji pride do porazdelitve zaradi različne velikosti molekul. Ta proces omogočajo t. i. molekularna sita, ki so sestavljena iz zamreženih sferičnih delcev. Ti ob stiku s topilom nabreknejo in tvorijo gel. Separacija temelji na razliki difuzije različnih molekul topljencev skozi pore gela. Molekule, ki so večje od por, ne morejo prodreti v zamreženo strukturo gela in se eluirajo z volumnom topila. Molekule, ki so manjše, pa difundirajo v pore in zato počasneje potujejo po koloni navzdol. Manjše kot so molekule, lažje in globlje prodrejo v notranjost delcev gela, zato je za elucijo manjših molekul potreben večji elucijski volumen. Molekule topljencev se eluirajo iz kolone tako, da najprej pridejo tiste z višjo molekularno maso, nazadnje pa tiste z najnižjo (Sepčić in sod., 2002; Kregar, 1996).

Geli morajo biti inertni do topila in ne smejo reagirati z materialom, ki ga ločujemo. Prav tako morajo biti geli nenabiti in kemijsko ter bakteriološko stabilni. Prostor med in v delcih gela je napolnjen s tekočino, ki zavzema velik del volumna gela. Kemijsko so geli polidekstrani, agarosa, poliakrilamid in polistiren. Dekstran je polisaharid, sestavljen iz glukoznih enot, ki so različno prečno povezane, da dobimo strukture z definirano zamreženostjo. Za frakcioniranje molekul z molekulskimi masami od 0,5 do 600 kDa se uporablja dekstranski gel Sephadex, ki ga proizvajajo v obliki kroglic različnih velikosti, z različno zamreženostjo. Poznan je gel Sephadex G-25, ki se v glavnem uporablja za razsoljevanje proteinov, loči pa lahko tudi proteine ali peptide z molekulskimi masami od 1 do 5 kDa (Sepčić in sod., 2002; Kregar, 1996).

Gelska kromatografija se lahko uporablja za separacije različno velikih bioloških makromolekul, kot so proteini, nukleinske kisline, polisaharidi, ali pa za manjše molekule kot so peptidi, oligonukleotidi in oligosaharidi (Kregar, 1996). Uporablja se lahko tudi za ločevanje vseh vrst molekul, ki se razlikujejo po molekularni masi, ne glede na ionsko sestavo, pH in temperaturo mobilne faze. Gelsko kromatografijo lahko uporabljamo za preparativne in analitske namene: za določanje molekularne mase, razsoljevanje, izmenjavo pufrov, frakcioniranje ter za ločevanje celic in subcelularnih delcev (Sepčić in sod., 2002).

2.4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC)

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti ločujemo snovi na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti in biološke afinitete. Je zelo učinkovita in hitra vrsta kromatografije, občutljiva, ima visoko stopnjo ločljivosti in primerna tudi za piko- in femtogramске količine materiala. Uporablja se tako za preparativno delo kot tudi za kvalitativne in kvantitativne analitske separacije (Kregar, 1996).

HPLC-sistem sestavljajo: rezervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kolona z detektorjem in rekorder za zapis signala. Na separacijo bistveno vpliva mobilna faza. Mobilna faza ne sme spreminjati lastnosti kolone, ne sme imeti velike lastne absorbance in prevelike viskoznosti. Med separacijo lahko sestavo mobilne faze tudi programsko spreminjamo: če spremenimo polarnost, dosežemo krajše čase zadrževanja močno vezanih komponent na koloni ter tako skrajšamo trajanje separacije, izboljšamo celotno ločljivost komponent v vzorcu, obliko kromatografskih pikov, s tem pa tudi občutljivost. Na koloni lahko poteka popolna ali delna separacija zmesi na posamezne komponente, odvisno od vrste polnila v koloni. Ponavadi so analitske kolone dolge 60–300 mm, z notranjim premerom 2–8 mm ter polnjene z delci velikosti 5–50 μm . Manjši kot so delci, boljša je separacija. Ker pa manjši delci povzročajo večji upor, so te kolone krajše. Za kakovost HPLC-kolone so pomembni trije parametri: učinkovitost, kapacitivnost in ločljivost. Pomemben element so tudi črpalke, ki morajo zagotoviti visok tlak (do 400 barov) in konstantem pretok brez pulzov. S specialnimi vrtljivimi injektorji (z zanko s stalnim volumnom) dosežemo odlično ponovljivost pri visokih tlakih ter avtomatično doziranje vzorcev pri različnih volumnih, ki jih pod visokim pritiskom potiskamo skozi kolono. Ko se komponente, ki smo jih ločili na koloni, eluirajo, se spremenijo fizikalne lastnosti (lomni količnik, električna prevodnost) mobilne faze in v njej raztopljenih snovi, ki jih detektor izmeri. Detektor lahko meri tudi lastnosti topljenca, npr. absorpcijo svetlobe ali fluorescenco. Najpogosteje se uporablja UV-detektor, ki meri absorpcijo UV-svetlobe (160 – 375 nm), ki jo oddaja devterijska ali Hg-žarnica. Signal iz detektorja se zapiše na rekorderju kot elucijski diagram – kromatogram (Prošek, 1992; Kordiš Krapež in Štancar, 1994; Kregar, 1996).

Kromatografija z obrnjeno fazo (Reversed Phase HPLC) se vse pogosteje uporablja. Pri RP-HPLC uporabljamo kemijsko modificiran silikagel, na katerega so z etrskimi vezmi pritrjene alkilne skupine (najbolj običajne so: butilne, oktilne, oktadecilne) različnih dolžin. Nastane plast, ki tvori nepolaro stacionarno fazo. Mobilna faza je zmes vode in organskega topila (acetonitril, metanol, izopropanol ...) (Kregar, 1996).

2.5 EKSTRAKCIJA NA TRDNI FAZI (SPE)

Ekstrakcija na trdni fazi (ang. solid-phase extraction, SPE) je danes uveljavljena tehnika in se uporablja za analize številnih skupin komponent, v različnih vrstah matriksov. Zaradi možnosti uporabe velikih volumnov vzorcev, se SPE uporablja za določitev organskih onesnaževalcev v vzorcih voda iz okolja. SPE se vedno več uporablja tudi za analize v biomedicini, farmaciji ter za analize hrane in pijač (Brodnjak Vončina, 2006).

Vzorec (mobilna faza), ki vsebuje merjeno komponento, nanese na ekstrakcijsko kolono s primernim polnilom (stacionarna faza). Komponenta se veže na stacionarno fazo, nekaj pa je ostane še v tekoči fazi. Če je polnilo učinkovito, bo merjena komponenta bolj ali manj uspešno ekstrahirana iz tekoče v trdno fazo. Polarne komponente matriksa spiramo s kolone z vodo oziroma s primernim pufrom, merjeno komponento pa speremo s kolone z organskim topilom. Pri moderni izvedbi SPE je adsorbent med dvema kalciniranima diskoma v polipropilenski ali stekleni koloni, angleško imenovani »cartridge«. Tekoča faza prehaja skozi to kolono s sesanjem ali s pozitivnim tlakom (gravitacija, tlak iz brizgalke, centrifugiranje) (Brodnjak Vončina, 2006).

SPE-polnila (sorbente) izberemo glede na naravo njihovih primarnih reakcij ali retencijskih mehanizmov z analitom, ki ga želimo ekstrahirati. Največkrat so v uporabi trije mehanizmi (z reverzno fazo, normalno fazo in ionsko izmenjevalni), katerim pripadajo tudi ustrezna polnila:

- Reverzna faza: ekstrakcija hidrofobnih ali polarnih organskih analitov iz vodnih matriksov
Sorbenti: SBD, C18, C8, fenil, CN
- Normalna faza: ekstrakcija polarnih analitov iz nepolarnih organskih topil
Sorbenti: Silica, Florisil, NH₂, CN
- Ionsko izmenjevalna: ekstrakcija nabitih analitov iz vodnih ali nepolarnih organskih vzorcev
Sorbenti: anionska izmenjava: SAX, kationska izmenjava: SCX (Phenomenex, 2008).

Ekstrakcija se izvaja v več stopnjah:

- aktivacija kolone: s primernim topilom (acetonitril ali čisti metanol) aktiviramo površino trdne faze, da se merjena komponenta bolje veže;
- odstranitev aktivacijskega topila: topilo običajno odstranimo z vodo ali s pufrom pri vrednosti pH, pri kateri poteka ekstrakcija merjene komponente;
- nanos vzorca: vzorec spuščamo skozi kolono običajno z majhnim nadtlakom ali pa pustimo, da prosto pada skozi kolono; pomembna sta volumen vzorca, ki ima pomembno vlogo pri izkoristku ekstrakcije in hitrost pretoka vzorca, od katerega je odvisna kvantitativnost vezave analita na polnilo;
- spiranje polarnih komponent: polarne komponente, ki so ostale pri nanosu vzorca odstranimo s kolone s spiranjem (z vodo ali s primernim pufrom), pri čemer pazimo, da ne izperemo iskane komponente;
- spiranje merjene komponente: analit iz polnila spiramo s primernim organskim topilom, pri čemer je pomembno, da elucija poteka počasi (največkrat topilo samo teče skozi kolono), saj je izkoristek ekstrakcije močno odvisen od hitrosti pretoka.

Opisani postopek velja za *off-line* SPE, tu je priprava vzorcev popolnoma ločena od kromatografske analize. V primerjavi z LLE (ekstrakcija tekoče-tekoče) je *off-line* SPE precej hitrejša, ter potrebuje veliko manj topila. Pri *on-line* SPE je ekstrakcijska kolona del kromatografske opreme, povezana s plinskim ali tekočinskim kromatografskim sistemom. *On-line* izvedba nam da bolj točne rezultate, uporabimo pa lahko tudi manjši volumen vzorca, saj pri *off-line* analiziramo ves volumen vzorca (Brodnjak Vončina, 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK POSKUSOV

Pripravili smo sterilno mleko, ga fermentirali z različnimi sevi laktobacilov, centrifugirali ter supernatant pripravili za analize. Mleko smo fermentirali na dva načina: s klasično fermentacijo in fermentacijo v bioreaktorju. Preverili smo tudi proteolitično aktivnost testnih sevov ter s pomočjo OPA-metode ocenili koncentracijo peptidov, ki so nastali po fermentaciji. Supernatant smo obdelali na dva načina: tako, da smo peptide supernatanta ločevali z gelsko filtracijo ali pa na HPLC-sistemu. Ker smo za analize želeli imeti v vzorcu čim večjo koncentracijo peptidov, smo frakcije supernatanta koncentrirali z liofilizacijo. Sledilo je ugotavljanje protimikrobne aktivnosti pripravljenih vzorcev z metodo lise na agarju (MLA), z metodo difuzije v agarju (MDA) ter z metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Reagenti in raztopine

- acetonitril, ACN (Merck, Nemčija)
- β -merkaptotanol (Fluka BioChemica, Nemčija)
- borna kislina, H_3BO_4 (Merck, Nemčija)
- deionizirana voda (dH_2O), prečiščena z Milli-Q sistemom (Millipore, Nemčija)
- encimi: proteinaza K iz *Tritirachium album*, 6,1 U/mg (Sigma, Nemčija);
tripsin iz prašičjega pankreasa, 94 U/ml (Fluka, Nemčija)
- glutaminska kislina (Sigma, Nemčija)
- kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 (Merck, Nemčija)
- kalijev hidrogen fosfat, K_2HPO_4 (Merck, Nemčija)
- klorovodikova kislina, HCl (Merck, Nemčija)
- metanol, CH_3OH (Merck, Nemčija)
- mlečna kislina; min. 90 % (Merck, Nemčija)
- dinatrijev tetraborat (boraks), $Na_2B_4O_7$ (Merck, Nemčija)
- natrijev dodecil sulfat, SDS (Sigma, Nemčija)
- natrijev hidroksid, NaOH (Merck, Nemčija)
- *o*-ftalaldehid, OPA (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- tehnični dušik (N_2 , čistost 4.0)
- trifluoroacetna kislina, TFA (Merck, Nemčija)
- tripton (Biolife, Nemčija)
- Tris, Trizma baza, $M = 121,1$ g/mol (Sigma, Nemčija)
- žveplova (VI) kislina (H_2SO_4) (Merck, Nemčija)

3.2.1.1 Priprava pufrov

Priprava fosfatnega, Tris-HCl in boratnega pufru:

- 50 mM fosfatni pufer, vrednost pH 7,5

Pripravili smo 1 l raztopine 0,1 M KH_2PO_4 (13,8 g/l) in 0,1 M K_2HPO_4 (26,8 g/l). Za pripravo 1 l fosfatnega pufru s pH 7,5 smo v litrski bučki zamešali 80 ml raztopine KH_2PO_4 in 420 ml K_2HPO_4 , z dH_2O dopolnili do oznake ter preverili vrednost pH.

- 50 mM Tris-HCl, vrednost pH 7,5

Pripravili smo 1 M raztopino Tris baze (12,1 g/l). Za pripravo 1 M raztopine Tris-HCl s pH 7,5 smo v litrski bučki zmešali 800 ml Tris baze in 65 ml konc. HCl (12 M, 37 % w/w) ter z dH_2O dopolnili do oznake. 1 l 50 mM Tris-HCl pufru s pH 7,5 smo pripravili tako, da smo v litrsko bučko odpipetirali 50 ml 1M Tris-HCl raztopine, z dH_2O dopolnili do oznake ter preverili vrednost pH.

- 0,1 M boratni pufer, vrednost pH 9,3

Pripravili smo 1 l raztopine 0,1 M natrijevega borata (38,137 g/l) in 0,1 M borne kisline (6,183 g/l). Nato smo k $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ dodajali H_3BO_3 , dokler nismo dosegli željene vrednosti pH raztopine (9,3).

3.2.1.2 Priprava OPA-reagenta (Church in sod., 1983)

Pred vsako meritvijo smo pripravili svež reagent. Najprej smo pripravili posamezne reagente, nato pa smo v sledečem vrstem redu, za 50 ml reagenta, v stekleničko dodali:

25 ml 0,1 M boratnega pufru (pH vrednost 9,3),
2,5 ml 20 % (w/v) SDS,
40 mg OPA (raztopljen v 1 ml metanola),
100 μl β -merkaptioetanol in
10,7 ml vode (dopolnimo do 50 ml).

