

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Barbara PAVEC

**PRIPRAVA ACE-INHIBITORNIH HIDROLIZATOV IZ
FERMENTIRANEGA MLEKA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION OF ACE-INHIBITORY HIDROLYSATES FROM
FERMENTED MILK**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijsko delo v okviru diplome je bilo opravljeno na Katedri za mlekarstvo, Oddelku 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.

Barbara Pavec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 637.146:579.222:547.96:577.15(043)=163.6
KG mleko/mlečni izdelki/bioaktivni peptidi/ugotavljanje bioaktivnih peptidov/
prebava/proteolitični encimi/inhibicija angiotenzinske konvertaze/*Lactobacillus
helveticus* BGRA43/*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8/*Lactobacillus
delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L12
AV PAVEC, Barbara
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 2008
IN PRIPRAVA ACE-INHIBITORNIH HIDROLIZATOV IZ FERMENTIRANEGA
MLEKA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 68 str., 32 pregl., 30 sl., 83 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, če med fermentacijo mleka z različnimi
mlečnokislinskimi starterskimi kulturami nastajajo peptidni inhibitorji
angiotenzinske konvertaze (ACE). ACE je encim, ki je vključen v regulacijo
krvnega tlaka. Proučili smo različne postopke priprave vzorcev: ultrafiltracijo,
ekstrakcijo na trdni fazi in dializo. Z vzorci fermentiranega mleka smo izvedli *in
vitro* simulacijo prebave s pepsinom in pankreatinom. Določili smo koncentracijo
prostih amino skupin v analiziranih vzorcih. ACE inhibitorno aktivnost peptidov
smo določili spektrofotometrično na mikrotitrskih ploščah z uporabo substrata
furanoakrilolil-L-fenilalanilglicilglicina (FAPGG) in kromatografsko s substratom
hipuroil-histidil-levcina (HHL). Najvišjo proteolitično aktivnost je imel sev
Lactobacillus helveticus BGRA43. Najboljšo inhibicijo ACE smo določili pri
vzorcu, fermentiranem s sevom *Lactobacillus helveticus* BGRA43, ultrafiltriranim z
membrano 2 kDa in ekstrahiranim s SPE. Podobno inhibitorno aktivnost so imeli
vzorci, ki smo jih dializirali. Vzorci, fermentirani s kulturama *Lactobacillus
delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 in L12 so imeli za dvakrat slabšo ACE-inhibitorno
aktivnost od vzorcev, fermentiranih s sevom *Lactobacillus helveticus* BGRA43.
Najnižjo ACE-inhibitorno aktivnost je imelo mleko in frakcije hidrolizatov z molsko
mason ad 10 kDa. Med simulacijo prebave so nastali ACE-inhibitorni peptidi,
vendar v manjši meri, kot med samo fermentacijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDK 637.146:579.222:547.96:577.15(043)=163.6
CX milk/milk products/bioactive peptides/determination of bioactive peptides /digestion/proteolytic enzymes/inhibition of angiotensin-converting enzyme/*Lactobacillus helveticus* BGRA43/*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8/*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L12
AU PAVEC, Barbara
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/CIGIĆ, 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 2008
TI PREPARATION OF ACE-INHIBITORY HIDROLYSATES FROM FERMENTED MILK
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 68 p., 32 tab., 30 fig., 83 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB The purpose of our work was to find if fermentation of milk with different lactic acid starter cultures results in formation of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. ACE is an enzyme, which helps to regulate blood pressure. Different procedures of sample preparation were studied, such as ultrafiltration, solid phase extraction (SPE) and dialysis. Samples of fermented milk were *in vitro* subjected to simulated digestion by adding pepsine and pancreatine enzymes. In samples concentration of free amino groups was determined. Furanoacryloil-L-phenylalanilglycylglycine (FAPGG) and hypuroil-histidyl-leucine (HHL) were used as substrates for the determination of ACE inhibitory peptides by spectrophotometry on microtiter plates and by liquid chromatography (HPLC), respectively. Milk fermented with *Lactobacillus helveticus* BGRA43, ultrafiltered through 2 kDa cut-off membrane and extracted on SPE expressed the most pronounced ACE inhibition. Similar ACE inhibition was determined on dialysed samples. Samples, fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 and L12 cultures showed half of the inhibition activity in comparison to samples fermented with *Lactobacillus helveticus* BGRA43. The lowest ACE inhibitory activity was determined for milk and fraction of hydrolysates with M_w above 10 kDa. During simulated digestion some ACE-inhibitorial peptides were created, but not as much as during the fermentation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOAKTIVNI PEPTIDI	3
2.2 BIOAKTIVNI PEPTIDI V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH.....	3
2.2.1 Bioaktivni peptidi s protimikrobnim delovanjem	4
2.2.2 Peptidi, ki preprečujejo strjevanje krvi (antitrombogeni peptidi)	4
2.2.3 Opioidni peptidi	4
2.2.4 Imunomodularni peptidi.....	6
2.2.5 Kazeino-fosfo peptidi.....	6
2.2.6 Glikomakro peptid (GMP)	6
2.2.7 Antioksidativni peptidi.....	6
2.2.8 ACE-inhibitorni peptidi.....	6
2.2.8.1 Angiotenzinska konvertaza (ACE).....	7
2.2.8.2 Regulacija krvnega tlaka	8
2.3 TVORBA BIOAKTIVNIH PEPTIDOV	9
2.3.1 Fermentacija mleka	9
2.3.2 Hidroliza proteinov s prebavnimi encimi.....	9
2.3.3 Hidroliza s proteolitičnimi encimi mikroorganizmov	10
2.4 ABSORPCIJA BIOAKTIVNIH PEPTIDOV <i>IN VIVO</i>	11
2.5 NAČINI SEPARACIJE PROTEINOV IN PEPTIDOV	12
2.5.1 Centrifugiranje	12
2.5.2 Filtracija in ultrafiltracija.....	12
2.5.3 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE – <i>angl.</i> solid phase extraction).....	12
2.5.4 Dializa	14
2.5.5 Liofilizacija.....	14
2.6 DOLOČANJE PROSTIH AMINO SKUPIN Z <i>O</i> -FTALALDEHIDOM (OPA METODA).....	14
2.7 AKTIVNOST ANGIOTENZINSKE KONVERTAZE.....	15

2.7.1	Fluorometrične metode	15
2.7.2	Radiološke metode	16
2.7.3	Spektrofotometrične metode	16
2.8	UPORABA RAZLIČNIH SUBSTRATOV PRI DOLOČANJU AKTIVNOSTI ACE	16
2.9	STARTERSKE KULTURE	18
3	MATERIAL IN METODE DELA	19
3.1	KRATEK POVZETEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	19
3.2	REAGENTI	19
3.2.1	Priprava raztopin:	20
3.3	PRIBOR IN OPREMA	22
3.4	SEVI BAKTERIJ IN GOJIŠČA	23
3.5	PRIPRAVA GOJIŠČ IN FERMENTACIJA	23
3.5.1	Priprava MRS bujona	23
3.5.2	Priprava rekonstituiranega mleka	23
3.5.3	Priprava inokuluma sevov <i>Lactobacillus helveticus</i> BGRA43, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L8 in <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L12	23
3.5.4	Fermentacija mleka s starterskimi kulturami	23
3.6	PRIPRAVA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA ZA ANALIZE	24
3.6.1	Postopek A	24
3.6.1.1	Ultrafiltriranje.....	24
3.6.1.2	Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)	24
3.6.1.3	Prepihovanje z dušikom	24
3.6.1.4	Liofilizacija	25
3.6.2	Postopek B	25
3.6.2.1	Liofilizacija	25
3.6.2.2	Dializa	25
3.7	<i>IN VITRO</i> SIMULACIJA PREBAVE	25
3.8	OZNAKE PERMEATOV IN RETENTATOV FERMENTIRANEGA MLEKA	26
3.9	UGOTAVLJANJE PROSTIH AMINO SKUPIN Z <i>O</i> -FTALALDEHIDOM	26
3.9.1	Potek spektrofotometričnega določanja	26
3.9.2	Umeritvena krivulja	27
3.10	EKSTRAKCIJA ACE IZ LIOFILIZIRANEGA TKIVA KUNČJIH PLJUČ	27
3.11	DOLOČANJE AKTIVNOSTI ACE	28
3.11.1	Spektrofotometrična metoda s FAPGG	28
3.11.2	Kromatografska metoda s HHL	28
3.11.2.1	Pogoji kromatografske analize	30
3.11.2.2	Inhibitorna aktivnost kaptoprila	30

4	REZULTATI.....	31
4.1	FERMENTACIJA VZORCEV.....	31
4.2	KONCENTRACIJA PROSTIH AMINO SKUPIN V VZORCIH FERMENTIRANEGA MLEKA	31
4.2.1	Koncentracija prostih amino skupin (C_{PAK}) pred in po fermentaciji mleka, v supernatantu	32
4.2.2	Koncentracija prostih amino skupin (C_{PAK}) v permeatih in retentatih fermentiranega mleka, obdelanega s SPE ali dializo	33
4.2.3	Koncentracija prostih amino skupin (C_{PAK}) v vzorcu fermentiranega mleka po simulirani prebavi.....	33
4.3	REZULTATI DOLOČANJA AKTIVNOSTI ACE	34
4.3.1	Določanje aktivnosti encima ACE z FAPGG.....	34
4.3.2	Določanje aktivnosti ACE s HHL	34
4.4	DOLOČANJE INHIBICIJE ACE S KAPTOPRILOM.....	35
4.5	ACE-INHIBITORNA AKTIVNOST VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA	37
4.5.1	Določanje ACE-inhibitorne aktivnosti vzorcev na mikrotitrskih ploščah s FAPGG.....	37
4.5.2	Določanje ACE-inhibitorne aktivnosti vzorcev s pomočjo HPLC.....	41
4.5.2.2	Določanje procent inhibicije ACE pri različnih razredčitvah vzorcev fermentiranega mleka.....	50
4.6	INHIBITORNA ACE-AKTIVNOST VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA PO SIMULIRANI PREBAVI	52
4.7	REZULTATI, KI SMO JIH DOBILI PRI RAZISKOVALNEM DELU S KROMATOGRAFSKO METODO	54
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	55
5.1	ACE-INHIBITORNA AKTIVNOST VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA.....	56
5.2	SKLEPI.....	59
6	POVZETEK.....	60
7	VIRI.....	61
8	ZAHVALA	68

