

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Rok CANKAR

**PEPTIDNI INHIBITORJI ANGIOTENZINSKE KONVERTAZE V
FERMENTIRANEM MLEKU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PEPTIDE INHIBITORS OF ANGIOTENSIN-CONVERTING
ENZYME IN FERMENTED MILK**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijsko delo v okviru diplome je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za kemijo, Oddelek za živilstvo ter v mlekerskem biotehnološkem laboratoriju Katedre 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, za somentorja doc. dr. Blaža Cigića in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Somentor: doc. dr. Blaž Cigić

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Rok Cankar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 637.146:547.96:577.15(043)=863
KG mleko/mlečni izdelki/bioaktivni peptidi/določanje bioaktivnih peptidov/fiziologija prebave/encimi/inhibicija angiotenzinske konvertaze
AV CANKAR, Rok
SA ROGELJ, Irena (mentorica)/CIGIČ, Blaž (somentor)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2007
IN PEPTIDNI INHIBITORJI ANGIOTENZINSKE KONVERTAZE V FERMENTIRANEM MLEKU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 54 str., 23 pregl., 16 sl., 1 pril., 61 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Namen naloge je bil vpeljati metodo za odkrivanje peptidnih inhibitorjev angiotenzinske konvertaze (ACE) v mleku, fermentiranem z različnimi mlečnokislinskimi starterskimi kulturami in pri različnih pogojih fermentacije določiti inhibicijske aktivnosti na angiotenzinsko konvertazo. ACE je encim, ki je vključen v regulacijo krvnega tlaka. Na vzorcih fermentiranega mleka smo izvedli tudi *in vitro* simulacijo prebave tako, da smo jih izpostavili simuliranim prebavnim sokovom. Proučili smo različne postopke priprave vzorcev ter na podlagi poskusov sestavili lasten, nekoliko modificiran način za pripravo vzorcev in ugotavljanje prisotnosti peptidnih inhibitorjev ACE. Molarno koncentracijo prostih amino skupin v vzorcih smo določili s pomočjo trinitrobenzensulfonske kisline, masno koncentracijo proteinov pa s pomočjo Kjeldahlove metode. Na podlagi omenjenih analiz smo ocenili tudi molarno in masno koncentracijo peptidov ter njihove povprečne dolžine. Najboljšo inhibicijo angiotenzinske konvertaze smo opazili po dodatku vzorcev mleka, fermentiranega s startersko kulturo YC380-K7, ki so vsebovali peptide z ocenjeno povprečno dolžino med 10 in 14 AK. Ugotovili smo, da so se med fermentacijo in procesom simulirane prebave povprečne dolžine peptidov v vzorcih krajšale in sicer sta primerljiva vzorca 24-urne fermentacije z uravnavanjem konstantnega pH in vzorci, vključeni v *in vitro* prebavo. Le ti so imeli najnižjo ACE inhibicijsko aktivnost.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 637.146:547.96:577.15(043)=863
CX milk/milk products/ bioactive peptides/determination of bioactive peptides /digestion/enzymes/inhibition of angiotensin-converting enzyme
AU CANKAR, Rok
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/CIGIČ, Blaž (co-advisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)
PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2007
TI PEPTIDE INHIBITORS OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME IN FERMENTED MILK
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 54 p., 23 tab., 16 fig., 1 ann., 61 ref.
LA SI
AL sl/en
AB Our aim was to develop a simple preparative method for detecting inhibitory activity of peptides that influence angiotensin-converting enzyme (ACE), due to its important role in a blood pressure regulation. All the samples were prepared by fermenting milk with different bacterial species and fermentation conditions and some of the samples were also *in vitro* digested. Different protocols were studied and tested in order to assemble our own protocol based on the experimental findings. We succeeded to determine all yoghurt samples inhibitory activity on ACE. Some other analytic tests were also performed. To get molar concentrations of free amino groups 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid was used. Kjeldahl analytic method was used to determine mass concentration of proteins. We assessed also mass and molar concentration of peptides and their average length in samples. The highest ACE inhibitory activity was measured after adding samples of milk fermented with culture YC380-K7. Those samples included peptides with average length between 10 to 14 amino acids. With the fermentation and digestion, average peptide lengths were shortened and inhibitory effect was lost to a certain point. Samples of 24 hours fermentation were comparable with those included in digestion. In all samples ACE inhibitory activity was confirmed and measured, but *in vitro* digested samples had the lowest inhibitory activity.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD.....	2
1.1 NAMEN NALOGE.....	3
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 BIOAKTIVNI PEPTIDI.....	4
2.2 BIOAKTIVNI PEPTIDI V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH TER NJIHOVI UČINKI.....	4
2.2.1 Peptidi z antihipertenzijskim učinkom - inhibitorji angiotenzinske konvertaze.....	5
2.2.1.1 Angiotenzinska konvertaza - ACE.....	5
2.2.1.2 Uravnavanje krvnega tlaka v telesu.....	5
2.2.2 Opioidni peptidi.....	6
2.2.3 Peptidi, ki preprečujejo strjevanje krvi.....	6
2.2.4 Imunomodulatorni peptidi.....	7
2.2.5 Protibakterijski peptidi.....	7
2.2.6 Citomodulatorski peptidi.....	7
2.2.7 Bioaktivni peptidi s sposobnostjo vezave različnih kovinskih ionov.....	7
2.2.8 Antioksidativni peptidi.....	7
2.3 TVORBA BIOAKTIVNIH PEPTIDOV.....	8
2.3.1 Nastanek peptidov v prebavnem traktu.....	8
2.3.2 Nastanek peptidov med fermentacijo mleka.....	8
2.4 STARTERSKE KULTURE.....	9
2.5 ABSORBCIJA BIOAKTIVNIH PEPTIDOV <i>IN VIVO</i>	10
2.6 TEHNIKE SEPARACIJE PEPTIDOV IN PROTEINOV.....	11
2.6.1 Obarjanje proteinov.....	11
2.6.1.1 Reverzibilno obarjanje.....	11
2.6.1.2 Ireverzibilno obarjanje proteinov.....	11
2.6.2 Filtracija in ultrafiltracija.....	12
2.6.3 Centrifugiranje.....	12
2.7 METODE DOLOČANJA AKTIVNOSTI ANGIOTENZINSKE KONVERTAZE.....	13
2.7.1 Encimske metode določanja.....	13
2.7.2 Detekcijske metode za ugotavljanje ACE aktivnosti.....	13
2.8 ACE INHIBITORNI BIOAKTIVNI PEPTIDI V HRANI TER METODE ZA NJHOVO DOLOČANJE IN KARAKTERIZACIJO.....	15

3	MATERIAL IN METODE DELA.....	16
3.1.	KRATEK OPIS EKSPERIMENTALNEGA DELA.....	16
3.2	REAGENTI IN RAZTOPINE.....	16
3.3	PRIBOR IN OPREMA.....	19
3.4	STARTERSKE KULTURE IN GOJIŠČA.....	19
3.5	PRIPRAVA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA.....	20
3.5.1	Priprava mleka.....	20
3.5.2	Priprava inokuluma bakterijske kulture <i>Lactobacillus gasseri</i> K7.....	20
3.5.3	Postopek klasične fermentacije mleka z različnimi starterskimi kulturami.....	20
3.5.4	Postopek fermentacije mleka v bioreaktorju z uravnavanjem konstantne vrednosti pH.....	22
3.5.5	Shranjevanje vzorcev.....	23
3.6	PRIPRAVA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA PRED ANALIZAMI.....	23
3.6.1	Postopek obarjanja in filtracije.....	23
3.6.2	Uravnavanje vrednosti pH.....	23
3.6.3	Ultrafiltracija.....	23
3.7	DOLOČANJE VSEBNOSTI PROTEINOV S KJELDAHLOVO METODO.....	24
3.8	DOLOČANJE PROSTIH AMINO SKUPIN S TRINITROBENZENSULFONSKO KISLINO (TNBS METODA).....	24
3.8.1	Izdelava umeritvene krivulje.....	25
3.9	EKSTRAKCIJA ACE IZ PRAHU ZAJČJEGA PLJUČNEGA TKIVA.....	25
3.10	MERJENJE AKTIVNOSTI ENCIMA ACE.....	25
3.10.1	Določanje kinetike raganje substrata FAPGG z ACE.....	26
3.10.2	Spektrofotometrično merjenje inhibitorne aktivnosti.....	26
3.10.2.1	Inhibitorna aktivnost kaptoprila.....	26
3.10.2.2	Inhibitorna aktivnost vzorcev fermentiranega mleka.....	27
3.10.2.3	Maksimalna encimska aktivnost.....	27
3.11	POSTOPEK SIMULACIJE PREBAVE <i>IN VITRO</i>	27
4	REZULTATI.....	29
4.1	OPAŽANJA IN TEŽAVE PRI LABORATORIJSKEM DELU.....	29
4.2	FERMENTACIJA VZORCEV.....	31
4.3	DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROSTIH AMINO SKUPIN V VZORCIH S TNBS METODO.....	31
4.3.1	Koncentracija prostih amino skupin v vzorcih.....	33
4.3.1.1	Klasična fermentacija mleka.....	33
4.3.1.2	Fermentacije mleka v bioreaktorju z uravnavanjem konstantne vrednosti pH.....	34
4.4	KJELDAHLOVA ANALIZA.....	34
4.5	OCENA MOLARNE IN MASNE KONCENTRACIJE TER POVPREČNE DOLŽINE PEPTIDOV V VZORCIH.....	35
4.6	REZULTATI MERITEV DOLOČANJA MAKSIMALNE AKTIVNOSTI ACE.....	36
4.7	DOLOČANJE K_M ANGIOTENZINSKE KONVERTAZE ZA SUBSTRAT FAPGG.....	37
4.8	DOLOČANJE INHIBICIJSKE AKTIVNOSTI KAPTOPRILA.....	38
4.9	INHIBITORNA AKTIVNOST VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA.....	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	43
5.1	PRIPRAVA IN TESTIRANJE VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA.....	44
5.2	INHIBITORNE AKTIVNOSTI VZORCEV FERMENTIRANEGA IN UHT MLEKA.....	45
5.3	SKLEPI.....	47
6	POVZETEK.....	49
7	VIRI.....	50
8	ZAHVALA.....	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Bioaktivni peptidi, izolirani iz kravjega mleka in njihovi učinki (Boland in sod., 2001).....	4
Preglednica 2: Priprava ACE analitske čistote s koncentracijo 0,125 U/mL	17
Preglednica 3: Sestava boratnega pufru s pH 8,3±0,1.....	17
Preglednica 4: Sestava 100 mM boratnega pufru s 5 % (v/v) deležem glicerola	17
Preglednica 5: Priprava ekstrakta ACE iz zajčjih pljuč.....	17
Preglednica 6: Sestava 0,213 M fosfatnega pufru s pH 8,3±0,1.....	17
Preglednica 7: Priprava 1 mM kaptoprila	17
Preglednica 8: Priprava 1,6 mM kromogenega substrata FAPGG	17
Preglednica 9: Sestava simuliranega želodčnega soka s pH 2 (Pripp, 2005).....	18
Preglednica 10: Sestava simuliranega žolčnega in pankreatičnega soka s pH 8 (Pripp, 2005).....	18
Preglednica 11: Kemijska sestava mleka uporabljenega pri fermentaciji	20
Preglednica 12: Vzorci mleka z dodanimi starterskimi kulturami pri klasični izdelavi fermentiranega mleka	21
Preglednica 13: Dodane starterske kulture pri fermentaciji z uravnano vrednostjo pH	22
Preglednica 14: Koncentracije raztopin levcina in volumni dodanih reagentov, uporabljeni pri izdelavi umeritvene krivulje	25
Preglednica 15: Sestava reakcijske zmesi za merjenje ACE aktivnosti (vir encima je ekstrakt liofiliziranih zajčjih pljuč).....	26
Preglednica 16: Sestava reakcijske zmesi za merjenje Km encima	26
Preglednica 17: Sestava reakcijske zmesi za merjenje ACE aktivnosti ob prisotnosti 10 nM kaptoprila	26
Preglednica 18: Razmerja med prebavnimi encimi in vzorci fermentiranega in UHT mleka v testih in vitro simulacije prebave.....	28
Preglednica 19 : Vrednosti pH posameznih vzorcev mleka med klasično fermentacijo v viskubatorju.....	31
Preglednica 20: Molarna koncentracija prostih amino skupin v vzorcih (klasična fermentacija).....	33
Preglednica 21: Molarna koncentracija prostih amino skupin v vzorcih (klasična fermentacija in simulacija prebave).....	34
Preglednica 22: Molarna koncentracija prostih amino skupin v vzorcih (fermentacija mleka v bioreaktorju z uravnavanjem konstantnega pH).....	34
Preglednica 23: Masne koncentracije in povprečne dolžine peptidov v vzorcih fermentiranega mleka.....	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv peptidnih inhibitorjev proteinaze ACE na krvni tlak (Pihlanto-Leppala, 2001).....	6
Slika 2: Blokovni diagram tehnološkega procesa izdelave fermentiranega mleka z različnimi starterskimi kulturami v viskubatorju (klasična fermentacija).....	21
Slika 3: Blokovni diagram vodenega fermentacijskega procesa v bioreaktorju s konstantno vrednostjo pH.....	22
Slika 4: Razpad kromogenega substrata FAPGG pod vplivom svetlobe v PP in PS kivetah pri neprekinjeni osvetljenosti, temperaturi 25 °C, valovni dolžini 340 nm in 0,8 mM koncentraciji substrata v reakcijski mešanici.....	30
Slika 5: Umeritvena krivulja za levcin: odvisnost absorbance TNP derivata od koncentracije levcina ($\lambda=340$ nm).....	31
Slika 6: Odvisnost absorbance od časa pri ugotavljanju maksimalne encimske aktivnosti.....	36
Slika 7: Odvisnost aktivnosti ACE od časa priprave raztopine (shranjevanje v ledeni kopeli).....	37
Slika 8: Michaelis-Mentenov diagram za kromogeni substrat FAPGG.....	38
Slika 9: Inhibicija ACE z različnimi koncentracijami sintetičnega inhibitorja kaptoprila...38	
Slika 10: Odvisnost absorbance od časa pri merjenju encimsko katalizirane razgradnje substrata ob prisotnosti inhibitornih peptidov iz vzorca YC380-K7.....	39
Slika 11: Zmanjševanje aktivnosti encima v odvisnosti od časa priprave raztopine pri testiranju za vzorec YC380-K7.....	39
Slika 12: Odvisnost inhibicije od koncentracije peptidov (vzorec UHT-prebava 1:1).....	40
Slika 13: Primerjava masnih in molarnih IC50 vrednosti vzorcev bioreaktorske fermentacije s konstantnih Ph.....	40
Slika 14: Masne IC50 vrednosti vzorcev.....	41
Slika 15: Molarne IC50 vrednosti analiziranih vzorcev.....	41
Slika 16: Povprečne dolžine peptidov v analiziranih vzorcih.....	42

KAZALO PRILOG

Priloga A: Razlaga oznak vzorcev.....	56
---------------------------------------	----

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kratica - okrajšava	Pomen
(1-C ¹⁴ -Gly)-Hip-His-Leu	Tetrapeptid s C ¹⁴ markerjem glicil-hipuroil-histidil-levcin
(p-H ³ -Bz)-Hip-Gly-Gly	Tripeptid s H ³ markerjem fenil-hipuroil-glicil-glicin
(p-H ³ -Bz)Hip-His-Leu	Tripeptid s H ³ markerjem fenil-hipuroil-histidil-levcin
(p-H ³ -Bz)-Phe-Ala-Pro	Tripeptid s H ³ markerjem fenil-fenilalanil-alanil-prolin
(p-H ³ -Bz)-Phe-His-Leu	Tripeptid s H ³ markerjem fenil-fenilalanil-histidil-levcin
ACE	Angiotenzinska konvertaza
AK	Aminokislina
Bz-Gly	N-benzoilglicin
Bz-Gly-His-Leu	Tripeptid fenil-glicil-histidil-levcin
Cfu	Colony forming unit
Chr. Hansen	Christian Hansen
Da	Dalton: enota za določevanje molekulske mase
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
FAP	Furanoakrioloil-L-fenilalanin
FAPGG	Furanoakrioloil-L-fenilalanilglicilglicin
GG	Glicilglicin
HHL	Hipuroil-L-histidil-L-levcin
Hip-Gly-Gly	Tripeptid (hipuroil glicil-glicin)
Hip-His-Leu	Tripeptid (hipuroil-histidil-levcin)
His-Leu	Dipeptid (histidil-levcin)
IC ₅₀	50% inhibicija
(p-H ³ -Bz)-Pro-Phe-Arg	Tripeptid s H ³ markerjem fenil-prolil-fenilalanil-arginin
IPP	Tripeptid (izolevcil-prolil-prolin)
ke	Kolonijske enote
K _m	Michaelisova Mentenova konstanta
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
M	Molarnost: oznaka za množinsko koncentracijo, enote (mol/L)
MKB	Mlečnokislinske bakterije

MRS	Gojišče de Man - Rogosa - Sharp
Obr/min	Obrati na minuto
OPA	o-ftaldialdehid
PP	Polipropilen
PS	Polistiren
RCF	Relativna centrifugalna sila
RP HPLC	Kromatografija z reverzno fazo visoke ločljivosti
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SDS	Natrijev dodecil sulfat
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
t	Čas
T	Temperatura
TNBS	Trinitrobenzensulfonska kislina
TNP	Trinitrofenil
UV	Ultravijolična
V	Volumen
v/v	Volumenski delež
V _d	Delovni volumen
VPP	Tripeptid (valil-prolil-prolin)
V _t	Celotni volumen
YGGF	Štiri-peptid (tirozil-glicil-glicil-fenilalanin)
Z-Phe-His-Leu	Tripeptid (glutamin-fenilalanil-histidil-levcin)

1 UVOD

Proteini so kompleksne organske spojine z veliko molekulsko maso. So pomembne spojine v vseh celicah, zgrajene iz verige aminokislin. V naravnih proteinih so določili dvajset različnih aminokislin. V posameznih proteinskih molekulah pa jih je lahko od nekaj tisoč do nekaj milijonov. Peptidi so manjše molekule, sestavljene iz verige dveh, treh, štirih oziroma več aminokislin. Če je v molekuli še več aminokislin, nastanejo polipeptidi. Zaporedje aminokislin v peptidih, polipeptidih in proteinih je genetsko določeno z DNA celic, v katerih nastanejo te molekule. Različnost zaporedja aminokislin jim omogoča pester strukturne in metabolične aktivnosti v organizmih.

Veliko raziskav v biološki, farmacevtski in živilski znanosti je namenjenih problemom izolacije oziroma sinteze proteinov, saj imajo te spojine pomembno vlogo v prehrani in nenazadnje vplivajo tudi na funkcionalne lastnosti hrane. Proteini so polimerne molekule, ki jih lahko z encimi, kislinami ali bazami razbijemo na manjše peptide oziroma na posamezne aminokisliline. V telesu človeka poteka proces hidrolize zaužitih proteinov v želodcu in v tankem črevesu, hrano pa je mogoče hidrolizirati še pred zaužitjem (Cigić, 2001).

Proteine najdemo v različnih vrstah hrane, tako rastlinskega kot živalskega izvora, kjer so količinsko različno zastopani. Najcenejši vir visoko kakovostnih proteinov so mleko in mlečni izdelki. Imajo visoko biološko vrednost in so pomemben vir dušika in esencialnih aminokislin (Puhan, 1995). Prebavni encimi, kisline ali baze jih hidrolizirajo, pri čemer se sprostijo nizkomolekularni peptidi. Mnogi med njimi imajo različne biološke učinke, zato jih razvrščamo med bioaktivne peptide.

Bioaktivni peptidi, izolirani iz mlečnih proteinov, so znani po številnih funkcionalnih učinkih, kot so: antitrombotično, protimikrobno, imunomodulatorno, opioidno in antihipertenzijsko delovanje (Clare in Swaisgood, 2000). Peptide s takšnim učinkom so našli še v drugih živalskih in rastlinskih tkivih. Pomembni so tudi v prehranskem smislu, saj se na primer kazeini v želodcu preoblikujejo v drobno granuliran koagulum, ki je lahko razgradljiv. Nastali nizkomolekularni peptidi se hitreje absorbirajo v prebavilih (Jolles in sod., 1986). Proteini mleka so zato zelo uporabni v prehrani ljudi in so glavni vir bioaktivnih peptidov, povzročajo pa tudi malo alergijskih reakcij (Korhonen in Pihlanto, 2003).

Posebna pozornost se v zadnjem času namenja bioaktivnim peptidom z antihipertenzijskim delovanjem, za katere je značilno določeno aminokislinsko zaporedje. Ti peptidi so neaktivni, dokler so sestavni del proteinov, aktivni postanejo šele, ko se po delovanju proteinaz, v procesu prebave ali fermentacije, sprostijo iz proteinov. Med fermentacijo ima pri nastanku bioaktivnih peptidov odločilno vlogo dodana starterska kultura in njena proteolitična aktivnost. Najbolj poznano fermentirano mleko je jogurt, ki nastane s fermentacijo mleka z dvema mlečnokislinskima bakterijama, *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Bakteriji imata značilen sinergistični odnos. Sevi vrste *Str. thermophilus* s svojo proteolitsko aktivnostjo zagotavljajo peptide, ki jih nato še dodatno razgradijo sevi *L. bulgaricus* do kratkih peptidov in aminokislin, z aktivnim učinkom.

V človeškem telesu je kar nekaj endogenih proteinov, ki so vključeni v proces regulacije krvnega tlaka. Ena pomembnejših molekul je angiotenzinska konvertaza, saj inhibicija le-te neposredno vpliva na znižanje krvnega tlaka. Angiotenzinska konvertaza je eksopeptidaza, ki odceplja dipeptide s C- konca različnih proteinskih molekul. Na ta način aktivira tudi angiotenzin, kar povzroča dvig krvnega tlaka v telesu. Nekateri bioaktivni peptidi, ki nastanejo med proteolizo mleka in mlečnih izdelkov, so učinkoviti inhibitorji angiotenzinske konvertaze, zato preprečujejo dvig krvnega tlaka.

Odkrivanje mehanizmov nastanka in delovanja bioaktivnih peptidov, ki izvirajo iz proteinov mleka, je pomembno tako z znanstvenega kot uporabnega vidika. Poznavanje dejavnikov, ki so vključeni v nastanek bioaktivnih peptidov in njihov fiziološki učinek, bo pojasnil nov delček kompleksnih dogajanj, ki jih sproži v človeškem telesu hrana, nova znanja pa bodo omogočila razvoj in kreiranje funkcionalnih živil z zdravju koristnimi učinki.

1.1 NAMEN NALOGE

Funkcionalna živila iz leta v leto pridobivajo na pomenu, vzporedno z njimi pa se oblikujejo vse bolj natančno izdelani predpisi, ki določajo pripravo, sestavo, kontrolo in ugotavljanje učinkovitosti teh živil. Prva faza v razvoju funkcionalnega živila je dobro poznavanje nastanka funkcionalnih učinkovin in razvoj metod za njihovo odkrivanje ter merjenje njihovih učinkov. Znano je, da številni bioaktivni peptidi ali njihovi predhodniki nastajajo med fermentacijo mleka, odvisno od uporabljene starterske kulture in pogojev fermentacije. V naši nalogi smo se osredotočili na iskanje inhibitorjev angiotenzinske konvertaze, encima, ki je vključen v regulacijo krvnega tlaka.

Delo je zajemalo pripravo vzorcev fermentiranega mleka, narejenih z različnimi starterskimi kulturami. Sledila je delna separacija bioaktivnih peptidov ter ugotavljanje njihove sposobnosti inhibicije ACE s spektroskopsko metodo in kromogenim substratom FAPGG (furanokrilolil-L-fenilalanilglicilglicin).

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljali smo, da bomo z različnimi kombinacijami starterskih kultur uspeli izdelati vzorce fermentiranega mleka, ki bodo vsebovali zadostno količino inhibitorjev ACE, da bomo lahko kvantitativno ovrednotili njihovo aktivnost. Predvidevali smo, da bodo imeli fermentirani vzorci, izpostavljeni simuliranim prebavnim sokovom, boljši inhibični učinek, saj naj bi se med prebavo mlečnih proteinov dodatno sproščali bioaktivni peptidi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOAKTIVNI PEPTIDI

Peptidi so zelo heterogena skupina molekul, ki so sestavljene iz aminokislin, povezanih s peptidnimi vezmi. Razlikujejo se v številu aminokislin, ki tvorijo peptid, aminokislinski sestavi in aminokislinskem zaporedju. Če peptidi vsebujejo več kot 10 aminokislin, jih uvrščamo med polipeptide. Molekule z več kot 100 aminokislina mi pa uvrščamo med proteine (Meisel, 2001).