3.2.1.3 Priprava SPE-mobilnih faz

Za pripravo SPE-mobilnih faz smo uporabili:

- vodo
- metanol
- raztopini trifluorocetne kisline (TFA) v vodi in v ACN

Preglednica 4: Priprava raztopin (za 500 ml) za SPE

raztopina	voda (ml)	ACN (ml)	TFA (ml)
0,05 % TFA v vodi	499,75	0	0,250
0,05 % TFA v 35 % ACN (aq.)	324,75	175	0,250
0,05 % TFA v 46 % ACN (aq.)	269,75	230	0,250
0,05 % TFA v 80 % ACN(aq.)	99,75	400	0,250

3.2.2 Pribor in oprema

- avtoklav (A-21 CA, Kambič, Slovenija)
- AmiconTM ultrafiltracijski koncentradorji, velikost por 10 kDa (Millipore, Nemčija)
- centrifuge (mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Nemčija; Sigma 3K18, Nemčija)
- čitalec mikrotitrskih plošč (EL 808, Biotek, ZDA)
- digestorij (Modelle 80, Waldner, Nemčija)
- filtri: 0,22 µm in 0,45 µm (Millex GV, Millipore, Nemčija)
- FPLC-sistem za gelsko filtracijo (Gradifrac, Amersham Pharmacia Biotech, Švedska): steklena kolona (90 × 3,5 cm) s polnilom (Sephadex G-25, Sigma, Nemčija; območje separacije 1-5 kDa), peristaltična črpalka (HiLoad Pump P-50)
- zbiralec frakcij (LKB Biocal 17 Minicad Fraction Collector, Švedska)
- HPLC-kromatografski sistem (Waters 2690, ZDA): detektor (UV/Vis), kolona: velikost zrn 4 µm, velikost por 90 Å, dimenzije: 250 mm × 4,6 mm s SecurityGuardTM predkolono (4 × 3,0 mm) (Resource RPC, Amersham Pharmacia Biotech, Švedska, 1 ml), HPLC-viale (Chromacol LTD, Velika Britanija), vstavki za viale (Agilent, Velika Britanija, 250 µl)
- inkubatorji: BT150, Marijan Krokter, Slovenija; Labo, Slovenija; BTE-S Termo-medicinski aparati, Hrvaška
- laboratorijska oprema: petrijeve plošče, steklovina, stojala, pipete, nastavki, mikrocentrifugirke, pincete, gorilnik, štoparica, termometer
- laboratorijski bioreaktor (fermentor KLF 2000, Bioengineering, Švica)
- liofilizator (Heto, CT 60e, ZDA)
- mikrotitrne plošče (Corning, Costar, ZDA)
- mikrovalovna pečica (32 L, Bosch, Nemčija)

- pH-meter (MP220, Mettler Toledo, Velika Britanija)
- SPE-kolone (Sep-Pak C18-E, Waters, ZDA)
- spektrofotometer (6505 UV/Vis Spectrophotometer, Jenway, Velika Britanija)
- stekleničke: za gojišča, reagente, liofilizacijske
- tehtnice (AT 400 FACT, Mettler Toledo, Nemčija; Exacta 300 EB, Tehnica, Slovenija)
- termoblok (Liebisch, Nemčija)
- ultrafiltracijski koncentradorji, velikost por 10 kDa (Amicon ultra, Nemčija)
- UV-kivete (Plastibrand, Nemčija)
- vodna kopel (0925095 MK, Marijan Krokter, Slovenija)
- zaščitna mikrobiološka komora (M12, Iskra PIO, Slovenija)

3.2.3 Gojišča

Vsa gojišča smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck). Trdna in tekoča gojišča smo pripravili tako, da smo zatehtali ustrezno količino gojišča, ki smo ga raztopili v vodi. Mehka gojišča pa smo pripravili tako, da smo za en liter gojišča zatehtali ustrezno količino gojišča v prahu, dodali še 7,5 g agar-agarja ter mešanico raztopili v vodi. Gojišča MRS agar in mehki MRS smo avtoklavirali 15 min pri 118 °C, ostala pa 15 minut pri 121 °C.

Uporabili smo naslednja gojišča:

- trdna gojišča: PCA, MRS agar
- tekoča gojišča: MRS, BHI
- mehka gojišča: MRS, BHI
- posneto mleko v prahu (Pomurske mlekarne, 1,25 % mlečne maščobe v suhi snovi)

Priprava rekonstituiranega mleka

Mleko smo rekonstituirali iz posnetega mleka v prahu: sestava mleka na deklaraciji v 100 g: beljakovine (37 g), ogljikovi hidrati (48 g), maščobe (1,25 g). Za pripravo 1 l mleka smo zatehtali 90 g mleka v prahu in dodali 910 ml vode, dobro premešali ter avtoklavirali pri 118 °C 15 minut.

3.2.4 Bakterijski sevi

Testni in indikatorski bakterijski sevi (preglednici 5 in 6), ki smo jih uporabili, so bili shranjeni v tekočem dušiku. Gojili smo jih v tekočem gojišču MRS (gojišče za gojenje laktobacilov) oziroma BHI (gojišče za gojenje indikatorskih sevov rodov *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus* in *Staphylococcus*), pri temperaturi 30 °C oziroma 37 °C, hranili pa v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Za poskuse smo uporabljali sveže 18-urne kulture s približno 10^8 KE/ml.

Preglednica 5: Testni sevi, gojišča, kjer smo jih gojili, temperatura gojenja in vir

Testni sev	Tekoče gojišče	Temperatura (°C)	Vir
<i>Lactobacillus helveticus</i> BGRA43	MRS	37	Zbirka laboratorija za molekularno genetiko industrijskih mikroorganizmov, Univerza v Beogradu, Srbija
<i>Lactobacillus helveticus</i> : LMG 6413, NCK 254			Zbirka mikroorganizmov Katedre za mlekarstvo, Biotehniška fakulteta, Slovenija
<i>Lactobacillus helveticus</i> 481 NCK 228 Hlv ⁺			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> : L7, L8, L12, L89, Biofank, LMG 6901			
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> : LMG 6412 ^T			
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> : LMG 6401			
<i>Lactobacillus gasseri</i> K7			

Preglednica 6: Indikatorski sevi, gojišča kjer smo jih gojili, temperatura gojenja in vir

Indikatorski sev	Tekoče gojišče	Temperatura (°C)	Vir
<i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2714	MRS	30	Zbirka mikroorganizmov Katedre za mlekarstvo, Biotehniška fakulteta, Slovenija
<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010 ^I	BHI	37	
<i>Escherichia coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻			
<i>Escherichia coli</i> 11229			
<i>Escherichia coli</i> 25922			
<i>Enterococcus faecalis</i> LMG 7937			
<i>Enterococcus faecium</i> LMG 11423			
<i>Enterococcus durans</i> CCM 5612			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
<i>Staphylococcus aureus</i> 19095			
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4223			
<i>Staphylococcus aureus</i> NRS 144			

3.3 METODE DE LA

3.3.1 Fermentacija mleka

Rekonstituirano mleko smo po avtoklaviranju fermentirali z različnimi testnimi sevi pri temperaturi 37 °C. Vedno smo izvedli klasično fermentacijo, pri dveh sevih pa še fermentacijo v bioreaktorju. Mleku smo izmerili vrednost pH pred in po fermentaciji, ki smo jo izvedli na dva načina:

1. Klasična fermentacija

Mleku (200 ml) smo dodali 2 % inokuluma 18-urne (prekonočne) kulture ustreznega testnega seva (preglednica 5) in izpeljali 18-urno fermentacijo pri 37 °C. Po fermentaciji in merjenju vrednosti pH vzorcev smo vzorcu mleka s koncentrirano mlečno kislino (min. 90 %) oz. z 1 M NaOH uravnali vrednost pH na 3,7 (povprečna vrednost pH supernatantov vzorcev) ter ga centrifugirali (5445×g, 20 min). Supernatante (160 ml) pa smo do nadaljnjih analiz shranjevali pri -20 °C.

2. Fermentacija v bioreaktorju

S testnima sevoma BGRA43 in L8 smo fermentirali mleko v bioreaktorju. Prednost te fermentacije je bila konstantna vrednost pH, ki smo jo vzdrževali z dodatkom 4 M NaOH in 1 M H₂SO₄.

Laboratorijski bioreaktor smo sterilizirali (121 °C, 15 min), nato pa vzpostavili pogoje fermentacije:

- V_{delovni} = 2,2 l, V_{celotni} = 3,7 l, N₂ = 0,5 bar, 200 obratov/min
- Gojišče: 2 l mleka z 2 % inokulumom 18-urne kulture ustreznega seva
- T = 37 °C
- pH = 6,5; vrednost pH smo vzdrževali z dodatkom 1 M H₂SO₄ in 4 M NaOH.
- Čas: 18 ur (L8, BGRA43), 72 ur (BGRA43).

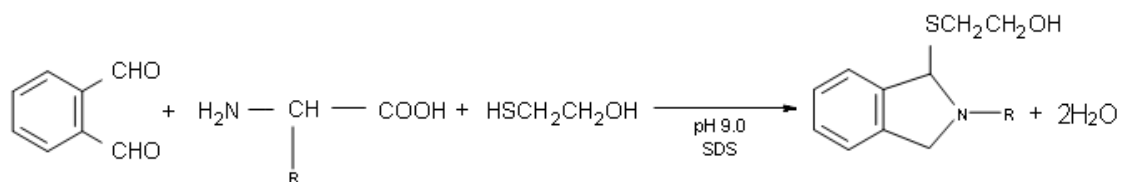
Vzorcu fermentiranega mleka (800 ml) smo s koncentrirano mlečno kislino znižali vrednost pH na 3,7 in ga centrifugirali 20 min pri 5445×g. Supernatant (500 ml) smo do nadaljnjih analiz hranili pri -20 °C.

3.3.2 Določanje koncentracije prostih amino skupin

Koncentracijo prostih amino skupin smo določali s pomočjo OPA-metode, ki smo jo izvedli tako, kot so opisali Church in sod. (1983), Zuman (2005) ter Frister in sod. (1986). OPA-metodo smo uporabili tudi za določanje proteolitične aktivnosti testnih sevov in za oceno masne koncentracije peptidov v vzorcih.

Princip

Metoda temelji na reakciji primarnih aminov oziroma prostih amino skupin peptidov ali proteinov z *o*-ftalaldehidom (OPA) in β-merkaptoetanolom. Več prostih amino skupin nastane med proteolizo mlečnih proteinov, ki jo povzročijo proteinaze starterske kulture. V reakciji lahko sodelujejo aminokisliline, peptidi ali proteini, ki vsebujejo proste amino skupine. OPA mora najprej reagirati s tiolno skupino β-merkaptoetanela, nato pa s prostimi amino skupinami. Produkt reakcije je derivat izoindola, 1-alkiltio-2-alkilizoindol (slika 2), ki močno absorbira svetlobo pri 340 nm.



Slika 2: Produkt reakcije med OPA-reagentom in prosto amino skupino je 1-alkiltio-2-alkilizoindol (Church in sod., 1983)

Pred vsako meritvijo smo pripravili svež OPA-reagent, kot je opisano v poglavju 3.2.1.2, ker reagent po določenem času oksidira in se mu zato zmanjšuje občutljivost. SDS denaturira proteine, da lahko poteče reakcija z vsemi prostimi amino skupinami v vzorcu, β -merkaptotanol pa pripomore k intenzivnejši in bolj stabilni absorbanci produkta. Metoda je hitra, občutljiva (do $\sim 7 \mu\text{M}$ primarnih aminov) in enostavna. Uporabna je za vse mlečne proteine (šibka reakcija s prostimi amino skupinami cisteina; s prolinom ni reakcije) (Church in sod., 1983; Zuman, 2005; Frister in sod., 1986).

Postopek

UV-kivete (1,5 ml) smo napolnili z 1 ml svežega OPA-reagenta in dodali 20 μl standardne raztopine (glutaminska kislina ali tripton) oz. vzorca. Kivete smo pokrili s parafilmom, da smo lahko rahlo premešali vsebino ter vse vzorce 3 minute pustili na sobni temperaturi, da je potekla reakcija. Nato smo s spektrofotometrom standardni raztopini oziroma vzorcem izmerili absorbanco pri 340 nm. Standardno raztopino smo uporabili za pripravo umeritvene krivulje, ki nam je služila pri določanju koncentracije prostih amino skupin v vzorcih. Pred merjenjem vzorcev smo spektrofotometer najprej umerili s slepim vzorcem, z mešanico 20 μl dH₂O in 1 ml OPA-reagenta.

Priprava umeritvene krivulje

Kot standard za določanje molarne koncentracije prostih amino skupin smo uporabili glutaminsko kislino (Pripp in sod., 2006), ki ima eno prosto amino skupino. Iz umeritvene krivulje glutaminske kisline (slika 3) smo izračunali molarne koncentracije prostih amino skupin v vzorcih pred fermentacijo in po njej (v mM), kar nam je služilo tudi pri oceni proteolitične aktivnosti testnih sevov. Predpostavili smo, da višja koncentracija prostih amino skupin na koncu fermentacije pomeni sorazmerno tudi višjo proteolitično aktivnost testnih sevov.

Tripton smo uporabili kot standard pri oceni masne koncentracije peptidov v vzorcih (Rizzello in sod., 2005; Muralidhara in sod., 2007). Tripton je encimski hidrolizat kazeina in ima tako relativno podobno strukturo kot naš vzorec. Naš vzorec je bil zelo mešan, sestavljen iz peptidov različnih velikosti in prostih aminokislin. Ker na podlagi uporabljenih metod pravzaprav ne vemo, komu amino skupine pripadajo, smo masno koncentracijo peptidov v naših vzorcih lahko le ocenili s pomočjo standarda podobne sestave. Masne koncentracije peptidov v naših vzorcih smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje (slika 5) in jih izrazili v mg/ml. Na ta način smo lahko rezultate, ki smo jih dobili pri analizah, primerjali s tistimi iz literature.

Najprej smo izmerili absorbance pripravljenih standardov (raztopine glutaminske kisline in triptona različnih koncentracij) in narisali umeritveni krivulji, nato pa iz njih odčitati in ocenili vsebnost prostih amino skupin v vzorcih.

3.3.3 Ugotavljanje proteolitične aktivnosti testnih sevov

Ugotavljali smo proteolitično aktivnost naslednjih testnih sevov:

L. delbrueckii ssp. *bulgaricus*: L7, L8, L12, L89, Biofank, LMG 6901

L. delbrueckii ssp. *delbrueckii*: LMG 6412

L. delbrueckii ssp. *lactis*: LMG 6401

L. helveticus: LMG 6413, NCK 254, BGRA 43

Z OPA-metodo smo v supernatantih vzorcev fermentiranega mleka in nefermentiranega mleka določili koncentracijo prostih amino skupin. Kot standard smo uporabili glutaminsko kislino in narisali umeritveno krivuljo (slika 3). Iz enačbe premice smo izračunali molarne koncentracije prostih amino skupin v vzorcu.

Predpostavili smo, da kulture z višjo stopnjo proteolitične aktivnosti proizvedejo tudi več bioaktivnih peptidov. Glede na izračune smo med sevi z najvišjo stopnjo proteolitične aktivnosti izbrali dva: BGRA43 in L8, ki smo ju uporabili za nadaljnje analize.

Po fermentaciji, določanju koncentracije prostih amino skupin v supernatantih fermentiranega mleka in ugotavljanju proteolitične aktivnosti testnih sevov, smo preverili še, ali morda testni sevi tvorijo bakteriocine. Postopek je opisan v poglavju 3.3.8.3.

3.3.4 Priprava vzorcev fermentiranega mleka

1. Priprava vzorcev za gelsko filtracijo

120 ml supernatanta fermentiranega mleka (klasična fermentacija in fermentacija v bioreaktorju) smo prefiltrirali skozi 0,22 μm filter ter filtrat ultrafiltrirali v ultrafiltracijskih koncentradorjih z membrano 10 kDa pri 4000 \times g, 20 min. Nato smo 20 ml permeata frakcionirali z gelsko filtracijo, kot je opisano v poglavju 3.3.6.1. Frakcije smo koncentrirali z liofilizacijo (gl. poglavje 3.3.7).