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Bioaktivni peptidi iz mlečnih proteinov (Korhonen in sod., 1998).....	4
Preglednica 2: Različni mikroorganizmi in njihovi encimi, odgovorni za nastanek bioaktivnih peptidov (Korhonen in Pihlanto, 2006).....	10
Preglednica 3: Priprava 0,1 M boratnega pufra, pH=9,3±0,1.....	20
Preglednica 4: Priprava 0,1 M fosfatnega pufra, pH=8,3±0,1 z 0,4 M NaCl.....	20
Preglednica 5: Priprava 50mM Tris-HCl pufra pH=7,5±0,1 z 0,3 M NaCl.....	20
Preglednica 6: Priprava raztopine ACE s aktivnostjo 60 mU/ml.....	20
Preglednica 7: Priprava 5 mM HHL.....	20
Preglednica 8: Priprava eluenta B.....	21
Preglednica 9: Priprava eluenta A.....	21
Preglednica 10: Priprava 1 mM kaptoprila.....	21
Preglednica 11: Priprava 1,75 mM FAPGG.....	21
Preglednica 12: Priprava 20 % (m/V) natrijevega dodecil sulfata (SDS).....	21
Preglednica 13: Priprava 25 ml reagenta OPA.....	21
Preglednica 14: Označe permeatov in retentatov fermentiranega mleka.....	26
Preglednica 15: Koncentracije raztopin glutaminske kisline (umeritvena krivulja) 1.....	27
Preglednica 16: Pogoji kromatografske analize.....	30
Preglednica 17: Gradient eluentov A in B s časom.....	30
Preglednica 18: Vrednost pH vzorcev mleka med fermentacijo z različnimi sevi.....	31
Preglednica 19: Koncentracija prostih amino skupin (c_{PAK}) pred in po fermentaciji mleka z različnimi sevi.....	32
Preglednica 20: Koncentracija prostih amino skupin (c_{PAK}) v permeatih in retentatih fermentiranega mleka.....	33
Preglednica 21: Koncentracija prostih amino skupin (c_{PAK}) v permeatih in retentatih mleka, fermentiranega s sevom BGRA43, po simulirani prebavi in ekstrakciji s SPE.....	33
Preglednica 22: Padeč absorbance (ΔA) med reakcijo.....	39
Preglednica 23: Vrednost IC_{50} izračunana za različne vzorce.....	40
Preglednica 24: Razlaga oznak kromatogramov.....	44
Preglednica 25: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2kDa), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje.....	45
Preglednica 26: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2-10kDa), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje.....	45
Preglednica 27: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (10kDa), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje.....	46
Preglednica 28: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2kDaDIALIZA), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje.....	47
Preglednica 29: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (10kDaDIALIZA), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje.....	48
Preglednica 30: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2kDaSPE), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje.....	49
Preglednica 31: Razlaga oznak kromatogramov za vzorce fermentiranega mleka po simulirani prebavi.....	52
Preglednica 32: Vrednost IC_{50} izračunana za različne vzorce.....	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Funkcije bioaktivnih peptidov (Silva in Malcata, 2005).....	5
Slika 2: Vpliv peptidnih inhibitorjev proteinaze ACE na krvni tlak (Pihlanto-Leppälä, 2001).....	7
Slika 3: Renin-angiotenziski sistem (Fitzgerald in sod., 2004).....	8
Slika 4: Pripomoček za ekstrakcijo na trdni fazi (Phenomenex..., 2008).....	13
Slika 5: Hidroliza substrata HHL z ACE (Mehanna in Dowling, 1999).....	17
Slika 6: Umeritvena krivulja za glutaminsko kislino: odvisnost absorbance derivata, ki nastane pri reakciji z OPA, od koncentracije glutaminske kisline ($\lambda=340$ nm)	27
Slika 7: Diagram koncentracije prostih amino skupin v supernatantu mleka in supernatantih mleka, fermentiranega z različnimi starterskimi kulturami.	32
Slika 8: Odvisnost absorbance od časa, pri ugotavljanju maksimalne encimske aktivnosti ACE.....	34
Slika 9: Inhibicija ACE, pri različnih razredčitvah inhibitorja kaptoprila, pri spektrofotometrični metodi z uporabo substrata FAPGG	35
Slika 10: Inhibicija ACE, pri različnih razredčitvah inhibitorja kaptoprila, določena s kromatografsko metodo.....	35
Slika 11: Inhibicija ACE s standardom IPP	36
Slika 12: Potek reakcije z različnim virom ACE in vzorcem BGRA43 (2kDa).....	37
Slika 13: Potek reakcije z vzorcem BGRA43 (2kDa) in kontrolo (1,75 mM FAPGG).....	38
Slika 14: Inhibicija ACE pri različnih koncentracijah vzorca BGRA43 (2kDa)	38
Slika 15: Padec absorbance med reakcijo z vzorcema BGRA43 (10kDa) in BGRA43 (2kDaPP).....	39
Slika 16: Diagramski prikaz nastanka HA ($t_r = 4,01$ min) iz substrata HHL ($t_r = 7,03$ min), pri kontroli.....	43
Slika 17: Diagramski prikaz nastanka standarda HA	43
Slika 18: Prikaz nastanka HA, iz substrata HHL, pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDa).....	44
Slika 19a: Površine vrhov HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDa).....	44
Slika 19b: Površine vrhov HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDa).....	44
Slika 20a: Površine vrhov HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2-10kDa)	45
Slika 20b: Površine vrhov HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2-10kDa)....	45
Slika 21a: Površine vrhov HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDa).....	46
Slika 21b: Površine vrhov HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDa).....	46
Slika 22a: Površine vrhov HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaDIALIZA)	47
Slika 22b: Površine vrhov HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaDIALIZA).....	47
Slika 23a: Površine vrhov HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDaDIALIZA).....	48
Slika 23b: Površine vrhov HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDaDIALIZA).....	48
Slika 24a: Površine vrhov HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaSPE).....	49
Slika 24b: Površine vrhov HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaSPE) ..	49
Slika 25: Inhibicija ACE pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaDIALIZA)....	50
Slika 26: Inhibicija ACE pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDa)	50

Slika 27: Inhibicija ACE pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaPPSPE).....	51
Slika 28: Diagramski prikaz IC_{50} za različno obdelane vzorce mleka, fermentiranega z BGRA43.	51
Slika 29: Površine vrhov HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaPPSPE) ..	52
Slika 30: Površine vrhov HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDaPPSPE)	52

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kratica – okrajšava	Pomen
ACE	Angiotenzinska konvertaza
AK	Aminokislina
BGRA43	<i>Lactobacillus helveticus</i> BGRA43
Bz-Gly	N-benzoilglicin
Bz-Gly-His-Leu	N-benzoilglicil-histidil-levcin
FAP	Furanoakriloil-L-fenilalanin
FAPGG	Furanoakriloil-L-fenilalanilglicilglicin
GG	Glicilglicin
GMP	Glikomakro peptid
HA	Hipurna kislina
HHL (Hip-His-Leu)	Hipuroil-histidil-levcin
His-Leu	Histidil-levcin
IC ₅₀	50 % inhibicija ACE
IPP	Izolevcil-prolil-prolin
KE	Kolonijske enote
K _M	Michaelisova Mentenova konstanta
L8	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L8
L12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> L12
μEkv	Mikroekvivalent
MKB	Mlečnokislinske bakterije
MRS	Gojišče de Man - Rogosa – Sharp
OPA	<i>o</i> -ftalaldehid
Phe	Fenilalanin
Phe-His-Leu	Fenilalanil-histidil-levcin
RAS	Renin-angiotenzinski sistem
RCF (g)	Relativna centrifugalna sila (<i>angl.</i> relative centrifugal force)
RP-HPLC	Kromatografija z reverzno fazo visoke ločljivosti
SDS	Natrijev dodecil sulfat
SPE	Ekstrakcija na trdni fazi (<i>angl.</i> solid phase extraction)
TGGP	Tirozil-glicil-glicil-fenilalanin

TNBS	2,4,6-trinitrobenzensulfonska kislina
TNP	Trinitrofenol
t_r	Retencijski čas
VPP	Valil-prolil-prolin

1 UVOD

Proteini, ki so biološki polimeri aminokislin (AK), imajo veliko različnih struktur in funkcij. AK, iz katerih so sestavljeni, predstavljajo nabor 20 različnih molekul z značilno kemijsko zgradbo. Značilna sestava in zaporedje AK omogočata vsakemu proteinu, da se zvije v natančno določeno tridimenzionalno strukturo, ki jo potrebuje za določeno biokemijsko vlogo. AK imajo značilno zgradbo, pri kateri so na centralni ogljikov atom vezani vodikov atom, karboksilna skupina, amino skupina in stranska skupina (Cigić, 2001).

Proteine najdemo v različnih vrstah hrane, in sicer rastlinskega in živalskega izvora. V mleku so glavni proteini kazeini, ki predstavljajo 80 % beljakovin mleka. Kazeini dajejo po koagulaciji trdno konsistenco skuti, sirom in drugim mlečnim izdelkom. V mleku so prisotni v obliki kalcijevih soli. Koagulirajo v kislem okolju ali ob dodatku sirila. V molekulah kazeinov je le malo sekundarnih ali terciarnih struktur, saj vsebujejo veliko prolinskih ostankov, ki se ne povezujejo v višje strukture, in nič disulfidnih vezi. Kazeini tako pri segrevanju ne denaturirajo. V mleku se nahaja v obliki koloidne raztopine in tvorijo tako imenovane kazeinske micele, ki imajo lastnosti, podobne micelam iz površinsko aktivnih snovi - hidrofilni deli molekul so obrnjeni navzven proti vodni fazi, hidrofobni deli pa so v sredici. Kazeinske molekule združujejo v micele kalcijevi ioni in hidrofobne povezave (Rogelj in Perko, 2003).

Peptidi nastanejo med fermentacijo mleka s hidrolizo. Poznani sta dve vrsti hidrolize, in sicer kislinska in encimska. Kislinsko hidrolizo sprožimo z dodatkom kisline, encimska hidroliza pa poteka s pomočjo encimov, ki jih izločajo mlečnokislinske (MKB) bakterije med fermentacijo. Popolna hidroliza pomeni, da vsi proteini razpadejo na AK. Hidroliza mlečnih proteinov med fermentacijo ponavadi ni popolna, zato nastanejo proteinski hidrolizati oz. krajši peptidi, ki imajo lahko tudi določeno biološko aktivnost (Hernández in sod., 1990).

Proteini v mleku so prekurzorji različnih biološko aktivnih peptidov, ki nastajajo pri njihovi razgradnji. Dokler so sestavni del mlečnih proteinov so neaktivni, sprostijo pa se med encimsko proteolizo, med prebavo ali pa že med samim tehnološkim postopkom kot je fermentacija. Bioaktivni peptidi so potencialni modulatorji različnih regulatornih procesov v telesu in lahko pozitivno učinkujejo na zdravje. Učinkujejo predvsem na krvožilni, prebavni, imunski in živčni sistem, zato so, glede na njihovo aktivnost, razdeljeni na protimikrobne, antioksidativne, antitrombogene, antihipertenzijske in imunomodulatorne peptide (Pan in sod., 2005).

Na trgu se pojavlja vse več t. i. funkcionalne hrane, ki potrošniku zagotavljajo specifične, zdravju koristne učinke. Med temi izdelki prevladujejo mlečni proizvodi. Zelo pomembna za nastanek bioaktivnih peptidov je proteolitična aktivnost MKB. Različni sevi s svojo proteolitsko aktivnostjo zagotavljajo peptide, ki jih nato še dodatno s peptidazami razgradijo do krajših peptidov in AK (Pan in sod., 2005).

Mlečni izdelki, ki vsebujejo bioaktivne peptide z ACE-inhibitorno aktivnostjo, so zanimivi predvsem za potrošnike, ki so nagnjeni k večjemu tveganju za razvoj bolezni srca in ožilja. Angiotenzinska konvertaza (ACE) pretvori angiotenzin I v angiotenzin II, ki pa je odgovoren za zvišanje krvnega tlaka. Bioaktivni peptidi v funkcionalnih mlečnih izdelkih inhibirajo delovanje ACE in s tem povzročajo znižanje krvnega tlaka (Coates, 2003). Visok krvni tlak je dejavnik tveganja pri razvoju večjega števila bolezni srca in ožilja, ki ga je danes možno nadzorovati. Glede na dejstvo, da je tveganje za bolezni srca in ožilja večje pri sistoličnem krvnem tlaku nad 115 in diastoličnem nad 75 mm Hg, so strokovnjaki za zdravje znižali prej obstoječo mejo za krvni tlak, da bi dosegli bolj proaktivno in zgodnejše zdravljenje (FitzGerald in sod., 2004).