Ker so peptidi z biološko aktivnostjo v večini primerov sestavljeni iz dveh pa do nekaj deset aminokislin, praktično vsak protein vsebuje druga aminokislinska zaporedja, ki odgovarjajo različnim bioaktivnim peptidom (Cigić, 2001). Peptidi, ki so sestavni del proteina, postanejo aktivni šele, ko proteinaze razcepijo proteine na manjše fragmente. Bioaktivni peptidi se lahko sprostijo v procesu fermentacije ali pa v prebavnem traktu zaradi delovanja endogenih proteinaz (Meisel, 2001). Med fermentacijo povzročijo proteolitični encimi, ki jih tvorijo mikroorganizmi starterske kulture, kvalitativne spremembe mlečnih proteinov.

2.2 BIOAKTIVNI PEPTIDI V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH TER NJHOVI UČINKI

Mleko in mlečni izdelki so človeškemu organizmu nepogrešljiv vir hranilnih snovi in energije, prav tako pa predstavljajo bogat vir bioaktivnih peptidov (Preglednica 1). Mlečni proteini so najpomembnejši vir bioaktivnih peptidov, njihova vloga pa se še povečuje ob stalnem odkrivanju vedno novih bioaktivnih komponent (Clare in Swaisgood, 2000; FitzGerald in sod., 2004; Kilara in Panyam, 2003; Silva in Malcata, 2005).

Preglednica 1: Bioaktivni peptidi, izolirani iz kravjega mleka in njihovi učinki (Boland in sod., 2001).

Peptidi	Izvorni protein	Bio-aktivna sekvenca peptida	Bioaktivni učinek
α -Kazomorfini	α_{s1}^3 -Kazein	Fragment 90-96	Opioidni učinek
β -Kazomorfini	β -Kazein	Fragment 60-70	Opioidni učinek
α -Laktorfin	α -Laktalbumin	Fragment 50-53	Opioidni učinek
β -Laktorfin	β -Laktoglobulin	Fragment 102-105	Opioidni učinek
Laktofericin	Laktoferin	Fragment 17-41	Protimikrobni učinek
α -Kazokinin	α_{s1} -Kazein	Fragment 23-27	ACE inhibitor
β -Kazokinin	β -Kazein	Fragment 177-183	ACE inhibitor
Kazeino -fosfopeptidi (CPP)	α_{s1} -Kazein β -Kazein	Fragmenti 43-58; 59-79 1-25	Vezava mineralov in rekalcifikacija
Imunomodulatorski peptidi	α_{s1} -Kazein β -Kazein	Fragmenti 194-199 63-68; 191-193	Imunomodulatorski učinek
Kazoplatelini	κ -Kazein	Fragment 106-116	Protimikrobni učinek
Kazoksini	κ -Kazein	Fragment 33-38	Opioidni učinek

Bioaktivni peptidi so specifični proteinski fragmenti, ki imajo pozitiven učinek na telesne funkcije in lahko ugodno vplivajo na zdravje (FitzGerald in Murray, 2006). Učinkujejo predvsem na krvožilni, prebavni, imunski in živčni sistem, zato so glede na njihovo aktivnost razdeljeni na protimikrobne, antioksidativne, antitrombogene, antihipertenzijske in imunomodulatorne. Za razliko od endogenih bioaktivnih peptidov kažejo multifunkcijske lastnosti, to pomeni, da imajo lahko peptidi z enakimi aminokislinskimi sekvencami dve ali več različnih aktivnosti (Korhonen in Pihlanto, 2006).

Posebna pozornost se v zadnjem času, zaradi vse večjega porasta bolezni srca in ožilja, namenja bioaktivnim peptidom z antihipertenzijsko (največkrat ACE-inhibitorno) funkcijo (López-Fandiño in sod., 2006).

2.2.1 Peptidi z antihipertenzijskim učinkom - inhibitorji angiotenzinske konvertaze

Največ inhibitorjev angiotenzinske konvertaze so izolirali iz živil kot so mleko, jajca, soja in ribe. Sestava teh peptidnih inhibitorjev je omejena na 2-10 aminokislin, kar prispeva k velikemu številu odkritih ACE inhibitorjev. Prav tako njihova funkcionalnost ni omejena s strogo določenimi strukturami, kot pri opioidnih peptidih, ki se morajo začeti s točno določeno aromatsko aminokislino in poleg tega vsebovati še eno na tretjem ali četrtem mestu v peptidu. Zaradi relativno kratke verige so bili nekateri peptidi iz te skupine pripravljani tudi po sintezni poti (Pihlanto-Leppala, 2001).

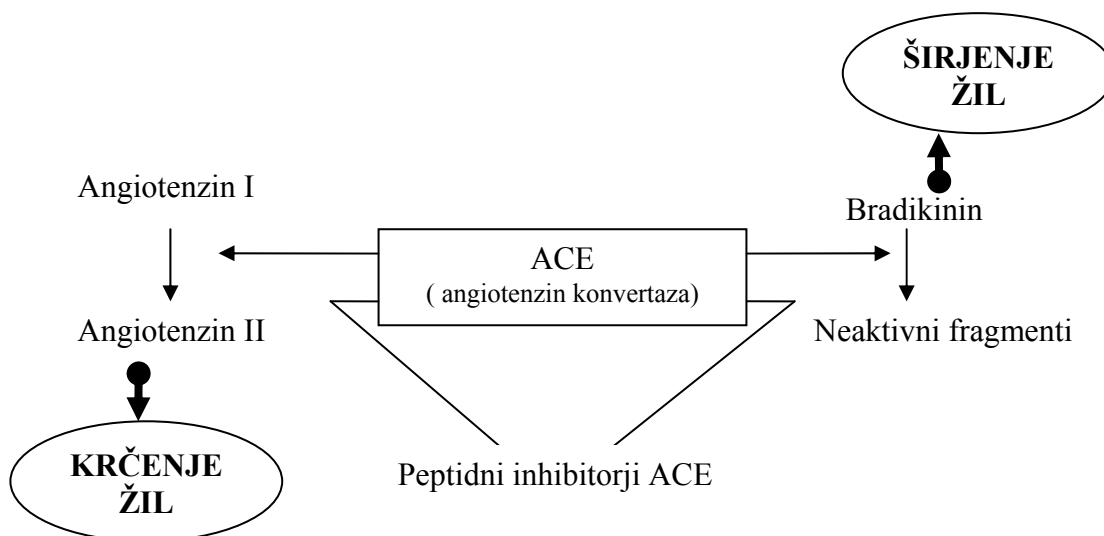
2.2.1.1 Angiotenzinska konvertaza - ACE

Angiotenzinska konvertaza je eksopeptidaza, peptidil-dipeptid hidrolaza, ki odceplja dipeptide s C- konca različnih proteinskih substratov. Optimalna pogoja delovanja ACE sta temperatura 45 °C in vrednost pH 8,3 (Pettrillo in Ondeti, 1982). Angiotenzinska konvertaza je ena glavnih spojin v človeškem telesu, ki skrbi za uravnavanje krvnega tlaka. Njena relativna molekulska masa znaša 15000, v človeškem telesu pa se nahaja na zunanji površini celičnih membran. Inhibicija delovanja ACE se izraža kot trenutno znižanje krvnega tlaka.

Eden pomembnejših substratov za ACE je angiotenzin I, ki povzroča dvig krvnega tlaka v telesu. Angiotenzin I se pod vplivom delovanja ACE preoblikuje v angiotenzin II. V telesu pa ACE deluje še na bradikinin, ki ima nasprotni učinek kot angiotenzin II, saj bradikinin deluje vazodilatorno, to pomeni, da povzroča širjenje žil (Coates, 2002).

2.2.1.2 Uravnavanje krvnega tlaka v telesu

Pri uravnavanju krvnega tlaka ima pomembno vlogo hormonski sistem, v katerem sodelujejo renin, angiotenzin in aldosteron. Renin pospešuje pretvorbo angiotenzinogena v angiotenzin I. Pod vplivom encima ACE se angiotenzin I pretvori v angiotenzin II. Ta se veže na angiotenzinske receptorje v žilni steni in povzroči, da se žila skrči, zato se krvni tlak dvigne. Poleg tega angiotenzin II pospešuje izločanje aldosterona iz nadledvične žleze. Aldosteron je hormon, ki zmanjšuje izločanje soli in vode v ledvica, zato se količina tekočine v krvnem obtoku poveča, krvni tlak pa poraste. Poznan pa je še en učinek delovanja angiotenzinske konvertaze in sicer na razgradnjo bradikinina, hormona, ki širi žile. ACE pospešuje razgradnjo bradikinina, končni učinek je znan kot hipertenzija oziroma povišan krvni tlak (Leclerc in sod., 2002).



Slika 1: Vpliv peptidnih inhibitorjev proteinaze ACE na krvni tlak (Pihlanto-Leppala, 2001)

2.2.2 Opioidni peptidi

To so peptidi, ki se vežejo na različne opioidne receptorje na celicah. Endogeni vir opioidnih peptidov so prekursorski proteini proenkefalin, propiomelanokortin in prodimorfin. Vsi endogeni peptidi imajo enak N- konec zaporedje YGGF (tirozil-glicil-glicil-fenilalanin), zaradi razlik v centralnem in C- koncu peptida pa se lahko vežejo na različne tipe opioidnih receptorjev in imajo različne fiziološke učinek, ki se v končni fazi odražajo kot spremenjena želja po hrani, sprememba v hitrosti prebave ali sprememba razpoloženja (Cigić, 2001).

Za opioidne peptide, ki nastanejo iz eksogenih proteinov, je značilno, da imajo vsi na N-koncu tirozin ter da imajo na mestu 3 ali 4 aromatsko aminokislino. Največ opioidnih peptidov je bilo odkritih v mlečnih proteinih, nastajajo pa iz α -kazeinov ter α -laktoglobulinov in β -laktoalbuminov. Dva izmed prvih odkritih opioidnih peptidov sta bila α -laktorfin in β -laktorfin, ki sta znana po svojem nasprotnem učinku. Medtem ko α -laktorfin upočasnjuje peristaltiko črevesja ima β -laktorfin nasprotni učinek, čeprav se oba vežeta na isti tip receptorja (Pihlanto-Leppala, 2001).

2.2.3 Peptidi, ki preprečujejo strjevanje krvi

Določeni fragment κ -kazeina je strukturno in funkcionalno zelo podoben fibrinogenemu proteinu, ki je vključen v proces strjevanja krvi. Pomemben je peptid kazoplastein, ki inhibira agregacijo in povezovanje fibrinogenih vlaken ter s tem prepreči strjevanje krvi (Silva in Malcata, 2005).

2.2.4 Imunomodulatorni peptidi

Peptidi lahko vplivajo tudi na imunski sistem. Večino imunomodulatornih peptidov so do sedaj izolirali iz mlečnih proteinov (Gill in sod., 2000). Celice imunskega sistema, makrofagi in limfociti, imajo na površini različne receptorje, na katere se vežejo ti peptidi in na ta način vplivajo na imunski odziv. Avtorji Silva in Malcata (2005) ter Meisel in Günther (1998) ugotavljajo, da uživanje mlečnih izdelkov zmanjšuje tveganje za nastanek rakavih obolenj prebavnega trakta. Podroben način delovanja še ni znan (Bernard in sod., 2000).

2.2.5 Protibakterijski peptidi

Protibakterijski peptidi sodelujejo pri obrambi mnogih višjih organizmov pred bakterijami (Silva in Malcata, 2005). Nekateri peptidi s protimikrobnimi lastnostmi so sestavni del določenih mlečnih proteinov. Najverjetneje delujejo tako, da tvorijo pore v membranah določenih vrst bakterij, kar povzroči propad teh organizmov (Strom in sod., 2000). Poznamo pa še peptide z drugačnim načinom delovanja. Ti preprečujejo vezavo bakterij in virusov na primer na zobno tkivo in tako onemogočajo učinek kariogenih bakterij (Brody, 2000).

2.2.6 Citomodulatorski peptidi

Citomodulatorski peptidi so peptidi, ki vplivajo na rast in delitev različnih celic. V številnih študijah je bilo dokazano, da nekateri hidrolizati mlečnih proteinov povzročijo celično smrt določenih tipov rakavih celičnih linij debelega črevesa ter zavirajo delitev rakavih in levkemičnih celic. Ugotovljen pa je bil tudi stimulativen učinek na rast in delitev določenih nekarcinogenih celičnih linij (Hagiwara in sod. 1995).

2.2.7 Bioaktivni peptidi s sposobnostjo vezave različnih kovinskih ionov

Aminokislina serin je lahko v določenih primerih fosforilirana. Zaradi negativno nabite fosfatne skupine so fosforilirani peptidi dobri kelatorji dvovalentnih kationov. Zato lahko fosforilirani peptidi vežejo različne kovinske ione, kot so na primer Ca^{2+} , Fe^{2+} in Mg^{2+} . S tem je povečana resorpcija mineralov v telo, kar zmanjšuje možnosti nastanka rahitisa, pospešena pa je tudi rekalcifikacija. Veliko afiniteto za vezavo ionov pa imajo tudi nekateri nefosforilirani peptidi. Vezava ionov je v tem primeru odvisna od tridimenzionalne strukture posameznega peptida (Vegarud in sod., 2000).

2.2.8 Antioksidativni peptidi

Oksidativni metabolizem je nujen za preživetje celic v telesu. Pri tem pa nastajajo radikali in ostali produkti, ki v tkivih povzročajo oksidativne spremembe. Če so zaščitni sistemi encimov, kot so superoksid dismutaza, katalaza in peroksidaza oslabljeni, lahko kopičenje prostih radikalov povzroči letalne celične spremembe. Antioksidante, ki preprečujejo take spremembe, pa vsebuje tudi mleko in mlečni izdelki. To so naravno prisotni vitamini, betakaroten, dismutaze in katalaze, kot tudi serum albumin, laktoferin, glikoprotein in aminokislina tirozin in cistein (Pihlanto-Leppala, 2006).

2.3 TVORBA BIOAKTIVNIH PEPTIDOV

2.3.1 Nastanek peptidov v prebavnem traktu

Bioaktivni peptidi, ki nastanejo iz prekursorskih proteinov v prebavnem traktu, oziroma s hidrolizo proteinov pred zaužitjem hrane, lahko pod določenimi pogoji preidejo iz prebavil v krvni obtok in nato v periferna tkiva. Skozi membrane v citosol enterocitov in preko bazolateralne membrane prehajajo deloma z difuzijo, deloma z aktivnim transportom. To velja predvsem za dipeptide in tripeptide, ki se pri tem vežejo na določene receptorje (Dornig in sod., 1998). V krvnem obtoku so našli tudi večje eksogene peptide (Roberts in sod., 1999). Iz tega lahko sklepamo, da iz prebavil v krvno plazmo lahko v manjši meri prehajajo tudi večji peptidi. Vendar pa zelo malo peptidov prehaja v kri nespremenjenih, kar omejuje njihov dejanski učinek po zaužitju in prebavi hrane (Pripp, 2005).

Bioaktivni peptidi so v prebavilih in krvi izpostavljeni najrazličnejšim proteazam, ki jih lahko razgradijo na manjše peptide brez biološke funkcije. Nekateri peptidi pa so relativno odporni na proteinaze, kar je predvsem posledica ustreznega aminokislinskega zaporedja. Peptida IPP in VPP, ki inhibirata ACE in znižujeta krvni tlak, sta relativno odporna na hidrolizo. Vzrok temu sta dva prolina v njunih molekulah. Ker sta tripeptida, se učinkovito prenašata skozi epitelne celice tankega črevesa. Delovanje teh dveh peptidov so uspešno dokazali s poskusi *in vivo* na podganah in ljudeh (Sekiya in sod., 1992).

2.3.2 Nastanek peptidov med fermentacijo mleka

Fermentacija je najstarejši način konzerviranja hrane, pri tem pa fermentirani izdelki dobijo značilno aromo in teksturo. V proizvodnji fermentiranih mlečnih izdelkov uporabljamo starterske kulture, sestavljene iz različnih vrst bakterij, kvasovk, plesni in kombinacijo le-teh. Najpomembnejše so mlečnokislinske bakterije, ki so tudi del avtohtone mikroflore človeškega in živalskega prebavnega trakta. Uravnavajo črevesno mikrofloro in preprečujejo razmnoževanje patogenih bakterij. Mlečnokislinske bakterije imajo pomembno vlogo pri proizvodnji hrane in zdravem prehranjevanju (Ouweland, 1998).

Fermentacija poteka ob prisotnosti mlečnokislinskih bakterij, ki s pomočjo lastnih encimov razgrajujejo različne substrate in tako pridobivajo potrebne snovi in energijo za preživetje in razmnoževanje. Proteolitični sistem mlečnokislinskih bakterij je zelo kompleksen in zapleten. Tvorijo ga ekstracelularne serinske proteinaze in večje število intracelularnih peptidaz. Mikrobne proteinaze lahko hidrolizirajo več kot 40 % peptidnih vezi α_{s1} - in β -kazeina in tako proizvajajo peptidne fragmente. Prav te v veliki meri predstavljajo do sedaj znane bioaktivne peptide, identificirane v mlečnih proizvodih (Minervini in sod. 2003).

Fermentirano mleko sodi med najstarejše mlečne izdelke. Ti izdelki so še danes v svetu najbolj razširjeni. Proizvodnje fermentiranih mlečnih izdelkov pa si danes brez uporabe selekcioniranih starterskih kultur ne moremo več predstavljati.

Glavne lastnosti starterskih kultur so:

- podaljšanje obstojnosti in varnosti izdelkov
- oblikovanje zelenih senzoričnih in reoloških lastnosti
- oblikovanje terapevtskih in funkcionalnih lastnosti izdelkov (Rogelj in Perko, 2003).

Najbolj razširjeno in popularno fermentirano mleko je jogurt. Pri tradicionalni izdelavi jogurta so naravno mikrofloro sestavljale termofilne mlečnokislinske bakterije rodov *Lactobacillus* in *Streptococcus*. Danes je tipična jogurtova kultura sestavljena iz vrst *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus* (Robinson in sod., 2002).

2.4 STARTERSKE KULTURE

Podrobneje bomo opisali bakterije, ki smo jih uporabili kot starterske kulture pri izdelavi vzorcev fermentiranega mleka. Uporabljene so bile naslednje kulture:

- *Streptococcus thermophilus* je gram pozitivna bakterija, njene celice so ovalne. V mleku oblikuje dolge verižice, sestavljene iz 10-20 celic. Laktozo fermentira po homofermentativni poti do L+ mlečne kisline. Njena proteolitska aktivnost je omejena, zato je odvisna od prostih aminokislin, ki so v mleku naravno prisotne. Njena optimalna temperatura za rast je 37°C. Fermentacija pa se lahko dokonča le ob prisotnosti drugih mikroorganizmov, ki s svojo proteolitsko in aminopeptidazno aktivnostjo zagotavlja kratkoverižne peptide. Dobro raste tudi pri temperaturi 42°C (Robinson in Itsranuwat, 2002).
- *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* je gram pozitivna, paličasta bakterija. Celice tvorijo v mleku kratke verižice. Laktozo fermentirajo po homofermentativni poti do D-mlečne kisline. Je precej bolj odporna na kislino kot *Str. thermophilus*. Za razliko od bakterij vrste *Str. thermophilus* tvorijo bakterije vrste *L. delbrueckii* subs. *bulgaricus* proteinaze za razgradnjo kazeina, predvsem β -kazeina. Tako nastajajo kratki peptidi in proste aminokisliline, ki pa dodatno stimulirajo rast bakterij *Str. thermophilus*. Optimalna temperatura za njihovo rast je 45 °C. Pri skupni fermentaciji zgoraj omenjenih bakterij je rast značilno sinergistična (Robinson in Itsranuwat, 2002).
- *Lactobacillus gasseri* K7 je homofermentativna, termofilna bakterija. Je tipična predstavnik črevesne mikroflore in spada med probiotične seve. Proizvaja bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnega delovanja (Bogovič Matijašič in sod., 2004). Pomembna lastnost tega seva sta odpornost proti nizkim vrednostim pH in žolčnim solem, saj je naravna ekološka niša probiotičnih bakterij prebavni trakt. Zato pa slabo rastejo v mleku, imajo počasno in majhno proizvodnjo mlečne kisline in so med slabšimi proteoliti. Izdelkom ne izboljšujejo senzoričnih in tehnoloških lastnosti, zato se jih največkrat uporablja v kombinaciji z drugimi mlečnokislinskimi bakterijami. Optimalna temperatura za rast je nekoliko nižja in znaša 37 °C (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000).

2.5 ABSORPCIJA BIOAKTIVNIH PEPTIDOV *IN VIVO*

Bioaktivni peptidi se morajo za doseg fiziološkega vpliva *in vivo* med prebavo v črevesju sprostiti in potem doseči mesto delovanja bodisi na luminalni strani prebavnega trakta, bodisi v perifernih organih po končani absorpciji. Prebavni trakt človeka vsebuje številne encime, ki sodelujejo pri hidrolizi proteinov oz. peptidov in so na različnih mestih. Pomembno je poznavanje dejstva, da se peptidaze nikoli ne pojavljajo same, v prebavnem traktu je vedno prisotna mešanica teh encimov, ki delujejo sinergistično. Poglavitni del prebave proteinov je hidroliza polipeptidov s pomočjo proteaz trebušne slinavke (tripsin, himotripsin, elastaza in karboksipeptidaza). Pri prebavi peptidov sodelujejo tudi mikroorganizmi debelega črevesa, ki proizvajajo večje količine številnih peptidaznih encimov. Po prebavi je v enterocitu prisotna večja količina oligopeptidov in prostih aminokislin. Ščetkasta meja enterocitne membrane izloči produkte intraluminalne prebave v glavnem s pomočjo dveh mehanizmov: hidrolize oligopeptidov na ščetkasti meji membrane in posledičnim transportom prostih aminokislin ali z membransko translokacijo manjših peptidov, ki jih nato razgradijo peptidaze v citosolu (Pihlanto in Korhonen, 2003). V ščetkasti meji membrane enterocitov je prisotno veliko število peptidaz, ki v glavnem sodijo v štiri razrede: endopeptidaze, aminopeptidaze, karboksipeptidaze in dipeptidaze. Glavno mesto absorpcije peptidov predstavlja tanko črevo, ki ima na različnih delih različno sposobnost za absorpcijo produktov proteinske razgradnje. Sposobnost tankega črevesa za absorpcijo aminokislin in peptidov je lahko zelo različna (Bruck in sod., 2003). Te razlike nastanejo predvsem v času razvoja, nosečnosti in laktacije, lahko pa so posledica bolezni, črevesnega izločanja in sprememb v kvaliteti in količini zaužite hrane. Končni produkti prebave proteinov, aminokislina in peptidi se absorbirajo s pomočjo različnih mehanizmov (Pihlanto in Korhonen, 2003).

Z uporabo elektrofizioloških metod so v 70-ih in 80-ih letih prejšnjega stoletja odkrili obstoj peptidnega transportnega sistema, ki naj bi bil v epiteliju črevesja in s pomočjo katerega naj bi se peptidi aktivno transportirali skozi apikalno membrano preko H⁺ gradienta. Omenjeni transportni sistem pa omogoča le prenos di- in tripeptidov in zelo slabo oziroma v večini primerov ne prepozna oligopeptidov z več kot štirimi ostanki. Možne transportne poti za prenos oligopeptidov preko črevesnega epitelija so: paracelularna, tekočinsko fazna in adsorptivna transcitoza. Vloga vsake izmed naštetih poti pri prenosu posameznega peptida je različna zaradi različne velikosti molekul in zaradi razlik v drugih strukturnih lastnostih, kot je na primer hidrofobnost. Di- in tripeptidi, kot so številni ACE inhibitorji, lahko prehajajo skozi prebavila v zadostnem številu, da dosežejo periferna tarčna mesta. Po absorpciji v prebavnem traktu pa lahko serumske peptidaze dodatno hidrolizirajo peptidne vezi. Zatorej je odpornost na delovanje peptidaz predpogoj za doseg fiziološkega učinka biološko aktivnih peptidov/hidrolizatov po peroralni oziroma intravenski aplikaciji (Pihlanto in Korhonen, 2003).