2. Priprava vzorcev za RP-HPLC

Peptide v supernatantu mleka (150 ml), fermentiranega v bioreaktorju, smo ekstrahirali s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi (SPE) kot je opisano v poglavju 3.3.5. Zbrane peptide smo nato ločevali z RP-HPLC, kot je opisano v poglavju 3.3.6.2.

3. Supernatant mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43 (18 ur), smo frakcionirali tudi s selektivno SPE-elucijo. Postopek je opisan v poglavju 3.3.6.3.

4. Del supernatanta (40 ml) klasično fermentiranega mleka (18 ur) smo liofilizirali, rehidrirali v 4 ml dH₂O (10-krat koncentrirani vzorci) ter 2 ml nevtralizirali z 1 M NaOH, 2 ml pa pustili na vrednosti pH, ki ga je imel supernatant po fermentaciji.

3.3.5 Ekstrakcija peptidov s SPE

Za ekstrakcijo peptidov iz supernatanta fermentiranega mleka smo uporabili SPE-kolone s stacionarno fazo C-18.

Postopek

Stacionarno fazo smo aktivirali najprej z metanolom in vodo ter jo izpirali z 0,05 % TFA v vodi. Nato smo nanесли vzorec, ki se je absorbiral v pore sorbenta in izpirali soli z 0,05 % TFA v vodi. Nazadnje smo z 0,05 % TFA v 80 % ACN (aq.) eluirali peptide, kar smo zbirali za analize na HPLC-sistemu. Postopek smo večkrat ponovili (skupaj smo ekstrahirali 150 ml supernatanta fermentiranega mleka), da smo lahko povečali koncentracijo zbranih peptidov. Postopek in količine nanosov so podani v preglednici 7.

Preglednica 7: Postopek izvedbe SPE

Nanos	Mobilna faza/Vzorec	Izpirek
1. aktivacija kolone	3 ml MeOH	odpad
2. uravnoteženje	3 ml vode	odpad
3. izpiranje	3 ml 0,05 % TFA v vodi	odpad
4. nanos vzorca	2 ml supernatanta	odpad
5. izpiranje nečistoč	3 ml 0,05 % TFA v vodi	odpad
6. izpiranje peptidov	3 ml 0,05 % TFA v 80 % ACN	zbiranje peptidov

Po SPE smo ACN odstranili s prepihanjem s tehničnim dušikom; 220 ml vzorca smo razdelili v steklene epruvete (22 × 10 ml), jih postavili v termoblok na 40 °C, vstavili cevke, skozi katere je uhajal dušik ter prepihovali toliko časa, da je na dnu epruvet ostal le vzorec kot suha snov. Vzorec razdeljen v epruvetah smo nato rehidrirali v minimalni količini sterilne vode ter ga združili v 10 ml stekleničko ($V_{\text{skupni}} = 4,5$ ml). Vzorcju smo pred HPLC-analizo dodali eluent A (0,05 % TFA v vodi) v razmerju 1:1, ga centrifugirali (10000×g, 10 min) ter prefiltrirali skozi 0,22 μm membranski filter (Rizzello in sod., 2005). Tako smo odstranili večje proteine, ki so v prisotnosti kisline denaturirali in bi lahko zamašili kolono.

3.3.6 Ločevanje vzorcev

Po pripravi vzorcev smo za ločevanje peptidov uporabili tri metode. Peptide v vzorcih, ki smo jih pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.3.4, točka 1, smo ločevali po velikosti s pomočjo gelske filtracije, druge vzorce (gl. poglavje 3.3.4, točka 2) pa smo ločevali na posamezne frakcije peptidov s pomočjo RP-HPLC na podlagi hidrofobnih interakcij med peptidi, polarno mobilno fazo in nepolarno stacionarno fazo RP-kolone. Po testiranju protimikrobne aktivnosti frakcij, pridobljenih z RP-HPLC, smo aktivno frakcijo peptidov pridobili tudi s pomočjo selektivne SPE elucije (C18 nepolarna stacionarna faza), ki temelji na podobnem principu ločbe kot ločba peptidov s pomočjo RP-HPLC.

3.3.6.1 Gelska filtracija

Gelsko filtracijo na Sephadex-u G-25 smo uporabili za ločitev peptidov po velikosti (od 1 do 5 kDa). Uporabili smo metodo po Muralidhara in sod. (2007) z nekaj modifikacijami – spremenili smo pretok in pri analizi poleg 50 mM Tris-HCl pufra (pH 7,5) uporabili tudi 50 mM fosfatni pufer (pH 7,5), saj se je Tris-HCl pufer izkazal za neprimerne pri določanju prostih amino skupin frakcij, ker (hidroksimetil)aminometan (Tris) že vsebuje NH_2 skupino.

Pripravljen vzorec (5 ml), kot je opisano v poglavju 3.3.4, smo nanekali na stekleno kolono ($90 \times 3,5$ cm), polnjeno z nosilcem Sephadex G-25, ki smo ga prej kondicionirali s pufrom. Vzorec smo eluirali pri pretoku 3 ml/min, z uporabo peristaltične črpalke ter zbirali frakcije po 12 ml. Prisotnost proteinov smo potrdili z merjenjem absorbance na UV-detektorju pri 280 nm. Frakcije smo liofilizirali, kot je opisano v poglavju 3.3.7. Protimikrobno aktivnost v liofiliziranih in rehidriranih frakcijah supernatanta fermentiranega mleka smo ugotavljali z metodo lise na agarju (MLA) (3.3.8.1).

3.3.6.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC)

Frakcionacijo vzorcev (gl. poglavje 3.3.4) smo izvedli z uporabo Resource RPC-kolone in kromatografskega sistema Waters 2690. Gradientno elucijo smo dosegli z uporabo dveh črpalk pri pretoku 1 ml/min. Eluent A je bil 0,05 % trifluoroacetna kislina v vodi, eluent B pa 0,05 % trifluoroacetna kislina v acetonitrilu. Delež acetonitrila je linearno naraščal od 0 do 5 % med 0 in 16 minutami, od 5 do 46 % med 16 in 62 minutami in od 46 do 100 % med 62 in 72 minutami. Injicirali smo 100 μl vzorca. Peptide smo detektirali z UV-detektorjem pri 214 nm. S pomočjo zbiralca frakcij smo na 2 minuti zbirali frakcije, postopek pa 6-krat ponovili ($V_{\text{skupni}} = 12$ ml), da smo pridobili zadostno količino peptidov (Rizzello in sod., 2005). Frakcije smo nato liofilizirali (gl. poglavje 3.3.7) in protimikrobno aktivnost preverili z metodo difuzije v agarju (MDA) (gl. poglavje 3.3.8.2). Protimikrobno aktivnost frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43 (18 ur), smo ugotavljali še z metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah (gl. poglavje 3.3.8.3).

3.3.6.3 Selektivna SPE-elucija

Selektivno SPE-elucijo (Herraiz in Casal, 1995) smo uporabili za ponovno frakcioniranje vzorca mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43, pri katerem smo z MDA ugotovili protimikrobno aktivnost, da bi se izognili dolgotrajnemu HPLC postopku separacije. Protimikrobno aktivnost so pokazale frakcije 1, 27, 28, 29 in 30, ki so bile pridobljene s pomočjo RP-HPLC. Štiri zaporedne frakcije (27–30) smo s pomočjo SPE zbrali tako, da smo upoštevali njihov retencijski čas med kromatografsko analizo ter iz programa gradienta na HPLC-sistemu razbrali koncentracijsko območje (% ACN), kjer so se aktivne frakcije eluirale. Nato smo pripravili 0,05 % TFA v ustrezni koncentraciji ACN v vodi. Retencijski čas aktivnih frakcij je bil od 56,5 do 62,5 minut, koncentracije ACN v vodi v tem časovnem razmiku pa od 35 % do 46 %.

Pripravili smo raztopine TFA v ACN (preglednica 4) in uporabili postopek, opisan v poglavju 3.3.5, ki se razlikuje v izpiranju peptidov. Tu smo peptide izpirali trikrat: najprej z 0,05 % TFA v 35 % ACN (aq.), nato z 0,05 % TFA v 46 % ACN (aq.) ter nazadnje z 0,05 % TFA v 100 % ACN. Zbirali smo le peptide, ki smo jih sprali z 0,05 % TFA v 46 % ACN (aq.), ostalo pa smo zavrgli. Frakcija peptidov, pridobljena s SPE, je predstavljala skupek štirih aktivnih frakcij pridobljenih z RP-HPLC. Nadalje smo s frakcijo peptidov postopali enako kot z vzorci po SPE (gl. poglavje 3.3.5). Uporabili smo ga kot primerjalni vzorec za ponovno potrditev protimikrobne aktivnosti z MDA.

3.3.7 Koncentriranje frakcij

V liofilizacijske stekleničke smo pipetirali po 12 ml frakcij, jih zaprli s pokrovčki ter zamrznili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preden smo jih postavili v liofilizator, smo na stekleničkah dvignili pokrovčke, da je skozi reže lahko izparevala voda ter vzorce sušili pri tlaku nižjem od 1 mbar in temperaturi $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Liofilizacijo smo zaključili, ko smo ocenili, da je v stekleničkah ostala le še suha snov. Naš postopek je trajal 24 ur. Nato smo frakcije, ki smo jih dobili z gelsko filtracijo, rehidrirali z 240 μl dH₂O, frakcije, ki smo jih dobili s HPLC pa z 200 μl dH₂O.

3.3.8 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti

3.3.8.1 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti z liso na agarju – MLA

Uporabili smo metodo po Bogovič-Matijašič (1998), ki smo jo priredili za naš vzorec.

V petrijeve plošče smo nalili 10 ml trdnega gojišča PCA in jih pri sobni temperaturi sušili čez noč. Osušeno plast smo prelili s 4 ml ustreznega mehkega gojišča, primerne za posamezen indikatorski sev (preglednica 6), v katerega smo predtem vmešali 50 μl 18-urne indikatorske kulture. Na spodnji strani petrijevk smo si označili točko nanosa vzorca in oznako vzorca. Nato smo na agar nanesli na vsako točko ustrezno količino vzorca. Ko je vzorec difundiral v gojišče smo plošče inkubirali 24 ur pri temperaturah, primernih za rast indikatorskih sevov (preglednica 6). Po inkubaciji smo opazovali cone inhibicije na področju nanosa vzorca in jih izmerili v milimetrih (premer). Opazovali smo velikost cone, ostrino roba cone (oster/zabrisan rob) in čistost (bistrost) cone. Za kontrolo vpliva kisline na inhibicijo rasti indikatorskih sevov smo na plošče nanašali tudi supernatant mleka (mleku smo z dodatkom koncentrirane mlečne kisline uravnali vrednost pH na $\sim 3,7$).

Na plošče smo nanesli različne količine vzorca:

1. Supernatant fermentiranega mleka, ki smo ga nevtralizirali oz. pustili na vrednosti pH, kot ga je imel supernatant po fermentaciji, smo na plošče nanašali po 5 μl .
2. Frakcije vzorcev fermentiranega mleka, ki smo jih pridobili z gelsko filtracijo, pa smo na plošče nanašali v količini 2-krat po 5 μl .

3.3.8.2 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti z metodo difuzije v agarju – MDA

V primeru, ko smo hoteli povečati količino nanešenega vzorca, smo uporabili metodo z difuzijo v agarju. To metodo smo uporabili pri vzorcih mleka, fermentiranega v bioreaktorju s testnima sevoma L8 oz. BGRA43, ki smo jih frakcionirali z RP-HPLC.

Postopek

V petrijeve plošče smo nalili po 10 ml trdnega gojišča MRS, ga osušili in prelili z 10 ml mehkega gojišča MRS, ki smo mu predhodno dodali 200 μ l indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714. V agar smo naredili luknjice in jih napolnili s 100 μ l frakcij, ki smo jih dobili po analizi s HPLC. Plošče smo za 4 ure postavili v hladilnik, da je vzorec difundiral v agar, nato pa inkubirali pri 30 °C. Po 24 urah smo opazovali cone inhibicije: velikost, ostrino roba in čistost. Velikost cone smo merili od roba luknjice do roba nastale cone.

Pri vzorcih, ki smo jih dobili z analizo na HPLC-sistemu, smo kot kontrolo TFA, ki ostane v frakcijah in lahko tvori inhibicijske cone, na plošče nanašali še 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 in 0 μ M koncentracije TFA v vodi. Različne koncentracije smo pripravili tako, da smo izračunali predviden ostanek TFA v frakcijah po HPLC-analizi. Raztopine TFA smo nanašali v enakih količinah kot frakcije fermentiranega mleka in opazovali nastanek con ter jih primerjali s conami, ki so nastale s frakcijami.

3.3.8.3 Ugotavljanje proteinske narave protimikrobne snovi (bakteriocini) z liso na agarju

Testne seve, pri katerih smo preverjali, ali tvorijo med fermentacijo mleka peptide s protimikrobno aktivnostjo, smo preverili ali tvorijo tudi protimikrobne snovi proteinske narave (bakteriocine). Ker imajo bakteriocini podoben način delovanja, bi pri naših testih lahko dajali lažno pozitivne rezultate. Pri sevu *L. gasseri* K7 je bila potrjena tvorba bakteriocinov, zato smo ga uporabili za pozitivno kontrolo.

Pripravili smo sveže 18-urne kulture testnih in indikatorskih sevov (prikazani v preglednici 9), ki smo jih nacepili v ustrezna tekoča gojišča. Iz 18-urne kulture v bujonu, ki smo jo dobro premešali, smo pripravili tudi supernatante vzorcev tako, da smo del 18-urne kulture centrifugirali (10000 \times g, 10 min) in odlili supernatant. Del supernatanta, ki je imel vrednost pH 4, smo še nevtralizirali z 1 M NaOH.

Tvorbo potencialnih bakteriocinov smo preverjali na dva načina: z nanašanjem lise 18-urne kulture testnih sevov na površino agarja in z nanašanjem lise supernatantov (izvornih in nevtraliziranih) na površino agarja. V prvem primeru smo na površino osušenega agarja MRS (v petrijevih ploščah) v obliki spota nanesli 5 μ l premešane kulture testnega seva v tekočem gojišču. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo gojišče z zraslimi kolonijami prelili s 4 ml mehkega gojišča primerne za indikatorski sev, ki smo ga predhodno vmešali v gojišče (50 μ l). Po 24 urah inkubacije pri temperaturah, primernih za rast indikatorskih sevov (preglednica 6), smo izmerili cone inhibicije (od roba nanešene lise do roba cone). V drugem primeru smo prisotnost bakteriocinov v supernatantu

preverjali tako, kot je opisano v poglavju 3.3.8.2, le da smo uporabili manjše količine mehkega gojišča (4 ml), ustreznega indikatorskega seva (50 μ l) in nanešenega vzorca (5 μ l).