Na trgu so že prisotni mlečni izdelki, ki vsebujejo ACE-inhibitorne peptide. Med najbolj poznanimi sta t. i. Ameal STM in EvolusTM in sta na voljo na japonskem in finskem tržišču. Ameal STM je mlečni izdelek, fermentiran s sevom *Lactobacillus helveticus* LBK16H in kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. EvolusTM pa mlečni izdelek, fermentiran samo s sevom *Lactobacillus helveticus* LBK16H. Za oba produkta velja, da vsebujeta tripeptida, in sicer izolevcil-prolil-prolin (IPP) in valil-prolil-prolin (VPP). Za izdelka so bile narejene raziskave, ki kažejo, da znižujeta krvni tlak pri človeku in podganah. Tudi drugi mlečni fermentirani izdelki, ki so jih fermentirali z različnimi sevi *Lactobacillus helveticus*, imajo antihipertenzijski učinek. Bioaktivni peptidi z antihipertenzijskim delovanjem nastajajo tudi med zorenjem sira (FitzGerald in Murray, 2006). Osnova priznavanja funkcionalnih živil so zanesljive metode odkrivanja funkcionalnih sestavin, zato smo se osredotočili na metode ugotavljanja aktivnosti inhibitorjev ACE, ki je vključen v mehanizem regulacije krvnega tlaka.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naše naloge je bil ugotoviti, če med fermentacijo mleka, z različnimi starterskimi kulturami, nastajajo ACE-inhibitorni peptidi in njihovo ACE-inhibitorno aktivnost tudi potrditi. Da bi uspešno izpeljali zastavljeno nalogo, smo najprej vpeljali ustaljeno spektrofotometrično metodo po Shalaby-ju in sod. (2006) z uporabo substrata FAPGG in jo primerjali s kromatografsko metodo po Hyun in Shin-u (2000) z uporabo substrata HHL.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Pri eksperimentalnem delu smo skušali ugotoviti inhibitorno aktivnost peptidov, ki nastajajo med fermentacijo mleka. Bistvo dela je bilo najti najbolj hitro in učinkovito "screening" metodo. Kot vir ACE smo uporabili ekstrakt kunčjih pljuč. Iz literature je poznano, da nastajajo med fermentacijo mleka z *Lactobacillus helveticus* CECT 402 in *Lactobacillus rhamnosus* CECT 287 ter med prebavo peptidi – ACE-inhibitorni hidrolizati. Predvidevali smo, da bodo ACE-inhibitorni peptidi nastajali tudi med fermentacijo mleka z izbranimi sevi iz zbirke Katedre za mlekarstvo. Fermentirano mleko smo izpostavili tudi *in vitro* simulaciji prebave, saj smo predvidevali, da se bo koncentracija ACE-inhibitornih peptidov še povečala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOAKTIVNI PEPTIDI

Bioaktivni peptidi so specifični fragmenti proteinov iz različnih živil, ki imajo pozitiven vpliv na telesno aktivnost in kondicijo ter sploh na zdravje človeka (Kitts in Weiler, 2003). Bioaktivni peptidi so vse pogostejše sestavine funkcionalnih prehranskih izdelkov in so potencialni regulatorji različnih procesov v telesu (Clare in Swaisgood, 2000).

2.2 BIOAKTIVNI PEPTIDI V MLEKU IN MLEČNIH IZDELKIH

Fermentirani mlečni izdelki predstavljajo bogat vir bioaktivnih peptidov (Preglednica 1 in slika 1) (Clare in Swaisgood, 2000; FitzGerald in sod., 2004; Kilara in Panyam, 2003). V človeškem organizmu bioaktivni peptidi vplivajo na različne sisteme (Clare in Swaisgood, 2000). Kazeini, kot glavna proteinska komponenta mleka, imajo pomembno vlogo pri nastanku bioaktivnih peptidov z multifunkcijskimi lastnostmi, ki jih v grobem delimo na: ACE-inhibitorne, imunomodulatorne, protimikrobne, antitrombogene ter antioksidativne (Silva in Malcata, 2005).

Potrebno je omeniti, da se *in vitro* meritve aktivnosti peptidov ponavadi razlikujejo od meritev *in vivo*, saj se hidrolizati, ki nastanejo s hidrolizo mlečnih proteinov, lahko nadalje razgradijo med samim procesom prebave in inaktivirajo, po drugi strani pa lahko pri istem procesu nastanejo tudi novi ACE-inhibitorni peptidi, kar potrjujejo tudi študije z *in vitro* simulacijo prebave (Parrot in sod., 2003).

V zadnjih nekaj letih je bilo opravljenih ogromno raziskav na področju bioaktivnih peptidov. Vpeljane so bile različne metode za določanje, karakterizacijo in izolacijo le-teh. Za nastanek bioaktivnih peptidov je pomembno, kateri encimi so vključeni v sintezo bioaktivnih snovi iz mlečnih proteinov, saj njihova AK sekvenca nastalih peptidov določa njihovo biološko aktivnost. Na nastanek bioaktivnih peptidov vpliva tudi proteolitična aktivnost MKB. Pri proteolizi nastanejo bioaktivni peptidi, ki imajo določeno fiziološko funkcijo (Pan in sod., 2005). Pomembno je, da so bioaktivni peptidi rezistentni na razgradnjo v prebavnem traktu in pri oralni zaužitvi tudi na peptidaze, da se lahko izrazi učinkovitost le-teh (Fitzgerald in Murray, 2006).

Preglednica 1: Bioaktivni peptidi iz mlečnih proteinov (Korhonen in sod., 1998)

Bioaktivni peptidi	Prekurzorski protein	Bioaktivnost
Kazomorfini	α - in β -kazein	opioidni agonist
α -laktorfin	α -laktalbumin	opioidni agonist
β -laktorfin	β -laktoglobulin	opioidni agonist
Laktoferoksin	laktoferin	opioidni antagonist
Kazoksin	κ -kazein	opioidni antagonist
Kazokinin	α - in β -kazein	antihipertenzijsko delovanje
Kazoplatelin	κ -kazein, transferin	antitrombogeno delovanje
Imunopeptidi	α - in β -kazein	stimulacija imunskega sistema
Fosfopeptidi	α - in β -kazein	nosilci mineralov
Laktofericin	laktoferin	protimikrobno, imunomodularno delovanje

2.2.1 Bioaktivni peptidi s protimikrobnim delovanjem

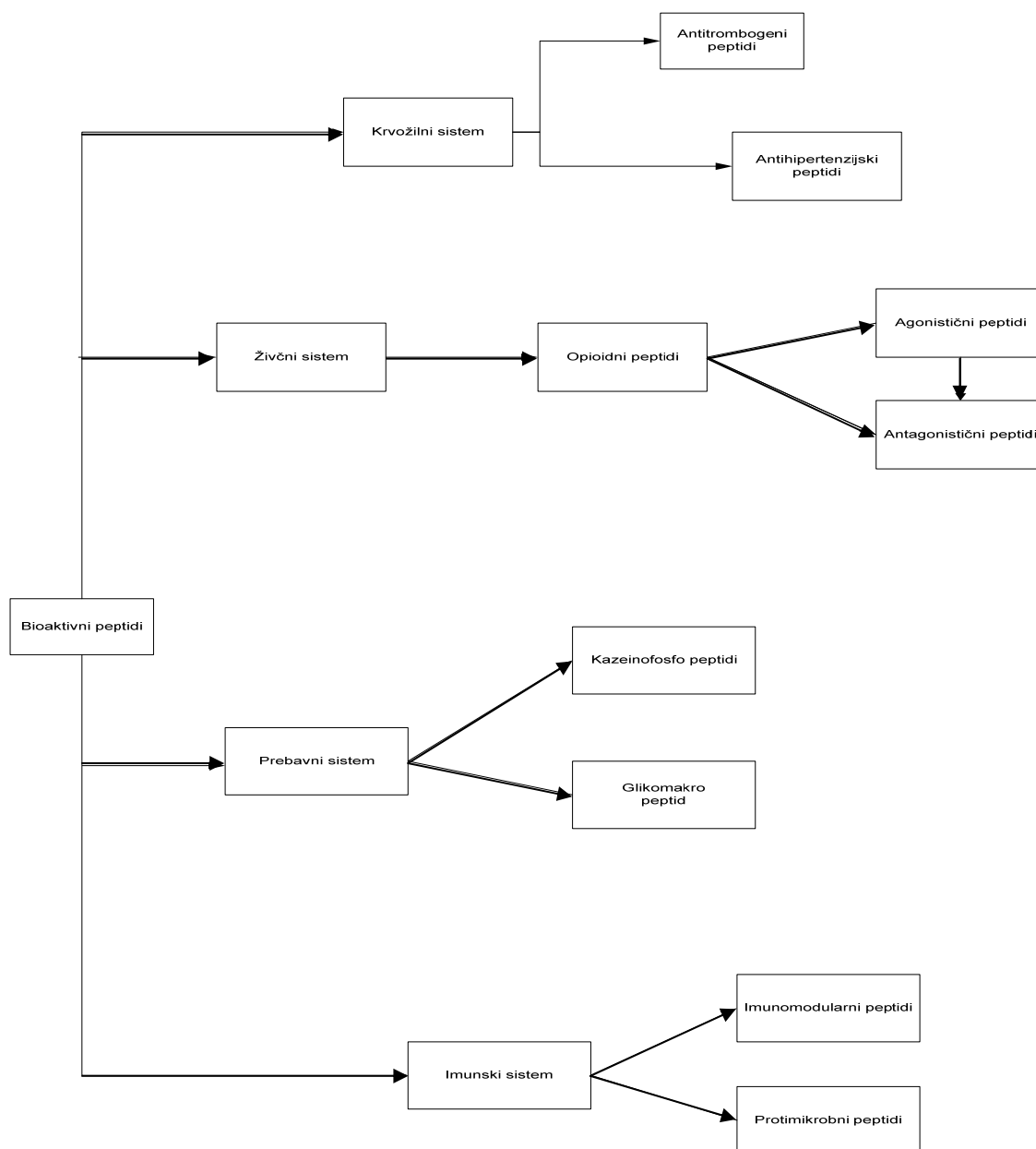
Nekateri peptidi s protimikrobnim delovanjem so iz mlečnih proteinov. Poznamo laktoferin, kazecidin ter izracidin, ki preprečujejo rast nekaterih patogenih bakterij kot so *Streptococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyrogenes*, *Escherichia coli* ter plesni *Candida albicans*. Najverjetneje delujejo tako, da tvorijo pore v membranah določenih vrst bakterij, kar povzroči propad teh organizmov. Pri ovcah in govedu preprečujejo nastanek mastitisa (Clare in Swaisgood, 2000). Protimikrobni peptidi sodelujejo pri obrambi mnogih višjih organizmov pred bakterijami (Silva in Malcata, 2005).

2.2.2 Peptidi, ki preprečujejo strjevanje krvi (antitrombogeni peptidi)

V proces strjevanja krvi je vključen protein fibrinogen. Med fermentacijo mleka nastajajo fragmenti κ -kazeina, ki so strukturno in funkcionalno podobni fibrinogenu. Med njimi je peptid kazoplatein, ki inhibira agregacijo in povezovanje fibrinogenih vlaken ter s tem prepreči strjevanje krvi (Clare in Swaisgood, 2000). Fragment f103-111 κ -kazeina pa preprečuje strjevanje krvi samo zato, ker inhibira agregacijo, ne vpliva pa na povezovanje fibrinogenih vlaken (Silva in Malcata, 2005).

2.2.3 Opioidni peptidi

Opioidni peptidi vplivajo na živčni sistem. Pomembni opioidni peptidi so bili odkriti v fermentiranih mlečnih izdelkih, in sicer enkefalin, endorfin ter dinorfin in vsi imajo enako N-terminalno zaporedje TGGP (tirozil-glicil-glicil-fenilalanin). Opioidni peptidi, ki nastanejo iz proteinov, imajo vsi na N-koncu tirozin ter na 3 ali 4 mestu aromatsko AK. Nastajajo iz α -kazeinov ter α -laktoglobulina in β -laktoalbumina. Ti peptidi imajo nasprotno delovanje in se jih loči glede na različne sekvence N-konca. Dva izmed prvih odkritih opioidnih peptidov sta bila α -laktorfin in β -laktorfin. Njun nasprotni učinek je v tem, da α -laktorfin upočasnjuje peristaltiko črevesja, β -laktorfin pa ima nasprotni učinek, čeprav se oba vežeta na isti tip receptorja (Silva in Malcata, 2005; Pihlanto-Leppälä, 2001).



Slika 1: Funkcije bioaktivnih peptidov (Silva in Malcata, 2005).

2.2.4 Imunomodularni peptidi

Ti peptidi spodbujajo delovanje imunskega sistema in so večinoma izolirani iz mlečnih proteinov. Ugotovili so, da uživanje mlečnih izdelkov zmanjšuje možnost za nastanek rakavih obolenj na črevesju. Imunomodularni peptidi vplivajo na imunski sistem tako, da se vežejo na različne receptorje, ki jih imajo na površini celice imunskega sistema, limfociti in makrofagi (Silva in Malcata, 2005). Makropeptidi kazeina pospešujejo rast mikroflore človeškega prebavnega trakta, kot so bifidobakterije in laktobacili, ter pomagajo pri prebolevanju črevesnih infekcij (Bruck in sod., 2003).

2.2.5 Kazeino-fosfo peptidi

Ti peptidi imajo citomodulatorni vpliv, kar pomeni, da vplivajo na rast in delitev različnih celic (Meisel in FitzGerald, 2003). Silva in Malcata (2005) ugotavljata, da uživanje mlečnih proteinov lahko ščiti telo pred rakom debelega črevesa, ker kazeino-fosfo peptidi povzročajo celično smrt določenih rakavih celičnih linij. Za bioaktivne peptide je znano tudi, da vežejo ione makroelementov, kot so kalcij, magnezij in železo ter oligoelementov, kot so cink, baker, nikelj in selen. Prav tako fosfopeptidi, ki vežejo nase ione kalcija, inhibirajo nastanek kariesa.