2.6 TEHNIKE SEPARACIJE PEPTIDOV IN PROTEINOV

2.6.1 Obarjanje proteinov

Pri izolaciji proteinov največkrat uporabimo proces obarjanja (Lovšin in sod., 1996). Obarjanje lahko dosežemo s povišano koncentracijo soli, z dodatkom organskih topil ali z ustreznim uravnavanjem vrednosti pH, pri kateri je topnost proteina najmanjša (Cigić in Zelenik, 2004).

2.6.1.1 Reverzibilno obarjanje

Proteine lahko reverzibilno obarjamo na več načinov, odvisno od njihovih značilnosti. Aminokisliline, ki sestavljajo proteine, imajo na stranskih skupinah lahko kisle ali bazične skupine. Z izborom ustrezne vrednosti pH dosežemo, da je neto naboj proteina na površini enak nič. To vrednost pH imenujemo izoelektrična točka. Različni proteini imajo zaradi različne aminokislinske sestave različne izoelektrične točke. Topnost proteinov je pri izoelektrični točki najmanjša, saj med enako nabitimi deli površin molekul ni odboja. Obarjanje pri izoelektrični točki največkrat kombiniramo z obarjanjem pri veliki ionski jakosti.

Topnost proteinov v vodnih raztopinah je zelo odvisna od vrste in koncentracije soli oziroma od ionske jakosti raztopine. Splošno velja, da je pri majhnih koncentracijah soli topnost proteinov slabša, z višanjem koncentracije le-te, pa narašča. Razlike v topnosti proteinov, ki so posledica razlik v hidrofobnosti površine molekul, lahko izkoristimo za selektivno, frakcionirano obarjanje.

Proteine pa lahko reverzibilno obarjamo tudi z vodotopnimi organskimi topili kot so aceton, metanol ali etanol. Obarjanje proteinov v mešanici organskih topil in vode je posledica dejstva, da organsko topilo zmanjša dielektrično konstanto raztopine. Posledica so močnejše privlačne sile med nasprotno nabitimi deli molekul. Ker je hidratacijski plašč, ki ga tvori voda okoli proteinov, zaradi manjše aktivnosti vode tanjši, se lahko proteini povezujejo z nasprotno nabitimi površinami v agregate, ki se usedajo na dno (Abram in sod., 2006).

2.6.1.2 Ireverzibilno obarjanje proteinov

Zgoraj omenjene tehnike so primerne za reverzibilno obarjanje proteinov, ko le-ti ohranijo tridimenzionalno strukturo in aktivnost. Večkrat pa se uporablja tudi ireverzibilno obarjanje, ki poruši strukturo proteinov. Ireverzibilno obarjanje lahko uporabimo tudi v kombinaciji z reverzibilnim obarjanjem, na primer s termično obdelavo in dodajanjem amonijevega sulfata. Ko nastalo oborino raztopimo v pufru, bodo v raztopino prešli le tisti proteini, ki zaradi denaturacije niso izgubili nativne strukture. Primer ireverzibilnega obarjanja je tudi termična obdelava, v prvi vrsti za doseg mikrobiološke varnosti živil. Pri tem pa se denaturirajo proteini, ki jih posledično v prebavnem traktu lažje razgradimo.

Včasih je potrebno proteine kvantitativno izločiti iz raztopine, da bi lahko analizirali kakšno drugo komponento. Takrat lahko uporabimo različna organska topila ali trikloroacetno kislino. Posebej temeljito je obarjanje s trikloroacetno kislino, saj v tem primeru ostanejo v raztopini le manjši peptidi in proste aminokisliline. Z velikimi koncentracijami kislin in baz skoraj vedno denaturiramo proteine, vendar so lahko ti v nekaterih primerih relativno dobro topni, kljub denaturiranemu stanju, zato to ni najbolj primerna tehnika za kvantitativno obarjanje (Abram in sod., 2006).

2.6.2 Filtracija in ultrafiltracija

Filtriranje je tehnika, ki omogoči ločitev suspenzije v koncentrirano (filtracijsko pogačo) in razredčeno (filtrat) komponento. Membrane ločujejo molekulske vrste med seboj, tako da nekatere zadržujejo, druge pa prepuščajo. Z uporabo različnih membran lahko ločujemo delce različnih velikosti (Kogej, 1996). S postopkom filtracije ločimo oborjene ostanke velikih peptidov in oborjene peptide od kratkih peptidov, ki so ostali topni. Enak rezultat pa lahko dosežemo tudi s centrifugiranjem ali predhodnim obarjanjem. Tako ločujemo velike peptide od malih (Herraiz, 1997).

Ultrafiltracija je zanesljiva in preprosta metoda za ločevanje peptidov glede na njihovo molekulsko maso. Največkrat se uporablja za izolacijo mlečnih proteinov in za koncentriranje encimov. S to metodo iz raztopin odstranjujemo in ločujemo peptide različnih velikosti ter druge makromolekule, ki so še lahko prisotne v vzorcih, namenjenih analizi. Tako uporaba filtrov z manjšo velikostjo por (1000 Da) odstrani aminokislino in majhne peptide iz vzorcev, namenjenih analizi (Kogej, 1996).

2.6.3 Centrifugiranje

Centrifugiranje je postopek, s katerim pospešimo sedimentacijo oborjenih proteinov. Posebne ultracentrifuge pa lahko uporabimo tudi za separacijo makromolekul. Tehnika centrifugiranja temelji na dejstvu, da se delci z različno gostoto, obliko in velikostjo, različno hitro usedajo, ko na njih deluje centrifugalna sila. Med sedimentacijo delujejo na delce sile, ki so lahko nekaj stotisočkrat večje od zemeljskega gravitacijskega pospeška (g). Sila, ki deluje na delce v centrifugi, je definirana kot (Kogej, 1996):

$$F = m \cdot \omega^2 \cdot r$$

F predstavlja centrifugalno silo, m maso delca, na katerega deluje sila, r je razdalja delca od centra rotacije in ω kotna hitrost (rd/s). Produkt $\omega^2 \cdot r$ imenujemo tudi relativna centrifugalna sila (ang. RCF) in je odvisen tako od kotne hitrosti, kakor tudi od razdalje delca od središča vrtenja. RCF je tisti parameter, ki ga moramo poznati in nastaviti, preden začnemo centrifugirati določen vzorec. Hitrost, s katero se delci gibljejo proti dnu centrifugirke, imenujemo sedimentacijska hitrost. Definirana je kot premik molekul (dx) v smeri centrifugalne sile na enoto časa (dt) in je sorazmerna pospešku centrifugalne sile.

$$v = \frac{dx}{dt} = s \cdot \omega^2 \cdot r$$

Sedimentacijski koeficient (s) je odvisen od vrste makromolekul in se izraža s Svedbergovimi enotami (1 S = 10⁻¹³ sekund). Vrednost sedimentacijskega koeficienta narašča z relativno molekulsko maso in velikostjo molekul oziroma delcev, odvisna pa je tudi od oblike le-teh. Po končanem centrifugiranju dobimo običajno bistro raztopino, ki jo imenujemo supernatant, na dnu ostane sediment (Kogej, 1996).

2.7 METODE DOLOČANJA AKTIVNOSTI ANGIOTENZINSKE KONVERTAZE

2.7.1 Encimske metode določanja

V literaturi se za merjenje aktivnosti angiotenzinske konvertaze največkrat omenjata dve metodi, kateri se razlikujeta v samem eksperimentalnem delu in pa pri uporabi encimskih substratov. Metoda po Cushman-u in Chung-u (1971), ki sta jo modificirala Nakamura in Takano (1995), temelji na odcepitvi hipurne kisline od dodanega substrata HHL (hipur-L-histidil-L-levcin), ob prisotnosti ACE kot katalizatorja. Metoda po dodatku ACE zahteva 30 minutno inkubacijo reakcijske zmesi, nato pa z etil acetatom iz reakcijske zmesi ekstrahiramo vso nastalo hipurno kislino. Šele nato lahko vzorcu spektrofotometrično izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 228 nm (López-Fandiño in sod., 2006). Vendar je uporaba HHL manj smiselna glede na dejstvo, da razgradni produkt HHL, hipurna kislina, inhibira delovanje ACE v nekajkrat večjem obsegu, kot pa dipeptid glicilglicin (GG), ki nastane pri hidrolizi kromogenega substrata (Holmquist in sod., 1979). Višje koncentracije substrata (nad 1,6 mM) v testih niso priporočljive, saj v večji meri inhibirajo ACE. Samah in sod., (2006) navajajo, da uporabljene manjše koncentracije substrata v testih nekoliko izboljšujejo deviacijo rezultatov merjenja absorbance. Tudi mi smo uporabili koncentracijo, ki je opisana kot optimalna in je znašala 0,80 mM. Tudi po naših ugotovitvah je predstavljala optimalno izbiro glede na razpad substrata pri kontrolnem vzorcu.

Druga metoda, ki se prav tako pojavlja v literaturi (López-Fandiño in sod., 2006, Vermeirssen in sod., 2002, Pripp in sod., 2004) in smo jo tudi mi uporabili pri svojem delu, pa temelji na uporabi kromogenega substrata FAPGG (Furanoakrioloil-L-fenilalanilglicilglicin). Substrat FAPGG so prvotno sintetizirali za merjenje ACE aktivnosti v serumu. Spektroskopska metoda temelji na spremembi absorbance vzorca, merjene pri valovnih dolžinah med 328 in 352 nm. Spremembo absorbance povzroči razpad substrata FAPGG pod vplivom encima ACE na FAP (Furanoakrioloil-L-fenilalanin) in GG (glicilglicin). Pri obeh metodah je sprememba absorbance osnova za določitev aktivnosti ACE.

Obe metodi so raziskovalci večkrat testirali in primerjali. Samah in sodelavci (2006), Murray in sod. (2004) ter López-Fandiño in sod. (2006) ugotavljajo, da je metoda z uporabo FAPGG občutljivejša in cenejša. Za njeno izvedbo se porabi manj časa, saj metoda ne zajema ekstrahiranja hipurne kisline, porabi pa se tudi manj kemikalij. Končna produkta FAP in GG, ki nastajata pri tej encimski reakciji, ne inhibirata delovanja ACE. Iz hitrosti zmanjševanja absorbance pa enostavno določimo encimsko aktivnost. Prednost metode z FAPGG je tudi kromogeni substrat, ki je 100 % topen tudi pri večjih koncentracijah, je stabilnejši, njegova K_m vrednost pa je za faktor 8 manjša od vrednosti HHL substrata, kar pomeni, da je koncentracija substrata v testu osemkrat manjša, ko encimska reakcija doseže polovico maksimalne hitrosti. Z nižjo koncentracijo substrata v testu pa dosežemo tudi boljše linearnost izmerjenih vrednosti (Samah in sod., 2006).

2.7.2 Detekcijske metode za ugotavljanje ACE aktivnosti

Za ugotavljanje ACE aktivnosti se kot substrat največkrat uporabljajo različni krajši sintetizirani peptidi, ki so nadomestili naravne substrate, kot sta bila angiotenzin I in bradikinin. Ti umetni substrati so veliko bolj občutljivi za delovanje ACE, cenejši in izredno

specifični ter se ne razgrajujejo pod vplivom nekaterih drugih aminopeptidaz. Zato je s temi substrati veliko lažje in bolje spremljati hitrost encimske reakcije, kot pa z uporabo naravnih substratov. Ko ACE deluje na umetno sintetiziran substrat, ta razpade na specifične di- ali tripeptide, katerih koncentracija je lahko merljiva. V literaturi najdemo veliko metod, s katerimi lahko kvantificiramo ACE aktivnost. Vključujejo spektrofotometrične, fluorometrične, radiološke, tekočinsko kromatografske metode, ki jih uporabljamo za analizo in zbiranje informacij o inhibicijski aktivnosti različnih snovi na ACE. Vsaka od naštetih metod pa ima svoje zahteve (López-Fandiño in sod., 2006).

Spektrofotometrične metode uporabljamo za kvantitativno določanje snovi. Absorpcija svetlobe je spektroskopsko opredeljena kot proces, pri katerem preiskovana kemijska snov v mediju, propustnem za svetlobo, selektivno zmanjša jakost svetlobnega toka določene frekvence elektromagnetnega sevanja. Glede na zmanjšanje toka svetlobe določimo koncentracijo snovi v vzorcih. Metoda je preprosta in natančna, saj z absorbanco pri majhnih valovnih dolžinah (<220 nm) določimo npr. peptidne vezi in ostanke aminokislin v mejah detekcije pikomolov. Uporaba te metode ne uniči snovi v vzorcu (Herraiz, 1997).

Pri fluorometričnih metodah uporabljamo posebne substrate, kot sta na primer Z-Phe-His-Leu in Bz-Gly-His-Leu, ki ob delovanju ACE razpadeta na His-Leu, Bz-Gly in Z-Phe. Te produkte pa nato določimo z merjenjem fluorescence. Reakcijsko mešanico vzbujamo z elektromagnetnim sevanjem. Molekule to energijo absorbirajo in jo nato tudi oddajo v obliki fotonov z manjšo energijo, kot pa so jo sprejele z absorpcijo. Oddana energija je sorazmerna količini nastalih produktov (Rendina, 1971).

Pri izotopskih metodah uporabljamo substrate, ki vsebujejo določene markerje, najpogostejša sta elementa C^{14} in H^3 . Substrati, ki jih največkrat omenjajo pri laboratorijskem delu, so (1- C^{14} -Gly)-Hip-His-Leu, (p- H^3 -Bz)-Hip-Gly-Gly, (p- H^3 -Bz)Hip-His-Leu, (p- H^3 -Bz)-Phe-His-Leu, (p- H^3 -Bz)-Phe-Ala-Pro in (p- H^3 -Bz)-Pro-Phe-Arg (Ondetti in Cushman, 1982).

Hipurno kislino, ki nastane kot produkt encimske razgradnje substrata Hip-His-Leu ali Hip-Gly-Gly, pa lahko določimo tudi s pomočjo tekočinske kromatografije. Uporabimo pa lahko tudi kolorometrične metode, ki temeljijo na reakciji produkta, nastalega pri encimski reakciji in 2,4,6-triklorotriazina ali p-dimetilaminobenzaldehida. Dipeptidne reakcijske produkte pa nato določimo fluorometrično po reakciji s fluoroskaminom ali pa spektrofotometrično po reakciji z ninhidrinom (Ondetti in Cushman, 1982).

2.8 ACE INHIBITORNI BIOAKTIVNI PEPTIDI V HRANI TER METODE ZA NJIHOVO DOLOČANJE IN KARAKTERIZACIJO

V zadnjih petnajstih letih so bile na področju bioaktivnih peptidov v hrani opravljene številne raziskave ter vpeljane različne metode za določanje, karakterizacijo in izolacijo bioaktivnih peptidov. S pomočjo različnih tehnik so izolirali peptide s številnimi funkcionalnimi učinki, ki so jih tudi uspešno dokazali (Minervini in sod. 2003). Najpogosteje so proučevali peptide, ki so jih izolirali po *in vitro* ter *in vivo* prebavi in kemijsko sintetizirane peptide (Meisel, 2001). Posebej zanimivo področje predstavljajo peptidi z antihipertenzičnim učinkom. Ti inhibirajo delovanje angiotenzinske konvertaze v različnih človeških tkivih, s čimer vplivajo na uravnavanje krvnega tlaka.

Veliko število antihipertenzičnih peptidov so odkrili po *in vitro* prebavi mleka in mlečnih izdelkov, kot tudi v fermentiranem mleku. Minervini in sodelavci (2003) so mleko različnih vrst živali fermentirali s sevom *Lactobacillus helveticus* (Yamamoto in sod., 1994). Nastali peptidi, ki so jih izolirali na koloni z reverzno fazno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (RP-HPLC) in karakterizirali z masno spektroskopijo in UV detektorjem, so delovali antihipertenzično. Koncentracijo teh peptidov so določili z reagentom o-ftaldialdehidom (OPA). V članku sta objavljeni dve različni encimski metodi za merjenje ACE aktivnosti. Prva vključuje uporabo hipuril-L-histidil-L-levcina (HHL) kot substrata in je priredba metod, ki so jih opisali Nakamura in Takano (1995) ter Cushman in Cheung (1971). Drugo metodo so povzeli po Vermeirssen in sod. (2002), vključuje pa kromogeni substrat (FAPGG), ki ob prisotnosti ACE razpade. Pri obeh metodah so aktivnost ACE merili s pomočjo spektroskopske metode pri različnih valovnih dolžinah. Kot standardni inhibitor so v testu uporabili kaptopril. Obe encimski metodi za določanje inhibitorne aktivnosti peptidov na ACE sta bili publicirani že prej, omejitve in razlike pa so razdelali Samah in sod. (2006), Vermeirssen in sod. (2002). Poleg tega so v raziskavah ugotovili, da bioaktivni peptidi delujejo na ACE le v prisotnosti kloridnih ionov in v območju le določenih koncentracij teh bioaktivnih peptidov. Pod to mejo nimajo inhibitornih učinkov, nad mejo pa se inhibitorna aktivnost ne večja.

Quiros in sod. (2005) so ugotavljali za ACE inhibitorno aktivnost bioaktivnih peptidov v kefirju, pripravljenem iz kozjega mleka. Pri tem so prav tako uporabili RP-HPLC, masno spektroskopijo in metodo za določanje aktivnosti ACE, ki sta jo opisala Cushman in Cheung (1971). Lotili pa so se tudi postopka *in vitro* prebave sintetiziranih inhibitornih peptidov s pepsinom po metodi, ki so jo razvili Alting in sod. (1997). Pihlanto-Leppälä in sod. (2000) so z zgoraj opisanimi metodami analizirali sirotko po *in vitro* prebavi s tripsinom in himotripsinom. Kot vir ACE vsi omenjeni članki navajajo uporabo zajčjega pljučnega tkiva oziroma čistega encima proizvajalca Sigme, ki izboljša občutljivost metode. Poleg RP-HPLC pa so bile za separacijo in analizo bioaktivnih peptidov uporabljene tudi druge metode. Kot navaja Herraiz (1997), so največkrat uporabljene metode pri pripravi in analizi vzorcev za peptide iz hrane ultrafiltracija, masna in ionska kromatografija in selektivno obarjanje.

Za določanje koncentracije peptidov se avtorji največkrat poslužujejo metode z OPA reagentom. Za določanje koncentracije prostih amino skupin in stopnje hidrolize se uporablja tudi metoda, ki jo je opisal Adler-Nissen (1979). Metoda temelji na spektrofotometričnem merjenju produkta, ki nastane po reakciji prostih amino skupin s TNBS reagentom.

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1. KRATEK OPIS EKSPERIMENTALNEGA DELA

Eksperimentalno delo smo začeli z ekstrakcijo angiotenzinske konvertaze in vpeljavo metode za določanje inhibicije ACE. Kot standardni inhibitor smo uporabili kaptopril analitske čistote (Sigma). Kasneje smo z uporabo različnih starterskih kultur pripravili vzorce fermentiranega mleka. Vzorce fermentiranega mleka smo ustrezno oborili, filtrirali in centrifugirali in jim določili inhibitorno aktivnost na ACE. V raziskavo smo vključili tudi vzorce fermentiranega mleka, ki smo jih izpostavili delovanju simuliranega želodčnega in črevesnega soka ter tako *in vitro* simulirali prebavo in vzorce mleka, fermentiranega v bioreaktorju z uravnavanjem konstantne vrednosti pH.

3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE

- ACE analitske čistote 0,125 U/mL (Sigma GmbH, Nemčija) (Preglednica 2)
- Bidestilirana voda (BdH₂O)
- Boratni pufer 100 M, pH=8,3 (Preglednica 3)
- Boratni pufer 100 M s 5% v/v glicerola, pH 8,3 (Preglednica 4)
- Borna kislina (H₃BO₃) (Merck, Nemčija)
- Destilirana voda (dH₂O)
- Ekstrakt ACE iz zajčjih pljuč (Preglednica 5)
- Fosfatni pufer 0,213 M, pH=8,3 (Preglednica 6)
- Glicerol (C₃H₅(OH)₃) (Kemika, Hrvaška)
- Kalijev klorid (KCl) (Merck, Nemčija)
- Kaptopril analitske čistote (Sigma GmbH, Nemčija) (Preglednica 7)
- Klorovodikova kislina 0,1 M in 1 M (HCl) (Merck, Nemčija)
- Koncentrirana žveplova kislina (H₂SO₄) (Merck, Nemčija)
- Kromogeni substrat FAPGG (Sigma GmbH, Nemčija) (Preglednica 8)
- Levcin v prahu (Leu) (Sigma GmbH, Nemčija)
- Liofilizirano zajčje pljučno tkivo (vir ACE; Sigma GmbH, Nemčija)
- Mešanica žolčnih soli (Sigma GmbH, Nemčija)
- Natrijev dihidrogen fosfat (NaH₂PO₄) (Merck, Nemčija)
- Natrijev dodecil sulfat 10 % - SDS 10 % (v/v) (Sigma GmbH, Nemčija)
- Natrijev hidrogen karbonat (NaHCO₃) (Merck, Nemčija)
- Natrijev hidroksid 1 M in 4 M in 10 M (NaOH) (Merck, Nemčija)
- Natrijev klorid (NaCl) (Merck, Nemčija)
- Ocetna kislina 60 % (v/v) (CH₃COOH) (Merck, Nemčija)
- Pepsin v prahu (Sigma GmbH, Nemčija)
- Simuliran želodčni sok (Preglednica 9)
- Simuliran žolčni in pankreatični sok s pH 8 (Preglednica 10)
- Tablete bakrovega katalizatorja KJELTABS Cu / 3,5 (3,5 g K₂SO₄+ 0,4 g CuSO₄×5H₂O)
- Trinitrobenzensulfonska kislina 5 % (v/v) - TNBS 5 % (v/v) (Sigma GmbH, Nemčija)
- Zmes encimov pankreasa (Sigma GmbH, Nemčija)

Priprava reagentov:

Preglednica 2: Priprava ACE analitske čistote s koncentracijo 0,125 U/mL.

Sestavina	Količina
ACE analitske čistote (Sigma)	1 U
Boratni pufer s 5 % v/v glicerola, pH 8,3	8 mL

Preglednica 3: Sestava boratnega pufera s pH 8,3±0,1.

Sestavina	Količina
Borna kislina	0,618 g
Natrijev klorid	1,753 g
dH ₂ O	Dopolnimo do 100 ml

Pufu smo predhodno z 1 M NaOH in 0,1 M HCl uravnali vrednost pH na 8,3±0,1.

Preglednica 4: Sestava 100 mM boratnega pufera s 5 % (v/v) deležem glicerola.

Sestavina	Količina
Borna kislina	0,618 g
Glicerol	6,380 g
dH ₂ O	Dopolnimo do 100 ml

Pufu smo pred razredčitvijo z 1 M NaOH in 0,1 M HCl uravnali vrednost pH na 8,3±0,1.

Preglednica 5: Priprava ekstrakta ACE iz zajčjih pljuč.

Sestavina	Količina
Liofilizirano zajčje pljučno tkivo (vir ACE; Sigma)	0,53 g
Boratni pufer s 5 % v/v glicerola, pH 8,3	10 mL

Preglednica 6: Sestava 0,213 M fosfatnega pufera.

Sestavina	Količina
NaH ₂ PO ₄	16,57 mg
dH ₂ O	500 mL

Pufu smo pred razredčitvijo z 1 M NaOH in 0,1 M HCl uravnali vrednost pH na 8,3±0,1.

Preglednica 7: Priprava 1mM kaptoprila.

Sestavina	Količina
Kaptopril (Sigma)	2,30 mg
Boratni pufer 100 mM s pH 8,3	10,585 mL

Preglednica 8: Priprava 1,6 mM kromogenega substrata FAPGG.

Sestavina	Količina
FAPGG	6,390 mg
100 mM Boratni pufer pH 8,3	Dopolnimo do 10 ml

Preglednica 9: Sestava simuliranega želodčnega soka s pH 2 (Pripp, 2005).

Sestavina	Količina
NaCl	1,46 g
KCl	0,11 g
NaHCO ₃	0,80 g
dH ₂ O	do 200 mL
Pepsin v prahu (Sigma)	0,045 g

Žolčnemu soku smo pred razredčenjem do končnega volumna z 1 M NaOH oziroma 0,1 M HCl uravnali vrednost pH na $2,0 \pm 0,1$.