Kjer so nastale cone pri testnih sevih, smo preverili proteinsko naravo protimikrobne snovi, ki je povzročila cono, z encimom proteinazo K (20 mg/ml) in tripsinom (25 mg/ml). Na ploščah smo označili nanos vzorca in še rob cone, ki smo ga izmerili pri prejšnjih analizah. Nanesli smo vzorce (5 μ l), na rob cone pa še 5 μ l premešane raztopine encima ter inkubirali (pri ustrezni temperaturi indikatorskega seva, 24 ur). Na plošče smo dodali tudi raztopine mlečne kisline z vrednostjo pH 3,7. Če je bil inhibitor proteinske narave (bakteriocin), je encim razgradil protimikrobno snov (na mestu nanosa encima je nastala oblika lunice, kot posledica rasti indikatorskega seva).

3.3.8.4 Metoda kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah

V frakcijah (18-urna fermentacija mleka v bioreaktorju z BGRA43, frakcioniranje s HPLC), ki so pri MDA dale pozitiven rezultat (frakcije 1, 27, 28, 29 in 30), smo prisotnost protimikrobnih snovi preverjali z metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah. S to metodo smo določali, kakšna koncentracija peptidov je potrebna za inhibicijo rasti indikatorskega seva. Kot indikatorski sev smo uporabili sev *L. sakei* NCDO 2714. Uporabili smo postopek, ki so ga opisali Bogovič-Matijašič in sod. (1998), delno modificiran za naš vzorec.

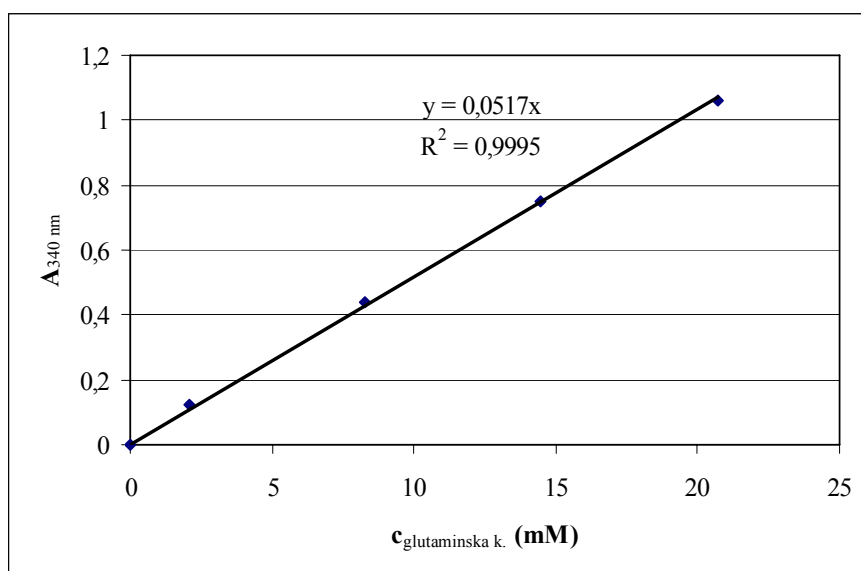
Sev *L. sakei* NCDO 2714 smo inkubirali 18 ur pri 30 °C. Po inkubaciji smo kulturo razredčili v svežem tekočem gojišču MRS 10.000-krat. V vsako vdolbino (razen v prvi in zadnji koloni) na mikrotitrski plošči smo nanesli 50 μ l tekočega gojišča MRS, v vdolbine v drugi koloni pa še 25 μ l MRS tekočega gojišča in 25 μ l frakcije. Z večkanalno pipeto smo prenesli 50 μ l mešanice iz te kolone v naslednjo ter tako naprej vse do predzadnje. Tako smo dobili ustrezne razredčitve. Zadnjih 50 μ l smo zavrgli. V zadnjo kolono smo nanesli 37,5 μ l tekočega gojišča MRS in 12,5 μ l sterilne vode. Na koncu smo v te vdolbine v vsako dodali še 150 μ l 10.000-krat razredčene kulture celic *L. sakei* NCDO 2714. V prvo kolono smo dali samo 187,5 μ l tekočega gojišča MRS in 12,5 μ l sterilne vode. Skupni volumen mešanice v posamezni vdolbini je znašal 200 μ l. Plošče smo inkubirali 18 ur pri 30 °C ter nato vsebino premešali in izmerili optično gostoto pri 620 nm. Prva kolona je služila za umerjanje fotometra. Inhibicijo rasti seva *L. sakei* NCDO 2714 smo določili tako, da smo primerjali absorbance vzorcev s kontrolo v zadnji koloni.

4 REZULTATI

Glede na namen našega raziskovanja smo najprej poiskali seve z najvišjo stopnjo proteolitične aktivnosti. Z izbranimi sevi smo pripravili vzorce fermentiranega mleka, nato pa ugotavljali protimikrobno aktivnost nastalih peptidov.

4.1 UGOTAVLJANJE PROTEOLITIČNE AKTIVNOSTI IZBRANIH TESTNIH SEVOV

Za ugotavljanje proteolitične aktivnosti testnih sevov smo uporabili OPA-metodo, s katero smo v supernatantih vzorcev fermentiranega mleka in nefermentiranega mleka določili koncentracijo prostih amino skupin. Iz umeritvene krivulje glutaminske kisline (slika 3) smo odčitali molarne koncentracije prostih amino skupin v vzorcu.



Slika 3: Umeritvena krivulja za določanje prostih amino skupin

Primer: vzorec 1 (supernatant mleka, fermentiranega s sevom L7, preglednica 8) z absorbanco 0,635

$$y = 0,0517x$$

$$A = 0,0517c$$

$$c = (0,635/0,0517) \text{ mM}$$

$$c = 12,28 \text{ mM}$$

Nato smo stopnjo proteolitične aktivnosti posameznega seva ocenili tako, da smo izračunali razliko med molarima koncentracijama prostih amino skupin v supernatantu vzorca po fermentaciji in pred njo.

Primer: vzorec 1

Stopnja proteolitične aktivnosti = c (vzorec) – c (mleko)

St. prot. akt. = 12,28 – 6,02

St. prot. akt = 6,26

V preglednici 8 so prikazani sevi, vključeni v raziskavo, vrednosti pH mleka po 18-urni fermentaciji, izmerjene absorbance supernatantov vzorcev fermentiranega mleka ob dodatku OPA-reagenta, na osnovi katerih smo iz umeritvene krivulje odčitali molarne koncentracije prostih amino skupin, na podlagi ugotovljene koncentracije prostih amino skupin mleka (nefermentiranega) in vzorca pa smo izračunali stopnje proteolitične aktivnosti (Δc).

Preglednica 8: Testni sevi, vrednosti pH mleka po 18-urni fermentaciji, izmerjene absorbance, molarne koncentracije prostih amino skupin in stopnje proteolitične aktivnosti

Vzorci mleka, fermentiranega s testnimi sevi/ neferm. mleko	Vrednost pH, 18 ur	Izmerjena A_{340}	Koncentracija prostih amino skupin, c (mM)	Stopnja proteolitične aktivnosti (Δc)
Nefermentirano mleko ¹	6,51	0,311	6,02	0
L7	3,80	0,635	12,28	6,26
L8 ²	3,37	0,843	16,31	10,29
L12	3,81	0,799	15,45	9,43
L89	4,05	0,650	12,57	6,55
Biofank	3,47	0,646	12,50	6,48
LMG 6901	3,59	0,549	10,62	4,60
LMG 6412	4,07	0,555	10,74	4,72
LMG 6401	/	0,366	7,08	1,06
LMG 6413	/	0,413	7,99	1,97
NCK 254	/	0,338	6,54	0,52
BGRA 43 ²	3,47	0,852	16,48	10,46

Legenda: ¹ mleku smo s koncentrirano mlečno kislino znižali vrednost pH na 3,7; ² seva z najvišjo stopnjo proteolitične aktivnosti; / ni meritve; c = koncentracija prostih amino skupin, Δc = stopnja proteolitične aktivnosti

Kot proteolitično najaktivnejša seva sta se izkazala sev BGRA43 in L8, ki smo ju uporabili za nadaljnje analize.

4.2 UGOTAVLJANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI IZBRANIH TESTNIH SEVOV

Protimikrobno aktivnost izbranih testnih sevov proti različnim indikatorskim sevom smo preverjali s pomočjo MLA ter na podlagi razgradnje protimikrobne snovi z encimoma tripsinom in proteinazo K potrjevali proteinsko naravo protimikrobne snovi (potencialnih bakteriocinov) (preglednica 9). Pozitiven rezultat delovanja encimov je prikazan na sliki 4.

Testna seva L7 in Biofank nista inhibirala nobenega od izbranih indikatorskih sevov, zato ju nismo vključili v preglednico 9. Z MDA, s katero smo preverjali prisotnost bakteriocinov v supernatantu kulture testnih sevov v bujonu (vrednost pH ~3,7) in nevtraliziranem supernatantu, nismo ugotovili inhibicije.

Preglednica 9: Rezultati ugotavljanja inhibicije indikatorskih sevov z izbranimi testnimi sevi in ugotavljanja proteinske narave inhibitorne snovi z encimi na gojišču MRS; metoda MLA

Testni sevi	Občutljivi indikatorski sevi – inhibicija rasti; cone	Razgradnja inhibitorne snovi z encimom	
		tripsin	proteinaza K
L8	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-
L12	<i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻ ; <i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-
L89	<i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻ ; <i>L. sakei</i> NCDO 2714; <i>S. aureus</i> NRS 144; <i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-
BGRA43	<i>L. sakei</i> NCDO 2714; <i>L. delbrueckii</i> LMG 6412 ^T , <i>E. faecalis</i> LMG 7937, <i>S. aureus</i> NRS 144; <i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-
K7	<i>Lb. sakei</i> NCDO 2714; <i>L. delbrueckii</i> LMG 6412 ^T ; <i>E. coli</i> A, , 08:K88 Ent ⁻ ; <i>E. faecalis</i> LMG 7937, <i>S. aureus</i> ATCC 25923	+: <i>Lb. sakei</i> NCDO 2714; <i>L. delbrueckii</i> LMG 6412 ^T	+: <i>Lb. sakei</i> NCDO 2714; <i>L. delbrueckii</i> LMG 6412 ^T

Legenda: - negativen rezultat testa, + pozitiven rezultat testa



Slika 4: Razgradnja bakteriocinov seva *L. gasseri* K7 (K) s tripsinom (T) in proteinazo K (P); indikatorski sev *L. sakei* NCDO 2714, metoda MLA

4.3 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST SUPERNATANTOV MLEKA, FERMENTIRANEGA S SEVI L7, L8, L12, L89, Biofank IN BGRA43

Ker smo predvidevali, da bodo koncentracije peptidov v fermentiranem mleku nizke, smo pripravili 10-krat koncentrirane supernatante fermentiranega mleka s testnimi sevi *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (L7, L8, L89, Biofank) in *Lactobacillus helveticus* BGRA43. Del supernatanta smo po liofilizaciji in rehidraciji nevtralizirali (N), del pa pustili na vrednosti pH (~3,7), ki so jo vzorci dosegli ob koncu fermentacije (nN). Nato smo ugotavljali protimikrobno aktivnost tako pripravljenih supernatantov proti indikatorskim sevom. Rezultati protimikrobnega delovanja so prikazani v preglednici 10.

Preglednica 10: Protimikrobna aktivnost 10-krat koncentriranih supernatantov mleka, fermentiranega s sevi *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (L7, L8, L12, L89, Biofank) in *L. helveticus* BGRA43 (18-urna klasična fermentacija); metoda MLA

Protimikrobna aktivnost supernatantov fermentiranega mleka														
Indikatorski sev	Testni sev													
	L7		L8		L12		L89		Biofank		BGRA43		Mleko	
	N	nN	N	nN	N	nN	N	nN	N	nN	N	nN	N	nN
<i>L. sakei</i> NCDO 2714	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ 6 mm	-	-
<i>E. durans</i> CCM 5612	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> CCM 2010 ^T	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
		7 mm		8 mm		8 mm								8 mm
<i>E. faecium</i> LMG 11423	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
					7 mm							6 mm		
<i>E. faecalis</i> CCM 4647	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		6 mm		7 mm		9 mm								
<i>E. faecalis</i> LMG 7937	-	+	-	+	-	+++	-	-	-	-	-	+	-	-
		8 mm		7 mm		7 mm						6 mm		
<i>E. coli</i> 11229	+	+	+	+	++	++	-	-	-	-	-	+	-	+
	8 mm	7 mm	6 mm	6 mm	7 mm	7 mm						6 mm		7 mm
<i>S. aureus</i> 19095	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 25922	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
		6 mm				8 mm						6 mm		6 mm
<i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻	-	++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	++	-	++
		6 mm				11						7 mm		8 mm
<i>S. aureus</i> CCM 4223	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: - ni inhibicije ali pa so cone komaj vidne; cone so ocenjene po velikosti (v mm) in po čistosti: motna (+), srednje bistra (++) , bistra (+++); N nevtraliziran supernatant, nN supernatant, ki ni bil nevtraliziran

Tudi koncentrirani supernatanti po nevtralizaciji kisline v večini primerov niso inhibirali rasti izbranih indikatorskih sevov.

4.4.1.2 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti

S pomočjo gelske filtracije smo pripravili 20 frakcij permeata mleka (ultrafiltracija, 10 kDa), fermentiranega z L8 ali BGRA43, ter preverili njihovo protimikrobno aktivnost proti indikatorskim sevom. Pri frakcijah, ki smo jih pripravili iz permeatov mleka, fermentiranega z L8, smo ugotovili protimikrobno delovanje enajste frakcije proti indikatorskemu sevu *E. coli* A, 08:K88 Ent⁻, kjer je nastala motna cona velika 4 mm. Ostale frakcije, kot tudi kontrolni vzorec (fosfatni pufer), niso kazali protimikrobne aktivnosti. Pri testiranju protimikrobne aktivnosti smo uporabili enake indikatorske seve, kot pri testiranju frakcij permeata mleka, fermentiranega z BGRA43.

Boljšo protimikrobno aktivnost smo ugotovili pri frakcijah permeata mleka, fermentiranega s sevom BGRA43, saj smo potrdili protimikrobno delovanje večih frakcij, tako z uporabo fosfatnega pufra (preglednica 12) kot tudi Tris-HCl pufra (preglednica 13 in slika 6) pri gelski filtraciji.