2.2.6 Glikomakro peptid (GMP)

El-Salam in sod. (1996) so dokazali pomen in uporabnost GMP pri dietah za uravnavanje delovanja jeter, ki so poškodovana. GMP imajo sposobnost vezave različnih kovinskih ionov kot so kalcij, železo in cink. To poveča resorbcijsko mineralov v prebavnem traktu, kar pa zmanjšuje nastanek rahitisa. Za te proteine je značilno, da so hidrofilni, ker vsebujejo oligosaharide, ki so -OH povezani med treoninom in serinom. Največ jih najdemo v sirotki (Silva in Malcata, 2005).

2.2.7 Antioksidativni peptidi

Antioksidanti so zelo pomembni v prehrani človeka. Preprečujejo nastanek radikalov, peroksidov in ostalih produktov, ki povzročajo letalne celične spremembe. Mlečni antioksidativni peptidi so sestavljeni iz 5 do 11 AK, med katerimi so hidrofobne AK: prolin, histidin, tirozin ali triptofan (Pihlanto, 2006).

2.2.8 ACE-inhibitorni peptidi

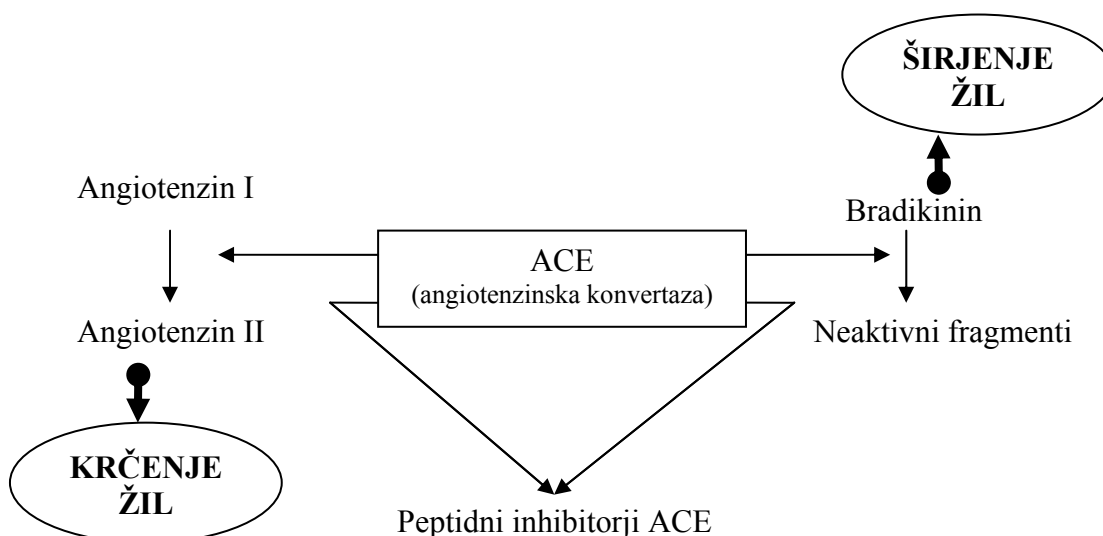
Peptidi, ki inhibirajo ACE, so iz skupine antihipertenzijskih peptidov. Ti peptidi nastanejo med procesom proteolize mlečnih proteinov, med fermentacijo, s peptidazami in proteinazami MKB ali med samo proteolizo že fermentiranih izdelkov (zorenjem sira) ter med encimsko hidrolizo v prebavnem traktu (FitzGerald in sod., 2004, FitzGerald in

Murray, 2006). Večina ACE-inhibitornih peptidov ima prolinski ostanek na C-terminalnem koncu. Prolin je znan po svoji odpornosti proti razgradnji s prebavnimi encimi, kratki peptidi, ki ga vsebujejo, pa lahko prosto prehajajo iz tankega črevesja v krvni obtok (Korhonen in Pihlanto, 2006).

Bioaktivne peptide, ki inhibirajo ACE, so našli v različnih prehranskih proteinih, in sicer v kazeinu (Pihlanto-Leppälä in sod., 1998), sirotkinih proteinih (Hernández-Ledesma in sod., 2002), ribjih proteinih, sojinih proteinih (Wu in Ding, 2001) ter glutenu iz koruze (Suh in sod., 2003). Za te peptide, ki imajo *in vitro* ACE-inhibitorno aktivnost, so dokazali *in vivo*, da inhibirajo ACE ter da imajo antihipertenzijski učinek brez neželenih stranskih učinkov pri podganah in ljudeh s povišanim krvnim tlakom. Ti prehranski proteini, katerih derivati so ACE inhibitorni peptidi, so pomembni pri proizvodnji funkcionalne hrane, ki preprečuje povišanje krvnega tlaka ter uravnava krvni tlak (Li in sod., 2005).

2.2.8.1 Angiotenzinska konvertaza (ACE)

ACE je angiotenzin-konvertaza oziroma peptidil-dipeptid-hidrolaza, ki cepi dipeptide s C-konca različnih proteinskih substratov. ACE je katalizator spremembe angiotenzina I v angiotenzin II, zvišuje krvni tlak in nivo aldosterona v krvi ter inaktivira bradikinin, ki deluje v telesu vazodilatatorno, to pomeni, da povzroča širjenje žil (Clare in Swaisgood, 2000).

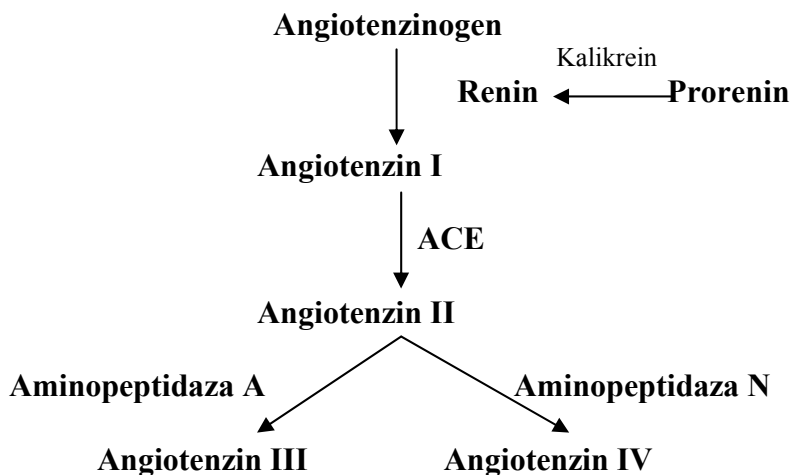


Slika 2: Vpliv peptidnih inhibitorjev proteinaze ACE na krvni tlak (Pihlanto-Leppälä, 2001)

ACE deluje optimalno pri temperaturi 45 °C in vrednosti pH 8,3 (Pihlanto-Leppälä, 2001). Renin-angiotenzinski sistem (slika 3), v katerega je vključen tudi encim ACE, skrbi za uravnavanje krvnega tlaka. Inhibicija ACE se izraža kot trenutno znižanje krvnega tlaka.

2.2.8.2 Regulacija krvnega tlaka

Krvni tlak uravnavajo različne, med seboj povezane biokemijske poti. Glavna regulacija krvnega tlaka v organizmu poteka pod vplivom renin-angiotenzin (slika 3) regulacijskega sistema (RAS). Dodatne peptide, ki vplivajo na krvožilni sistem in so od ACE neodvisni, tvorijo kinin-dušikov oksidni sistem, sistem nevtralne endopeptidaze in encimski sistem, ki konvertira endotelin. Sintetizirajo se različni regulatorni encimi, ki skupaj vplivajo na krvni tlak in tekočinsko ter elektrolitsko ravnotežje preko membransko vezanih receptorjev, ki so v različnih tkivih človeškega telesa (FitzGerald in sod., 2004). RAS je eden glavnih regulatorjev krvnega tlaka, elektrolitskega ravnotežja, ledvične, živčnih in endokrinih funkcij, ki so povezane s kontrolo krvožilnega sistema v telesu (slika 3). Začetek delovanja RAS se začne z neaktivnim predhodnikom, angiotenzinogenom. To je glikopeptid z molekularno maso 60 kDa, ki je v plazmi in cerebrospinalni tekočini, kot tudi v številnih tkivih. Je edini znani predhodnik angiotenzina I in prav tako edini znani substrat renina. Renin je proteinaza, ki jo sestavlja približno 350 amino kislin. Glavni izvor renina so jukstaglomerularne ledvične celice, izoliran pa je bil tudi iz submaksilarne žleze in amnijske tekočine. Pod vplivom kalikreina nastane iz neaktivnega predhodnika prorenina. Renin je odgovoren za sproščanje angiotenzina I iz angiotenzinogena. Angiotenzin I je dekapeptid, ki se pod vplivom renina sprošča iz N-terminalnega dela angiotenzinogena. Encim ACE odstrani C-terminalni dipeptid HL iz angiotenzina I, kar ima za posledico nastanek angiotenzina II, ki je močan vazokontraktor. ACE odstrani tudi C-terminalni dipeptid bradikinin (močan vazodilatator), kar povzroči nastanek neaktivnih peptidnih fragmentov (Fitzgerald in sod., 2004).



Slika 3: Renin-angiotenzinski sistem (FitzGerald in sod., 2004).

2.3 TVORBA BIOAKTIVNIH PEPTIDOV

V zadnjih letih so znanstveniki ugotovili, da so proteini hrane bogat vir biološko aktivnih peptidov. Ti peptidi so neaktivni, kadar so še sestavni del proteina. Tako se lahko iz proteinov mleka sprostijo na tri načine: s fermentacijo, s prebavnimi encimi in s proteolitičnimi encimi mikroorganizmov.

2.3.1 Fermentacija mleka

Fermentacija je najstarejši način konzerviranja hrane. Pri tem postopku dobijo izdelki značilno teksturo in aromo. Fermentirano mleko sodi med najstarejše mlečne izdelke. Sedaj je najbolj razširjeno in popularno fermentirano mleko jogurt. Proizvodnja fermentiranih mlečnih izdelkov je danes vodena s selekcioniranimi starterskimi kulturami.

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).

Starterske kulture so lahko sestavljene iz različnih vrst bakterij, kvasovk, plesni ter mešanice teh treh. Najpomembnejše so MKB, ki so tudi del avtohtone mikroflore človeškega in živalskega prebavnega trakta. Uravnavajo črevesno mikrofloro in preprečujejo razmnoževanje patogenih bakterij. MKB imajo pomembno vlogo pri proizvodnji hrane (Ouweland, 1998).

Med fermentacijo s starterskimi kulturami *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* nastanejo bioaktivni peptidi (Korhonen in Pihlanto, 2006). Med njimi so zelo raziskani ACE-inhibitorni peptidi, ki se sprostijo iz proteinov mleka med fermentacijo z bakterijo *Lactobacillus helveticus*. Nastajajo kazeinski ACE-inhibitorni peptidi, predvsem f142-147, f157-164 in f194-199 iz α_{s1} -kazeina ter f108-113, f177-183 in f193-198 iz β -kazeina. Najbolj znana ACE-inhibitorna peptida sta VPP (Val-Pro-Pro) in IPP (Ile-Pro-Pro) iz β -kazeina (Nakamura in sod., 1995). Gobbetti in sod. (2000) so ugotovili, da imajo najvišjo ACE-inhibitorno aktivnost peptidi, ki se med fermentacijo sprostijo iz β -kazeina. Inhibitorna aktivnost peptidov je podana z vrednostjo IC_{50} . IC_{50} je definirana kot tista koncentracija bioaktivnih peptidov, ki inhibira aktivnost ACE za 50 %.

2.3.2 Hidroliza proteinov s prebavnimi encimi

Gill in sod. (2000) so ugotavljali, da pri hidrolizi mlečnih proteinov s prebavnimi encimi (pepsin in tripsin) *in vitro* nastanejo peptidi z imunomodulatornim učinkom na krvne limfocite. Peptidi, sproščeni iz γ -kazeina in α_{s1} -kazeina, zavirajo nastanek limfocitov v

krvi, medtem ko peptidi sproščeni iz β - in κ -kazeina predvsem spodbujajo nastanek limfocitov (Sutas in sod., 1996).