Preglednica 10: Sestava simuliranega žolčnega in pankreatičnega soka s pH 8 (Pripp, 2005).

Sestavina	Količina
Mešanica žolčnih soli (Sigma)	0,6 g
Zmes encimov pankreasa (Sigma)	0,2 g
dH ₂ O	Do 200 mL

Prebavni mešanici smo pred razredčenjem do končnega volumna z 1 M NaOH in 0,1 M HCl uravnali vrednost pH na $8,0 \pm 0,1$.

3.3 PRIBOR IN OPREMA

- Centrifuge (5415 C Eppendorf, Nemčija)
(Janetzki, Nemčija)
(Centric 332A, Tehtnica, Slovenija)
- Cepilne zanke
- Destilacijska enota (Distillation unit B-324 Büchi, Nemčija)
- Enota za razklop vzorcev (Digestion unit K.426 Büchi, Nemčija)
- Enota za odvod zdravju škodljivih hlapov (Schrubber Büchi, Nemčija)
- Filtrirni papir (Whatman 0,45 µm, Velika Britanija)
- Laboratorijski gorilnik
- Posnemalnik mleka
- Polistirenske in polipropilenske kivete
- Laboratorijski bioreaktor s pripadajočo kontrolno enoto in črpalkami za uravnavanje vrednosti pH
- Magnetno mešalo (550 M Tehtnica, Slovenija)
- Merilni valji (50, 100, 500, 1000 mL)
- Mikroepruvete (Eppendorf, Nemčija)
- pH meter (Mettler Toledo, Slovenija)
- pH meter (MA 5705 Iskra, Slovenija)
- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Spektrofotometer s pripadajočo računalniško enoto (Hewlett-Packard HP 8453, ZDA)
- Mešalo za epruvete (Vibromix 104 EV, Tehtnica, Slovenija)
(Vibromix 204 EV, Tehtnica, Slovenija)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf, Nemčija)
- Tehtnice (AT 201/A, Mettler Toledo, Nemčija)
(Exacta 2200 EB, Tehtnica, Slovenija)
(AX 250, Mettler Toledo, Nemčija)
- Ultrafiltracijski modul z ultrafiltrom (YC05 – 500 MW, Amicon, ZDA)
- Viskubator
- Vodna kopel (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- Jeklenka s tekočim dušikom (Apollo-Messer, Nemčija)

3.4 STARTERSKE KULTURE IN GOJIŠČA

- YC380 - liofilizirana starterska kultura za jogurt (CHR Hansen, Danska) sestavljena iz vrst *Streptococcus thermophilus* in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- TH4 – liofilizirana starterska kultura (CHR Hansen, Danska) sestavljena iz *Streptococcus thermophilus*
- K7 – *Lactobacillus gasserii* K7
- MRS BROTH gojišče (Oxoid, Velika Britanija) - pripravljeno gojišče (pH 6,2±0,2)
Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca: 52g gojišča smo raztopili v 1000 mL deionizirane vode in 15 min sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C.
- mleko

3.5 PRIPRAVA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA

3.5.1 Priprava mleka

Osnovna surovina za pripravo fermentiranega mleka je bilo sveže mleko, ki smo ga dobili v kmetijskem centru Jable. Do začetka dela smo ga hranili v ustrezni embalaži pri temperaturi 4 °C. Pred začetkom laboratorijskega dela smo mleko temperirali (50 °C) in delno posneli s posnemalnikom, kapacitete 1,5 L/min. Kemijsko sestavo tako pripravljene mleka so določili v Laboratoriju za mlekarstvo, Biotehniške fakultete (Preglednica 11).

Preglednica 11: Kemijska sestava mleka, uporabljenega pri fermentaciji.

Vzorec 1	Maščoba %	Proteini %	Laktoza %	Suha snov brez maščobe %
Meritev 1	1,36	3,52	4,84	9,09
Meritev 2	1,35	3,51	4,83	9,07
Meritev 3	1,36	3,50	4,83	9,06
Povprečje	1,36	3,51	4,83	9,07

Analiza je bila narejena z aparaturo Combi 6000.

Za izdelavo fermentiranega mleka smo uporabili 12 L posnetega mleka. Po 2 L mleka smo nalili v viskubatorske posode in ga pasterizirali v viskubatorju (10 min, 90 °C). Mleko smo nato ohladili na 42 °C in izmerili vrednost pH.

3.5.2 Priprava inokuluma bakterijske kulture *Lactobacillus gasseri* K7

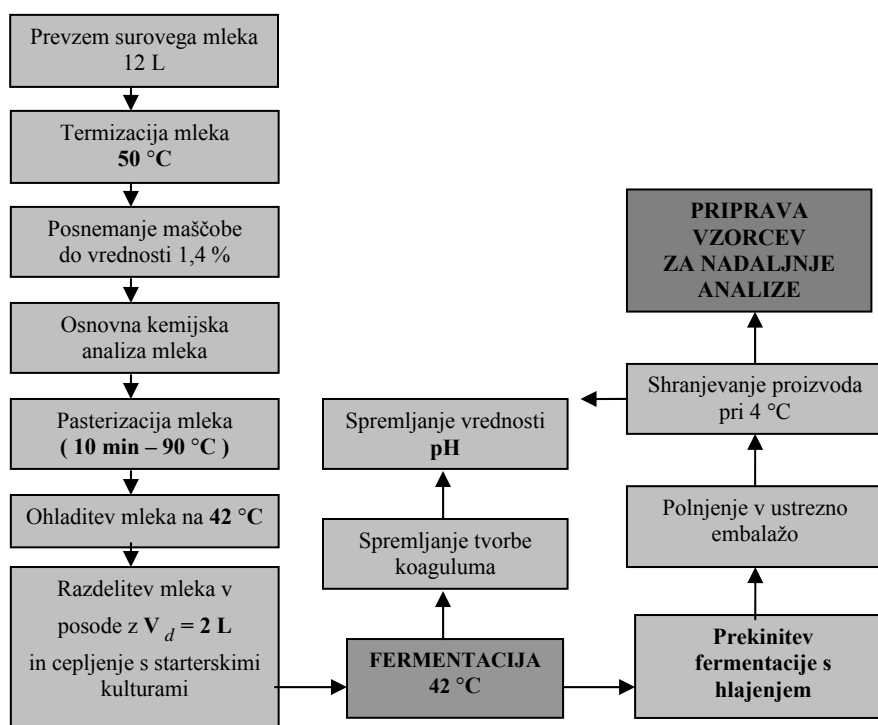
Lactobacillus gasseri K7 smo nacepili v 5 mL tekočega gojišča MRS in inkubirali 18 ur pri temperaturi 37 °C. 18-urno kulturo, ki je vsebovala 5×10^7 cfu/mL, smo centrifugirali in odlili supernatant. Sedimentu smo dodali manjšo količino pasteriziranega mleka in dobro premešali. Tako pripravljene kulture smo nato dodali v fermentacijske posode k preostalemu mleku (Preglednici 12 in 13).

3.5.3 Postopek klasične fermentacije mleka z različnimi starterskimi kulturami

Po pasterizaciji smo v ohlajeno mleko nacepili starterske kulture. Liofilizirane starterske kulture YC380 in TH4 smo najprej raztopili v nekaj mL mleka ter jih dolili k preostalemu mleku v fermentacijskih posodah (Preglednici 12 in 13). Dodali smo po 0,05g liofiliziranih kultur na 2 L mleka, razen kulture *Lactobacillus gasseri* K7, ki smo jo dodajali kot suspenzijo. Med fermentacijo smo vzorcem merili pH in opazovali nastajanje koaguluma. Viskubatorske posode smo po sedmih urah postavili v ledeno kopel ter s hlajenjem vsebine (20 °C) zaustavili fermentacijo. Ohlajeno fermentirano mleko smo dobro premešali, prelili v sterilno plastično embalažo ter ustrezno zapakirali s termofolijo. Vzorce fermentiranega mleka smo nato ustrezno označili in jih shranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C do nadaljnje uporabe (Slika 2).

Preglednica 12: Vzorci mleka z dodanimi starterskimi kulturami pri klasični izdelavi fermentiranega mleka.

Vzorec	Dodana starterska kultura Vd viskubatorske posode = 2 L	Oblika dodane kulture		
Vzorec : YC380				
YC380	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,025 %	0,05 g	Liofilizat
Vzorec : YC380-TH4				
YC380	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,025 %	0,05 g	Liofilizat
TH4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,025 %	0,05 g	Liofilizat
Vzorec : YC380-K7				
YC380	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,025 %	0,05 g	Liofilizat
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	1 %	20 ml	Suspenzija
Vzorec : TH4-K7				
TH4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,025 %	0,05 g	Liofilizat
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	1 %	20 mL	Suspenzija
Vzorec : YC380-TH4-K7				
YC380	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,025 %	0,05 g	Liofilizat
TH4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,025 %	0,05 g	Liofilizat
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	1 %	20 mL	Suspenzija
Vzorec : TH4				
TH4	<i>Streptococcus thermophilus</i>	0,025 %	0,05 g	Liofilizat



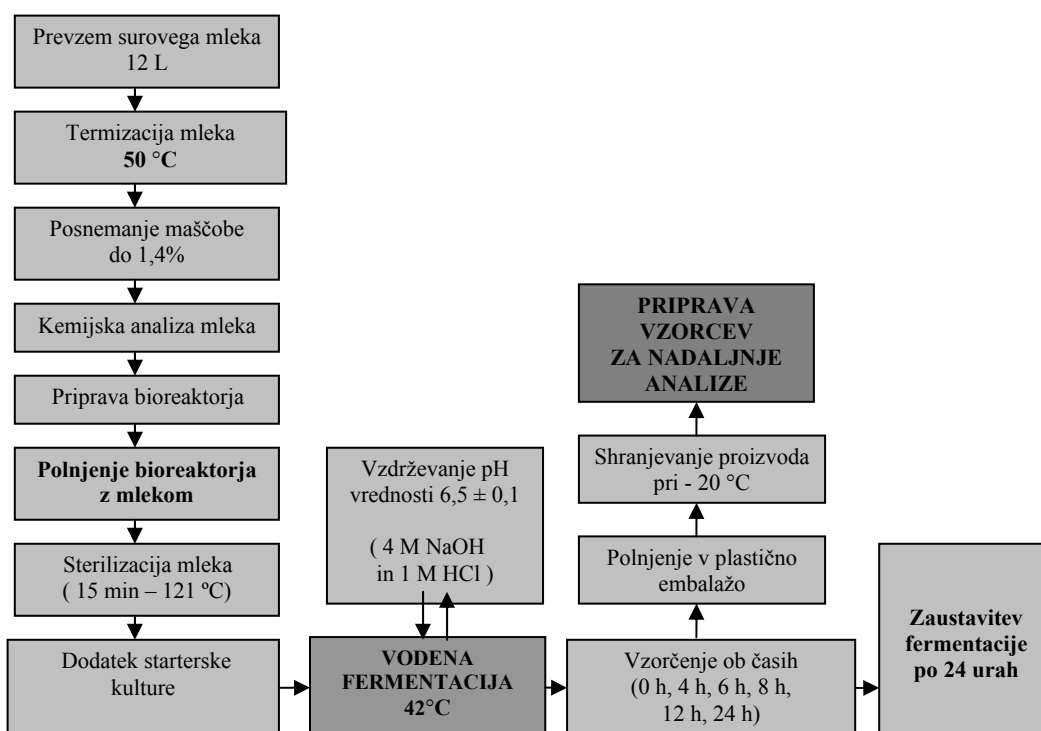
Slika 2: Blokovni diagram tehnološkega procesa izdelave fermentiranega mleka z različnimi starterskimi kulturami v viskubatorju (klasična fermentacija)

3.5.4 Postopek fermentacije mleka v bioreaktorju z uravnavanjem konstantne vrednosti pH

Fermentacijo mleka z uravnavanjem konstantne vrednosti pH smo izvedli v laboratorijskem bioreaktorju (slika 3). Bioreaktor smo sestavili, priključili kontrolno enoto ter sterilizirali vse nastavke za dodajanje in odvzemanje vzorcev. Po umeritvi pH elektrode smo bioreaktor napolnili z delno posnetim mlekom. Sledila je sterilizacija mleka v bioreaktorju (121 °C, 15 min, 1,1 bar, mešalo 400 obratov/min). Mleko smo po končani sterilizaciji ohladili na temperaturo 42 °C in cepili s starterskimi kulturami (preglednica 13). Fermentacijo smo izpeljali pri temperaturi 42 °C, vrednosti pH 6,5±0,1 in mešanju 200 obratov/min. Pogoje fermentacije je uravnavala kontrolna enota. Za vzdrževanje vrednosti pH smo uporabljali 4 M NaOH oziroma 1 M HCl. Med 24-urno fermentacijo smo odvzeli vzorce ob časih 0, 4, 6, 8, 12 in 24 ur.

Preglednica 13: Dodane starterske kulture pri fermentaciji z uravnavano konstantno vrednostjo pH.

Vzorec	Dodana bakterijska kultura v vzorce mleka Vd bioreaktorja = 2L	Dodane kulture (%)	dodatek kulture	Oblika dodane kulture
Vzorec : YC380 B				
YC380	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,025	0,05 g	Liofilizat
Vzorec : YC380-K7 B				
YC380	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,025	0,05 g	Liofilizat
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7	1	20 mL	Suspenzija



Slika 3: Blokovni diagram vodene fermentacijskega procesa v bioreaktorju s konstantno vrednostjo pH

3.5.5 Shranjevanje vzorcev

Vzorci fermentiranega mleka, ki smo jih odvzeli med fermentacijskim procesom, smo shranjevali v zaprti plastični embalaži. Vzorce mleka iz viskubatorja smo pet dni po fermentaciji shranjevali v hladilniku pri temperaturi 4 °C in jih nato prestavili na -20 °C. Shranjevanje vzorcev pri temperaturi 4 °C je omogočalo počasno delovanje bakterijskih proteinaz, ki so tako še dodatno prispevale k povečanju koncentracije kratkih peptidov. Vzorce mleka, fermentiranega pri konstantni vrednosti pH v bioreaktorju, pa so bili takoj po odvzemu shranjeni v zmrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Pri -20 °C smo do analize hranili tudi filtrate vzorcev.

3.6 PRIPRAVA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA PRED ANALIZAMI

Pri analizi vzorcev smo se osredotočali na proteinski del, saj smo v vzorcih iskali kratke peptide z inhibitorno aktivnostjo za ACE. Vzorce, ki smo jih odvzeli med in po končani fermentaciji, smo morali zato ustrezno pripraviti.

3.6.1 Postopek obarjanja in filtracije

Eden izmed postopkov priprave vzorcev za nadaljnje analize je bilo obarjanje. Obarjanje smo izvedli tako, da smo vzorcu fermentiranega mleka dodali očetno kislino (60 % v/v) v razmerju 50:15. V trenutku je v vzorcih nastala bela oborina. Vzorec smo dobro premešali s stekleno palčko, ga pustili stati 15 minut na sobni temperaturi in filtrirali preko filter papirja (Whatman filter – 0,45 µm). Tako smo oborili vse večje peptide, majhni pa so ostali topni. Dobljeni filtrati so bili rahlo rumenkaste barve.

3.6.2 Uravnavanje vrednosti pH

Filtratom vzorcev smo uravnali vrednost pH na 8,0. Vrednost pH smo uravnavali z 10 M NaOH oziroma 1 M HCl, ki smo jo filtratom dodajali po kapljicah. Med dodajanjem je bil vzorec vseskozi na magnetnem mešalu. Po uravnavanju vrednosti pH smo v nekaterih filtratih ponovno opazili motnost, zato smo jih centrifugirali (5 minut pri 10.000 obratih/min). Vzorce so bili tako pripravljene za analizo.

3.6.3 Ultrafiltracija

Za ultrafiltracijo smo uporabljali filter YC05 (500 MW, Amicon), ki smo ga pred vsako filtracijo ustrezno pripravili. Pred prvo uporabo smo membrano z gladko stranjo navzdol potopili v destilirano vodo in jo v njej pustili eno uro. Destilirano vodo smo medtem zamenjali vsaj trikrat in membrano tako rehidrirali in pripravili za ultrafiltracijo. Nato smo jo namestili v ultrafiltracijski modul na magnetnem mešalu, vanj nalili filtrat, sestavili modul in ga priključili na nadtlak dušika, ki je znašal 35 barov. Ultrafiltracija je potekala pri temperaturi 4 °C. Ultrafiltrirane vzorce smo do nadaljnjih analiz shranili pri -20 °C. Membrano za ultrafiltracijo smo med analizami shranjevali po navodilih proizvajalca v 10 % etanolni raztopini pri temperaturi 0 °C.

3.7 DOLOČANJE VSEBNOSTI PROTEINOV S KJELDAHLOVO METODO

Kjeldahlova metoda omogoča določanje proteinov glede na prisotnost dušika v vzorcu (ob upoštevanju, da je ves dušik, prisoten v živilu, proteinski). Vzorce razgradimo z mokrim sežigom. Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostimo NH_3 , ki ga lovimo v prebitek borne kisline in nato titriramo amonijev borat s standardno raztopino klorovodikove kisline. Za preračunavanje dušika (N, %) v proteine (%) uporabljamo ustrezne faktorje F.

$$\text{Proteini (\%)} = \text{N} \times \text{F}$$

Faktor za mlečne izdelke: $\text{F} = 6,38$

Predhodno oborjene in filtrirane vzorce fermentiranega mleka smo najprej razgradili z mokrim sežigom (s pomočjo H_2SO_4 , katalizatorja in visoke temperature). V sežigno epruveto smo odpipetirali 5 mL vzorca, dodali 2 tableti bakrovega katalizatorja in 20 mL koncentrirane H_2SO_4 . Epruvete smo postavili v stojala in jih pokrili s steklenimi zvonovi. Vse skupaj smo postavili v ogreto enoto za razklop ($T = 370 \text{ }^\circ\text{C}$). Z vodno črpalko smo odvajali zdravju škodljive hlape. Vzorce v epruvetah smo po enournem sežigu ohladili na sobno temperaturo. Vsako epruveto smo nato posamično postavili v destilacijsko enoto, kjer se je vanjo avtomatsko dodalo 50 mL destilirane vode in 70 mL 10 M NaOH. Nato smo na destilacijsko enoto priključili še destilacijsko predložko, v katero se je avtomatsko dodalo 60 mL borne kisline H_3BO_4 , nakar smo začeli s 4 minutnim uvajanjem pare v epruveto. Pri destilaciji smo pare, ki vsebujejo NH_3 oziroma destilat, lovili v destilacijsko predložko z nasičeno borno kislino. Po končani destilaciji smo zavrgli vsebino epruvete, uporabili smo le raztopino nastalega amonijevega borata v predložki. To smo titrirali z 0,1 M HCl do vrednosti pH 4,65. Titracija je potekla avtomatsko po vnosu zatehtanega vzorca v kontrolno enoto. Ob koncu titracije smo zabeležili porabo kisline, iz katere smo izračunali delež dušika in posledično delež proteinov v vzorcu.

3.8 DOLOČANJE PROSTIH AMINO SKUPIN S TRINITROBENZENSULFONSKO KISLINO (TNBS METODA)

Za določanje koncentracije prostih amino skupin v vzorcih smo uporabili modificirano metodo po Okuyama in Satake (1966). Reakcija temelji na 2,4,6-trinitrobenzensulfonski kislini, ki reagira s prostimi amino skupinami v oranžni trinitrofenilni (TNP) derivat z maksimalno absorpcijo pri 340 nm. Pri vrednosti pH 1,0 je ta rumene barve. TNP derivat reagira tudi s sulfitom v bazičnem mediju, kjer nastane stabilni TNP-sulfitni kompleks z maksimalno absorpcijo pri 420 nm. TNBS ne reagira z NH_3 in ureo, zato je zelo primeren za določanje amino skupin v vodnih raztopinah proteinov (Goodwin-Jesse in Choi, 1970). V epruvete smo dodajali po 50 μL predhodno oborjenih in filtriranih vzorcev fermentiranega mleka, 400 μL fosfatnega pufra (0,2125 M, pH $8,0 \pm 0,02$), 300 μL raztopine TNBS (0,1 % v/v) in 100 μL SDS (1 % v/v). Epruvete smo zaprli ter jih postavili v stresalno vodno kopel ($50 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 min). Kopel smo pokrili z aluminjasto folijo, da smo se izognili vplivu svetlobe. Reakcijo smo končali po eni uri z dodatkom 800 μL HCl (0,1 M), sledilo je 30 minutno ohlajanje vzorcev na sobno temperaturo. Reakcijski mešanici smo nato v polistirenskih kivetah izmerili absorbanco pri 340 nm in $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ter s pomočjo umeritvene krivulje (slika 5)

določili koncentracijo prostih amino skupin. Pri kontrolnem poskusu smo namesto predpripravljenih vzorcev fermentiranega mleka uporabili 1% (v/v) raztopino SDS.

3.8.1 Izdelava umeritvene krivulje

V 1 % (v/v) SDS smo dodali levcin v prahu, da smo dobili ustrezne koncentracije levcina v raztopini. Za umeritveno krivuljo smo pripravili raztopine levcina kot je prikazano v preglednici 14. Koncentracija levcina je sorazmerna vrednosti absorbance trinitrofenilnega (TNP) derivata, ki nastane med reakcijo prostih amino skupin s TNBS. Umeritvena krivulja za standard levcin, ki nam je služila za določanje koncentracije prostih amino skupin v vzorcih, je prikazana na sliki 5.

Preglednica 14: Koncentracije raztopin levcina in volumni dodanih reagentov, uporabljeni pri izdelavi umeritvene krivulje.

	Koncentracija levcina v 50 μ L dodane raztopine (M)	Volumen (μ L) Na-dodecil sulfata (1 % v/v)	Volumen (μ L) fosfatnega pufra (0,2125 M)	Volumen (μ L) HCl (0,1 M)	Volumen (μ L) TNBS (0,1 % v/v)	Koncentracija levcina v reakcijski mešanici (μ M)
1.	$2,5 \times 10^{-4}$	100	400	800	300	7,6
2.	$5,0 \times 10^{-4}$	100	400	800	300	15,2
3.	$7,5 \times 10^{-4}$	100	400	800	300	22,7
4.	$1,0 \times 10^{-3}$	100	400	800	300	30,3
5.	$1,25 \times 10^{-3}$	100	400	800	300	37,9
6.	$1,5 \times 10^{-3}$	100	400	800	300	45,5
7.	$1,75 \times 10^{-3}$	100	400	800	300	53,0
8.	$2,0 \times 10^{-3}$	100	400	800	300	60,6
9.	$2,25 \times 10^{-3}$	100	400	800	300	68,2
10.	$2,5 \times 10^{-3}$	100	400	800	300	75,8

3.9 EKSTRAKCIJA ACE IZ PRAHU ZAJČJEGA PLJUČNEGA TKIVA

Pri delu smo uporabili metodo po Cushman-u in Cheung-u (1971) ter jo sami nekoliko modificirali. Prah in koščke pljučnega tkiva (Sigma) smo do pričetka ekstrahiranja shranjevali v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koščke ($\approx 0,5\text{ g}$) in nekaj prahu pljučnega tkiva smo dodali v 10 mL 100 mM boratnega pufra. Puffer je imel vrednost pH 8,2 in je vseboval 5 % (v/v) glicerola. Ekstrakcija je potekala čez noč na magnetnem mešalu pri temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobljeni ekstrakt smo nato 30 minut centrifugirali pri 40.000 obratih/min. Supernatant, ki smo ga dobili, smo do nadaljnje uporabe shranili v zmrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bil je bister in rahlo rjavkaste barve.

3.10 MERJENJE AKTIVNOSTI ENCIMA ACE

V reakcijski mešanici smo kot substrat uporabili 1,6 mM FAPGG, raztopljen v 100 mM boratnem pufri z vrednostjo pH 8,3. Kot vir ACE smo v začetnih poskusih uporabili ekstrakt liofiliziranih zajčjih pljuč (Sigma), kasneje pa ACE analitske čistote (Sigma). Absorbance smo merili s spektrofotometrom (Hewlett-Packard) pri valovni dolžini svetlobe 340 nm v polistirenskih kivetah. Pri temperaturi merilne celice $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo kinetiko vsakega vzorca merili 10-15 minut, merjenja pa smo ponavljali na 20 sekund.