Preglednica 12: Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega z *L. helveticus* BGRA43, proti posameznemu indikatorskemu sevu (50 mM fosfatni pufer; pH 7,5)

Indikatorski sev	Frakcije mleka, fermentiranega z BGRA43/protimikrobna aktivnost																				P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
<i>L. sakei</i> NCDO 2714	-	-	-	-	-	-	-	+++ 6 mm	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. durans</i> CCM 5612	-	-	-	-	-	-	+	+++ 7 mm	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>B. cereus</i> CCM 2010 ^T	-	-	-	-	-	-	++	+++ 8 mm	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. faecium</i> LMG 11423	-	-	-	-	-	-	+	+++ 6 mm	9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	+	+++ 6 mm	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i> CCM 4647	-	-	-	-	-	-	++	+++ 7 mm	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. faecalis</i> LMG 7937	-	-	-	-	-	-	+++	+++ 7 mm	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> 11229	-	-	-	-	-	-	+	+++ 7 mm	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. aureus</i> 19095	-	-	-	-	-	-	++	+++ 7 mm	9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> 25922	-	-	-	-	-	-	++	+++ 7 mm	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻	-	-	-	-	-	-	+	+++ 7 mm	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>S. aureus</i> CCM 4223	-	-	-	-	-	-	++	+++ 6 mm	9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda: - ni inhibicije ali pa so cone komaj vidne; + motna cona; ++ srednje bistra cona; +++ dobra inhibicija, bistra cona; velikost (premer) cone je izmerjena v milimetrih; P fosfatni pufer

Preglednica 13: Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega z *L. helveticus* BGRA43, proti posameznemu indikatorskemu sevu (50 mM Tris-HCl; pH 7,5)

Indikatorski sev	Frakcije mleka, fermentiranega z BGRA43/protimikrobna aktivnost																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	P
<i>L. sakei</i> NCDO 2714	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. durans</i> CCM 5612	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> CCM 2010 ^T	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> LMG 11423	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> CCM 4647	-	-	-	-	-	+	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> LMG 7937	-	-	-	-	-	+	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 11229	-	-	+	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 19095	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 25922	-	-	-	-	-	+	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> CCM 4223	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

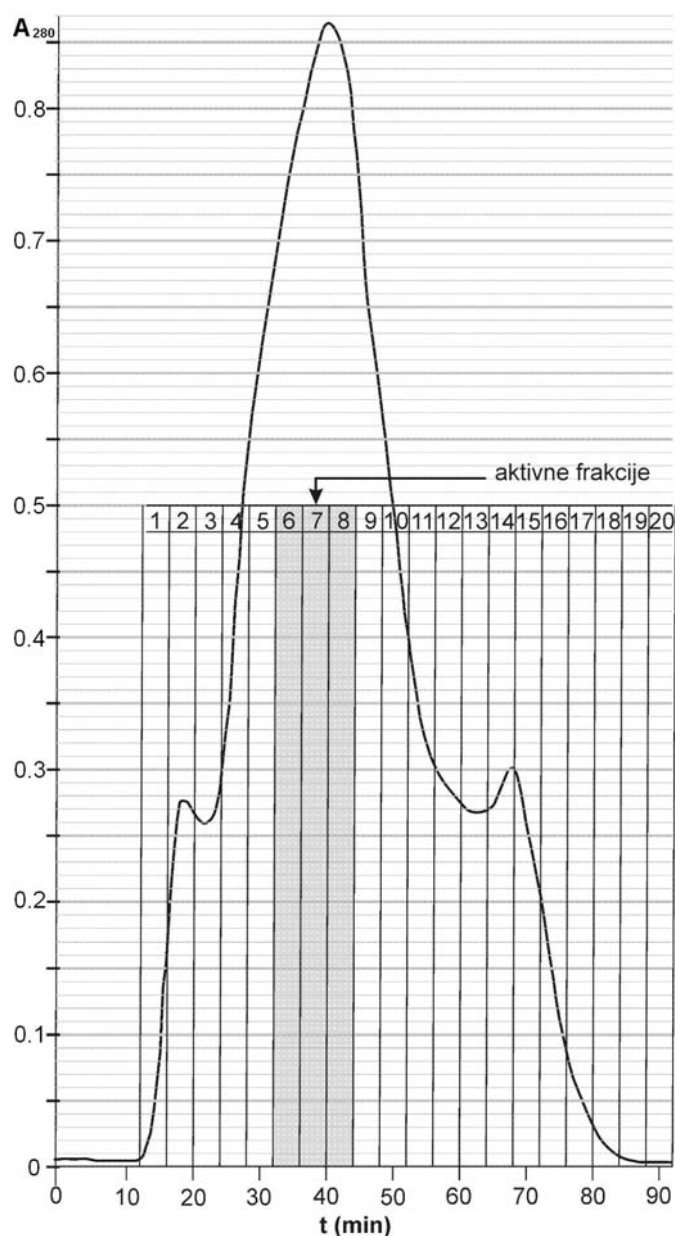
Legenda: - ni inhibicije ali pa so cone komaj vidne; + motna cona; ++ srednje bistra cona; +++ dobra inhibicija, bistra cona; velikost (premer) cone je izmerjena v milimetrih; P pufer Tris-HCl



Slika 6: Protimikrobno delovanje 7. in 8. frakcije vzorca mleka, fermentiranega z *L. helveticus* BGRA43 (indikatorski sev *E. coli* A, 08:K88 Ent⁻ (levo) in *S. aureus* ATCC 25923 (desno)); frakciji 6 in 9 nista bili protimikrobno aktivni; P pufer Tris-HCl

4.4.2 Priprava fermentiranega mleka v bioreaktorju

Fermentirano mleko smo pripravili tudi v bioreaktorju (konstantna vrednost pH = 6,5). Po ultrafiltraciji supernatanta fermentiranega mleka smo z gelsko filtracijo na Sephadex-u G-25 pridobili 20 frakcij, kar je prikazano na sliki 7.



Slika 7: Gelska filtracija permeata (<10 kDa) mleka, fermentiranega v bioreaktorju z *L. helveticus* BGRA43 (18 ur), na Sephadex-u G-25; hitrost pretoka 3 ml/min; UV detektor $\lambda = 280$ nm; vhodni signal detektorja 5 mV; hitrost pisala 1 mm/min. Protimikrobno aktivnost frakcij smo ugotavljali z metodo MLA

4.4.2.1 Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z L8 in BGRA43

Iz preglednice 14 je razvidno protimikrobno delovanje frakcij mleka, fermentiranega z *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8, iz preglednice 15 pa aktivnost frakcij mleka, fermentiranega z *L. helveticus* BGRA43. Na sliki 8 so prikazane inhibicijske cone delovanja 6., 7. in 8. aktivne frakcije mleka, fermentiranega z BGRA43 proti indikatorskima sevoma *L. sakei* NCDO 2714 in *E. coli* A, 08:K88 Ent⁻.

Preglednica 14: Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8, proti posameznemu indikatorskemu sevu

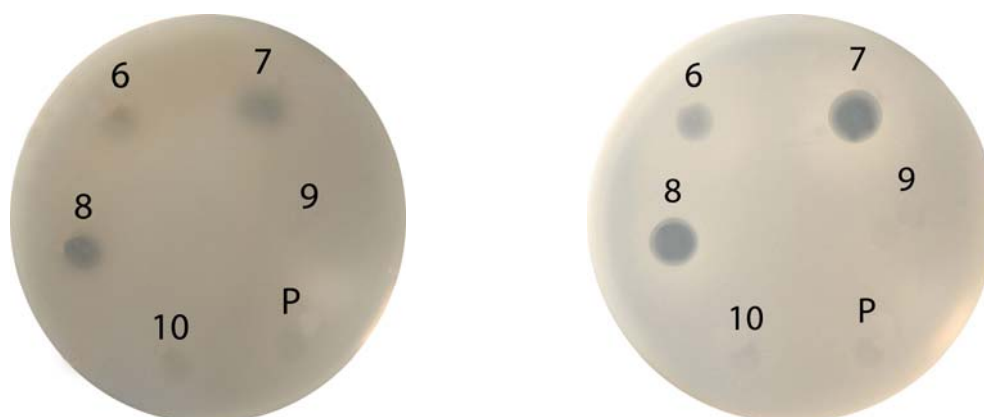
Indikatorski sev	Frakcije mleka, fermentiranega v bioreaktorju z L8/protimikrobna aktivnost																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	P
<i>L. sakei</i> NCDO 2714	-	-	-	-	-	* ++ 5 mm	* ++ 6 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. durans</i> CCM 5612	-	-	-	-	-	+ 5 mm	+++ 9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> CCM 2010 ^T	-	-	-	-	-	-	+++ 9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> LMG 11423	-	-	-	-	-	++ 6 mm	+++ 8 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	++ 7 mm	+++ 9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> CCM 4647	-	-	-	-	-	++ 7 mm	++ 7 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> LMG 7937	-	-	-	-	-	+ 7 mm	++ 8 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 11229	-	-	-	-	-	++ 7 mm	+++ 9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 19095	-	-	-	-	-	++ 7 mm	+++ 9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 25922	-	-	-	-	-	++ 7 mm	+++ 9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻	-	-	-	-	-	++ 7 mm	+++ 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> CCM 4223	-	-	-	-	-	+ 5 mm	+ 7 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: - ni inhibicije ali pa so cone komaj vidne; + motna cona; ++ srednje bistra cona; +++ dobra inhibicija, bistra cona; velikost (premer) cone je izmerjena v milimetrih; * nejasen rob; P fosfatni pufer

Preglednica 15: Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z *L. helveticus* BGRA43, proti posameznemu indikatorskemu sevu

Indikatorski sev	Frakcije mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43/protimikrobna aktivnost																				P
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
<i>L. sakei</i> NCDO 2714	-	-	-	-	-	-	++ 7 mm	++ 6 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. durans</i> CCM 5612	-	-	-	-	-	++ 7 mm	+++ 11	+++ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> CCM 2010 ^T	-	-	-	-	-	-	+++ 11	+++ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> LMG 11423	-	-	-	-	-	+ 6 mm	+++ 10	+++ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	++ 7 mm	+++ 11	+++ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> CCM 4647	-	-	-	-	-	++ 8 mm	+++ 11	+++ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> LMG 7937	-	-	-	-	-	++ 8 mm	+++ 10	+++ 9 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 11229	-	-	-	-	-	+++ 8 mm	+++ 13	+++ 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> 19095	-	-	-	-	-	+ 7 mm	+++ 10	+++ 9 mm	-	-	++ 4 mm	++ 4 mm	-	-	-	-	-	-	-	-	++ 2 mm
<i>E. coli</i> 25922	-	-	-	-	-	++ 7 mm	+++ 10	+++ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> A, 08:K88 Ent ⁻	-	-	-	-	-	++ 8 mm	+++ 10	+++ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++ 2 mm
<i>S. aureus</i> CCM 4223	-	-	-	-	-	+ 7 mm	+++ 11	+++ 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: - ni inhibicije ali pa so cone komaj vidne; + motna cona; ++ srednje bistra cona; +++ dobra inhibicija, bistra cona; velikost (premer) cone je izmerjena v milimetrih; P fosfatni pufer



Slika 8: Protimikrobno delovanje 6., 7. in 8. frakcije vzorca mleka, fermentiranega z *L. helveticus* BGRA43 (indikatorski sev *L. sakei* NCDO 2714 (levo) in *E. coli* A, 08:K88 Ent⁻ (desno)); frakciji 9 in 10 nista bili protimikrobno aktivni; P fosfatni pufer

4.5 REVERZNO FAZNA KROMATOGRAFIJA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA IN UGOTAVLJANJE PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI NASTALIH FRAKCIJ

Vzorci smo pripravili s fermentacijo mleka v bioreaktorju z L8 in BGRA43. Protimikrobno delovanje frakcij s peptidi, ki smo jih ločevali z reverzno fazno kromatografijo, pa smo preverili z MDA.

4.5.1 Ugotavljanje masne koncentracije peptidov v vzorcih mleka, fermentiranega z L8 in BGRA43 po ločevanju na RP-HPLC

Masno koncentracijo peptidov smo ocenili v supernatantu fermentiranega mleka, nefiltriranemu in filtriranemu vzorcu (0,22 μ m), ki smo ju pripravili (gl. poglavje 3.3.5) pred RP-HPLC (preglednica 16) ter frakcijam po RP-HPLC (preglednica 17).

Preglednica 16: Masna koncentracija peptidov v supernatantu fermentiranega mleka v bioreaktorju, nefiltriranem in filtriranem vzorcu po ekstrakciji s SPE, pred frakcionacijo z RP-HPLC (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 in *L. helveticus* BGRA43)

Sev	Fermentacija	Čas	Masna koncentracija peptidov (mg/ml)		
			Supernatant	Nefiltriran vzorec	Filtriran vzorec
L8	bioreaktor	18 ur	5,00	198,44	85,99
BGRA43	bioreaktor	18 ur	4,87	172,82	72,37
	bioreaktor	72 ur	12,51	169,22	69,31

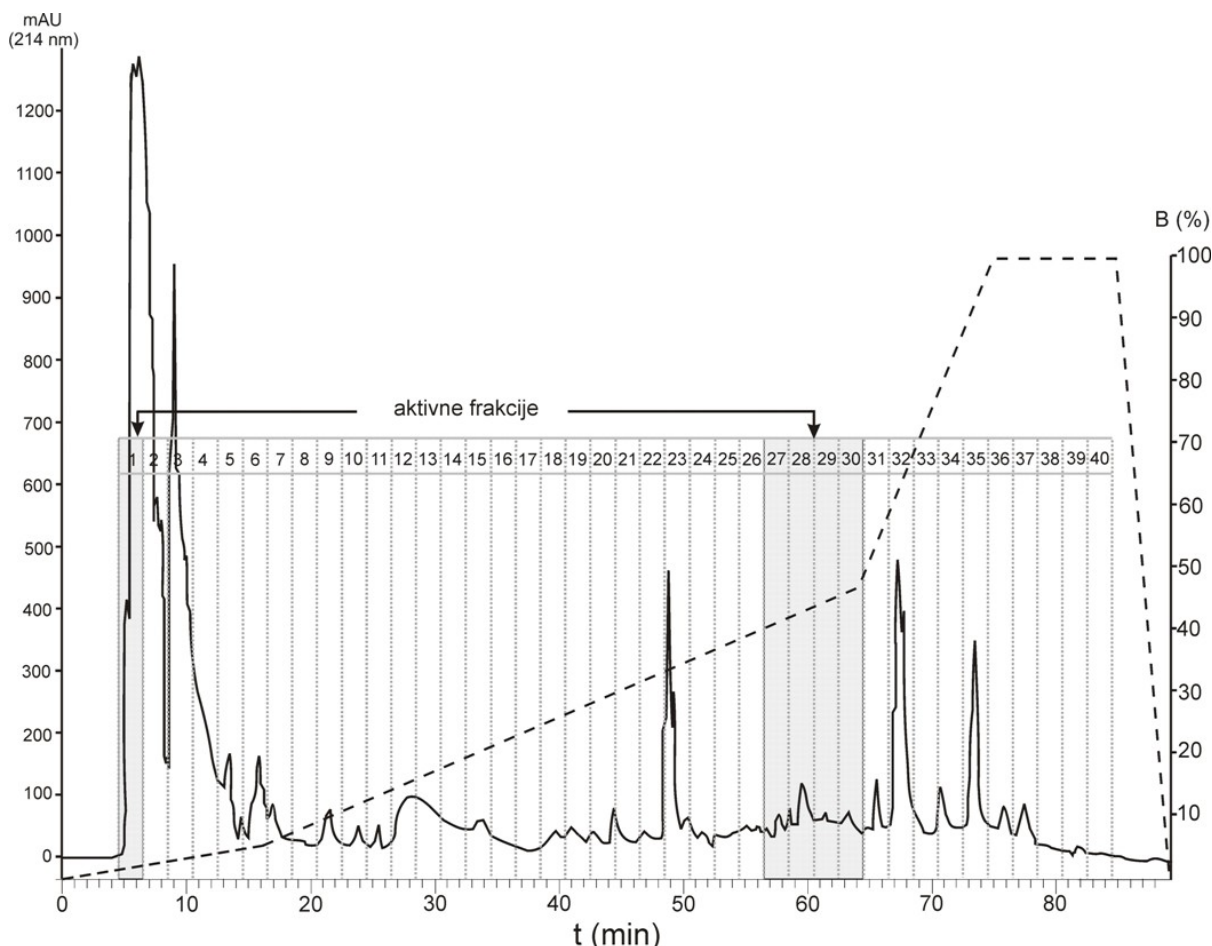
Preglednica 17: Masna koncentracija peptidov v frakcijah vzorcev mleka, fermentiranega v bioreaktorju z *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 (18 ur) in *L. helveticus* BGRA43 (18 in 72 ur), dobljenih po RP-HPLC