Med hidrolizo proteinov s prebavnimi encimi nastajajo tudi ACE-inhibitorni bioaktivni peptidi. Nastajajo po hidrolizi s tripsinom, alkalazo, kimotripsinom, pankreatinom, pepsinom in termolizinom. Raziskave so pokazale, da ACE-inhibitorno aktivnost prav tako kažejo peptidi iz α_{s2} -kazeina, vendar pa je aktivnost peptidov iz α_{s1} -kazeina največja. ACE-inhibitorni peptidi so znani tudi iz γ -kazeina (Pihlanto-Leppälä in sod., 1998).

Nekateri bioaktivni peptidi lahko prosto prehajajo skozi membrano enterocitov. Drugi dipeptidi in tripeptidi se vežejo na določene receptorje, nato pa lahko prehajajo skozi apikalno membrano v citosol enterocitov ali pa preko bazolateralne membrane, deloma z difuzijo, deloma z aktivnim transportom (Dornig in sod., 1998). V krvnem obtoku so našli tudi večje peptide. Teh večjih peptidov je zelo malo, kar omejuje njihov dejanski učinek po zaužitju in prebavi hrane (Pripp, 2005).

2.3.3 Hidroliza s proteolitičnimi encimi mikroorganizmov

Med uporabnimi industrijskimi starterskimi kulturami je veliko proteolitičnih (preglednica 2). To pomeni, da imajo proteinaze in veliko znotraj celičnih peptidaz, endopeptidaz, aminopeptidaz, tripeptidaz ter dipeptidaz, ki vplivajo na razgradnjo mlečnih proteinov (Christensen in sod., 1999). Na nastanek bioaktivnih peptidov in na delovanje mikrobioloških proteolitičnih encimov ima velik vpliv proizvodnja in kakovost mlečnega izdelka (Smacchi in Gobetti, 2000).

Tudi študija Yammamota in sod. (1994) je pokazala, da s proteolitičnimi encimi MKB nastajajo bioaktivni peptidi. V študiji so Mizuno in sod. (2004) ugotavljali ACE-inhibitorno aktivnost z devetimi proteolitičnimi encimi. Med encimi, ki so jih uporabljali, so največjo aktivnost *in vitro* pokazali hidrolizati proteaze, izolirane iz *Aspergillus oryzae*.

Preglednica 2: Različni mikroorganizmi in njihovi encimi, odgovorni za nastanek bioaktivnih peptidov (Korhonen in Pihlanto, 2006)

Mikroorganizmi in encimi	Prekurzorski protein	Peptidna sekvenca
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	β - kazein, κ - kazein	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro
proteinaza <i>Lactobacillus</i> GG	β - kazein, α_{s1} - kazein	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp
proteinaza <i>Lb. helveticus</i> CP90	β - kazein	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-(Glu)
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SS1, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	β - kazein, κ - kazein	številni fragmenti
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	β - kazein	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile
<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	β - kazein	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro
proteinaza <i>Lb. helveticus</i> ICM1004	hidrolizat posnetega mleka	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro
<i>Lb. rhamnosus</i> + <i>in vitro</i>	β - kazein	Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe, Tyr-

simulacija prebave	Gln-Glu-Pro-Val-Leu
--------------------	---------------------

2.4 ABSORPCIJA BIOAKTIVNIH PEPTIDOV *IN VIVO*

Primarna funkcija proteinov hrane je, da so telesu nujno potreben vir esencialnih in neesencialnih AK in dušikovih spojin (Froetschel, 1996). V mleku so kazeini pomemben vir tudi biološko aktivnih peptidov. Kot smo že omenili, se peptidi sprostito iz večjih molekul kazeina z encimsko proteolizo *in vitro* ter *in vivo* in nastajajo tudi med prebavo v prebavnem traktu. Bioaktivni peptidi zgleда, da skrbijo za absorpcijo hranil (fosfopeptidi, kazomorfini), izločanje hormonov po hranjenju (kazomorfini), ščitijo imunski sistem (imunopeptidi, kazokinini, kazomorfini) ter sodelujejo pri prenosu informacij po živčevju (kazokini) (Schlimme in Meisel, 2006). Bioaktivni peptidi se med prebavo v črevesju sprostito s pomočjo številnih encimov, ki sodelujejo pri hidrolizi proteinov oz. peptidov. Pri prebavi peptidov sodelujejo tudi mikroorganizmi debelega črevesa, ki proizvajajo večje količine številnih peptidaz, ki v glavnem sodijo v štiri razrede: endopeptidaze, aminopeptidaze, karboksipeptidaze in dipeptidaze (Pihlanto in Korhonen, 2003).

Glavno mesto absorpcije peptidov predstavlja tanko črevo, ki ima na različnih delih različno sposobnost absorpcije produktov proteinske razgradnje. Sposobnost tankega črevesa za absorpcijo AK in peptidov je lahko zelo različna. Te razlike so opazne predvsem v času razvoja, nosečnosti in laktacije, lahko pa so posledica bolezni, črevesnega izločanja in sprememb v kakovosti in količini zaužite hrane. Končni produkti prebave proteinov, AK in peptidi, se absorbirajo s pomočjo različnih mehanizmov (Roberts in sod., 1999).

Roberts in sod. (1999) so v raziskavi ugotovili, da se dipeptidi in tripeptidi lahko absorbirajo celi. Ne ve se, kaj se zgodi z večjimi peptidi in manjšimi proteini. Skratka, ni jasno, kakšen je biološki potencial le-teh, da se absorbirajo in kolikšna je količina peptidov, ki mora priti v črevo, da pride lahko do biološkega učinka. Z raziskavo so Roberts in sod. (1999) dokazali, da se manjši (di- in tripeptidi) in večji (10-51 amino kislin) peptidi, ki nastanejo med prebavo, lahko absorbirajo z difuzijo skozi črevo ter učinkujejo v tkivih.

2.5 NAČINI SEPARACIJE PROTEINOV IN PEPTIDOV

2.5.1 Centrifugiranje

Centrifugiranje je postopek, pri katerem s hitrim vrtenjem ustvarimo veliko umetno gravitacijsko polje, ki ob delovanju na delce v raztopini povzroči njihovo gibanje, katerega smer in hitrost sta odvisni od hitrosti, s katero se vrti centrifugirka, od položaja delca v centrifugirki ter od lastnosti delca in medija. Dejstvo je, da se med centrifugiranjem 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). Posebne ultracentrifuge pa lahko uporabimo tudi za separacijo makromolekul (Kogej, 1996).

2.5.2 Filtracija in ultrafiltracija

Filtracija je tehnika, ki omogoča ločevanje suspenzije v koncentrirano (filtracijsko pogačo) in razredčeno (filtrat) komponento. Suspenzijo z določeno silo potiskamo skozi filtrni medij. To so največkrat membrane, ki ločujejo molekulske vrste med seboj, tako da nekatere zadržujejo, druge pa prepuščajo. Da dobimo delce različnih velikosti, uporabljamo različne membrane, ki imajo različno velike pore (Kogej, 1996). Na površini filtrnega sredstva nastaja vedno debelejša plast filtrne pogače, skozi katero pronica filtrat. Dogajanje lahko opišemo s tokom kapljevine skozi strnjen sloj delcev oz., če predpostavimo, da so med delci kapilare, z laminarnim tokom kapljevine po ceveh. Zaradi debeljenja pogače se večja tudi dolžina kapilar oziroma večja upor proti toku filtrata (Lakota in Pavko, 2000).

Ultrafiltracija je membranski separacijski proces, ki poteka pri normalni temperaturi in z uporabo mehanske oblike pogonske energije. Uporabljamo jo pri separaciji termično in kemijsko občutljivih bioloških materialov, kot so encimi, proteini in bakterije. Je preprosta in zanesljiva metoda za ločevanje peptidov glede na njihovo molekulsko maso. Uporabljamo jo za izolacijo in koncentriranje mlečnih proteinov ter encimov. Z ultrafiltracijo, z uporabo filtrov z velikostjo por 10 kDa, lahko iz raztopin odstranimo in ločujemo peptide (<100 kDa) in kDa, ki so namenjene analizi (Kogej, 1996).

2.5.3 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE – *angl. solid phase extraction*)

Ekstrakcija je postopek, s katerim odstranjujemo iz trdnih ali tekočih zmesi topne komponente s topilom. Poteka v dveh zaporednih postopkih. V prvem spravimo zmes v intenziven stik s topilom, v drugem pa obe fazi ločimo. Ta metoda omogoča ekstrakcijo, ločbo in adsorbcijo ene ali več komponent iz tekoče faze (vzorec) na stacionarno fazo (Knez, 1996). S to tehniko ločujemo snovi, ki se različno močno adsorbirajo na stacionarno fazo in nato desorbirajo z mobilno fazo. Adsorbcijo povzročajo šibke van der Waalsove

sile. Za separacijo komponent je pomembna razlika v njihovi adsorpciji, to je vezavi na površino adsorbenta in njihovi topnosti v mobilni fazi. Adsorbent mora biti kemijsko čim bolj inerten, imeti mora veliko površino, ki je dosežena s poroznostjo delcev in biti mora primerne granulacije, da je omogočen pretok mobilne faze. Spojine lahko eluiramo z mobilno fazo le z enim ali pa z več topili. Adsorbirana količina snovi na adsorbentu narašča s koncentracijo topljenca v mobilni fazi, ki je v stiku s trdno fazo (Anzelc, 2006).

Princip ekstrakcije na trdni fazi zajema več zaporednih postopkov, ki vodijo k izolaciji analita od matriksa (cit. po Simpson in Van Horne, 1985):

- spiranje kolone z metanolom in kondicioniranje z raztopino ustreznega pufra – A,
- nanos vzorca, ki je navadno raztopljen v pufri – A,
- spiranje matriksa s stacionarne faze z mešanico pufra – A in metanola ali kakšnega drugega organskega topila, v različnih razmerjih, kar je odvisno od tega, kako močno se analit veže na sorbent v koloni,
- sušenje sorbenta z nadtlakom dušika: navadno traja do tri minute in je posebno pomembno, če stopnji spiranja analita z organskim topilom sledi izparevanje topila do suhega, kot stopnja predkoncentriranja vzorca,
- elucija analita s kolone z ustreznim organskim topilom ali pufro mešanico z ustrežno vrednostjo pH.

SPE je metoda, ki je ponovljiva, enostavna ter zelo učinkovita. Za močno zadrževanje in natančno ločevanje spojin, ki jih želimo eluirati, uporabljamo pripravke s polimerno stacionarno fazo. Obstaja več različnih stacionarnih faz, od katerih ima vsaka specifično rabo. Poznamo:

- Reverzna faza, ki ločuje polarne in nepolarne snovi ter se uporablja za ekstrakcijo polarnih in aromatskih komponent.
- Močna kationska reverzna faza, ki se uporablja za ekstrakcijo baz, kot na primer za čiščenje plazme in urina.
- Šibka kationska reverzna faza ločuje baze, kot so kvartarni amini.
- Šibka anionska reverzna faza, ki ločuje močne kisline.



Slika 4: Pripomoček za ekstrakcijo na trdni fazi (Phenomenex..., 2008)

2.5.4 Dializa

Postopek ločevanja spojin na osnovi različne lastnosti prehajanja skozi semipermeabilno membrano imenujemo dializa. Dializa je ločevanje raztopljenih snovi z manjšo molekulsko maso iz raztopin visokomolekularnih snovi s pomočjo polprepustne membrane, ki takšne nizkomolekularne snovi prepušča, zadržuje pa visokomolekularne spojine. Polprepustne membrane, ki se uporabljajo, so iz celuloze, modificirane celuloze in umetnih mas. Velikost por v membrani je od 1 do 10 nm. Dializa se uporablja za razsoljevanje ter čiščenje snovi, kot so proteini, hormoni in encimi. Postopek poteka počasi in ni zelo selektiven. Dializa poteka po principu prehajanja snovi v osnovi od večje proti manjši koncentraciji (Miller, 1975).