Za umerjanje spektrofotometra pred analizo smo uporabili 100 mM boratni pufer. V kiveto smo odpipetirali kromogeni substrat FAPGG in boratni pufer (preglednica 15). Pri merjenju inhibitorne aktivnosti pa smo dodali še vzorec fermentiranega mleka oziroma kaptoprila (preglednica 17). Kiveto smo dobro pretresli in jo vstavili v merilno celico. Po dvominutnem temperiranju vzorca smo začeli z merjenjem absorbance. Po sedmih minutah smo dodali ekstrakt ACE, ponovno premešali vsebino kivete in nadaljevali z merjenjem nadaljnjih 10-15 minut.

Preglednica 15: Sestava reakcijske zmesi za merjenje ACE aktivnosti (vir encima je ekstrakt liofiliziranih zajčjih pljuč).

Vzorec	1	2	3	4	5
Boratni pufer	600	500	400	300	200
Substrat FAPGG	100	200	300	400	500
Ekstrakt ACE	100	100	100	100	100

Pri uporabi ekstrakta zajčjih pljuč nismo ugotovili ACE aktivnosti, zato smo se v kasnejših poskusih odločili za uporabo ACE analitske čistote (Sigma). Encim smo med testi shranjevali pri 4 °C in na ledeni kopeli. Volumska razmerja raztopin, uporabljenih za merjenje aktivnosti ACE, so predstavljena v preglednici 16. V test smo dodajali 35 µL encima s koncentracijo 0,125 U/mL.

3.10.1 Določanje kinetike rgradnje substrata FAPGG z ACE

Pri določanju K_m encimske reakcije smo merili absorbanco reakcijskim zmesem po postopku, ki je opisan pod točko 3.10. Uporabili smo ACE analitske čistote, razmerja uporabljenega boratnega pufera in substrata FAPGG pa so prikazana v spodnji preglednici.

Preglednica 16: Sestava reakcijske zmesi za merjenje K_m encima.

Vzorec	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Boratni pufer (100 mM)	715	695	670	650	600	550	450	350	250
FAPGG (1,6 mM)	50	70	95	115	165	215	315	415	515
ACE (0,125 U/mL)	35	35	35	35	35	35	35	35	35

3.10.2 Spektrofotometrično merjenje inhibitorne aktivnosti

3.10.2.1 Inhibitorna aktivnost kaptoprila

Standardnemu inhibitorju ACE kaptoprilu smo preverili aktivnost. Postopek dela je enak merjenju aktivnosti ACE pod točko 3.10, z izjemo dodajanja 10 nM kaptoprila. Razmerja dodanega boratnega pufera, substrata FAPGG, ACE in kaptoprila, so predstavljena v preglednici 17.

Preglednica 17: Sestava reakcijske zmesi za merjenje ACE aktivnosti ob prisotnosti 10 nM kaptoprila.

Vzorec	1	2	3	4	5
Boratni pufer (100 mM)	325	350	340	345	355
Substrat FAPGG (1,6 mM)	400	400	400	400	400
Čisti encim ACE (0,125 U/mL)	35	35	35	35	35
Kaptopril (10 nM)	40	35	25	20	10

Ob dodatku encima v vzorec se je substrat razgrajeval in absorbanca se je zaradi tega v odvisnosti od časa linearno zmanjševala. Kasnejši dodatek inhibitorja pa je naklon regresijske premice izmerjenih absorbanc zmanjšal.

3.10.2.2 Inhibitorna aktivnost vzorcev fermentiranega mleka

Po natančno določenih parametrih in zagotovitvi dovolj dobre ponovljivosti merjenja reakcije razgradnje substrata FAPGG z ACE ter stopnje inhibicije s kaptoprilom smo začeli s preskušanjem inhibitorne aktivnosti vzorcev fermentiranega mleka po spodaj opisanem postopku.

Pri vsakem merjenju smo v PS kiveto odpipetirali 400 μL 1,6 mM sveže pripravljenega substrata FAPGG. Boratni pufer in vzorec, v katerem smo ugotavljali prisotnost peptidnih inhibitorjev ACE, smo dodajali v različnih razmerjih, a vedno v skupnem volumnu 365 μL . Reakcijsko zmes smo nato dobro premešali, kiveto vstavili v merilni modul spektrofotometra, počakali 2 minuti in začeli z merjenjem absorbance. Po sedmih minutah smo dodali še 35 μL ACE (0,125 U/mL). Vzorec smo ponovno pretresli in nadaljevali z merjenjem. Kinetiko vsakega vzorca smo spremljali 20-30 minut, spremembo absorbance v vzorcu pa merili v intervalih 20 sekund pri temperaturi 25 °C in valovni dolžini svetlobe 340 nm.

3.10.2.3 Maksimalna encimska aktivnost

Ker se je aktivnost encima tekom dneva zmanjševala, smo maksimalno encimsko aktivnost določali večkrat dnevno. Reakcijski mešanici smo dodali le boratni pufer, kromogeni substrat FAPGG in encim. Inhibitorja oziroma vzorca fermentiranega mleka nismo dodajali. Količina dodanega substrata je znašala 400 μL , boratnega pufra pa 365 μL . Po inkubaciji smo dodali še 35 μL encima in spremljali razgradnjo substrata. Podatke smo kasneje uporabili za preračunavanje maksimalne aktivnosti encima oziroma za izračun odstotka inhibicije ACE glede na maksimalno aktivnost encima med dnevno uporabo.

3.11 POSTOPEK SIMULACIJE PREBAVE *IN VITRO*

Ker smo želeli preveriti ali med prebavo fermentiranega mleka nastanejo peptidi, ki inhibirajo ACE, smo vzorce YC380 K7, YC380 in UHT izpostavili simuliranim pogojem *in vitro* prebave. Vzorcem smo simulirani želodčni in pankreatični sok dodajali v količinah, predstavljenih v preglednici 18. Želodčni sok smo pripravili tako, da smo v 150 mL destilirane vode zatehtali 1,46 g NaCl, 0,11 g KCl, 0,8 g NaHCO₃ in dodali še 0,045 g pepsina. Vrednost pH smo uravnali z 1 M HCl oziroma 0,1 M NaOH do pH 2 (Preglednica 9). Rastopino smo do 200 mL dopolnili z destilirano vodo. Vzorce smo pustili 15 minut pri temperaturi 37 °C, nakar smo začeli z dodajanjem soka pankreasa. Pankreasni sok s pH 8,0 smo pripravili tako, da smo v 150 mL destilirane vode dodali 0,6 g mešanice žolčnih soli (Sigma) in 0,2 g pankreatina (Sigma) (Preglednica 10). Pankreatin je komercialno pripravljena zmes encimov pankreasa.

Preglednica 18: Razmerja med prebavnimi encimi in vzorci fermentiranega in UHT mleka v testih *in vitro* simulacije prebave.

Vzorec : želodčni sok	2 : 1	1 : 2	1 : 1
Vzorec YC380-K7	20 mL	10 mL	10 mL
Želodčni sok	10 mL	20 mL	10 mL
Vzorec YC380	20 mL	10 mL	10 mL
Želodčni sok	10 mL	20 mL	10 mL
Mleko UHT	/	10 mL	10 mL
Želodčni sok	/	20 mL	10 mL
Dodatek pankreasnega soka je bil vedno 10 mL			

Vzorci so nato pustili 30 minut v vodni kopeli pri 37 °C. Sledilo je obarjanje z očetno kislino (60% v/v) v razmerju 50:15, filtracija, uravnavanje vrednosti pH na 7 (10 M NaOH oziroma 1 M HCl) in centrifugiranje (5 minut pri 10.000 obratih/min). Vzorci so bili tako pripravljene za nadaljnje analize. Do analize smo jih hranili pri -20 °C.

4 REZULTATI

4.1 OPAŽANJA IN TEŽAVE PRI LABORATORIJSKEM DELU

Pri predpripravi in vpeljavi metode za ugotavljanje inhibitorne aktivnosti vzorcev fermentiranega mleka za ACE smo naleteli na številne težave.

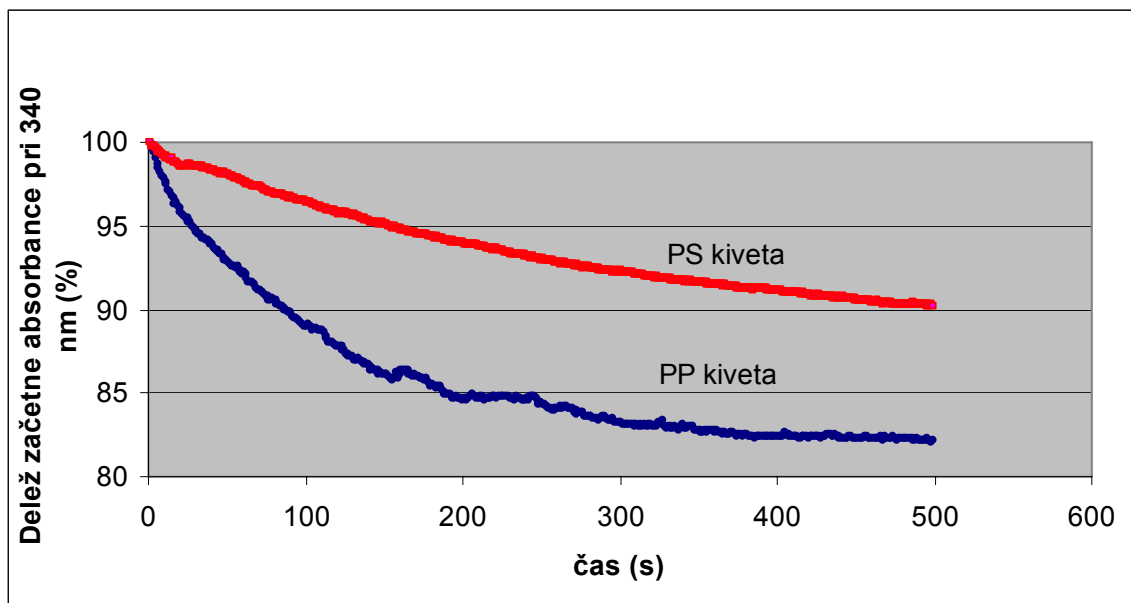
Prvotno smo ACE ekstrahirali iz preparata zajčjih pljuč (Sigma). Dobljena vsebina naročenega materiala pa ni vsebovala le prahu, kot je bilo navedeno na specifikaciji (Lung acetone powder from rabbit), temveč tudi koščke posušenega pljučnega tkiva. Za ekstrakcijo smo uporabili postopek, opisan pod točko 3.9, ki ga kot učinkovitega navajajo Cushman in Cheung (1971), Leclerc in sod. (2002), Vermeirssen in sod. (2002) in Minervini in sod. (2003). Vendar pa so se naše ugotovitve v zvezi z ekstrakcijo močno razlikovale od tistih, ki so navedene v literaturi. Po končani ekstrakciji je bila barva dobljenega ekstrakta svetlo rumena in ne vinsko rdeča, kot so zapisali v člankih zgoraj omenjeni avtorji. Poleg tega v dobljenem ekstraktu po dodatku kromogenega substrata FAPGG in boratnega pufra s pH 8,3 nismo določili encimske aktivnosti.

Menili smo, da je v ekstraktu encim prisoten in da encimska reakcija ne poteče zaradi pomanjkanja aktivatorjev encimskega procesa. Zato smo mešanici poleg boratnega pufra, dodali še kloridne ione v koncentraciji 300 mM/L. Kljub dodanim aktivatorjem v ekstraktu nismo ugotovili encimske aktivnosti. Postopek ekstrakcije smo še nekajkrat ponovili z novim vzorcem liofiliziranih zajčjih pljuč, podaljšali smo tudi čas ekstrakcije, vendar so bili rezultati vedno negativni.

Zaključili smo, da je bila ekstrakcija angiotenzinske konvertaze neuspešna oziroma, da uporabljen preparat ni vseboval zadostnih količin ACE.

Ker ekstrakcija ni uspela, smo za nadaljnje analize uporabili ACE analitske čistote (Sigma) z aktivnostjo 1 U. Pred analizami smo encim ustrezno razredčili, celotno količino pa razdelili na manjše volumne (500 μ L z aktivnostjo 0,125 U/mL) in jih shranili pri temperaturi -20 °C. V predposkusih smo opazili, da aktivnost ACE na sobni temperaturi pada, saj se je po nekaj urah zmanjšala kar za 20 %. Zato smo v nadaljevanju med analizami encim shranjevali v ledeni kopeli v hladilniku. Tako smo dosegli boljšo stabilnost encima. Kljub temu smo med analizami vzorcev vedno večkrat izmerili začetno maksimalno aktivnost ACE. Dobljene vrednosti smo uporabili pri izračunu inhibicije ACE z različnimi vzorci fermentiranega mleka.

Težave nam je povzročala tudi stabilnost kromogenega substrata. Ugotovili smo, da je substrat zelo nestabilen in se je v reakcijski zmesi razgrajeval že pred dodatkom ACE. Hidroliza substrata je bila fotokemično aktivirana. V polistirenskih kivetah (PS), ki slabo prepuščajo UV svetlobo, je bila hitrost hidrolize manjša kot v polipropilenskih (PP), ki prepuščajo tudi svetlobo krajših valovnih dolžin (slika 4). Stabilnost substrata smo izboljšali tudi s tem, da nismo merili absorbance na vsako sekundo, ampak na vsakih 20 s. Zaslونka med žarnico in kiveto je bila med meritvami zaprta.



Slika 4: Razpad kromogenega substrata FAPGG pod vplivom svetlobe v PP in PS kivetah pri neprekinjeni osvetljenosti, temperaturi 25 °C, valovni dolžini 340 nm in 0,8 mM koncentraciji substrata v reakcijski mešanici

Pri testiranju stabilnosti substrata smo uporabili kromogeni substrat, katerega koncentracija je v reakcijski mešanici znašala 0,8 mM. Glede na navedbe Samah in sod., (2006) in Murray in sod., (2004) smo z uporabo te koncentracije FAPGG nekoliko znižali razgradnjo substrata pod vplivom svetlobe (prikazano na sliki 4).

Prav tako pa smo pri spektrofotometričnih meritvah obračali kiveto in tako skrajšali pot žarka za 4 mm. Pri določanju K_m smo namreč ugotovili, da je pri običajni postavitvi kivete absorbanca vzorcev prevelika (nad 1,5) in ne daje linearne korelacije s količino substrata v testu. S skrajšanjem poti žarka preko medija v kiveti smo dobili boljše rezultate glede absorbance in količine razpadlega substrata v testih. Vrednost absorbance smo s tem nekoliko zmanjšali. Preizkušali smo različne načine in pogoje merjenja aktivnosti ACE, dokler nismo uvedli postopka, ki je dajal najboljše rezultate in je predstavljen pod točko 3.10.

Do zapletov pa je prišlo tudi pri določanju vsebnosti proteinov v vseh vzorcih s Kjeldahlovo analizo. Po standardnem protokolu se za določanje uporablja vzorce z volumnom 10 mL in tako smo postopali tudi pri naših analizah. Vzorci so se pri razklopu na temperaturi 370 °C penili, nekaj vsebine pa nam je ušlo iz razklopnih epruвет. Postopek smo ponovili z nekoliko počasnejšim segrevanjem, vendar je bil rezultat enak. Šele ko smo zmanjšali količino vzorcev na 5 mL in jih segrevali zelo počasi do temperature razklopa, smo uspeli izvesti analizo. Tudi tu smo opazili penjenje in nekoliko več črnih oborin, kot jih nastaja običajno, vendar smo postopek izpeljali brez zapletov.

4.2 FERMENTACIJA VZORCEV

Potek fermentacije vzorcev mleka, cepljenih z različnimi starterskimi kulturami, smo spremljali z merjenjem vrednosti pH. Rezultati meritev so prikazani v preglednici 19.

Preglednica 19 : Vrednosti pH posameznih vzorcev mleka med klasično fermentacijo v viskubatorju.

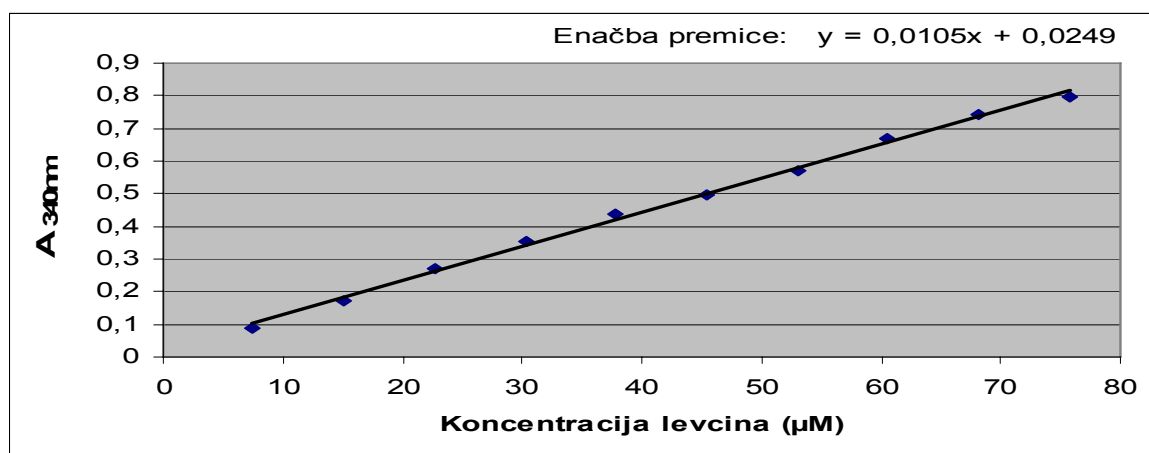
Vzorec	pH								
	0h	1h	2h	2,5h	3h	3,5h	4h	4,5h	17h
YC380	6,6	6,41	5,85	5,16	4,93	4,77	4,63	4,47	4,47
YC380-TH4	6,6	6,42	5,93	5,20	5,00	4,78	4,66	4,51	4,51
YC380-K7	6,6	6,44	5,92	5,19	4,95	4,77	4,60	4,45	4,45
TH4 -K7	6,6	6,26	5,56	5,08	4,92	4,81	4,72	4,58	4,58
YC380-TH4 -K7	6,6	6,40	5,91	5,18	4,98	4,80	4,71	4,52	4,52
TH4	6,6	6,31	5,61	5,09	4,94	4,80	4,71	4,56	4,56
UHT					6,6 *				

* Vzorec UHT - posneto nefermentirano UHT mleko, temperirano na temperaturo 50 °C.

2,5 ure po začetku fermentacije je vrednost pH najbolj padla vzorcema TH4-K7 in TH4. Razlog so različne dodane starterske kulture in njihove specifične lastnosti, hitrost fermentacije in tvorba mlečne kisline. Po treh urah so se vrednosti pH vzorcev dokaj izenačile. Nato se je trend obrnil, saj je vrednost pH začela hitro padati pri vzorcih YC380 in YC380-K7, najhitreje pri vzorcu YC380-K7.

Po 17 urah sta najnižjo vrednost pH dosegla vzorca YC380-K7 in YC380, zato smo predvidevali, da je tu fermentacija potekala najbolj intenzivno in da je v teh dveh vzorcih nastalo največ kratkih peptidov. Zato smo se v nadaljevanju osredotočili na starterski kulturi YC380 in K7, s katerima smo fermentirali mleko v bioreaktorju, z uravnavanjem konstantne vrednosti pH. Na ta način smo podaljšali fazo nastajanja kratkih peptidov, ki je pri klasični fermentaciji zavrtja tudi zaradi nastajanja mlečne kisline. Za razliko od klasične fermentacije v viskubatorju je bila tu vrednost pH vseskozi uravnavana na $6,5 \pm 0,1$ s 4 M NaOH in 1 M HCl. Med fermentacijo mleka v bioreaktorju smo spremljali vrednost pH in jemali vzorce po 4-ih, 6-ih, 8-ih, 12-ih in 24-ih urah fermentacije.

4.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROSTIH AMINO SKUPIN V VZORCIH S TNBS METODO



Slika 5: Umeritvena krivulja za levcin: odvisnost absorbanca TNP derivata od koncentracije levcina ($\lambda=340$ nm)

Molarno koncentracijo prostih amino skupin v vzorcih smo izračunali po naslednjem postopku:

Primer za vzorec YC380-K7:

- Na podlagi TNBS metode smo vzorcu izmerili absorbanco (A) 1,646: vrednost absorbance kontrolnega vzorca je znašala 1,278.

$$\begin{aligned} A_{\text{kontrolnega vzorca}} - A_{\text{vzorca izmerjena}} &= A_{\text{vzorca realna}} \\ 1,646 - 1,278 &= 0,368 \end{aligned}$$

- Absorbanco vzorca (0,368), ki predstavlja vrednost y, smo vstavili v enačbo regresijske premice: $y = 0,0105x + 0,0249$ (umeritvena krivulja za levcin). Nato smo izračunali vrednost x, ki predstavlja molarno koncentracijo prostih amino skupin v vzorcu.

$$0,368 = 0,0105 x + 0,0249$$

$$x = 32,73 \mu\text{mol/L}$$

- Sledil je izračun dejanske koncentracije prostih amino skupin v vzorcu z upoštevanjem vseh razredčitev, ki smo jih pri delu izvedli (razredčitev pri TNBS metodi, uravnavanju vrednosti pH in pri obarjanju).

Celotni volumen reakcijske mešanice pri TNBS metodi je bil 1650 μL , koncentracija izmerjenega vzorca pa je po zgornjem izračunu znašala $3,27 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. V epruveto smo dodali 50 μL vzorca neznane koncentracije.

$$\begin{aligned} 50 \mu\text{L} \times c &= 1650 \mu\text{L} \times 3,27 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \\ c &= 1,079 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \end{aligned}$$

Torej je bila v vzorcu koncentracija prostih amino skupin $1,079 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$.

- Nato smo upoštevali razredčitev zaradi uravnavanja vrednosti pH pred spektrofotometričnim merjenjem pri TNBS metodi. 20 mL vzorca smo dopolnili z 2,55 mL NaOH, da se je vrednost pH dvignila na 8,0.

$$\begin{aligned} 1,079 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \times 22,55 \text{ mL} &= 20 \text{ mL} \times c \\ c &= 1,22 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \end{aligned}$$

- Upoštevali smo še razredčitve, do katerih je prišlo pri postopku obarjanja. Vsakemu vzorcu (100 mL) smo dodali 200 mL 60 % očetne kisline.

$$\begin{aligned} 1,22 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \times 300 \text{ mL} &= 100 \text{ mL} \times c \\ c &= 3,65 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \end{aligned}$$

- Koncentracija $c = 3,65 \times 10^{-3}$ mol/L je predstavljala začetno koncentracijo prostih amino skupin v vzorcu po končani fermentaciji in nekaj dnevnem skladiščenju pri temperaturi 4°C

Po enakem postopku so bile izračunane vse koncentracije analiziranih vzorcev glede na izmerjeno absorbanco pri TNBS metodi in ob upoštevanju vseh razredčitev posameznih vzorcev.

4.3.1 Koncentracija prostih amino skupin v vzorcih

4.3.1.1 Klasična fermentacija mleka

V vzorcu YC380-K7 je fermentacija potekala najbolj intenzivno, kar delno ponazarja vrednost pH, ki je pri tem vzorcu padala najhitreje, dosegla pa je tudi najnižjo vrednost (Preglednica 19). Pri tem je nastalo največ spojin s prostimi amino skupinami, kar potrjujejo tudi rezultati preglednice 20. Pri vseh ostalih vzorcih je bila absorbanca manjša, posledično pa tudi manjša molarna koncentracija amino skupin. Sklepali smo, da bo imel vzorec YC380-K7 tudi največjo inhibitorno aktivnost v primerjavi z drugimi vzorci.

Če primerjamo vrednosti pH in koncentracije amino skupin v vzorcih, dobljenih s klasično fermentacijo, ugotovimo da te niso vedno v korelaciji. Vrednost pH vzorca po fermentaciji je nizka, kar pa ne pomeni, da je koncentracija prostih amino skupin v vzorcu večja od ostalih. Razlog so različne lastnosti dodanih starterskih kultur, pogoji za rast in fermentacijo ter sproščanje različnih količin restriktijskih encimov. Ugotovimo lahko, da vrednosti pH niso primerne za oceno koncentracije prostih amino skupin.