Frakcija	Masna koncentracija peptidov (mg/ml)		
	Sev L8 (18 ur)	Sev BGRA43 (18 ur)	Sev BGRA43 (72 ur)
1	25,32	46,50	76,81
2	16,80	19,23	15,06
3	3,33	3,72	4,65
4	4,29	14,22	1,24
5	2,53	11,79	0,69
6	1,89	11,37	0,72
7	0,43	0,72	0,68
8	/	0,36	0,83
9	1,42	0,42	0,69
10	4,86	2,22	1,53
11	/	5,55	2,19
12	/	7,20	2,64
13	10,50	9,87	3,33
14	8,22	13,68	3,54
15	14,34	13,50	2,64
16	/	11,79	2,38
17	8,22	6,60	3,36
18	5,10	3,66	1,32
19	3,60	3,42	0,90
20	/	3,45	0,54
21	/	3,96	0,48
22	/	3,18	0,31
23	0,12	12,55	0,21
24	/	1,62	0,07
25	0,28	0,70	0,08
26	0,14	1,10	0,07
27	/	0,73	0,07
28	/	0,40	0,05
29	/	0,24	0,05
30	/	0,16	0,05
31	/	1,10	0,04
32	/	11,11	0,04
33	/	0,10	0,20
34	/	1,10	0,05
35	/	1,11	0,05
36	/	1,10	0,04
37	/	0,10	0,02
38	/	0,13	0,02
39	/	0,07	0,03
40	/	0,11	0,04

Legenda: / ni meritve

4.5.2 RP-HPLC kromatogram

Po ločevanju vzorca z RP-HPLC smo pridobili 40 frakcij (slika 9). Na sliki 9 so prikazane tudi aktivne frakcije, ki smo jih ugotovili z MDA ter koncentracijski gradient.



Slika 9: RP-HPLC kromatogram supernatanta mleka, fermentiranega v bioreaktorju z *L. helveticus* BGRA43, po SPE-ekstrakciji in prikaz aktivnih frakcij

4.5.3 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti frakcij vzorcev mleka, fermentiranega z *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 in *L. helveticus* BGRA43, proti indikatorskemu sevju *L. sakei* NCDO 2714

4.5.3.1 Metoda z difuzijo v agarju (MDA)

Vsi rezultati ugotavljanja protimikrobne aktivnosti frakcij fermentiranega mleka z L8 proti indikatorskemu sevju *L. sakei* NCDO 2714 so bili negativni. Rezultati protimikrobnega delovanja frakcij mleka po 18-urni fermentaciji v bioreaktorju z BGRA43 so prikazani v preglednici 18 ter na slikah 10 in 11, kjer so razvidne aktivne frakcije 1, 27, 28, 29 in 30.

Pri frakcijah mleka, fermentiranega v bioreaktorju 72 ur z BGRA43, smo ugotovili protimikrobno delovanje le pri prvi frakciji. Nastala je srednje bistra cona (++) z velikostjo 4 mm in neizrazitim robom (slika 12). Ostale frakcije niso kazale inhibicije.

Preverili smo tudi vpliv kisline (TFA), ki ostane v frakcijah po RP-HPLC-analizi, na nastanek inhibicijskih con. Protimikrobno aktivnost pripravljenih vzorcev različnih molarnih koncentracij TFA(aq.) smo ugotavljali proti indikatorskemu sevu *L. sakei* NCDO 2714. Ugotovili smo, da je bila inhibitorna koncentracija 200 μM , ko je nastala 2 mm velika bistra cona. Ostale koncentracije (100, 50, 25, 10, 5, 2, 1 in 0 μM) niso bile inhibitorne za indikatorski sev.

Preglednica 18: Protimikrobna aktivnost frakcij mleka po 18- in 72-urni fermentaciji v bioreaktorju z *L. helveticus* BGRA43 (indikatorski sev *L. sakei* NCDO 2714)

Frakcija	Protimikrobna aktivnost frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43	
	18-urna fermentacija	72-urna fermentacija
1	+++, <1 mm	++, 4 mm
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
25	-	-
26	-	-
27	++, 2 mm	-
28	+++; 1 mm bistra, okrog +: 1 mm	-
29	++: 1 mm	-
30	+++; <1mm	-
31	-	-
32	-	-
33	-	-
34	-	-
35	-	-
36	-	-
37	-	-
38	-	-
39	-	-
40	-	-

Legenda: - ni inhibicije; + motna cona; ++ srednje bistra cona; +++ dobra inhibicija, bistra cona; velikost (premer) cone je izmerjena v milimetrih (od roba nanešene frakcije do roba nastale cone)



Slika 10: Protimikrobno delovanje 1. frakcije mleka, po 18-urni fermentaciji z *L. helveticus* BGRA43 v bioreaktorju; frakcije 2, 3 in 4 niso bile protimikrobno aktivne; indikatorski sev *L. sakei* NCDO 2714



Slika 11: Protimikrobno delovanje frakcij 27, 28, 29 in 30, po 18-urni fermentaciji mleka z *L. helveticus* BGRA43 v bioreaktorju; frakcije 25, 26, 31 in 32 niso bile protimikrobno aktivne; indikatorski sev *L. sakei* NCDO 2714



Slika 12: Protimikrobno delovanje 1. frakcije mleka, po 72-urni fermentaciji z *L. helveticus* BGRA43 v bioreaktorju; frakcije 2, 3 in 4 niso bile protimikrobno aktivne; indikatorski sev *L. sakei* NCDO 2714

Aktivne frakcije (razen prve) supernatanta mleka, po 18-urni fermentaciji v bioreaktorju z BGRA43, smo pridobili še s selektivno SPE-elucijo. Masna koncentracija peptidov v zbrani frakciji po selektivni SPE-eluciji je bila 13,80 mg/ml (B1, slika 13). Zanimalo nas je tudi, kakšno protimikrobno aktivnost ima zbrana frakcija, katere masna koncentracija peptidov ustreza vsoti (4-ih) posameznih koncentracij peptidov v prej določenih aktivnih frakcijah (od 27 do 30) (preglednica 17) in znaša 1,53 mg/ml (B2, slika 13). Protimikrobna aktivnost je prikazana tudi v preglednici 19.

Preglednica 19: Protimikrobna aktivnost zbrane frakcije, pridobljene s selektivno SPE-elucijo

Frakcija	Premer cone (v mm)
B1	+ 2,5 mm
B2	+++ 1 mm
K7	+++ 2,5 mm

Legenda: + motna cona; ++ srednje bistra cona; +++ bistra cona



Slika 13: Protimikrobna aktivnost zbrane frakcije po selektivni SPE-eluciji supernatanta mleka, fermentiranega v bioreaktorju z *L. helveticus* BGRA43, s koncentracijo peptidov 13,80 mg/ml (B1) in 1,53 mg/ml (B2) in supernatanta seva K7 kot kontrola; indikatorski sev *L. sakei* NCDO 2714

4.5.3.2 Ugotavljanje protimikrobnega delovanja frakcij mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43 (18 ur), z metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah

Pri metodi kritične razredčitve smo uporabili frakcije 1, 27, 28, 29 in 30 s koncentracijami peptidov, ki so prikazane v preglednici 17. Koncentracija peptidov v mešanici, ki smo jo pripravili v mikrotitrski plošči za merjenje inhibicije rasti indikatorskega seva (metoda opisana v poglavju 3.3.8.4), je znašala: 1. frakcija: 2,906 mg/ml, 27. frakcija: 0,046 mg/ml, 28. frakcija: 0,025 mg/ml, 29. frakcija: 0,015 mg/ml in 30. frakcija: 0,010 mg/ml. Po inkubaciji indikatorskega seva v MRS, ki smo mu dodali različne koncentracije frakcij, smo merili optično gostoto. Rezultati ugotavljanja inhibicije rasti indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714 so prikazani v preglednicah 20 in 21.

Preglednica 20: Rast indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714 ob prisotnosti različnih koncentracij frakcij 1, 27, 28, 29 in 30 mleka, fermentiranega 18 ur s sevom *L. helveticus* BGRA43, merjena kot optična gostota (620 nm) z metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah

Frakcija	Slepa	Razredčitev										Kontrola
		1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
1	0,135	0,170*	0,291	0,392	0,444	0,476	0,477	0,52	0,49	0,507	0,618	0,502
27	0,137	0,172*	0,398	0,406	0,473	0,449	0,449	0,519	0,564	0,585	0,608	0,562
28	0,126	0,150*	0,393	0,417	0,44	0,452	0,468	0,534	0,559	0,598	0,587	0,527
29	0,130	0,428	0,446	0,565	0,585	0,618	0,579	0,607	0,638	0,635	0,629	0,560
30	0,129	0,516	0,597	0,577	0,634	0,614	0,613	0,616	0,632	0,628	0,619	0,553

Legenda: * >50 % inhibicija rasti indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714

Odstotek inhibicije rasti indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714 smo izračunali tako, da smo najprej izračunali povprečje izmerjenih vrednosti optične gostote pri kontroli. Nato smo izmerjene vrednosti optične gostote za posamezno razredčitev vzorca odšteli od prej izračunanega povprečja, dobljen rezultat pa še delili s tem povprečjem ter pomnožili z vrednostjo 100, da smo dobili rezultat inhibicije (I) v odstotkih.

Primer: Frakcija 1, razredčitev 1:1 (preglednica 21)

$$I = (((0,502 + 0,562 + 0,527 + 0,560 + 0,553) / 5) - 0,170) / 0,5408 \times 100$$

$$I = 68,6$$

Preglednica 21: Izračuni inhibicije rasti (I) indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714

Frakcija	Razredčitev									
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
1	68,6*	46,2	27,5	17,9	12,0	11,8	3,9	9,4	6,3	0
27	68,2*	26,4	24,9	12,5	17,0	17,0	4,0	0	0	0
28	72,3*	27,3	22,9	18,6	16,4	13,5	1,3	0	0	0
29	20,9	17,5	0	0	0	0	0	0	0	0
30	4,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: * >50 % inhibicija rasti indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714

5 RAZPRAVA

V literaturi lahko najdemo veliko rezultatov raziskav o bioaktivnih peptidih. Njihovi biološki učinki so številni, vendar pa niso vsi enako dobro raziskani. Med manj raziskane spadajo bioaktivni peptidi s protimikrobno aktivnostjo, ki lahko nastanejo med fermentacijo mleka.

Za našo raziskavo smo izbrali dva načina fermentacije. Najprej smo mleko fermentirali z enajstimi sevi s klasično fermentacijo, brez uravnavanja vrednosti pH, nato pa še z izbranimi, proteolitično najbolj aktivnima sevoma L8 in BGRA43 v laboratorijskem bioreaktorju. Prednost tega tipa fermentacije je v tem, da smo med fermentacijo lahko vzdrževali stalno vrednost pH 6,5 in s tem vzpostavili boljše pogoje za delovanje peptidaz. Peptidaze BGRA43 so namreč najbolj aktivne prav pri vrednosti pH 6,5 (Fira in sod., 2001). Oba načina fermentacije smo izpeljali v 18-urah, fermentacijo v bioreaktorju pa še v 72-urah. Po fermentaciji v bioreaktorju smo v supernatantih fermentiranega mleka ugotovili večjo koncentracijo peptidov (preglednica 16) kot pri klasični fermentaciji (preglednica 11). Čeprav smo pričakovali, da bo v vzorcih mleka po 72 urah fermentacije več bioaktivnih peptidov in s tem tudi več protimikrobnih peptidov, pa smo ugotovili slabšo protimikrobno aktivnost teh vzorcev, v primerjavi z vzorci mleka fermentiranega 18 ur (preglednica 18). Predvidevamo, da je bila slabša protimikrobna aktivnost posledica delovanja nekaterih mikrobnih peptidaz, ki so pri optimalni vrednosti pH nastale protimikrobne peptide razgradile.

Vzorci fermentiranega mleka smo pripravili s sevi, ki smo jih najprej izbirali na podlagi njihove proteolitične aktivnosti. Predpostavili smo, da sevi, ki imajo višjo proteolitično aktivnost, med fermentacijo lahko proizvedejo tudi več bioaktivnih peptidov. Iz preglednice 8 je razvidno, da sta med enajstimi sevi proteolitično najaktivnejša seva *Lactobacillus helveticus* BGRA43 in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8, zato smo ju uporabili za nadaljne raziskave. Predvsem pa smo se osredotočili na *Lactobacillus helveticus* BGRA43, saj je že Topisirovič (2006) opisal inhibitorni učinek mleka, fermentiranega z omenjenim sevom, proti nekaterim indikatorskim bakterijam.

Poleg protimikrobne aktivnosti pa smo ugotavljali tudi sposobnost testnih sevov za tvorbo protimikrobnih snovi proteinske narave, ki so običajno bakteriocini. Bakteriocini bi namreč lahko v nadaljnjih raziskavah protimikrobnega delovanja bioaktivnih peptidov dajali lažno pozitiven rezultat. Pozitiven rezultat smo dobili le pri sevu *L. gasseri* K7, proti indikatorskima sevoma *L. sakei* NCDO 2714 (slika 4) in *L. delbrueckii* LMG 6412^T. Inhibicijske cone proti nekaterim indikatorskim sevom smo z metodo MLA ugotovili tudi pri testnih sevih L8, L12, L89 in BGRA43 (preglednica 9), vendar z uporabo encima proteinaze K in tripsina nismo potrdili proteinske narave protimikrobne snovi. Rezultati za BGRA43 so v skladu z rezultati Topisirovič-a in sod. (2006), ki z dodatkom pronaze E prisotnosti bakteriocinov prav tako niso mogli potrditi. Pri tem bi bilo smiselno, da bi v raziskavah uporabili še kak drug encim, npr. kimotripsin. V supernatantih preiskovanih kultur (nevtraliziranih in nenevtraliziranih) nismo ugotovili prisotnosti protimikrobnih snovi proteinske narave.