2.5.5 Liofilizacija

Liofilizacija ali sušenje z zmrzovanjem je postopek, s katerim odstranjujemo tekočo fazo po principu sublimacije. Postopek poteka v dveh fazah. Prva faza je zamrzovanje materiala pri -15 do -50 °C. V drugi fazi pa poteka sušenje zamrznjenega materiala v visokem vakuumu, pri nizki temperaturi. Posušen material vsebuje do 3% preostale vlage in ohranja visoko biološko aktivnost. S to metodo lahko vzorce tudi koncentriramo. To pomeni, da lahko npr. iz sirotke odstranimo vodo in dobimo skoncentrirane proteine in peptide. Pri rehidraciji pa dodamo manjšo količino vode, kot jo je bilo pred liofilizacijo (Marić, 1996).

2.6 DOLOČANJE PROSTIH AMINO SKUPIN Z *o*-FTALALDEHIDOM (OPA METODA)

Leta 1971 je Roth razvil hitro in občutljivo spektrofotometrično metodo za določanje proteolize proteinov mleka. To je določanje prostih α -amino skupin z reagentom *o*-ftalaldehidom (OPA). Vse proste amino skupine proteinov, peptidov in AK reagirajo z OPA in β -merkaptetanolom, pri čemer nastanejo derivati, ki najboljše absorbirajo svetlobo pri 340 nm. Ti derivati so izoindoli (Zuman, 2005). Tudi absorbanca derivatov, ki nastanejo pri reakciji z α - in ϵ -amino skupinami, je nespremenjena, če te proteine denaturiramo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS). Zato je kvantitativna določitev α -amino skupin, nastalih med proteolizo, zelo natančna. S pomočjo OPA metode lahko določimo relativno stopnjo hidrolize mlečnih proteinov med proteolizo (Frister in sod., 1986).

Z OPA lahko določamo tudi koncentracijo peptidov v vzorcih. Določitev koncentracije prostih amino skupin je uporabna pri skoraj vseh biokemijskih raziskavah. Za OPA so ugotovili, da tvori zelo stabilne derivate, ki jih nato merimo spektrofotometrično ali fluorometrično. V preteklosti so uporabljali za določanje α -amino skupin barvno reakcijo z ninhidrinom, vendar je ta manj občutljiva in je zaradi tega nenatančna pri kvantitativni določitvi le teh (Zuman, 2005).

Za določanje koncentracije proteinov v vzorcu uporabljamo več metod. Lowry in sod. (1951) so določali koncentracijo proteinov z uporabo reagenta folinfenol (FP). Poteče barvna reakcija, ki pa je bolj občutljiva kot reakcija z ninhidrinom zato, ker je s prostimi amino skupinami nastali produkt močnejše obarvan. Reakcija s FP je občutljivejša od biuretske reakcije. Pri tej metodi bakrovi ioni v alkalnem tvorijo koordinacijsko spojino s 4 NH-skupinami peptidnih vezi. Kompleks, ki nastane, absorbira svetlobo pri 540 – 580 nm. Uporabljajo ga za dokazovanje proteinov in sečnine (Minervini in sod., 2003). Leta 1951 so Lowry in sod. ugotavljali tudi pomankljivosti pri določanju koncentracije proteinov z uporabo reagenta FP. Intenziteta barve varira glede na različne proteine tako jakost barve ni sorazmerna s koncentracijo proteinov. Cankar (2007) je v svojem diplomskem delu uporabil Kjeldahlovo metodo, ki omogoča določanje vsebnosti proteinov glede na prisotnost dušika v vzorcu. Pri tej metodi predpostavimo, da je ves dušik, prisoten v živilu, proteinski. Leta 1966 sta Okuyama in Satake določala proste amino skupine s 2,4,6-trinitrobenzensulfonsko kislino (TNBS). TNBS reagira s prostimi amino skupinami v oranžni trinitrofenilni (TNP) derivat z maksimalno absorbanco pri 340 nm. TNBS ne reagira z NH_3 in ureo, zato je zelo primeren za določanje amino skupin v vodnih raztopinah proteinov.

Spektrofotometrično določanje prostih amino skupin z OPA je hitrejše in primernejše od metod, ki uporabljajo za določanje prostih amino skupin reagente ninhidrin, TNBS ali FP. Koncentracijo prostih amino skupin z OPA lahko merimo tudi s fluorescenco, ker produkti reakcije fluorescirajo. Vzbujanje poteka pri 340 nm, emisija pa pri 460 nm. Merjenje s fluorescenco je bolj občutljivo od merjenja z absorbanco (Church in sod., 1983, Spellman in sod., 2003). OPA metoda je hitra, občutljiva, reagent je hitro pripravljen, pri analizi uporabimo malo vzorca, reagent pa reagira z vsemi znanimi in pogostimi AK, ki sestavljajo proteine (Spellman in sod., 2003).

2.7 AKTIVNOST ANGIOTENZINSKE KONVERTAZE

V literaturi najdemo veliko metod, s katerimi lahko kvantificiramo aktivnost ACE. Uporabljajo se različni substrati, kot vir krajših peptidov, na katere deluje ACE in so nadomestili naravne substrate. Osnova za določitev aktivnosti ACE je sprememba absorbance. Merimo produkt encimske reakcije, ki nastane pri razgradnji substrata HHL ali FAPGG. Več kot je produkta, ki absorbira pri določeni valovni dolžini, večja je aktivnost encima (Vermeirssen in sod., 2002). Najpogosteje uporabljamo spektrofotometrične, radiološke, fluorometrične, tekočinsko-kromatografske metode in elektroforezo. S temi metodami lahko dobimo informacije tudi o inhibitornem potencialu različnih ACE inhibitornih snovi (López-Fandiño in sod., 2006, Li in sod., 2005).

2.7.1 Fluorometrične metode

Pri fluorometričnih metodah ponavadi uporabljamo posebne substrate, kot sta npr. Z-Phe-His-Leu in Bz-Gly-His-Leu, ki ob delovanju ACE razpadeta na His-Leu, Z-Phe in Bz-Gly. Te produkte nato določimo z merjenjem fluorescence. Reakcijsko mešanico vzbujaemo z elektromagnetnim valovanjem. Molekule to energijo absorbirajo in jo nato tudi oddajo v

obliki fotonov z manjšo energijo, kot pa so jo sprejele z vzbujanjem. Oddana energija je sorazmerna količini nastalih produktov (Persson in Wilson, 1977).

2.7.2 Radiološke metode

Pri radioloških metodah uporabljajo substrate, ki vsebujejo specifične izotope. Najpogostejša sta izotopa C^{14} in H^3 . Substrati, ki se največkrat uporabljajo pri *in vitro* testih so ($I-C^{14}$ -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 (Ryan in sod., 1977).

2.7.3 Spektrofotometrične metode

Spektrofotometrične metode se najpogosteje uporabljajo, ker so direktne, občutljive, hitre, ponovljive in najcenejše (Li in sod., 2005). Prva sta eno tako opisala Cushman in Cheung (1971) in je bila kasneje tudi najbolj uporabna za določanje aktivnosti in inhibicije encima ACE *in vitro*. Absorbanco hipurne kisline (HA), ki se sprosti iz substrata hipuroil-histidil-levcina (HHL), merimo pri valovni dolžini 228 nm. Osnova te metode je, da preiskovana kemijska snov v mediju, ki je prepustna za svetlobo, selektivno zmanjša jakost svetlobnega toka določene frekvence elektromagnetnega valovanja. Koncentracijo snovi v vzorcu določimo glede na zmanjšanje toka svetlobe. Spektrofotometrične metode uporabljamo za kvantitativno določanje snovi (Herraiz, 1997).

Hipurno kislino, ki nastane kot produkt encimsko katalizirane razgradnje substrata Hip-His-Leu ali Hip-Gly-Gly, pa lahko določimo tudi s pomočjo tekočinske kromatografije. Uporabimo lahko tudi kolorimetrične metode, ki detektirajo produkt encimske reakcije 2,4,6-triklorotriazin ali *p*-dimetilaminobenzaldehid, dipeptidne reakcijske produkte pa nato določimo fluorometrično po reakciji s fluoraminom ali pa spektrofotometrično po reakciji z ninhidrinom (Doig in Smiley, 1993).

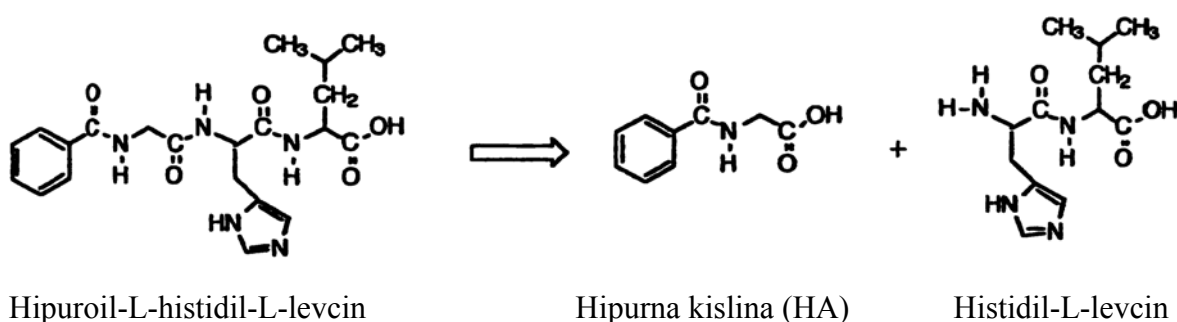
Drugi pogost substrat je kromogeni FAPGG in ga v svoji raziskavi uporabljajo Vermeirssen in sod. (2002) ter drugi. Substrat ob prisotnosti encima ACE razpade in s spektrofotometričnim merjenjem pri določenih valovnih dolžinah določimo aktivnost ACE. Shalaby in sod. (2006) in Vermeirssen in sod. (2002) so raziskovali omejitve in razlike uporabe posameznega substrata.

Hernández-Ledesma in sod. (2004) in Hernández-Ledesma in sod. (2007) so raziskovali tudi postopek *in vitro* prebave sintetiziranih inhibitornih peptidov. Vsi omenjeni članki kot vir ACE navajajo čist encim ali ekstrakt kunčjih pljuč.

2.8 UPORABA RAZLIČNIH SUBSTRATOV PRI DOLOČANJU AKTIVNOSTI ACE

Za merjenje aktivnosti ACE se največkrat uporabljata dve metodi, ki se razlikujeta v substratih in v samem eksperimentalnem delu. Metoda po Cushman-u in Chung-u (1971), ki sta jo modificirala Nakamura in Takano (1995) in Hyun in Shin (2000), temelji na

odcepitvi HA od dodanega substrata HHL, ob prisotnosti ACE kot katalizatorja, ki ga ekstrahiramo iz kunčjih pljuč. HHL se lahko razgradi z ACE, je cenejši kot naravna substrata angiotenzin I in bradikinin ter je izredno specifičen in se ne razgrajuje pod vplivom nekaterih drugih aminopeptidaz. Metoda je zasnovana tako, da substratu, kateremu so dodani inhibitorni peptidi, dodamo ACE in zmes inkubiramo 30 minut pri temperaturi 37 °C. HA ekstrahiramo z etil acetatom, ki ga nato odparimo (slika 5). López-Fandiño in sod. (2006) ter Pihlanto-Leppälä in sod. (2000) so izmerili maksimalno absorbanco pri valovni dolžini 228 nm. HA, ki nastane kot produkt encimske razgradnje HHL, pa se lahko kvantitativno določi tudi s pomočjo HPLC metode (Hyun in Shin, 2000).



Slika 5: Hidroliza substrata HHL z ACE (Mehanna in Dowling, 1999)

S sintetičnimi substrati, kot sta HHL in FAPGG, je veliko lažje spremljati hitrost encimske reakcije, kot pa z uporabo naravnih substratov. Ko ACE deluje na umetno sintetiziran substrat, ta razpade na specifične di- ali tri- peptide, katerih koncentracija je lahko merljiva (Vermeirssen in sod., 2002).

V literaturi se za merjenje aktivnosti ACE pojavlja tudi druga metoda, katero opisujejo Vermeirssen in sod., (2002), López-Fandiño in sod. (2006), Shalaby in sod., (2006) ter Pripp in sod. (2006). Pri tej metodi uporabljajo kromogen substrat FAPGG. Substrat, pod vplivom delovanja ACE razpade na FAP (furanoakriloil-L-fenilalanin) in GG (glicilglicin). Absorbanco izmerimo pri valovnih dolžinah med 328 in 352 nm. Hou in sod. (2003) so merili spremembo absorbance, pri razpadu substrata FAPGG, na mikrotitrskih ploščah, ker je metoda primerna za merjenje več vzorcev hkrati. Absorbanco so merili vsakih 30 sekund v času 30 minut pri 340 nm.