Vzorca YC380-K7 in UHT smo tudi ultrafiltrirali (500 Da) in določili molarno koncentracijo prostih amino skupin v obeh dobljenih frakcijah, ultrafiltratu in ultrafiltracijskemu ostanku.

Preglednica 20: Molarna koncentracija prostih amino skupin v vzorcih (klasična fermentacija).

Vzorec	Koncentracija prostih amino skupin (mmol/L)						
	UHT	YC380	YC380-K7	YC380 -TH4	TH4-K7	YC380-TH4-K7	TH4
Filtrat	1,5	2,3	3,7	3,3	1,3	1,1	1,6
Ultrafiltrat	0,27	/	1,7	/	/	/	/
Ultrafiltracijski ostanek	2,2	/	5,2	/	/	/	/

Preglednica 21: Molarna koncentracija prostih amino skupin v vzorcih (klasična fermentacija in simulacija prebave).

Vzorec	Koncentracija prostih amino skupin (mmol/L)								
	UHT			YC380			YC380-K7		
	(1:1)	(1:2)	(2:1)	(1:1)	(1:2)	(2:1)	(1:1)	(1:2)	(2:1)
Filtrat prebave	95,9	139,5	/	176,4	198,1	128,6	194,5	207,2	141,6
Ultrafiltrat prebave	27,0	/	/	88,9	/	/	92,5	/	/

* Vrednosti v oklepaju predstavljajo razmerje vzorcev in prebavnih sokov.

4.3.1.2 Fermentacije mleka v bioreaktorju z uravnavanjem konstantne vrednosti pH

Molarno koncentracijo prostih amino skupin smo določali samo filtratom vzorcev. Rezultati so prikazani v Preglednici 22.

Preglednica 22: Molarna koncentracija prostih amino skupin v vzorcih (fermentacija mleka v bioreaktorju z uravnavanjem konstantnega pH).

Vzorec	Koncentracija prostih amino skupin (mmol/L)									
	YC380-K7 B					YC380 B				
	(4 h)	(6 h)	(8 h)	(12 h)	(24 h)	(4 h)	(6 h)	(8 h)	(12 h)	(24 h)
Filtrati	1,0	1,5	1,6	2,2	4,7	3,6	4,2	5,7	6,8	18,9

*Vrednosti v oklepajih predstavljajo čas fermentacije vzorcev

4.4 KJELDAHLOVA ANALIZA

Kot rezultat Kjeldahlove analize smo dobili podatke o vsebnosti proteinov v analiziranih vzorcih. Volumni vzorcev so znašali 5 mL, mase vzorcev, ki smo jih upoštevali pri izračunih, pa so variirale med 5200,0 mg in 5400,0 mg.

Odstotek proteinov v posameznem vzorcu smo dobili avtomatsko, po vpisu zatehte vzorca v kombinirano destilacijsko-titracijsko kontrolno enoto. Odstotek proteinov je bil izračunan po naslednji enačbi.

$$\text{Proteini (\%)} = \frac{V_{\text{HCl}} \times 1,4 \times C_M}{m_{\text{vz}}} \times 6,38 \times 100$$

C_M = točna molarnost HCl/0,1 M HCl

Pri čemer je :

- V_{HCl} = poraba mL 0,1 M HCl
- 1,4 = ekvivalent (1 mL 0,1 M HCl.....1,4 mg N)
- 6,38 = empirični faktor F za preračun N v proteinov za mleko
- C_M = molarnost raztopine HCl

Iz deleža proteinov v paralelkah vsakega vzorca smo nato izračunali povprečno masno koncentracijo proteinov v vzorcu na naslednji način (primer za vzorec YC380-K7 B (t=6h)):

- Paralelki vzorca YC380-K7 B (t=6h) (vzorec mleka fermentiran v bioreaktorju pri uravnavanem konstantnem pH, odvzet po šestih urah fermentacije) sta vsebovali 0,217 % in 0,232 % proteinov. Zatehta prve paralelke je znašala 5335,6 mg in druge 5251,0 mg. Za vsako paralelko vzorca smo nato izračunali koncentracijo proteinov ter izračunali povprečno koncentracijo proteinov posameznega vzorca.

$$\frac{5335,6\text{mg} \times 0,217\%}{100 \times 0,005\text{L}} = 2,32\text{g/L} \quad \text{masna koncentracija proteinov prve paralelke}$$

$$\frac{5251,0\text{mg} \times 0,232\%}{100 \times 0,005\text{L}} = 2,44\text{g/L} \quad \text{masna koncentracija proteinov druge paralelke}$$

$$\frac{2,32\text{g/L} + 2,44\text{g/L}}{2} = 2,40\text{g/L} \quad \text{povprečna masna koncentracija proteinov v vzorcu}$$

4.5 OCENA MOLARNE IN MASNE KONCENTRACIJE TER POVPREČNE DOLŽINE PEPTIDOV V VZORCIH

Ker je bil namen naloge ugotoviti ali vzorci fermentiranega mleka vsebujejo ACE inhibitorne peptide, smo na podlagi rezultatov, dobljenih s Kjeldahlovo in TNBS metodo, ocenili njihovo masno in molarno koncentracijo ter povprečno molsko maso in dolžino. Glede na to, da smo vzorce fermentiranega mleka pred analizo obarjali z očetno kislino (3.6.1), kjer smo oborili večje proteine in polipeptide, krajši peptidi pa so ostali topni in so med (ultra) filtracijo prehajali skozi filter, smo predpostavili, da vse proste amino skupine v vzorcu pripadajo peptidom in tako korelirali molarno koncentracijo prostih amino skupin v vzorcih (rezultat TNBS metode) z molarno koncentracijo peptidov. Prav tako smo korelirali masno koncentracijo proteinov (rezultat Kjeldahlove metode) z masno koncentracijo peptidov v vzorcu. Potrebno je poudariti, da so vzorci lahko vsebovali tudi določen odstotek prostih aminokislin, zato je ocenjena molarna in masna koncentracija peptidov predstavljala le grob približek njihove realne koncentracije. Povprečno dolžino peptidov v vzorcih smo izračunali s pomočjo ocenjene molarne (mol/L) in masne (g/L) koncentracije peptidov v vzorcih ter povprečne molske mase aminokislinskega ostanka v proteinu, ki znaša 110 g/mol (Coates, 2002).

- Primer izračuna povprečne molske mase peptidov v vzorcu YC380-K7 (t6) B, kjer smo upoštevali ocenjeno masno in molarno koncentracijo peptidov preiskovanega vzorca ter dobili povprečno molsko maso (g/mol) peptidov v analiziranem vzorcu:

$$\frac{2,38\text{g/L}}{0,00153\text{mol/L}} = 1555,6\text{g/mol}$$

- Izračun povprečne dolžine peptidov v vzorcu YC380-K7 (t6) B; v izračun smo vključili povprečno molsko maso peptidov ter povprečno molsko maso aminokislinskega preostanka (110 g/mol):

$$\frac{1555,6 \text{ g/mol}}{110 \text{ g/mol}} = 14,1$$

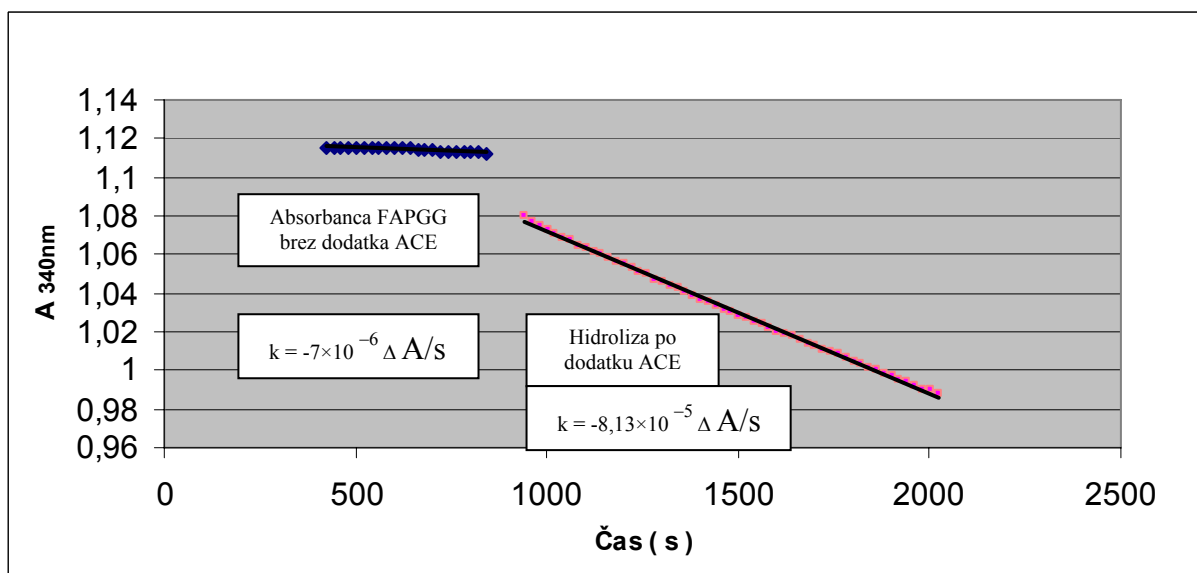
V vzorcu YC380-K7 (t6) B torej najdemo peptide, ki vsebujejo v povprečju 14 aminokislin. Vrednosti za ostale vzorce so bile izračunane po enakem postopku, rezultati pa so prikazani v preglednici 23 in na sliki 15.

Preglednica 23: Masne koncentracije in povprečne dolžine peptidov v vzorcih fermentiranega mleka.

Vzorce (filtrati)	YC380 B			YC380-K7 B			UHT	UHT	PREBAVA 1:1	
	t 6	t 12	t 24	t 6	t 12	t 24			YC380-K7	YC380
konc. peptidov (g/L)	3,8	4,1	7,2	2,4	2,7	2,9	4,4	70,1	75,6	77,6
Povprečna dolžina peptidov	8	6	3	14	11	6	27	6	4	4

4.6 REZULTATI MERITEV DOLOČANJA MAKSIMALNE AKTIVNOSTI ACE

Med meritvami inhibicije ACE z različnimi vzorci smo kontrolirali maksimalno aktivnost ACE s hidrolizo kromogenega substrata FAPGG brez dodanega ACE in z ACE analitske čistote, brez prisotnosti inhibitorjev iz vzorcev .



Slika 6: Odvisnost absorbance od časa pri ugotavljanju maksimalne encimske aktivnosti

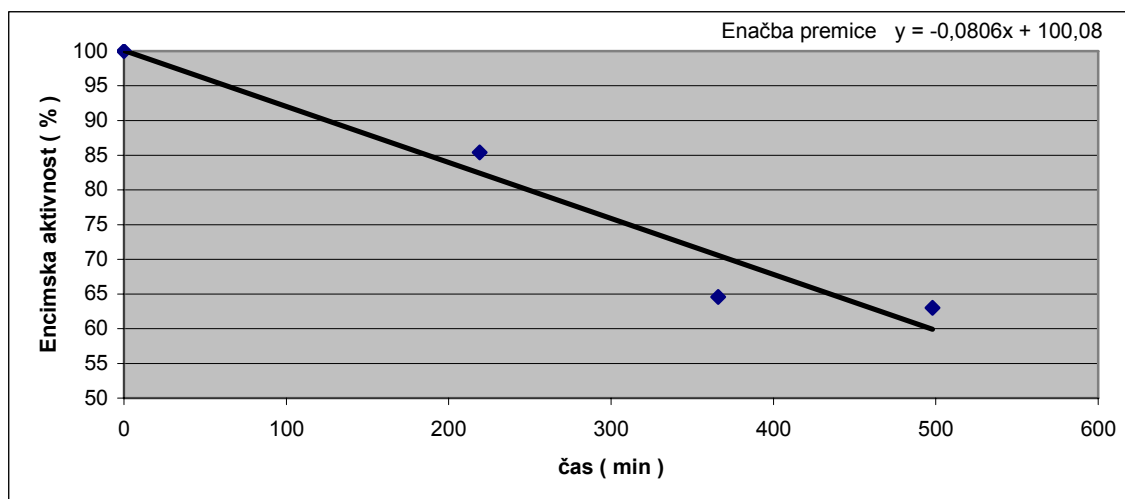
S slike 6 smo odčitali koeficient naklona premice za hidrolizo FAPGG po dodatku ACE. Kot naklon neencimske hidrolize oziroma hidrolize FAPGG brez dodatka ACE smo vzeli povprečje vseh 107 opravljenih meritev, ki je znašalo $-5,55 \times 10^{-6} \Delta A/s$. Iz razlik naklonov

neencimske hidrolize FAPGG in hidrolize FAPGG po dodatku ACE pa smo dobili vrednost, ki je merilo za hitrost encimsko katalizirane hidrolize substrata.

K povprečni naklon neencimske hidrolize = $-5,55 \times 10^{-6} \Delta A/s$

Realni naklon je $-8,13 \times 10^{-5} \Delta A/s + 5,55 \times 10^{-6} \Delta A/s = -7,57 \times 10^{-5} \Delta A/s$ absorbance v testu brez prisotnosti inhibitorja.

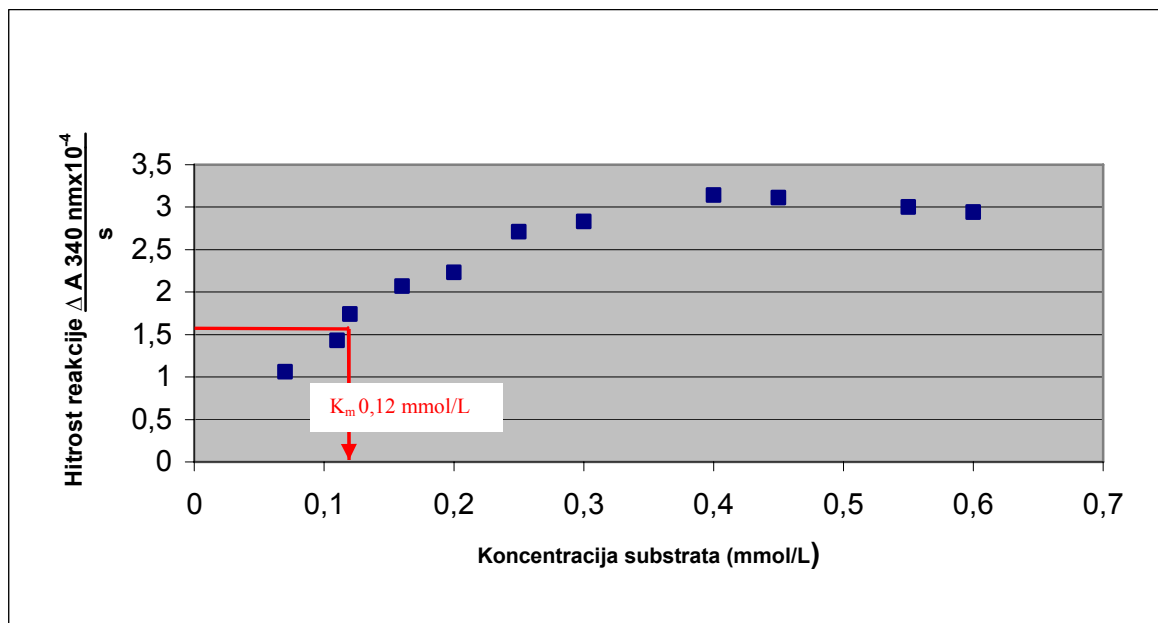
Pri vsakodnevnem delu smo, kljub shranjevanju raztopine ACE na ledu, opazili zmanjševanje aktivnosti encima. Zato smo v ustreznih časovnih intervalih, ob določanju inhibitorne aktivnosti vzorcev, merili tudi maksimalno aktivnost ACE. Primer padanja aktivnosti encima je prikazan na sliki 7 in znaša 5 % /h.



Slika 7: Odvisnost aktivnosti ACE od časa priprave raztopine (shranjevanje v ledeni kopeli)

4.7 DOLOČANJE K_m ANGIOTENZINSKE KONVERTAZE ZA SUBSTRAT FAPGG

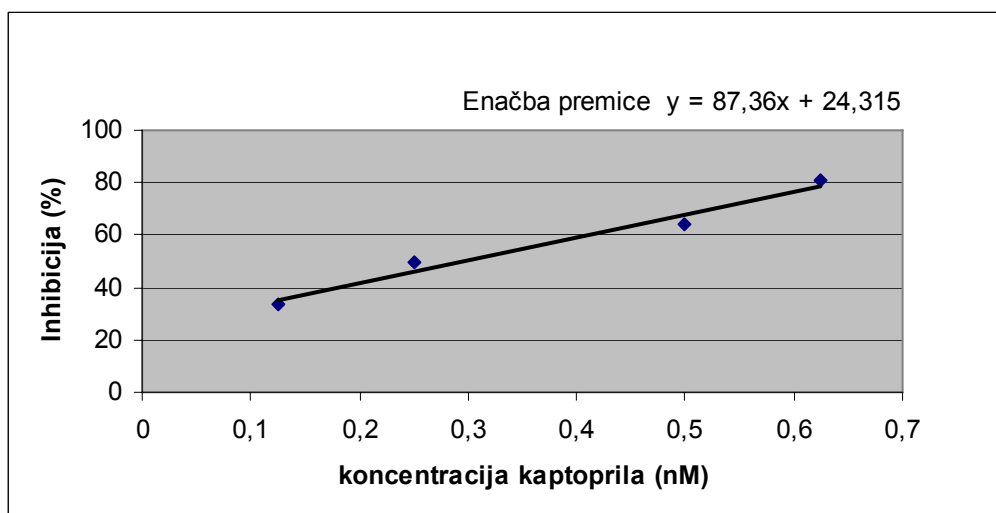
Pri določanju parametrov hidrolize FAPGG z ACE smo določili tudi K_m za ta encim. Postopek dela je bil enak postopku določanja maksimalne aktivnosti ACE. Spremljali smo odvisnost hitrosti encimsko katalizirane reakcije od koncentracije substrata FAPGG pri konstantnem dodatku encima ACE (0,125 U/mL), temperaturi 25 °C in pH 8,3. Za vsako koncentracijo substrata smo sledili encimsko katalizirani reakciji na 20 s. Nato smo izračunali koeficiente naklona premic za hidrolizo pri uporabljenih koncentracijah FAPGG v reakcijskih mešanicah in jih zapisali na sliko 8. Ugotovili smo, da je K_m 0,12 mmol/L.



Slika 8: Michaelis-Mentenov diagram za kromogeni substrat FAPGG

4.8 DOLOČANJE INHIBICIJSKE AKTIVNOSTI KAPTOPRILA

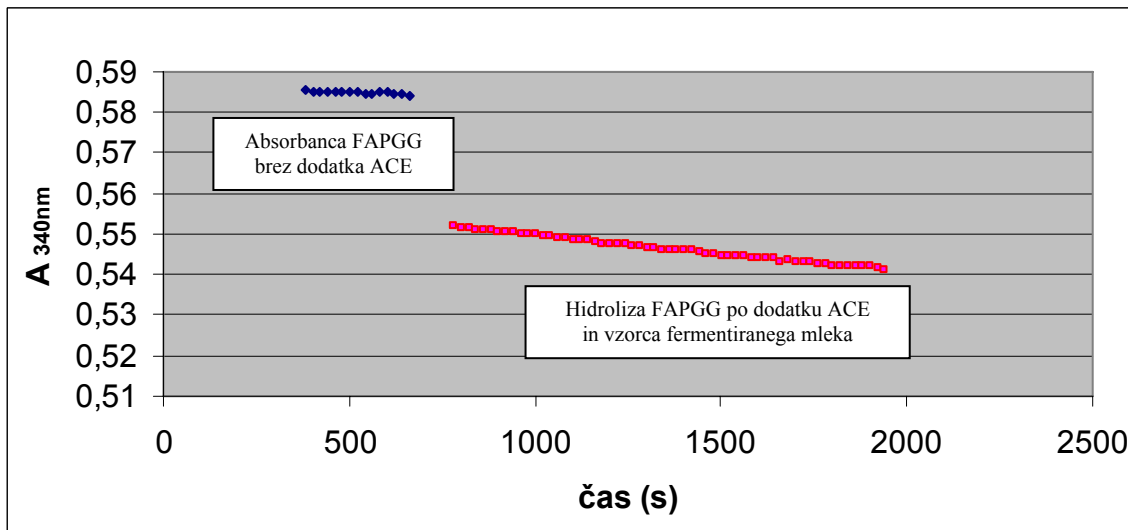
V okviru določanja parametrov encimske reakcije smo ugotavljali tudi ACE inhibitorno aktivnost kaptoprila, kot standardnega inhibitorja. Uporabili smo zelo nizke koncentracije kaptoprila, saj se je pokazalo, da ima zelo močan inhibitorni učinek. Kot lahko vidimo s slike 9, vrednost IC_{50} kaptoprila znaša $0,29 \text{ nmol/L}$, kar pomeni, da je inhibicijska aktivnost kaptoprila za faktor koncentracije 10^{-6} višja od inhibicijske aktivnosti vzorcev fermentiranega mleka.



Slika 9: Inhibicija ACE z različnimi koncentracijami sintetičnega inhibitorja kaptoprila

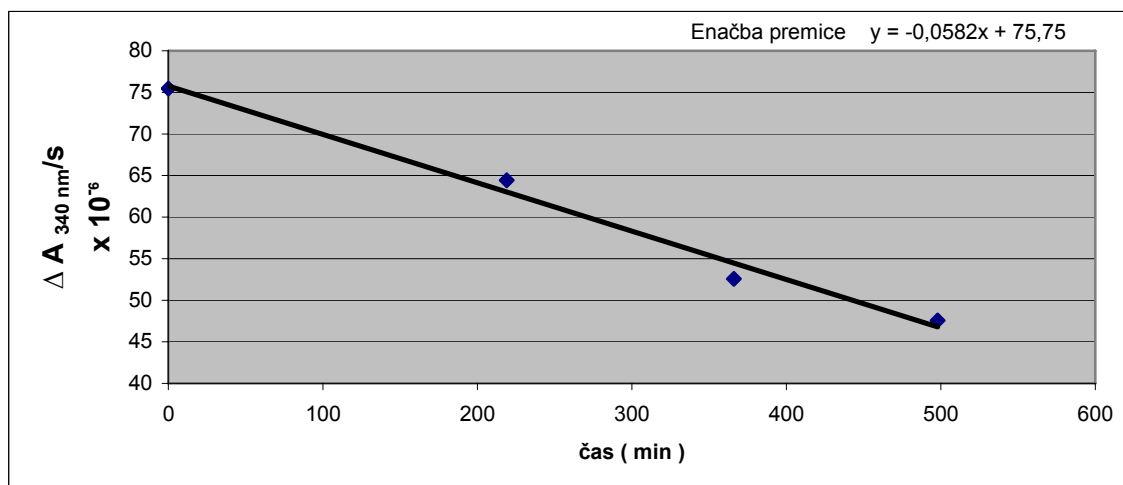
4.9 INHIBITORNA AKTIVNOST VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA

Primer merjenja inhibitorne aktivnosti vzorca filtrata fermentiranega mleka je prikazana na sliki 10.



Slika 10: Odvisnost absorbance od časa pri merjenju encimsko katalizirane razgradnje substrata ob prisotnosti inhibitornih peptidov iz vzorca YC380-K7

Delež aktivnosti ACE v prisotnosti inhibitorskih vzorcev fermentiranega mleka smo izračunali po enačbi $B \times 100/A = C$ (%), kjer A predstavlja maksimalno aktivnost ACE ob času izvedbe inhibitornega testa, B pa razliko naklonov med hidrolizo substrata v prisotnosti ACE ter vzorca fermentiranega mleka in neencimsko hidrolizo substrata. Po predvidevanjih se je ob dodatku filtrata vzorca fermentiranega mleka zmanjšala hitrost reakcije v primerjavi z referenčno meritvijo, kjer smo namesto filtrata dodali boratni pufer. Zmanjšanje hitrosti je bilo odvisno od vzorcev filtrata in njihovih koncentracij, saj so inhibitorji delovali na ACE in zmanjšali aktivnost encima oziroma sposobnost razgrajevanja substrata FAPGG.