Samo na podlagi encimskega testa nismo mogli zavreči domneve, da sev BGRA43 ne tvori bakteriocinov, zato je bila na Katedri za mlekarstvo narejena tudi analiza PCR. Le-ta je potrdila, da BGRA43 nima kodirane sekvence za proizvodnjo helveticina J, ki ga tvori sev *L. helveticus* 481 NCK228 Hlv⁺ (Priloga A). Poleg tega Topisirović in sodelavci predvidevajo, da BGRA43 najverjetneje tvori spojine podobne revertinu (β -hidroksipropionaldehid, antibiotik), ki niso proteinske narave. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da BGRA43 lahko smiselno uporabimo v nadaljnih raziskavah. Uporabili pa smo tudi sev L8, ki proti indikatorskemu sevu *L. sakei* NCDO 2714 ni kazal inhibitorne aktivnosti, je pa imel dobro proteolitično aktivnost.

Stopnjo proteolize smo določili s pomočjo OPA-metode, ki smo jo uporabili tudi za določanje prostih amino skupin in posredno za oceno masne koncentracije peptidov. Masno koncentracijo peptidov smo določali v supernatantih vzorcev in nato v rehidriranih frakcijah po ločevanju vzorcev fermentiranega mleka z RP-HPLC (preglednice 11, 16 in 17).

V nadaljevanju raziskav smo testirali veliko število frakcij (po frakcionaciji z gelsko filtracijo smo jih dobili 20, po frakcionaciji z RP-HPLC pa 40), zato smo med številnimi indikatorskimi sevi izbrali samo enega, in sicer *L. sakei* NCDO 2714. Za ta sev smo že v prejšnjih raziskavah ugotovili, da sev BGRA43 nanj deluje inhibitorno (preglednica 9), prav tako pa so *L. sakei* v svojih raziskavah uporabili tudi Rizzello in sodelavci (2005).

Kot je navedla že Bogovič-Matijašić (1997), ima tudi mlečna kislina protimikrobni učinek. Zato smo preverili protimikrobno delovanje supernatantov mleka, fermentiranega z L7, L8, L12, L89, Biofank in BGRA43 tako, da smo del supernatantov pustili na vrednosti pH, ki so jo imeli po fermentaciji (pH ~3,7), drugi del pa smo nevtralizirali (pH ~7). Za potrditev inhibicije indikatorskih sevov, katere vzrok naj bi bila mlečna kislina, ki nastaja med fermentacijo mleka, smo za kontrolo uporabili še supernatant mleka, ki smo mu s koncentrirano mlečno kislino uravnali vrednost pH na 3,7. Naša predvidevanja, da pri protimikrobnem delovanju vzorcev fermentiranega mleka sodeluje mlečna kislina, so delno potrdili rezultati (preglednica 10), saj so vzorci, ki niso bili nevtralizirani (nN) sicer pokazali večji inhibitorni učinek od vzorcev, ki so bili nevtralizirani (N), a so tudi slednji kazali inhibitorne učinke. Inhibicijske cone proti indikatorskim bakterijam smo ugotovili predvsem pri nanosu nN supernatantov (velikost con od 6 do 11 mm), medtem ko se pri testiranju večine nevtraliziranih supernatantov (N) niso pojavile cone inhibicije (razen proti indikatorskima sevoma *E. coli* 11229 in *S. aureus* ATCC 25923). Ugotovili smo tudi inhibicijski učinek nN supernatantov mleka, vendar ne na vse indikatorske seve. Za tiste, kjer je bila ugotovljena inhibicija (*B. cereus* CCM 2010^T, *E. coli* 11229, *E. coli* 25922, *E. coli* A, 08:K88 Ent⁻), smo sklepali, da so občutljivi na mlečno kislino.

Peptide v supernatantih mleka, fermentiranega s sevoma L8 in BGRA43, smo najprej ločevali z gelsko filtracijo. Glede na različna načina fermentacije smo pri vzorcih mleka, fermentiranega s sevom L8, ugotovili zanimive razlike. Kot je opisano že v rezultatih klasične fermentacije (gl. poglavje 4.4.1.2), smo med dvajsetimi analiziranimi frakcijami mleka, fermentiranega z L8, ugotovili protimikrobno delovanje le v enajsti frakciji, ki je inhibirala rast indikatorskega seva *E. coli* A, 08:K88 Ent⁻. Na agarju smo opazili motno cono. Po drugi strani pa smo med frakcijami mleka, fermentiranega v bioreaktorju,

ugotovili inhibicijsko delovanje dveh frakcij (frakciji 6 in 7) proti vsem indikatorskim sevom (razen 6. frakcije proti *B. cereus* CCM 2010^T) (preglednica 14). Domnevali smo, da ima lahko tudi pufer, ki je ostal v frakcijah po liofilizaciji, inhibitorni učinek zaradi soli. Vendar smo pri kontroli protimikrobne aktivnosti pufra, ki smo ga enako testirali kot frakcije vzorcev fermentiranega mleka, dobili negativne rezultate pri vseh indikatorskih sevih. Sklepali smo, da s fermentacijo v bioreaktorju, poleg višje koncentracije peptidov, dobimo tudi več peptidov s protimikrobnim delovanjem.

Do podobnih zaključkov smo prišli pri analizi frakcij mleka, fermentiranega z BGRA43, ki smo jih pridobili z gelsko filtracijo na Sephadex-u G-25 (slika 7). V frakcijah vzorcev mleka, ki smo jih pripravili s klasično fermentacijo, smo pričakovali protimikrobno delovanje, saj smo le-to ugotovili že v supernatantu fermentiranega mleka. Ugotavljali smo tudi razlike med frakcijami, ki smo jih pridobili z gelsko filtracijo, kjer smo uporabili fosfatni pufer (preglednica 12) ali pa Tris-HCl (preglednica 13, slika 6). Pri obeh pufrih smo ugotovili podobne inhibicije indikatorskih sevov. Srednje bistre do bistre cone inhibicije vseh indikatorskih sevov smo opazili po delovanju 7. in 8. frakcije. Pri frakcijah, pripravljenih s fosfatnim pufrom, sta imeli protimikrobno delovanje tudi frakciji 9 in 10 in sicer proti indikatorskemu sevu *L. sakei* NCDO 2714, proti kateremu pa 7. frakcija ni imela inhibitornega vpliva. Pri frakcijah, pripravljenih s pufrom Tris-HCl, pa je bila inhibicija nekoliko širša, od 6. do 9. frakcije. Preverjanje vpliva pufrov je pokazalo, da koncentracije, ki smo jih uporabili pri pripravi frakcij, niso inhibirale indikatorskih bakterij. Pri frakcijah mleka, fermentiranega v bioreaktorju, smo potrdili prejšnje zaključke. V primerjavi s frakcijami klasično fermentiranega mleka (fosfatni pufer), smo dobili podobne rezultate, le da smo pri frakcijah mleka, fermentiranega v bioreaktorju ugotovili večje (6 – 13 mm) in bolj bistre cone (preglednica 15, slika 8), kar kaže na večjo protimikrobno aktivnost frakcij. Vzrok za to so najverjetneje optimalni pogoji delovanja peptidaz med kontrolirano fermentacijo v bioreaktorju.

Supernatante fermentiranega mleka, ki smo jih frakcionirali z gelsko filtracijo, smo pred tem ultrafiltrirali, da smo dobili permeat z molekulsko maso peptidov pod 10 kDa, saj imajo, glede na podatke v literaturi (Silva in Malcata, 2005), protimikrobno aktivni peptidi molekulsko maso manjšo od 10 kDa. Ker smo supernatant ultrafiltrirali z 10 kDa membrano, lahko sklepamo, da imajo peptidi v aktivnih frakcijah mleka, fermentiranega z L8 in BGRA43, molekulsko maso manjšo od 10 kDa oz. med 1 in 5 kDa (separacijsko območje Sephadex G-25 gela). Vendar bi za točno določitev molekulske mase peptidov bilo potrebno primerjati retencijske čase s peptidnimi standardi, molekulske mase od 1 do 10 kDa. Ker teh standardov nismo imeli na voljo, tudi molekulske mase peptidov nismo mogli natančno določiti. Poleg tega bi bila potrebna še potrditev z elektroforezo SDS-PAGE, kot so to naredili Muralidhara in sod. (2007).

Po izbiri testnih sevov *L. helveticus* BGRA43, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 in indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714 ter dobljenih rezultatih z gelsko filtracijo, smo mleko fermentirali v bioreaktorju in peptide ločevali še s pomočjo RP-HPLC (slika 9). Peptide supernatanta fermentiranega mleka smo ekstrahirali s pomočjo C18 stacionarne faze SPE, da bi pridobili čim višjo koncentracijo hidrofobnih peptidov, saj literatura navaja, da prav hidrofobni aminokislinski ostanki v peptidu vplivajo na protimikrobno aktivnost (López-Expósito in sod., 2006). Na ta način smo želeli tudi odstraniti soli mlečne

kislina, vendar smo s tem postopkom izgubili tudi del hidrofilnih peptidov in aminokislin. Iz preglednice 16 je tudi razvidno, da se je po filtraciji vzorca, ki smo ga pripravili za RP-HPLC ločbo (gl. poglavje 3.3.5), zmanjšala masna koncentracija peptidov v filtriranem vzorcu, saj smo odstranili peptide/proteine, ki jih je TFA denaturirala in bi lahko zamašili kolono.

V supernatantu mleka, fermentiranega s sevom BGRA43, smo po 18-urah fermentacije v bioreaktorju po pričakovanih izmerili nižjo koncentracijo prostih amino skupin kot po 72-urah fermentacije. Čeprav je bila koncentracija peptidov v supernatantu po 72 urah fermentacije (12,51 mg/ml) v primerjavi z 18-urno fermentacijo (4,87 mg/ml) več kot 2,5-krat večja, je bila koncentracija peptidov v vzorcu po SPE-ekstrakciji in pripravi za HPLC-analizo nižja (72-ur: 169,22 mg/ml, 18-ur: 172,82 mg/ml) (preglednica 16). Rezultat nakazuje, da so lahko proteolitični encimi seva BGRA 43 po 72-urah proteine razgradili v večji meri do aminokislin, hidrofilne aminokislina pa so se med ekstrakcijo najverjetneje sprale z vodo.

Ker smo hoteli nanesti čim večji volumen frakcij na petrijeve plošče, smo protimikrobno aktivnost v nadaljevanju ugotavljali z metodo difuzije v agarju. Po 18-urni fermentaciji mleka z L8 in BGRA43 smo dobili naslednje rezultate:

1. Pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti 40-ih frakcij mleka, fermentiranega z L8, proti indikatorskemu sevu *L. sakei* NCDO 2714, nismo opazili nobene cone inhibicije. Kontrola s TFA je bila pozitivna le pri najvišji koncentraciji nanosa (200 μ M).
2. Med 40-imi frakcijami mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43 (18 ur), smo ugotovili pet protimikrobno aktivnih frakcij: 1, 27, 28, 29, 30. Cone inhibicije so bile velike do 2 mm (preglednica 18, sliki 10 in 11).
3. Preverili smo tudi protimikrobno aktivnost vzorca, ki so ga pripravili na Katedri za mlekarstvo: 48-urna klasična fermentacija mleka s sevom BGRA43 ter izvedena simulacija prebave (pepsin + pankreatin) (Pavec, 2008). Vzorec ni imel inhibitornega učinka proti sevu *L. sakei* NCDO 2714. To lahko pomeni, da so se v tem času peptidi s protimikrobno aktivnostjo razgradili že med fermentacijo oz. sta jih razgradila prebavna encima. Če velja slednje, bi po zaužitju mleka, fermentiranega s sevom BGRA43, peptidi v prebavnem traktu izgubili svoj učinek.

Po 72-urah fermentacije mleka z BGRA43 v bioreaktorju smo ugotovili protimikrobno delovanje le pri prvi frakciji. Nastala je 4 mm velika, bistra cona inhibicije indikatorskega seva, z neizrazitim robom (slika 12). Le-ta je najbolj verjetno nastala (tako kot prva frakcija fermentiranega mleka po 18-urni fermentaciji) kot posledica preostanka soli, ki jih nismo sprali med ekstrakcijo s SPE in se večinoma eluirajo na začetku kromatografske ločbe z RP-HPLC. V tej prvi frakciji so bili lahko tudi aktivni peptidi, ki pa jih nismo uspeli ločiti. Ostale frakcije (od 27 do 30) niso bile aktivne, zato sklepamo, da so med podaljšano fermentacijo proteolitični encimi razgradili protimikrobne peptide. Vzorce fermentiranega mleka bi bilo smiselno separirati tudi z ionsko-izmenjevalno kromatografijo oz. ekstrahirati peptide s kationskim izmenjevalcem (SPE), glede na to, da imajo pozitivno nabiti peptidi dokazan protimikrobni učinek (Dathe in Wieprecht, 1999), vendar te možnosti v časovnem okvirju diplomskega eksperimentalnega dela nismo imeli.

Teoretično lahko TFA, ki smo jo uporabili v mobilni fazi pri RP-HPLC-analizi, s pozitivno nabitimi peptidi tvori soli. Te soli so prisotne še v liofiliziranih frakcijah, ko pa jih pri testiranju protimikrobne aktivnosti dodamo na petrijeve plošče z agarjem (pH nad 6,0), ionizirajo in nastanejo anioni (Rizzello in sod., 2005). Zato smo v naših analizah preverili vpliv kisline (TFA), ki ostane v frakcijah po RP-HPLC-analizi, na nastanek inhibicijskih con. Protimikrobno aktivnost smo ugotovili le pri najvišji koncentraciji 200 μM , ko je nastala 2 mm velika bistra cona. Na podlagi tega lahko trdimo, da protimikrobna aktivnost frakcij 27–30 vzorca mleka, fermentiranega z BGRA43 (18-ur) ni posledica TFA. Poleg tega so frakcije 27–30 vsebovale bistveno manjšo koncentracijo peptidov kot začetne frakcije, ki niso bile protimikrobno aktivne.

Protimikrobno aktivnost frakcij 27–30 (slika 11) smo preverili še enkrat tako, da smo vzorec pripravili s selektivno SPE-elucijo, kot je opisano v poglavju 3.3.6.3, nato pa smo ugotavljali protimikrobno aktivnost zbrane frakcije z MDA. Tudi tu smo še enkrat potrdili protimikrobno delovanje. Na sliki 13 in v preglednici 19 je vidna protimikrobna aktivnost zbrane frakcije, pripravljene s selektivno SPE-elucijo. Postopek smo uporabili, ker kromatografija HPLC traja dalj časa, na HPLC-kolono pa smo lahko nanесли največ 100 μl vzorca, zato smo morali postopek 6-krat ponoviti (da smo dobili dovolj koncentrirane frakcije). S SPE smo to dosegli hitreje, nanесли pa smo lahko veliko več vzorca. Ker smo že predhodno vedeli, katere frakcije nas zanimajo, smo se lahko odločili za specifično koncentracijsko območje mobilne faze, kjer so se eluirali aktivni peptidi.