Obe metodi so raziskovalci večkrat testirali in primerjali. Pri prvi metodi so aktivnost ACE merili glede na količino nastanka HA iz HHL po 30 minutni inkubaciji z ACE. Pri drugi metodi pa so aktivnost ACE merili kot padec absorbance, oziroma kinetiko reakcije, prvih 30 minut, ko je ACE kataliziral hidrolizo substrata FAPGG (Shalaby in sod., 2006). Raziskave, ki so jih delali Shalaby in sod. (2006) in López-Fandiño in sod. (2006) so pokazale, da je metoda z uporabo FAPGG cenejša, hitrejša in občutljivejša. Substrat je stabilnejši, dobro topen in, ko razpade na FAP in GG, ne inhibira delovanja ACE. Njegova K_M vrednost je za faktor 8 manjša od vrednosti HHL substrata, kar pomeni, da je koncentracija substrata v testu lahko osemkrat manjša, ko encimska reakcija doseže polovico maksimalne hitrosti.

2.9 STARTERSKE KULTURE

Podrobnejši opis bakterijskih sevov, ki smo jih uporabili kot starterske kulture pri izdelavi fermentiranega mleka. Uporabili smo:

- *Lactobacillus helveticus* BGRA43 (BGRA43)
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 (L8)
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L12 (L12)

Bakterije rodu *Lactobacillus* so gram pozitivne, dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene paličice. So mikroaerofilne, fermentativne ter razgrajujejo laktozo. Lahko so homo- ali heterofermentativne (Gilmour in Rowe, 1990). Laktobacile uporabljajo za starterske kulture pri proizvodnji mlečnih izdelkov. Najdemo jih tudi v kefirnih zrnih. Laktobacili so termofilni, kar pomeni, da je optimalna temperatura za rast bakterij med 37 °C in 45 °C.

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* je gram pozitivna, paličasta bakterija. Celice tvorijo kratke verižice. Laktozo fermentirajo po homofermentativni poti do D-mlečne kisline. Optimalna temperatura rasti je 40 °C. Bakterije tvorijo proteinaze za razgradnjo kazeina, predvsem β -kazeina. Kot starterska kultura med fermentacijo proizvaja tudi acetaldehid. Med zorenjem se tvorijo snovi, ki dajejo aromo. Je precej bolj odporna proti kislini kot *Streptococcus thermophilus*. Vendar je njuna rast sinergistična, kajti *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* razgradi kazein na kratke peptide in proste AK, le te pa stimulirajo rast bakterije *Streptococcus thermophilus*. Uporablja se v kombinaciji z drugimi bakterijami za proizvodnjo jogurtov, italjanskih ter švicarskih sirov (Gilmour in Rowe, 1990).

Lactobacillus helveticus fermentira laktozo po homofermentativni poti do D-mlečne kisline. Je termofilna bakterija in njena optimalna temperatura rasti je 45 °C. Med zorenjem prav tako tvori snovi, ki dajejo aromo mlečnemu proizvodu. Uporablja se tudi kot starterska kultura pri italjanskih in švicarskih tipih sira. Za nekatere seve je dokazano, da inhibirajo rast bakterije *Staphylococcus aureus* (Gilmour in Rowe, 1990). Prav tako so Topisirovic in sod. (2006) dokazali močno inhibitorno delovanje proti vrsti *Clostridium sporogenes*.

Med fermentacijo mleka s proteolitičnimi starterskimi kulturami poteka encimsko katalizirana razgradnja proteinov. Encimi bakterij cepijo mlečne proteine na manjše polipeptide in peptide ter v manjši meri na proste AK. Ta razgradnja je rezultat aktivnosti proteolitičnih encimov. Med proteolizo se tvorijo tudi bioaktivni peptidi (Topisirovic in sod., 2006). Proteolitična aktivnost je odvisna od proteolitičnega sistema bakterij, ki so v mediju (mleko) ter od temperature inkubacije. Proteoliza je odvisna od naraščanja ali padanja sinteze proteinaz oz. spremembe encimov v aktivno ali neaktivno obliko (Abraham in sod., 1993). Leta 2001 so Fira in sod. dokazali, da je *Lactobacillus helveticus* BGRA43 eden med redkimi sevi, ki hidrolizira vse tri tipe kazeina (α -, β - in κ -kazein).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 KRATEK POVZETEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

Namen eksperimentalnega dela je bil ugotoviti ali med fermentacijo mleka s kulturami *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L12 in *Lactobacillus helveticus* BGRA43 nastanejo ACE-inhibitorni peptidi. ACE-inhibitorno aktivnost nastalih hidrolizatov oz. peptidov smo določali s pomočjo spektrofotometrične metode, ki je vključevala spremljanje kinetike encimske reakcije encima ACE in substrata FAPGG in nastanek produkta FAP in GG ter z uporabo kromatografske metode in substrata HHL, s katero smo kvantitativno ovrednotili produkt reakcije HA. ACE smo pridobili iz liofiliziranega ekstrakta kunčjih pljuč. Kot referenčni inhibitor smo uporabili kaptopril. Za primerjavo vzorcem fermentiranega mleka smo v eksperimentalno delo vključili tudi sveže mleko in fermentirano mleko, ki je bilo naknadno izpostavljeno simulaciji prebave *in vitro*, da bi ugotovili, če prebava vpliva na inhibitorno aktivnost peptidov. Prav tako smo imeli ves čas za kontrolo tudi sveže mleko in na ta način primerjali aktivnost peptidnih frakcij pred fermentacijo in po njej.

3.2 REAGENTI

- ACE analitsko čist 0,25 U/mL (Sigma GmbH, Nemčija)
- Acetonitril (ACN) (Merck, Nemčija)
- β -merkaptotanol (Fluka Biochemika, Nemčija)
- Deionizirana voda (dH₂O)
- Dinatrijev tetraborat, boraks (Na₂B₄O₇ × 10H₂O) (Merck, Nemčija)
- Etil acetat (Merck, Nemčija)
- Glutaminska kislina (Merck, Nemčija)
- Hipurna kislina (Sigma, Nemčija)
- Izolevcil-prolil-prolin (IPP, Bachem AG, Nemčija; 0,250 g)
- Kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) (Merck, Nemčija)
- Kalijev hidrogen fosfat (K₂HPO₄) (Merck, Nemčija)
- Kaptopril analitsko čist (Sigma GmbH, Nemčija)
- Klorovodikova kislina (HCl) (Merck, Nemčija)
- Furanoakrilolil-L-fenilalanilglicilglicin (FAPGG) (Sigma GmbH, Nemčija)
- Liofilizirano kunče pljučno tkivo (vir ACE; Sigma GmbH, Nemčija)
- Metanol (Merck, Nemčija)
- Mlečna kislina, 90 % (Kemika, Zagreb)
- Mleko v prahu (1,25 % mlečne maščobe v suhi snovi, Pomurske mlekarne, Slovenija)
- Natrijev dihidrogen fosfat (NaH₂PO₄) (Merck, Nemčija)
- Natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma, Nemčija)
- Natrijev hidrogen karbonat (NaHCO₃) (Merck, Nemčija)
- Natrijev hidroksid (NaOH) (Merck, Nemčija)

- Natrijev klorid (NaCl) (Merck, Nemčija)
- *o*-ftalaldehid (OPA) (Sigma Aldrich, Nemčija; 1g)
- Pankreatin iz prašičjega pankreasa (EG/EC 232-468-9, Sigma, kat. št. P3292, Nemčija)
- Pepsin iz prašičje želodčne sluznice, encimska aktivnost 1750 U/mg proteinov (E.C. 3.4.23.1; 1:10.000, Sigma, kat. št. P7000, Nemčija)
- HHL (hipuroil-histidil-levcin hidrat, Sigma, Nemčija; 100mg)
- Trifluoroacetna kislina (TFA)
- Tripton (Biolife, Nemčija)
- Valin-prolin-prolin (VPP, Bachem AG, Nemčija; 0,250g)

3.2.1 Priprava raztopin:

V preglednicah je prikazana priprava raztopin, ki smo jih uporabljali med eksperimentalnim delom.

Preglednica 3: Priprava 0,1 M boratnega pufru, pH=9,3±0,1.

Sestavina	Količina
Na ₂ B ₄ O ₇ × 10H ₂ O	19,069 g
dH ₂ O	500 ml
H ₃ BO ₃	3 ml

Z 0,1 M NaOH (0,8 g NaOH; dopolnimo do 200 ml dH₂O) smo uravnali vrednost pH na 9,3±0,1.

Preglednica 4: Priprava 0,1 M fosfatnega pufru, pH=8,3±0,1 z 0,4 M NaCl.

Sestavina	Količina
K ₂ HPO ₄	8,709 g
dH ₂ O	500 ml
NaCl	2,338 g

Z 0,1 M KH₂PO₄ (2,722 g KH₂PO₄; dopolnimo do 100 ml dH₂O) smo uravnali vrednost pH na 8,3±0,1.

Preglednica 5: Priprava 50mM Tris-HCl pufru pH=7,5±0,1 z 0,3 M NaCl.

Sestavina	Količina
Tris-HCl	1,211 g
dH ₂ O	200 ml
NaCl	3,506 g

Preglednica 6: Priprava raztopine ACE z aktivnostjo 60 mU/ml.

Sestavina	Količina
ACE analitsko čist (Sigma)	0,720 ml 0,25 U
Fosfatni pufer 0,1 M, pH=8,3 z 0,4 M NaCl	2,280 ml

Preglednica 7: Priprava 5 mM HHL.

Sestavina	Količina
HHL	25,1 mg
Fosfatni pufer 0,1 M, pH=8,3±0,1 z 0,4 M NaCl	10 mL

Preglednica 8: Priprava eluenta B.

Sestavina	Količina
Acetonitril	800 ml
Trifluorocetna kislina	1 ml
dH ₂ O	199 ml

Preglednica 9: Priprava eluenta A.

Sestavina	Količina
Trifluorocetna kislina	2 ml
dH ₂ O	1998 ml

Preglednica 10: Priprava 1 mM kaptoprila.

Sestavina	Količina
Kaptopril analitsko čist (Sigma)	2,30 mg
Fosfatni pufer 0,1 M pH=8,3 z 0,4 M NaCl	10,585 ml

Preglednica 11: Priprava 1,75 mM FAPGG.

Sestavina	Količina
FAPGG	6,99 mg
Tris-HCl pufer 50 mM pH=7,5 z 0,3 M NaCl	10 ml

Preglednica 12: Priprava 20 % (m/V) natrijevega dodecil sulfata (SDS).

Sestavina	Količina
SDS	2 g
dH ₂ O	8 ml

Mešanico smo segreli na 68 °C, ohladili na sobno temperaturo in dopolnili do 10 mL z dH₂O.

Preglednica 13: Priprava 25 ml reagenta OPA.