Slika 11: Zmanjševanje aktivnosti encima v odvisnosti od časa priprave raztopine pri testiranju za vzorec YC380-K7

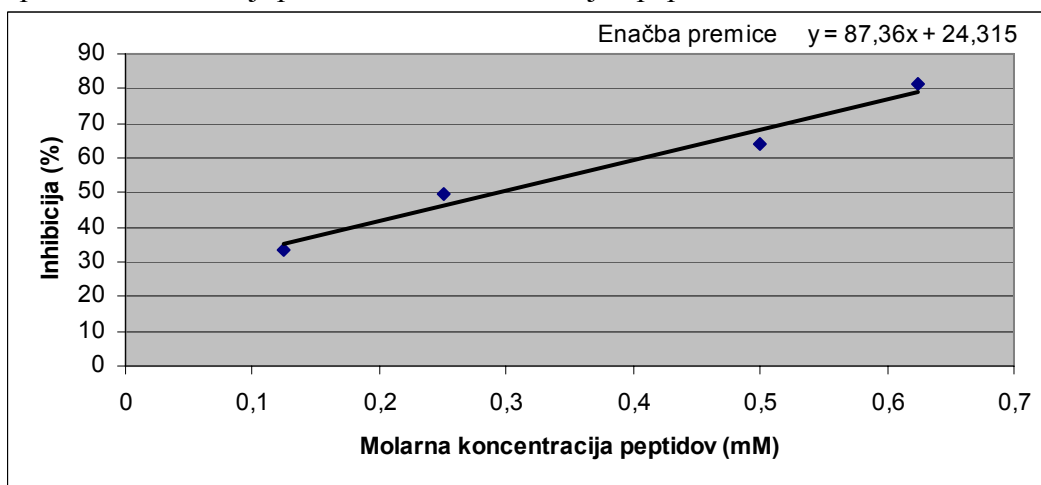
Maksimalna aktivnost ACE na dan merjenja vzorca YC380-K7 po 30 minutah od začetka merjenja, (slika 11) je bila $74,0 \times 10^{-6} \Delta A/s$. Vrednost B smo dobili iz razlike naklonov na sliki 11 in znaša $6,0 \times 10^{-6} \Delta A/s$.

$$\frac{B \times 100}{A} = C (\%) \quad \rightarrow \quad \frac{6,0 \times 10^{-6} \times 100}{74,0 \times 10^{-6}} = 8,1 \%$$

Vrednost C predstavlja aktivnost ACE ob prisotnosti inhibitorja. Da smo dobili delež inhibicije ACE, smo vrednost C odšteli od 100. Vrednost D predstavlja delež inhibicije v prisotnosti dodanega vzorca :

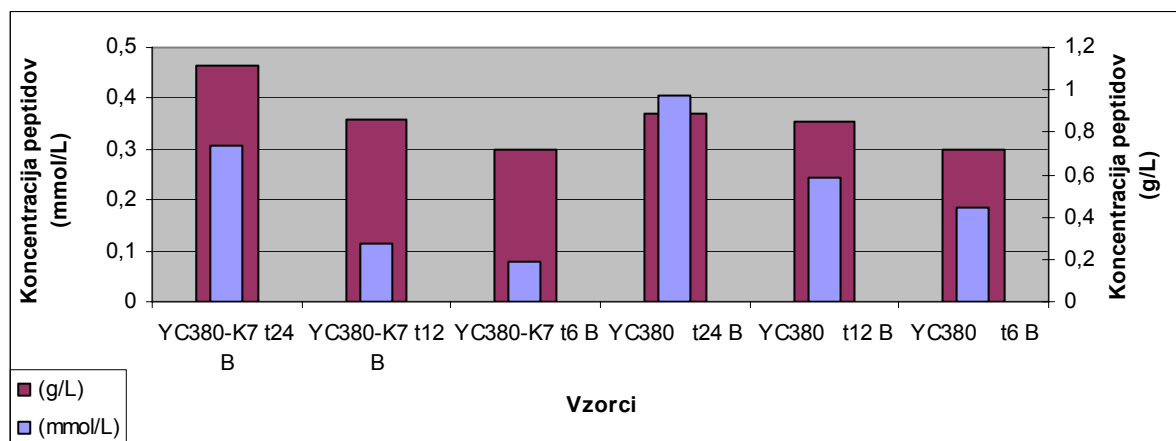
$100\% - 8,1\% = 91,9 \%$ inhibicija ACE ob prisotnosti vzorca YC380-K7.

V reakcijski mešanici smo spreminjali tudi količino dodanega vzorca (Slika 12). Tako smo dobili podatke o inhibiciji pri različnih koncentracijah peptidov:



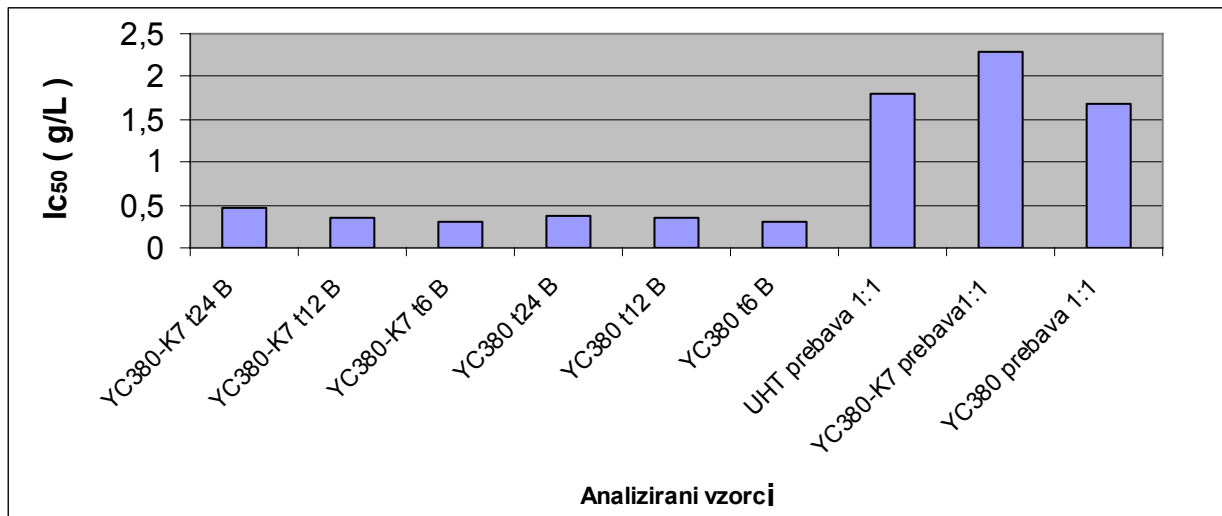
Slika 12: Odvisnost inhibicije od koncentracije peptidov (vzorec UHT-prebava 1:1)

IC_{50} vrednost (*angl.* half maximal inhibitory concentration) oziroma koncentracijo peptidov, ki za 50% inhibira aktivnost ACE smo razbrali iz grafov, ki prikazujejo masno oz. molarno koncentracijo peptidov v analiziranih vzorcih in ustrezen odstotek inhibicije (slika 12 za vzorec UHT (1:1)).

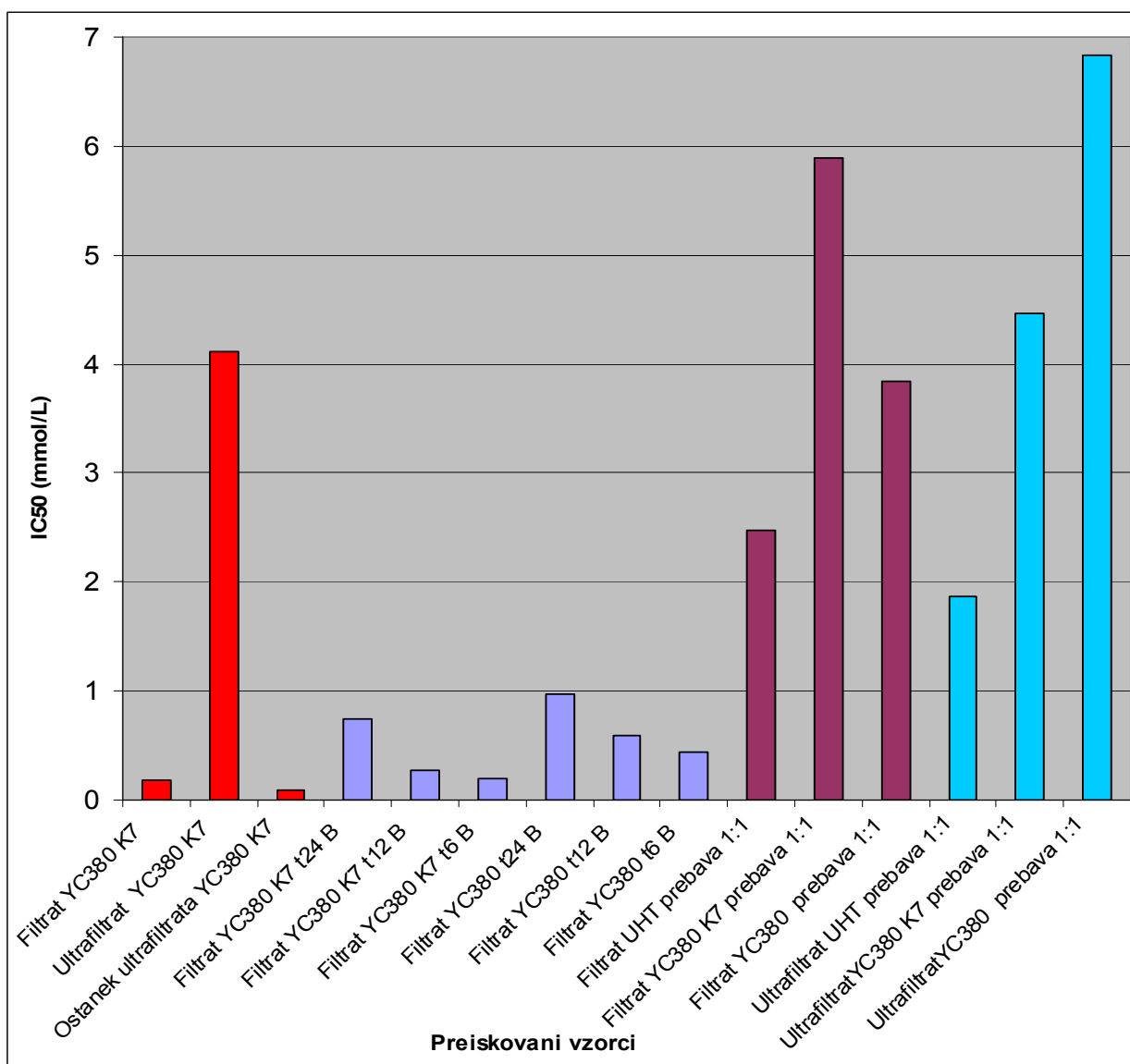


Slika 13: Primerjava masnih in molarnih IC_{50} vrednosti vzorcev bioreaktorske fermentacije s konstantnim pH

Na slikah 14 in 15 so masne in molarne IC₅₀ koncentracije analiziranih vzorcev.

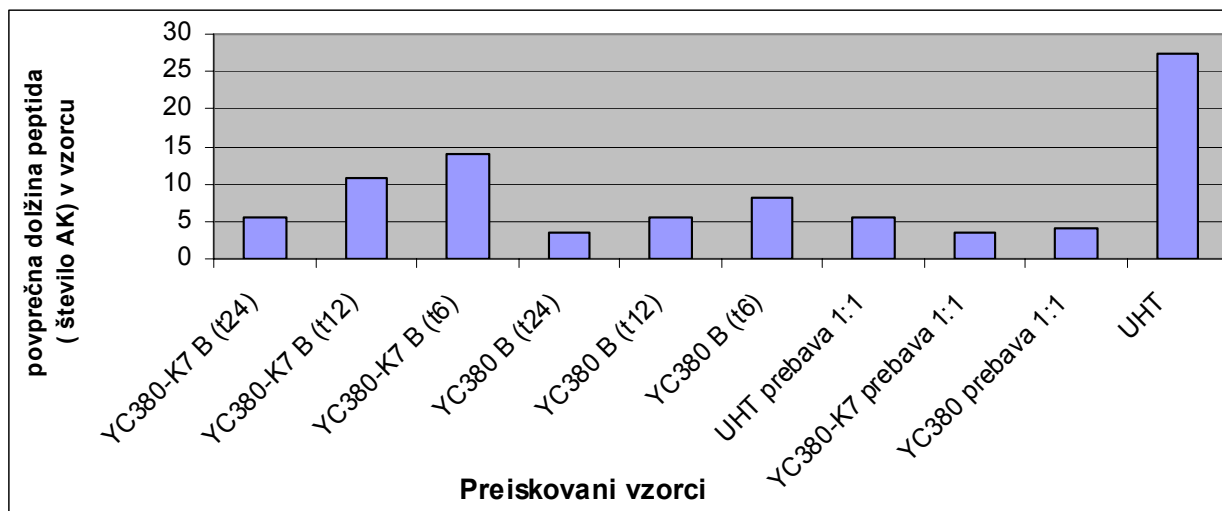


Slika 14: Masne IC₅₀ vrednosti vzorcev



Slika 15: Molarne IC₅₀ vrednosti analiziranih vzorcev

Slika 16 prikazuje povprečne dolžine peptidov v analiziranih vzorcih, katere so odraz časa fermentacije vzorcev, delovanja prebavnih in bakterijskih restriksijskih encimov ter pogojev fermentacije.



Slika 16: Povprečne dolžine peptidov v analiziranih vzorcih

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Osnova priznavanja funkcionalnosti, tako fermentiranim mlečnim, kot tudi drugim izdelkom, so zanesljive metode odkrivanja funkcionalnih sestavin. Ena izmed najcenejših in dokaj zanesljivih metod odkrivanja peptidnih inhibitorjev ACE je spektrofotometrična metoda z uporabo kromogenega substrata FAPGG (Samah in sod., 2006), zato smo jo uporabili pri našem delu. Pri samih meritvah pa smo se soočili s kar nekaj težavami, ki jih nismo zasledili v literaturi.

Kromogeni substrat FAPGG se je izkazal za dokaj nestabilnega. Med spektrofotometričnim merjenjem se je pri določenih valovnih dolžinah svetlobe razgrajeval, pri čemer je svetloba substrat fotokemično aktivirala in povzročila njegov razpad. Boljše rezultate smo dosegli s spreminjanjem intervalov merjenja in dnevno pripravo svežega substrata. Pri delu smo uporabljali polistirenske kivete, v katerih je bila fotoinducirana hidroliza substrata manjša, kot pri testih s polipropilenskimi kivetami. Vendar pa razpada substrata nismo mogli zaustaviti. Kot navajajo Samah in sod. (2006), pri delu niso imeli težav z razpadom substrata. Koncentracije substrata v reakcijski mešanici so bile podobne našim, res pa je, da so absorbance vzorcev merili v mikrotitrskih ploščah pri nekoliko spremenjenih pogojih. Vzorce so merili pri temperaturi 37 °C, intervali merjenja absorbance vzorca pa so se ponavljali na 30 sekund. Tudi Vermeirssen in sod. (2002) navajajo, da ima substrat poleg dobre topnosti tudi veliko stabilnost. Zaradi prevelikega razpada substrata smo v našem poskusu intervale merjenja podaljšali z 1 na 20 sekund, temperaturo pa znižali na 25 °C.

Nekaj težav smo imeli tudi z encimom ACE. Soočili smo se s slabo stabilnostjo raztopine in posledično s padajočo aktivnostjo encima ACE. Preden smo spremenili pogoje shranjevanja encima, se je aktivnost zmanjševala do 10 % na uro. Encimska aktivnost je padala sorazmerno s časom priprave raztopine encima, čeprav smo encim kasneje vseskozi shranjevali v hladilniku, med poskusom pa je bil encim shranjen v ledeni kopeli. Encim je v povprečju izgubljal do 5 % aktivnosti na uro. Zaradi padanja aktivnosti smo končne rezultate inhibicije preračunavali na maksimalno encimsko aktivnost pri določenem času uporabe encima. Zaradi tega smo poleg inhibicijskih analiz dnevno določali tudi maksimalne aktivnosti ACE zaradi nestabilnosti raztopin ACE.

Pri vseh meritvah smo pri laboratorijskem delu uporabili ACE analitske čistote (Sigma). Prvotno smo encim poskušali pridobiti z ekstrakcijo iz zajčjega pljučnega tkiva. Leclerc in sod. (2002), Vermeirssen in sod. (2002) in Minervini in sod. (2003) so iz zajčjega pljučnega tkiva uspešno ekstrahirali ACE. Tudi mi smo na enak način poskušali ekstrahirati ACE, vendar nam kljub večkratni izvedbi to ni uspelo oziroma je bila koncentracija ACE v ekstraktu premajhna, da bi lahko dokazali njegovo aktivnost. Razlog je najverjetneje neprimerno pripravljen in obdelan (zmlet) preparat, ki smo ga uporabili (Sigma). Nekaj mesecev kasneje so na Katedri za mlekarstvo opravili podoben poskus, kjer so prav tako poskušali ekstrahirati ACE iz zajčjega pljučnega tkiva istega proizvajalca (Sigma). Prišli pa so do podobnega zaključka, kar še dodatno potrjuje izsledke našega poskusa.

Pred inhibicijskimi testi z vzorci fermentiranega mleka smo določili še K_m encimske reakcije angiotenzinske konvertaze s substratom FAPGG. Dobljena vrednost Michaelis-Mentenove konstante je znašala 0,12 mmol/L. Kot navajajo Vermeirssen in sod. (2002), je bila dobljena vrednost K_m pri njihovem delu 0,3 mmol/L za substrat FAPGG, za HHL pa 24 mmol/L, kar potrjujejo tudi Samah in sod. (2006). Majhna K_m pomeni večjo afiniteto substrata do encima. Naša dobljena vrednost je bila torej za približno dvakrat manjša od vrednosti, navedenih v literaturi. Najverjetneje je do razlik prišlo zaradi različne temperature pri merjenju K_m vrednosti, saj so naše meritve potekale pri temperaturi 25 °C, ostali pa so pri eksperimentalnem delu vzorce temperirali na 37 °C.

Kot standardni ACE inhibitor smo v testih uporabili kaptopril, ki je znana učinkovina antihipertenzičnih farmacevtskih sredstev. Dodane koncentracije kaptoprila v testih so bile zelo majhne (0,3-1,25 nM), saj je inhibitor relativno hitro in popolnoma zavrl delovanje ACE. Določili smo molarno IC_{50} vrednost kaptoprila, ki je kar za faktor 3×10^5 manjša od IC_{50} vrednosti našega najboljšega vzorca ostanka ultrafiltrata YC380-K7. O podobnih faktorjih razlikovanja IC_{50} kaptoprila in inhibitorskih vzorcev govorijo tudi Murray in sod. (2004).

5.1 PRIPRAVA IN TESTIRANJE VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA

Mleko smo fermentirali na dva različna načina. Prvi način je bila klasična fermentacija z različnimi starterskimi kulturami, ki je potekala v viskubatorju. Različne starterske kulture smo uporabili zato, da bi ugotovili, katera kultura proizvede največ bioaktivnih peptidov. Drugi način pa je predstavljala fermentacija mleka v bioreaktorju z uravnavanjem konstantne vrednosti pH. Za ta način priprave vzorcev smo se odločili zaradi majhnih razlik v inhibiciji ACE, ki smo jih ugotovili pri vzorcih, pripravljenih s klasično fermentacijo. Želeli smo podaljšati fazo nastajanja bioaktivnih peptidov med fermentacijo z vzdrževanjem vrednosti pH pri 6,5. Tako mlečna kislina ne bi zaustavila fermentacije in starterske kulture bi nadaljevale razgradnjo proteinov v kratke peptide. V vzorcih YC380-K7 B in YC380 B smo po 24-urni fermentaciji tako res dobili večje koncentracije peptidov, saj so znašale 4,7 in 18,9 mmol/L.

Glede na izračun povprečnih dolžin peptidov lahko sklepamo, da so se pri obarjanju oborili peptidi z več kot tridesetimi aminokisljinami. Pri fermentaciji in procesu prebave pa so nastajali krajši peptidi, ki so ostali topni v filtratih vzorcev. Glede na podatke, ki jih navajajo Yvon in sod. (1988), je naša koncentracija očetne kisline ustrezala obarjanju peptidov z okoli 30 aminokislinskih enot. To potrjujejo tudi rezultati fermentiranih in *in vitro* prebavljenih vzorcev, ki so vsi vsebovali peptide v povprečju krajše od 30 aminokisljin.

Pri analizah vzorcev pa smo merili tudi celotne spektre le-teh pri 280 nm in prišli do zanimivega zaključka. Vsi vzorci YC380-K7 B so imeli večje vrednosti absorbance glede na vzorce YC380 B. Meritve smo izvedli, ker smo bili prepričani, da bodo rezultati v korelaciji z ugotovitvami Kjeldahlove analize. Vendar pa rezultati niso kazali nobenih logičnih povezav z masno koncentracijo peptidov. Morda je vzrok temu bakterijska DNA, ki povišuje absorbanco merjenih vzorcev. Za potrditev pravilnosti te trditve pa bi morali narediti še nekaj dodatnih analiz.

5.2 INHIBITORNE AKTIVNOSTI VZORCEV FERMENTIRANEGA IN UHT MLEKA

Med hidrolizo vzorcev fermentiranega mleka so se dolžine peptidov krajšale. Vzorci, odvzeti ob različnih časih pri bioreaktorski fermentaciji ob konstantnem pH, lepo nakazujejo potek razgradnje proteinov mleka. To velja tako za vzorce YC380-K7 B, YC380 B, YC380, YC380-K7, kot tudi za vzorce, izpostavljene simuliranim prebavnim sokovom po fermentaciji. Če primerjamo vzorca YC380 B, za katerega je bila pri fermentaciji uporabljena jogurtova kultura (*Str. thermophilus* in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) in YC380-K7 B z jogurtovo kulturo in *L. gasseri* K7, ugotovimo, da so pri vzorcih YC380 B nastali povprečno krajši peptidi. Iz tega lahko sklepamo, da je tu encimska hidroliza potekala bolj učinkovito. Ugotovili smo tudi, da s simulacijo prebave fermentiranega mleka dobimo relativno enake povprečne dolžine peptidov, kot med 24-urno fermentacijo v bioreaktorju s konstantno vrednostjo pH. Vzorec UHT mleka pa je vseboval peptide z dolžinami 27 aminokislin. Vse zgoraj navedene povprečne dolžine peptidov so le statistično povprečje. Sestavljajo ga proste aminokisliline, kratki in tudi daljši peptidi. Zgornji podatki o peptidnih dolžinah so nam služili kot ocena stanja, saj bi morali za natančnejše določitve uporabiti druge analitske metode.

Na začetku dela smo predvidevali, da bodo vzorci mleka pripravljene z daljšimi fermentacijskimi časi in višjo molarno koncentracijo peptidov, bolje inhibirali angiotenzinsko konvertazo. Pokazalo pa se je ravno obratno. S podaljšanjem hidrolize se je zmanjševal inhibični učinek vzorcev, kar prikazujejo slike 14, 15 in 16. Pri vzorcih YC380-K7 (t12) B, YC380-K7 (t24) B, YC380 (t12) B in YC380 (t24) B je bila potrebna višja koncentracija peptidov, tako molarna kot masna, za 50 % inhibicijo ACE, kot pri istih vzorcih, odvzetih po šestih urah fermentacije. Pri primerjavi razlik masnih in molarnih koncentracij peptidov v vzorcih YC380-K7 B in YC380 B smo ugotovili, da je manjša učinkovitost inhibicije bolj izražena pri molarnih koncentracijah peptidov. Sklepali smo, da imajo krajši peptidi najverjetneje manjšo afiniteto do ACE in dosežajo 50 % inhibicijo le pri višjih koncentracijah.

Primerjava vzorcev YC380-K7 B in YC380 B pa nam je dodatno pokazala, da vzorci mleka, fermentirani z mešanico jogurtove kulture in *L. gasseri* K7, učinkoviteje inhibirajo ACE. Še posebej je to razvidno v molarnem smislu, saj je pri vzorcih YC380-K7 B z istimi časi hidrolize za 50 % inhibicijo ACE potrebna za približno tretjino manjša koncentracija bioaktivnih peptidov kot pri vzorcih YC380 B. Po drugi strani pa lahko na podlagi Kjeldahlove analize ugotovimo, da vsebujejo vzorci YC380 B višjo masno koncentracijo peptidov. To pomeni, da v absolutnem smislu vsebujejo več angiotenzinskih inhibitorjev kot vzorci YC380-K7 B. Na osnovi vseh podanih ugotovitev lahko trdimo, da intenzivnejša hidroliza zmanjšuje inhibično učinkovitost, kar prikazujejo grafi 14, 15 in 16.