Protimikrobno aktivnost frakcij (1, 27, 28, 29 in 30) mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43 (18 ur), smo preverili še z metodo kritične razredčitve. Ugotovili smo, da so več kot 50 odstotno inhibicijo rasti indikatorskega seva *L. sakei* NCDO 2714 povzročile 1., 27. in 28. frakcija (preglednici 20 in 21), s koncentracijami peptidov 2,906, 0,046 in 0,025 mg/ml. Zanimivo je to, da smo v 1. frakciji izmerili veliko višjo koncentracijo peptidov kot v 27. frakciji, odstotek inhibicije rasti indikatorskega seva pa je bil pri obeh frakcijah skoraj enak (1. frakcija 68,6 % inhibicija, 27. pa 68,2 %). Največjo inhibicijo rasti indikatorskega seva je povzročila 28. frakcija (72,3 %). Frakciji 29 in 30, s koncentracijama peptidov 0,015 in 0,010 mg/ml, sta pokazali minimalno inhibicijo rasti indikatorske bakterije (20,9 % in 4,9 %). Inhibicija rasti indikatorskega seva z razredčenimi frakcijami je bila manj kot 50 odstotna. Rizzello in sod. (2005), ki so protimikrobno aktivnost ugotavljali v različnih vrstah sira s podobnim načinom frakcionacije, so z metodo kritične razredčitve testirali frakcije s koncentracijami peptidov od 0,005 do 0,600 mg/ml. Inhibicijo so ocenili kot minimalno koncentracijo peptidov, ki je potrebna za popolno inhibicijo rasti indikatorskega seva (MIC). Rezultati so pokazali, da je bila MIC za indikatorski sev *L. sakei* A15 od 0,025 do 0,200 mg/ml. MIC so določili petim frakcijam (3. in od 19. do 22.), v petih vrstah sira ter proti devetim indikatorskim sevom, med njimi tudi patogenim, kot so npr. *E. coli* K12, *S. aureus* ATCC25923 in *Salmonella* spp. Njihove meritve lahko primerjamo z našimi, vendar je potrebno poudariti, da bi za določitev MIC (popolne inhibicije rasti indikatorskega seva) v našem primeru potrebovali nekajkrat višje koncentracije peptidov v aktivnih frakcijah oz. bi bila potrebna ustrežna modifikacija metode. MIC tako nismo uspeli določiti, zato smo na podlagi metode kritične razredčitve lahko ugotovili le odstotek inhibicije pri določeni koncentraciji.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno aktivne frakcije dodatno ločiti s pomočjo RP-HPLC in nato peptide karakterizirati še z masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Na ta način bi lahko ugotovili natančno molekulsko maso in aminokislinsko zaporedje peptidov ter s tem dokončno potrdili njihov izvor (Rizzello in sod., 2005; López-Expósito in sod., 2006).

5.1 SKLEPI

- Med enajstimi testnimi sevi laktobacilov, ki smo jih vključili v raziskavo, sta bila proteolitično najaktivnejša seva *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 in *Lactobacillus helveticus* BGRA43, zato smo ju izbrali za ugotavljanje prisotnosti protimikrobno aktivnih peptidov v fermentiranem mleku.
- V supernatantih mleka, fermentiranega s sevoma L8 in BGRA43 v bioreaktorju pri kontrolirani vrednosti pH, smo določili višjo koncentracijo nastalih peptidov kot pri supernatantih klasično fermentiranega mleka.
- Ugotovili smo različno protimikrobno aktivnost frakcij, ki smo jih pridobili iz permeatov po ultrafiltraciji z gelsko filtracijo na Sephadex-u G-25. Frakcije mleka, fermentiranega v bioreaktorju (z L8 ali BGRA43), so bile protimikrobno aktivnejše (večje in bolj bistre cone inhibicije) od frakcij mleka, fermentiranega brez uravnavanja vrednosti pH.
- Frakcije mleka, fermentiranega v bioreaktorju z L8, po ekstrakciji s SPE in ločbi z RP-HPLC, niso bile protimikrobno aktivne. Iz mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43 pa smo po ekstrakciji s SPE in frakcionaciji z RP-HPLC pridobili štiri frakcije s protimikrobno aktivnostjo.
- Na podlagi naših rezultatov lahko sklepamo, da med fermentacijo mleka s sevom *L. helveticus* BGRA43 nastajajo bioaktivni peptidi s protimikrobno aktivnostjo, saj so določene frakcije vzorcev fermentiranega mleka inhibirale rast indikatorskih bakterij, prisotnosti bakteriocinov pa nismo mogli potrditi. Izključili smo tudi vpliv mlečne kisline.
- Po 72-urni fermentaciji mleka v bioreaktorju z *L. helveticus* BGRA43 smo ugotovili manjšo protimikrobno aktivnost frakcij fermentiranega mleka kot po 18-urni fermentaciji, zato sklepamo, da protimikrobne peptide najverjetneje razgradijo peptidaze razgrajenih bakterijskih celic.
- Peptidi v aktivnih frakcijah mleka, fermentiranega z BGRA43 (18 ur), so se s kolone eluirali pri koncentracijskem gradientu od 35 do 46 % ACN, kar nakazuje na hidrofobni značaj le-teh in potrjuje ugotovitve nekaterih avtorjev, da imajo protimikrobni peptidi poleg pozitivnega naboja tudi hidrofobne lastnosti.

6 POVZETEK

Bioaktivni peptidi s protimikrobnim delovanjem lahko pomagajo pri obrambnem sistemu človeškega organizma tako, da inhibirajo rast patogenih bakterij. Nastanejo lahko med fermentacijo mleka s proteolitičnimi encimi mikroorganizmov ali pa med hidrolizo proteinov s prebavnimi encimi. Nastanek bioaktivnih peptidov med fermentacijo mleka in njihove učinke pa pogojuje izbira starterske kulture ter pogoji fermentacije.

Namen naše naloge je bil ugotoviti, če med fermentacijo mleka z izbranimi bakterijskimi sevi nastanejo bioaktivni peptidi s protimikrobno aktivnostjo. Predpostavili smo tudi, da pri kontrolirani fermentaciji mleka v bioreaktorju nastaja več peptidov kot pri klasični fermentaciji.

Protimikrobno aktivnost smo ugotavljali v vzorcih mleka, fermentiranega z *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 oz. *Lactobacillus helveticus* BGRA43, pri katerih smo v predposkusih ugotovili najvišjo proteolitično aktivnost. Frakcije permeatov mleka, fermentiranega v bioreaktorju z L8 ali BGRA43, ki smo jih pridobili s pomočjo gelske filtracije, so bile protimikrobno aktivnejše (večje in bolj bistre cone inhibicije) od frakcij permeatov mleka, fermentiranega brez uravnavanja vrednosti pH. Po 72-urni fermentaciji mleka v bioreaktorju z BGRA43 smo ugotovili manj protimikrobno aktivnih frakcij, kot po 18-urni fermentaciji. Ti rezultati kažejo, kako pomembna je optimizacija fermentacijskih procesov, če želimo narediti funkcionalni izdelek z bioaktivnimi peptidi.

Peptide v vzorcih fermentiranega mleka smo ločili s pomočjo gelske filtracije in RP-HPLC. Permeate fermentiranega mleka, ki smo jih ločili z gelsko filtracijo, smo ultrafiltrirali skozi 10 kDa membrano. Vzorce fermentiranega mleka, ki smo jih ločili s pomočjo RP-HPLC pa smo pripravili tako, da smo mleko fermentirali v bioreaktorju in peptide supernatanta ekstrahirali z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE). Protimikrobno aktivnost frakcij smo preverili z metodo lise na agarju (MLA) in metodo difuzije v agarju (MDA).

Z RP-HPLC smo zbirali frakcije glede na retencijski čas eluiranih peptidov s kolone. Njihovo protimikrobno aktivnost smo potrdili z MDA. Frakcije mleka, fermentiranega v bioreaktorju z BGRA43 (18 ur), smo na petrijeve plošče nanašali v koncentracijah od 0,07 mg/ml do 46,50 mg/ml. Predvidevali smo, da bodo imele večjo protimikrobno aktivnost tiste frakcije z višjo koncentracijo peptidov, a smo ugotovili, da so bile bolj inhibitorne frakcije s koncentracijami peptidov od 0,16 do 0,73 mg/ml. Aktivnost smo kvantitativno preverili še z metodo kritične razredčitve na mikrotitrskih ploščah, kjer smo več kot 50 odstotno inhibicijo indikatorskega rasti seva *L. sakei* NCDO 2714 ugotovili pri frakcijah s koncentracijami peptidov 2,906, 0,046 in 0,025 mg/ml.

Na podlagi eksperimentalnega dela lahko potrdimo hipotezo, da med kontrolirano fermentacijo mleka v bioreaktorju nastaja več peptidov kot pri klasični fermentaciji. Pri tem pa smo potrdili tudi, da med fermentacijo mleka s preiskovanimi sevi lahko nastajajo bioaktivni peptidi s protimikrobno aktivnostjo.

7 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem. Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–46
- Banina A., Vukasinovic M., Brankovic S., Fira D., Kojic M., Topisirović L. 1998. Characterization of natural isolate *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 593–599
- Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K., Tomita M. 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1121: 130–136
- Bogovič-Matijašič B. 1997. Bakteriocini seva *Lactobacillus acidophilus* LF221: Preučevanje tvorbe, protibakterijske aktivnosti, biokemijskih lastnosti in sestave. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 106 str.
- Bogovič-Matijašič B., Rogelj I., Nes I. F., Holo H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 606–612
- Brodnjak Vončina D. 2006. Analizna kemija II: Zbrano gradivo. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 124 str.
- Champagne C. P., Fustier P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184–190
- Church F. C., Swaisgood H. E., Porter D. H., Catignani G. L. 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal Dairy Science*, 66: 1219–1227
- Dathe M., Wieprecht T. 1999. Structural features of helical antimicrobial peptides: Their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 11–28
- Fira D., Kojic M., Banina A., Spasojevic I., Strahinic I., Topisirović L. 2001. Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 123–130
- Frister H., Meisel H., Schlimme E. 1986. Modifizierte OPA-Methode zur Charakterisierung von Proteolyse-Produkten. *Milchwissenschaft*, 41, 9: 483–487

- Gill I., López-Fandiño R., Jorba X., Vulfson E. N. 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 162–183
- Hancock R. E. W., Lehrer R. 1998. Cationic peptides: A new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16: 82–88
- Haque E., Chand R. 2006. Milk protein derived bioactive peptides. Karnal, India, National Dairy Research Institute, Division of Dairy Microbiology <http://www.dairyscience.info/bio-peptides.htm>. (11. 9. 2008): 13 str.
- Herraiz T., Casal V. 1995. Evaluation of solid-phase extraction procedures in peptide analysis. *Journal of Chromatography A*, 708: 209–221
- Hildebrand G. E., Tack J. W. 2000. Microencapsulation of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 196: 173–176
- Kordiš Krapež M., Štancar A. 1994. Uporaba separacijskih tehnik pri določanju aditivov v hrani. V: Aditivi: Dodatki – tehnologija – zdravje. Zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevov in 1. simpozija živilcev (Slovenije), Bled, 9. in 10. junij 1994. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 161–168
- Korhonen H., Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945–960
- Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A., Rantamäki P., Tupasela T. 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 307–319
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609–632
- López-Expósito I., Gómez-Ruiz J. Á., Amigo L., Recio I. 2006. Identification of antibacterial peptides from ovine α_{s2} -casein. *International Dairy Journal*, 16: 1072–1080
- Malkoski M., Dashper S. G., O'Brien-Simpson N. M., Talbo G. H., Macris M., Cross K. J. 2001. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2309–2315
- Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov: učbenik za program srednjega strokovnega in poklicno-tehniškega izobraževanja živilski tehnik, Ljubljana, Tehniška založba Slovenije, 91–95
- Meisel H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8: 363–373

- Minervini F., Algaron F., Rizzello C. G., Fox P. F., Monnet V., Gobbetti M. 2003. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 5297–5305
- Muralidhara C., Haque E., Chand R. 2007. Antimicrobial peptides purified from bovine milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Milchwissenschaft*, 62, 1: 62–66
- Pavec B. 2008. Priprava ACE-inhibitornih hidrolizatov iz fermentiranega mleka. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 68 str.
- Phenomenex. 2008. Strata: Solid phase extraction products. Aschaffenburg, Phenomenex. <http://www.phenomenex.com/products/brands/view.aspx?id=150> (maj 2008): 13 str.
- Pripp A. H., Sørensen R., Stepaniak L., Sørhaug T. 2006. Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. *Food Science and Technology*, 39: 677–683
- Prošek M. 1992. Kromatografske metode v biotehnologiji. V: *Biotehnologija*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 341–353
- Recio I., Visser S. 1999. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428: 314–326
- Rizzello C. G., Losito I., Gobbetti M., Carbonara T., De Bari M. D., Zambonin P. G. 2005. Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal Dairy Science*, 88: 2348–2360
- Roberts P. R., Burney J. D., Black K. W., Zaloga G. P. 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from gastrointestinal tract. *Digestion*, 60: 332–337
- Rogelj I. 2003. Mikrobiologija mleka in mlečnih izdelkov. Mleko. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem. Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 511–539
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mikrobiologija mleka in mlečnih izdelkov. Mlečni izdelki. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem. Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541–577
- Sandre C., Gleizes A., Forestier F., Gorges-Kergot R., Chilmonczyk S., Leonil J., Moreau M. C., Labarre C. 2001. A peptide derived from bovine β -casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germfree and human flora-associated mice. *Journal of Nutrition*, 131: 2936–2942

Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 2002. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Študentska založba, 36–61

Silva S. V., Malcata F. X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15: 1–15

Topisirović L., Kojic M., Fira D., Golic N., Strahinic I., Lozo J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 230–235

Zuman P. 2005. Reactions of orthophthalaldehyde and related compounds with amino acids. *Analytical Letters*, 38: 1213–1220

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ireni Rogelj za vse nasvete in pregled diplomskega dela.

Hvala tudi recenzentki prof. dr. Veroniki Abram za strokovni pregled diplomskega dela.

Za vodenje praktičnega dela, dobrodošle nasvete in temeljit pregled naloge se zahvaljujem Gorazdu Tompa. Hvala za vse vzpodbude in pomoč, da je diplomsko delo dobilo svojo podobo.

Zahvala gre tudi prof. dr. Ljubiši Topisiroviću, ker nam je odstopil sev *Lactobacillus helveticus* BGRA43.

Hvala vsem sodelavcem na Katedri za mlekarstvo za uvajanje v laboratorijsko delo, prijazno pomoč, nasvete ter prijetno vzdušje v laboratoriju. Hvala tudi sodelavcem na Inštitutu za mlekarstvo, ki so kakorkoli prispevali k nastanku tega dela.

Posebna zahvala gre vsem domačim, predvsem pa staršem in sestram, ki ste mi vsak na svoj način omogočili in polepšali čas študija. Brez vas mi ne bi uspelo.

Matej, hvala za potrpežljivost in podporo tekom študija in nastanka tega dela.

PRILOGE

Priloga A: Analiza PCR: sev *L. helveticus* 481NCK228 Hlv+ in *L. helveticus* BGRA43



Legenda: 1 pozitivna kontrola: *L. helveticus* 481NCK228 Hlv+ (Joerger in Klaenhammer, 1990); 2 pozitivna kontrola izolacije; 3 sev *L. helveticus* BGRA43; 4 negativna kontrola: voda-pufer; M = 100bp