Po šestih urah fermentacije v bioreaktorju s konstantnim pH so vzorci YC380-K7 B in YC380 B vsebovali daljše peptide in bolje inhibirali ACE, kot pa vzorci, odvzeti po 24-urah fermentacije. Izračunana povprečna dolžina peptidov v vzorcu YC380-K7 (t6) B je bila 14 AK, v YC380 (t6) B pa 8 aminokislin. Ker so bile v vzorcu YC380 (t6) B povprečne dolžine peptidov skoraj dvakrat krajše, kot v vzorcu, YC380-K7 (t6) B, slabše pa je bilo tudi inhibično delovanje na ACE, smo sklepali, da so peptidi, ki so nekoliko daljši in v povprečju vsebujejo okoli 10 do 14 AK inhibičijsko učinkovitejši. Poleg dolžin peptidov pa je pomembna tudi stopnja hidrolize proteinov. Analizirani vzorci, ki so vsebovali v

povprečju peptide enakih dolžin, so se zelo razlikovali po sposobnosti inhibicije ACE. Vzorci UHT 1:1, YC380 (t12) B, YC380-K7 (t24) B so vsebovali v povprečju peptide s šestimi AK, njihove IC_{50} pa so znašale 2,47 mmol/L, 0,59 mmol/L in 0,74 mmol/L. Ugotovili smo torej, da se starterske kulture, ki smo jih uporabili v našem poskusu, razlikujejo v sposobnosti hidrolize mlečnih proteinov in produkciji peptidnih inhibitorjev ACE. Še večje razlike smo ugotovili po izpostavitvi vzorcev simulirani *in vitro* prebavi. Presenetljivo je med *in vitro* simulacijo prebave nastalo manj ACE inhibitornih peptidov, kot pri fermentaciji v bioreaktorju.

Vsi vzorci, vključeni v *in vitro* prebavo, so bili pripravljene s klasično fermentacijo, brez uravnavanja vrednosti pH (klasičen postopek izdelave jogurta). Analizirali smo le vzorec YC380-K7, njegov ultrafiltrat in ostanek vzorca po ultrafiltraciji. Neultrafiltriran vzorec dosega podobno stopnjo inhibicije ACE kot vzorec YC380-K7 (t6), medtem ko ima ultrafiltrat zelo slab inhibicijski učinek. Ostanek ultrafiltriranega vzorca YC380-K7 pa izmed vseh vzorcev najbolje inhibira ACE (Slika 15).

Vzorci, ki so bili po fermentaciji izpostavljeni *in vitro* simulaciji prebave, prikazujejo drugačno sliko. Njihova inhibitorna aktivnost je nekaj desetkrat slabša, kot pa inhibitorna aktivnost vzorcev fermentiranega mleka. Vzorec UHT-prebava 1:1 ima med njimi najboljšo inhibitorno aktivnost. Pri analizi vzorcev, izpostavljenih prebavi, je vzorec YC380-prebava 1:1 bolje inhibiral angiotenzinsko konvertazo, kot pa vzorec YC380-K7-prebava 1:1. Boljšo ACE inhibitorno aktivnost vzorca YC380-prebava 1:1 po simulirani prebavi si lahko razlagamo z nekoliko višjo masno koncentracijo inhibitornih peptidov, ki smo jo ugotovili s Kjeldahlovo analizo.

Prebavni sokovi so bolje hidrolizirali vzorec YC380-K7, kot pa vzorec YC380. Primerjava vzorcev klasične in bioreaktorske fermentacije z vzorci, izpostavljenimi prebavi, je pokazala, da je pri *in vitro* prebavi nastalo več krajših peptidov, ki pa so imeli slabše inhibitorne lastnosti. Najboljšo inhibicijo med prebavljenimi vzorci je dosegel vzorec UHT-prebava 1:1, kateremu sta sledila vzorca YC380-prebava 1:1 in YC380-K7-prebava 1:1.

Prav tako pa smo opazili kar 20% boljšo inhibicijo pri ultrafiltriranih vzorcih prebave. Izjema je le vzorec ultrafiltrat YC380-prebava 1:1. Temu se je inhibitorna aktivnost zmanjšala za več kot 70% glede na neultrafiltriran vzorec. Najverjetneje je, da so po simulirani prebavi v vzorcu ostali daljši peptidi, kar prikazuje rezultat inhibicije pred ultrafiltracijo. Po ultrafiltraciji pa večina najbolj inhibitornih peptidov ni prešla preko membrane v ultrafiltrat. V ultrafiltratu smo zato dobili le krajše peptide s slabo inhibitorno aktivnostjo, kljub njihovi visoki koncentraciji.

Najboljšo inhibitorno aktivnost med ultrafiltriranimi vzorci prebave je dosegel vzorec ultrafiltrat UHT-prebava 1:1. Kljub temu, da je bil ta vzorec izpostavljen le prebavnim encimom in ne fermentaciji in da je preko membrane prešlo le 30% koncentracijskega deleža peptidov, kar je posledica velikosti peptidov, je ta vzorec dosegel v povprečju za 50% boljšo inhibicijo, kot pa ostala dva ultrafiltrata vzorcev prebave.

Zaključimo lahko, da vzorci fermentiranega mleka po izpostavitvi simulirani prebavi slabše inhibirajo ACE, kot pa vzorci po fermentaciji. Razlike najverjetneje nastanejo kot posledica specifične hidrolize proteinov mleka. ACE inhibitorna aktivnost je odvisna od dolžine peptidov in njihove aminokislinske zgradbe, le-te pa od proteolitičnih in peptidaznih sposobnosti starterskih kultur in prebavnih encimov. Na samo hidrolizo lahko vplivajo tudi

postopki priprave vzorcev. Vzorci fermentiranega mleka, izpostavljeni simulirani prebavi, so imeli po tem nekaj desetkrat slabše inhibicijske lastnosti, kot isti vzorci fermentiranega mleka pred simulirano prebavo.

In vitro smo dokazali, da vzorci fermentiranega mleka, ki smo jih pripravili s pomočjo različnih starterskih kultur, vsebujejo peptidne inhibitorje ACE, vendar na podlagi teh rezultatov le stežka sklepamo o njihovi *in vivo* učinkovitosti. Med prebavo fermentiranega mleka pride očitno do nadaljnje hidrolize proteinov, saj so vzorci fermentiranega mleka po *in vitro* simulaciji prebave vsebovali krajše peptide, ki se nato v telesu najverjetneje še dodatno hidrolizirajo in tako prehajajo v krvni obtok. Že majhne koncentracije peptidnih inhibitorjev ACE pa imajo verjetno določen pozitiven učinek na zniževanje krvnega tlaka (Pihlanto in Korhonen, 2003).

Pripp (2005) je v svojem poskusu teoretično in praktično določal stopnjo razgradnje proteinov s kombinacijo pepsina, tripsina in α -kimotripsina in nato določal IC_{50} vrednosti vzorcem s pomočjo bioinformatičnega pristopa. Ta predvideva več možnih nastankov bioaktivnih peptidov s pomočjo prebavnih encimov. Uporabljal je različne baze podatkov in matematičnih funkcij, ki opisujejo razmerja med aktivnostjo in kemijsko strukturo (QSAR model). Teoretične IC_{50} vrednosti so znašale od 0,03 do 0,06 g/L, navaja pa tudi rezultate praktičnih raziskav IC_{50} vrednosti, ki znašajo od 0,05 do 0,07 g/L. Razlike med izmerjenimi in izračunanimi podatki pripisuje peptidaznim inhibitorjem v realnih vzorcih. V primerjavi z našimi rezultati so njegove IC_{50} vrednosti v povprečju za desetkrat manjše. Razlike lahko pripišemo uporabi vzorcev z le določenimi proteini analitske čistote. Quirós in sod., (2005) ter Leclerc in sod. (2002) pa navajajo rezultate, zelo podobne našim. Po fermentaciji vzorcev s kulturo *Lactobacillus helveticus* so določili IC_{50} vrednosti od 0,6 do 1,1 g/L. Ti so primerljivi z našimi rezultati. Leclerc in sod. (2002) pa navajajo tudi rezultate inhibitornih vrednosti določenih fermentiranih vzorcev z IC_{50} vrednostjo do 32 g/L ter, da kazeini v mleku predstavljajo vir za nastanek antihipertenzično najučinkovitejših bioaktivnih peptidov ob uporabi seva *L. helveticus*.

Raziskovali pa so tudi učinke ultrafiltracije na bioaktivne peptide. Analize ultrafiltriranih vzorcev Quirós-a in sod. (2005) so pokazale nekoliko manjša razmerja IC_{50} vrednosti med permeatom in ostankom vzorca po ultrafiltraciji, kar je posledica uporabe ultrafiltra z večjimi porami (50 MW-Amicon). Drugače pa so razmerja podobna našim. Koncentracije proteinov, določenih v našem poskusu pri klasični fermentaciji so se prav tako ujemale z njihovimi rezultati.

5.3 SKLEPI

- Ugotovili smo, da se sorazmerno s časom fermentacije zmanjšuje dolžina peptidov v vzorcih fermentiranega mleka.
- Po *in vitro* simulirani prebavi vzorcev fermentiranega mleka smo ugotovili podobno stopnjo hidrolize, kot med 24-urno fermentacijo v bioreaktorju pri konstantni vrednosti pH 6,5.
- Najboljšo inhibicijo angiotenzinske konvertaze smo opazili po dodatku vzorcev, ki so vsebovali peptide z ocenjeno povprečno dolžino med 10 in 14 AK.

- Mleko, fermentirano z jogurtovo kulturo YC380, je vsebovalo po naših ocenah največ kratkih peptidov, kljub temu smo največjo inhibicijo ACE ugotovili pri vzorcih, fermentiranih s startersko kulturo YC380-K7.

6 POVZETEK

Angiotenzinska konvertaza je encim, vključen v regulacijo krvnega tlaka. Ugotovljeno je bilo, da različni bioaktivni peptidi, ki izhajajo iz proteinov mleka, inhibirajo ACE, kar preprečuje porast krvnega tlaka. Prav tako je znano, da številni bioaktivni peptidi ali njihovi predhodniki nastajajo med fermentacijo mleka, odvisno od uporabljene starterske kulture in pogojev fermentacije. Namen naloge je bil vpeljati metodo za odkrivanje peptidnih inhibitorjev angiotenzinske konvertaze v mleku, fermentiranem z različnimi mlečnokislinskimi starterskimi kulturami in pri različnih pogojih fermentacije določiti inhibicijske aktivnosti na ACE.

Pri našem raziskovalnem delu smo najprej spoznali značilnosti reakcije ACE s kromogenim substratom FAPGG, ACE aktivnost pa smo določali s kontinuirno spektrofotometrično metodo. Kot vir encima smo uporabili ACE analitske čistote in kaptopril kot standardni inhibitor. Po optimizaciji metode smo pripravili fermentirano mleko z različnimi starterskimi kulturami in različnimi pogoji fermentacije. Proučili smo različne načine priprave vzorcev ter na podlagi poskusov sestavili lastno, nekoliko modificirano verzijo. Fermentirano mleko smo obarjali in filtrirali s filtrnim papirjem (Whatman 0,45 μm) in tako dosegli ločitev dolgih in kratkih peptidov.

Kot proteolitično najbolj aktivni sta se izkazali starterski kulturi YC380 in YC380 K7, saj smo v vzorcih, fermentiranih s tema dvema kulturama, s pomočjo Kjeldahlove in TNBS metode, ocenili najvišjo vsebnost kratkih peptidov. Molarno koncentracijo prostih amino skupin v vzorcih smo določili s pomočjo trinitrobenzensulfonske kisline, masno koncentracijo proteinov pa s pomočjo Kjeldahlove metode. Na podlagi omenjenih analiz smo ocenili tudi molarno in masno koncentracijo peptidov ter njihove povprečne dolžine. Inhibicijo ACE smo ugotavljali s predhodno optimizirano spektroskopsko metodo ob uporabi kromogenega substrata FAPGG. Vzorce klasične fermentacije smo še dodatno izpostavili simulirani *in vitro* prebavi in jih ultrafiltrirali, medtem smo vzorce, fermentirane v bioreaktorju z vzdrževanjem vrednosti pH pred analizo le filtrirali.

Ugotovili smo, da se sorazmerno s časom fermentacije zmanjšuje dolžina peptidov v vzorcih fermentiranega mleka ter da pride po *in vitro* simulirani prebavi vzorcev fermentiranega mleka do podobne stopnje hidrolize kot med 24-urno fermentacijo v bioreaktorju pri konstantni vrednosti pH 6,5.

Vzorci mleka po klasični fermentaciji in po simulirani prebavi so imeli več kot desetkrat slabše sposobnosti inhibicije ACE, kot pa vzorci le fermentiranega mleka. Vzorci fermentiranega mleka, v katerih smo ugotovili višjo molarno koncentracijo peptidov, so na naše presenečenje slabše inhibirali ACE, kot manj hidrolizirani vzorci.

Najpomembnejši lastnosti, ki vplivata na inhibicijski karakter peptidov, sta dolžina peptidov in njihova aminokislinska zgradba. Pri filtriranju vzorcev pa lahko pride do velikih sprememb, tako povečanja ali pomanjšanja ACE inhibitornih lastnosti vzorcev.

Z delom smo dokazali *in vitro* inhibicijo ACE z različnimi vzoci fermentiranega mleka in tako delno potrdili hipotezo. Ugotovili smo, da je po procesu *in vitro* prebave inhibicijska aktivnost vzorcev fermentiranega mleka manjša kot pred simulirano prebavo, kar je v nasprotju s postavljeno hipotezo.

7 VIRI

Abram V., Cigić B., Poklar-Ulrih N., Skrt M. 2006. Eksperimentalna biokemija: za študente biotehnologije in živilske tehnologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-92

Adler-Nissen J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27: 1256-1262

Alting A. C., Meijer R. J. G. M., van Beresteijn E. C. H. 1997. Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants. *Diabetes Care*, 20: 875-880

Bernard H., Meisel H., Cremion C., Wal J.M. 2000. Post-translation phosphorylation affects the IgE binding activity of caseins. *FEBS Letters*, 467: 239-244

Bogovič Matijašič B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7-a new candidate for a probiotic strain. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 2: 113-119

Bogovič Matijašič B., Stojković S., Salobir J., Malovrh Š., Rogelj I., 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. *Animal Research*, 53: 35-44

Boland M., MacGibbon A., Hill J. 2001. Designer milks for the new millennium. *Livestock Production Science*, 72: 99-109

Brody E.P. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition*, 84, Suppl. 1: 39-46

Bruck W. M., Kelleher S. L., Gibson G. R., Nielsen K. E., Chatterton D. E., Lonnerdal B. 2003. rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 37, 3: 273-280

Cigić B. 2001. Bioaktivni peptidi v hrani. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. novembra 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 109-119

Cigić B., Zelenik-Blatnik M. 2004. Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate. *Acta Chimica Slovenica*, 51: 177-188

Clare D. A., Swaisgood H. E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, 6: 1187-1195

Coates D. 2002. The angiotensin converting enzyme (ACE). *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 769-773

Cushman D. W., Cheung H. S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20: 1637-1648

Dornig F., Will J., Amasheh S., Clauss W., Ahlbrecht H., Daniel H. 1998. Minimal molecular determination of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 23211-23218

FitzGerald R. J., Murray B. A., Walsh D. J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134: 980-988

FitzGerald R. J., Murray B. A. 2006. Bioactive peptides and lactic fermentation. *International Journal of Dairy Technology*, 59: 119-125

Gill H.S., Doull F., Rutherford K.J., Cross M.L. 2000. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 58, Suppl. 1: 111-117

Godwin-Jesse F., Choi S. 1970. Quantification of protein solutions with trinitrobenzenesulfonic acid. *Clinical Chemistry*, 16, 1: 24-31

Hagiwara T., Shinoda I., Fukuwatari Y., Shimamura S. 1995. Effects of lactoferrin and its peptides on rat intestinal epithelial cell line, IE-18, in the presence of epidermal growth factor. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59, 10: 1875-1881

Herraiz T. 1997. Sample preparation and reversed phase-high performance liquid chromatography analysis of food-derived peptides. *Analytica Chimica Acta*, 352: 119-139

Holmquist B., Bunning P., Riordan J. 1979. A continuous spectrophotometric assay for the angiotensin converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 95: 40-48

Jolles P., Levy-Toledano S., Fiat A. M., Soria C., Gillessen D., Thomaidis A. Dunn F.W., Cean J.B. 1986. Analogy between fibrinogen and casein. *European Journal of Biological Chemistry*, 158: 379-384

Kilara A., Panyam D. 2003. Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 607-633

Kogej S. 1996. Mehanski separacijski procesi. V: *Biotehnologija: Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 571-590

Korhonen H., Pihlanto A. 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1297-1308

Korhonen H., Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945-960

Leclerc P.L., Gauthier S.F., Bachelard H., Santure M., Roy D. 2002. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal* 12: 995-1004

López-Fandiño R., Otte J., Camp van J. 2006. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16: 1277-1293

Lovšin K.I., Zelenik B. M., Gramc A. 1996. Sojini in sirotkini proteinski hidrolizati-priprava in karakterizacija. V: Tehnologija, hrana zdravje. 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, Bled, 21.-25. april 1996. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih sodelavcev Slovenije: 563-570

Meisel H. 2001. Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56: 83-92

Meisel H., Günther S. 1998. Food proteins as precursors of peptide modulating human cell activity. *Nahrung*, 42, 2: 175-176

Minervini F., Algaron F., Rizzello G. C., Fox F. P., Monnet V., Gobbetti M. 2003. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed casein of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 5297-5305

Murray B. A., Walsh D. J., FitzGerald R. J. 2004. Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 95: 127-137

Nakamura Y., Takano T. 1995. Angiotensin converting enzyme inhibitor and method for preparing same. United States Patent No. 5,449,661: 1-14

Okuyama T., Satake K., 1966. On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenyl amino acids and peptides. *Journal of Biochemistry*, 47: 454

Ondetti M. A., Cushman D. W. 1982. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry* 51: 283-308

Ouwehand A. C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 2nd. Salminen S., von Wright A. (eds.). New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, Inc.: 139-160

Petrillo Jr. E. V., Ondetti M. A. 1982. Angiotensin converting enzyme inhibitors: Biochemical properties and biological action. *Medical Research Reviews*, 2: 1-41

Pihlanto-Leppala A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 347-356

Pihlanto-Leppala A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16: 1306-1314

Pihlanto A., Korhonen H. 2003. Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47: 175-260

Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Pilola K., Tupasela T., Korhonen H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67: 53-64

Prupp A. H. 2005. Initial proteolysis of milk proteins and its effect on formation of ACE-inhibitory peptides during gastrointestinal proteolysis: a bioinformatic, in silico, approach. *European Food Research and Technology*, 221, 5: 712-716

Prupp A. H., Isaksson T., Stepaniak L., Sørhaug T. 2004. Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 219, 6: 579-583

Puhan Z. 1995. Influence of dairy technology on nutrition properties of milk and milk products. V: Knjiga izvlečkov. 1. slovenski mednarodni kongres "Mleko in mlečni izdelki" in 10. jubilejni mednarodni simpozij Inštituta za mlekarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani "Sodobna proizvodnja in predelava mleka", Portorož, 20. in 22. september 1995. Rogelj I. (ur.). Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 323-331

Quiros A., Hernández-Ledesma B., Ramos M., Amigo L., Recio I. 2005. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of Dairy Science*, 88, 10: 3480-3487

Rendina G. 1971. *Experimental methods in modern biochemistry*. Philadelphia, W. B. Saunders.: 76-77

Roberts P.R., Burney J.D., Black K.W., Zaloga G.P. 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal tract. *Digestion*, 60: 332-337

Robinson R. K., Itsranuwat P. 2002. The microbiology of concentrated and dried milks. V: *Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products*. 3rd ed. Robinson R. K. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 175-211

Robinson R. K., Tamime A. Y., Wszolek M. 2002. Microbiology of fermented milks. V: *Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products*. 3rd ed. Robinson R.K (ed.). New York, John Wiley & Sons: 367-430

Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. 2003. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541-577

Samah M. S., Zakora M., Otte J. 2006. Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*, 73: 178-186

Sekiya S., Kobayashi Y., Kita E., Imamura Y., Toyama S. 1992. Antihypertensive effects of tryptic hydrolysates of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 45, 6: 513-517

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

Strom M.B., Rekdal O., Svendsen J.S. 2000. Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives. *Journal of Peptide Research*, 56: 265-274

Vegarud G.E., Langsrud T., Svenning C. 2000. Mineral binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *British Journal of Nutrition*, 58: 91-98

Vermeirssen V., van Camp J., Verstraete W. 2002. Optimisation and validation of angiotensin converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 51: 75-87

Yamamoto N., Ozuki A., Akino A., Takano T. 1994 Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science* 77: 917-922

Yvon M., Chabanet C., Pélissier J.P. 1988. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 34, 3: 166-176

Oxoid. 2006. Mrs BROTH. Cambridge, Oxoid.
<http://www.owoid.com> (november 2006): 1 str

8 ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so me v času študija vzpodbujali, pomagali z nasveti. Posebna zahvala gre:

Mentorici prof. dr. Ireni Rogelj za mentorstvo, strokovno pomoč, tehtne pripombe in potrpežljivost pri končni izdelavi naloge.

Somentorju doc. dr. Blažu Cigiću za pomoč pri vodenju in načrtovanju poskusa ter urejanju misli pri pisanju diplomske naloge

Recenzentki dr. Veroniki Abram za temeljit pregled diplomske naloge.

Mr. Gorazdu Tompi za odlično timsko delo, pomoč pri iskanju literature ter vedno spodbudne besede.

Moji družini, Niku, Vesni, Jelki, Nataši, Ani, Neži, Angeli in Primožu, ki mi je v vsem vedno stala ob strani.

Moji Martini.

Sošolcem, kolegom in prijateljem.

PRILOGE

Priloga A: Razlaga oznak vzorcev

Oznaka vzorca	Razlaga oznake vzorca
YC380-TH4	Filtrat vzorca fermentiranega s kulturama YC 380 in TH4
TH4-K7	Filtrat vzorca YC TH4 K7
YC380-TH4-K7	Filtrat vzorca YC380 TH4 K7
TH4	Filtrat vzorca TH4
UHT	Filtrat vzorca temperiranega mleka
YC380-K7	Filtrat klasično fermentiranega vzorca s kulturama YC 380 in K7
YC380	Filtrat klasično fermentiranega vzorca s kulturo YC 380
YC380-K7 t(4, 6, 12, 24) B	Filtrat vzorca fermentiranega v bioreaktorju s kulturami YC380 in K7 ob različnih časih fermentacije
YC380 t(4, 6, 12, 24) B	Filtrat vzorca fermentiranega v bioreaktorju s kulturo YC 380 ob različnih časih fermentacije
UHT prebava 1:1	Filtrat vzorca temperiranega mleka, izpostavljenega simulirani prebavi; razmerje vzorec, želodčni sok 1:1
YC380-K7 prebava 1:1	Filtrat klasično fermentiranega vzorca s kulturami YC380 in K7, izpostavljenega simulirani prebavi; razmerje vzorec, želodčni sok 1:1
YC380 prebava 1:1	Filtrat klasično fermentiranega vzorca s kulturo YC380, izpostavljenega simulirani prebavi; v razmerju vzorec, želodčni sok 1:1
UHT prebava ultrafiltrat 1:1	Ultrafiltrat vzorca temperiranega mleka, izpostavljenega simulirani prebavi; razmerje vzorec, želodčni sok 1:1
YC380-K7 prebava ultrafiltrat 1:1	Ultrafiltrat klasično fermentiranega vzorca s kulturami YC380 in K7, izpostavljenega simulirani prebavi; razmerje vzorec, želodčni sok 1:1
YC-380 prebava ultrafiltrat 1:1	Ultrafiltrat klasično fermentiranega vzorca s kulturo YC380, izpostavljenega simulirani prebavi; razmerje vzorec, želodčni sok 1:1
Ultrafiltracijski ostanek YC380-K7	Ultrafiltracijski ostanek klasično fermentiranega vzorca s kulturo YC380