Sestavina	Količina
Boratni pufer 0,1 M pH=9,3	12,5 ml
SDS 20 %	1,25 ml
<i>o</i> -ftalaldehid raztopljen v metanolu (40 mg/mL)	0,5 ml
β-merkptoetanol	50 µl
dH ₂ O	10,7 ml

3.3 PRIBOR IN OPREMA

- Brizga 1 in 50 mL (Icogamma, Italija)
- Centrifuge (Hettich Micro 22R, Nemčija)
(Hettich EBA 12, Nemčija)
(Sigma 3K18, Nemčija)
(RC5C, Sorvall, ZDA)
- Cepilne zanke
- Čitalec mikrotitrskih plošč (EL808, Biotek)
- Dializni nastavki 200 μ L: membrana z velikostjo por 0,1 kDa (Dispo Biodializator, Sigma, Nemčija)
- Filtri z velikostjo por 0,22 μ m (Millipore Corporation, Millex, Nemčija)
- Filtrirni papir (Whatman 0,45 μ m, Velika Britanija)
- Inserti (vstavki) za HPLC vial 250 μ l (Agilent, Velika Britanija)
- Kolona za kromatografijo na reverzni fazi (Resource RPC 1 mL, Amersham Pharmacia Biotech AB, Švedska)
- Laboratorijski gorilnik
- Ledomat (Angelantoni ATS 40, Ahsi, Italija)
- Liofilizator (CT 60E, Heto)
- Magnetno mešalo (Rotamix 545 MMH Tehnica, Slovenija)
- Merilni valji (50, 100, 500, 1000 mL)
- Mešalo za epruvete (Vibromix 104 EV, Tehnica, Slovenija)
(Vibromix 202 EV, Tehnica, Slovenija)
(Vibromix 10, Tehnica, Slovenija)
- Plastične epruvete z zamaškom, 12 mL (Thermo Finnpiette, Nemčija)
- Mikrotitrne plošče, prepustne za UV (Greiner, Nemčija)
- Nastavki za ekstrakcijo na trdni fazi SPE (solid phase extraction) 60 mL (Strata X, 500 mg/3 mL, Phenomenex, Nemčija)
- pH meter (Mettler Toledo MP220, Velika Britanija) in (Mettler Toledo MP120, Velika Britanija)
- Spektrofotometer (Jenway 6505 UV, Velika Britanija)
- Pipete (Thermo, Finnpiette, Nemčija)
- Polistirenske in polipropilenske kivete
- Tehnice (AT 400 FACT, Mettler Toledo, Nemčija) in (Exacta 300 EB, Tehnica, Slovenija)
- Tekočinski kromatograf (HPLC Waters 2690, Dual λ Absorbance Detector 2487)
- Ultrafiltracijski koncentradorji (10 kDa, 15 mL in 2 kDa, 15 mL, Amicon ultra, Nemčija)
- Ultrazvočna kopel Sonis 4GT (Iskra, Pro, Slovenija)
- Vial 2 mL za HPLC (Chromacol, Velika Britanija)
- Vodna kopel (RT-1000 Kambič, Slovenija)
(Bioblock, ZDA)

3.4 SEVI BAKTERIJ IN GOJIŠČA

- *Lactobacillus helveticus* BGRA43 (BGRA43)
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 (L8)
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L12 (L12)
- MRS bujon
- Rekonstituirano mleko v prahu

3.5 PRIPRAVA GOJIŠČ IN FERMENTACIJA

3.5.1 Priprava MRS bujona

Tekoče gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Nemčija) in ga 15 minut sterilizirali pri temperaturi 121 °C. Za pripravo 1 litra tekočega gojišča smo zatehtali 52,2 g MRS bujona in ga raztopili v dH₂O.

3.5.2 Priprava rekonstituiranega mleka

Mleko smo pripravili iz posnetega mleka v prahu, in sicer tako, da smo za pripravo 1 L mleka zmešali 910 g dH₂O in 90 g posnetega mleka v prahu. Rekonstituirano mleko je vsebovalo 33,3 g proteinov/L mleka, 43,2 g ogljikovih hidratov/L mleka in 1,13 g maščob/L mleka. Mleko smo avtoklavirali in ga nato hranili v hladilniku pri 4-6 °C.

3.5.3 Priprava inokuluma sevov *Lactobacillus helveticus* BGRA43, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L12

Uporabili smo bakterijske seve iz zbirke Katedre za mlekarstvo, ki so bili hranjeni v tekočem dušiku. S pomočjo cepilne zanke smo kulturo iz krio epruvice nacepili v MRS bujon ter inkubirali 18 ur pri 37 °C. 18-urno kulturo smo nato precepili (2 % inokulum) v MRS bujon in inkubirali še nadaljnih 18 ur. Po končani inkubaciji smo aseptično prenesli 1 mL kulture, ki je vsebovala približno 10⁸ kolonijskih enot/mL v sterilno epico in centrifugirali (10000×g, 10 min) ter odlili supernatant (MRS bujon). Pelet smo raztopili v 1 mL rekonstituiranega mleka (točka 3.5.2), ki smo ga po avtoklaviranju ohladili na sobno temperaturo in tako dobili cepivo za filtracijo.

3.5.4 Fermentacija mleka s starterskimi kulturami

K 50 mL rekonstituiranega mleka smo dodali 1 mL cepiva (2 %) in mleko fermentirali 48 ur pri 37 °C v inkubatorju. pH vzorcev smo merili pred fermentacijo, po 18 urah fermentacije in po 48 urah fermentacije. Nato smo fermentirano mleko centrifugirali 20

min pri 5500×g in 12 °C. Supernatant smo do nadaljne rabe hranili v zmrzovalniku pri -20 °C.

3.6 PRIPRAVA VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA ZA ANALIZE

Priprava vzorcev je vključevala ultrafiltriranje, koncentriranje ultrafiltrata s pomočjo liofilizacije, ekstrakcijo peptidov na trdni fazi ter razsoljevanje z dializo. Da smo krajše peptide ločili od večjih, smo uporabili ultrafiltracijski membrani z velikostjo por 10 in 2 kDa. Za analizo smo pripravili vzorce z dvema različnima postopkoma:

3.6.1 Postopek A

Pri postopku A smo fermentirano mleko ultrafiltrirali, permeat ekstrahirali s SPE in koncentrirali.

3.6.1.1 Ultrafiltriranje

Fermentirano mleko (50 mL) smo najprej centrifugirali (20 min, 5500×g, 12 °C), da smo v supernatantu dobili v vodi topne proteine in peptide. Nato smo supernatant (4 ultrafiltracijske tube po 15 mL) ultrafiltrirali v ultrafiltracijskih koncentradorjih z membrano 10 kDa 20 min med centrifugiranjem pri 4000×g in 20 °C. Dobili smo permeat s peptidi, katerih molekulska masa je bila manjša od 10 kDa. 10 kDa permeat (40 mL) smo ultrafiltrirali z drugim ultrafiltracijskim koncentradorjem z membrano prepustno za 2 kDa (30 min, 3000×g, 20 °C). Zbrali smo retentat (ultrafiltracijski ostanek nad 10 kDa) ter permeat med 10 in 2 ter pod 2 kDa, ki smo ga nadalje uporabili za testiranje ACE inhibitorne aktivnosti peptidov. Permeate smo do naslednje obdelave shranjevali v zmrzovalniku pri -20 °C.

3.6.1.2 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

S pomočjo ekstrakcije na trdni fazi smo ekstrahirali peptide iz permeatov in retentatov, ki smo jih dobili z ultrafiltracijo. Postopek je potekal tako, da smo najprej kondicionirali polimerni sorbent Strata X SPE s 4 mL metanola in nato ekvilibrirali še s 4 mL dH₂O. Nato smo nanесли vzorce na stacionarno fazo (2 mL), sprali soli in AK z vodo (2 mL) ter eluirali peptide z 2 mL mešanice acetonitrila in vode v razmerju 80:20. Postopek smo za vsak vzorec ponovili 5-krat. Ultrafiltrat, vodo in acetonitril smo nanašali čimbolj enakomerno z brizgo.

3.6.1.3 Prepihovanje z dušikom

S prepihovanjem vzorcev z dušikom smo odparili acetonitril iz raztopine vzorcev. Zato smo uporabili dušik iz jeklenke in ga vodili skozi stekleno kapilaro v vzorec pri sobni temperaturi.

3.6.1.4 Liofilizacija

Po preprihovanju vzorcev z dušikom je v ekstrahiranih permeatih in retentatih ostalo nekaj vode, zato smo jih liofilizirali in tako koncentrirali, da smo dobili ustrezno količino peptidov, ki je bila potrebna za določanje inhibitorne aktivnosti, glede na podatke v literaturi. Po liofilizaciji smo vzorce rehidrirali s 750 μL dH_2O .

3.6.2 Postopek B

V postopku B smo razsoljevali vzorce s pomočjo dialize. Fermentirano mleko smo ultrafiltrirali (3.6.1.1), nato pa obdelali po naslednjem postopku:

3.6.2.1 Liofilizacija

Liofilizirali smo 10 mL permeata ali retentata (ultrafiltracija) in tako dobili ustrezno količino peptidov, ki je bila potrebna za določanje inhibitorne aktivnosti glede na podatke v literaturi. Po liofilizaciji smo vzorce rehidrirali s 750 μL dH_2O .

3.6.2.2 Dializa

Dializirali smo 150 μL rekonstituiranega liofilizata s pomočjo 200 μL dializnih nastavkov (membrana z velikostjo por 0,1 kDa). S tem smo izločili soli, ki bi lahko vplivale na inhibicijo ACE. Dializa je potekala proti 5 L dH_2O pri sobni temperaturi. Posodo z vodo in nastavki smo pokrili s folijo in prenesli na magnetno mešalo ter pustili čez noč.

3.7 *IN VITRO* SIMULACIJA PREBAVE

In vitro simulacijo prebave smo izvedli po postopku, ki so ga opisali Hernández-Ledesma in sod. (2007). Fermentiranemu mleku in rekonstituiranemu mleku (50 mL) smo izmerili vrednost pH, ga uravnali na 3,5 z 0,5 M HCl in dodali encim pepsin (98 mg; razmerje encim-substrat 58,8 mg/g proteinov), dobro zmešali ter inkubirali 30 minut pri 37 °C. Optimalni pH delovanja pepsina je pri 2,2 (Sigma-Aldrich, 2008), vendar je višji pH, ki smo ga uporabili, bližje fiziološki vrednosti med prebavo. Reakcijo smo ustavili, tako da smo fermentirano mleko postavili v ledeno vodo za 10 minut, nato pa zvišali vrednost pH na 7,0 z 0,5 M NaHCO_3 . Nato smo dodali pankreatin v razmerju 58 mg/g proteinov in inkubirali 1 uro pri 37 °C, da smo simulirali prebavo fermentiranega mleka v črevesju. Med samim procesom simulirane prebave smo mešanico večkrat premešali. Po poteku prebave smo postavili vzorce v vodno kopel za 15 minut pri 95 °C in s tem inaktivirali encime in zaustavili potek prebave. Na koncu smo vzorce ohladili na sobno temperaturo, jih centrifugirali in jih shranili v zmrzovalniku pri -20 °C za kasnejše analize. S

fermentiranim mlekom, izpostavljenim *in vitro* prebavi, smo ravnali enako kot s fermentiranim mlekom in z enakimi metodami določili inhibicijo ACE. Za kontrolo smo uporabili sveže mleko, ki ni bilo fermentirano.

3.8 OZNAKE PERMEATOV IN RETENTATOV FERMENTIRANEGA MLEKA

V preglednici 14 smo zbrali oznake pripravljenih permeatov in retentatov fermentiranega mleka.

Preglednica 14: Oznake permeatov in retentatov fermentiranega mleka

Oznaka permeatov in retentatov	Razlaga oznake
BGRA43 (2kDa)	Fermentiran s sevom BGRA43 in permeat pod 2 kDa.
BGRA43 (2-10kDa)	Fermentiran s sevom BGRA43 in retentat med 2 in 10 kDa.
BGRA43 (10kDa)	Fermentiran s sevom BGRA43 in retentat nad 10 kDa.
BGRA43 (2kDaDIALIZA)	Fermentiran s sevom BGRA43, permeat pod 2 kDa in dializiran.
BGRA43 (10kDaDIALIZA)	Fermentiran s sevom BGRA43, retentat nad 10 kDa in dializiran.
BGRA43 (2kDaSPE)	Fermentiran s sevom BGRA43, permeat pod 2 kDa in ekstrahiran na trdni fazi.
BGRA43 (2kDaPPSPE)	Fermentiran s sevom BGRA43, permeat pod 2 kDa, ekstrahiran na trdni fazi ter simulacija prebave.
BGRA43 (2-10kDaPPSPE)	Fermentiran s sevom BGRA43, retentat med 2 in 10 kDa in ekstrahiran na trdni fazi ter simulacija prebave.
L8 (2kDa)	Fermentiran s sevom L8 in permeat pod 2 kDa.
L12 (2kDa)	Fermentiran s sevom L12 in permeat pod 2 kDa.

3.9 UGOTAVLJANJE PROSTIH AMINO SKUPIN Z *o*-FTALALDEHIDOM

Za določanje prostih amino skupin v vzorcih smo uporabili modificirano metodo po Churchu in sod. (1982). Proste α -amino skupine proteinov, peptidov in AK reagirajo z OPA in β -merkaptetanolom. Nastanejo derivati, ki najbolj absorbirajo svetlobo pri 340 nm. Koncentracijo prostih amino skupin v vzorcu smo določili s pomočjo merjenja absorbance produkta pri tej valovni dolžini.

3.9.1 Potek spektrofotometričnega določanja

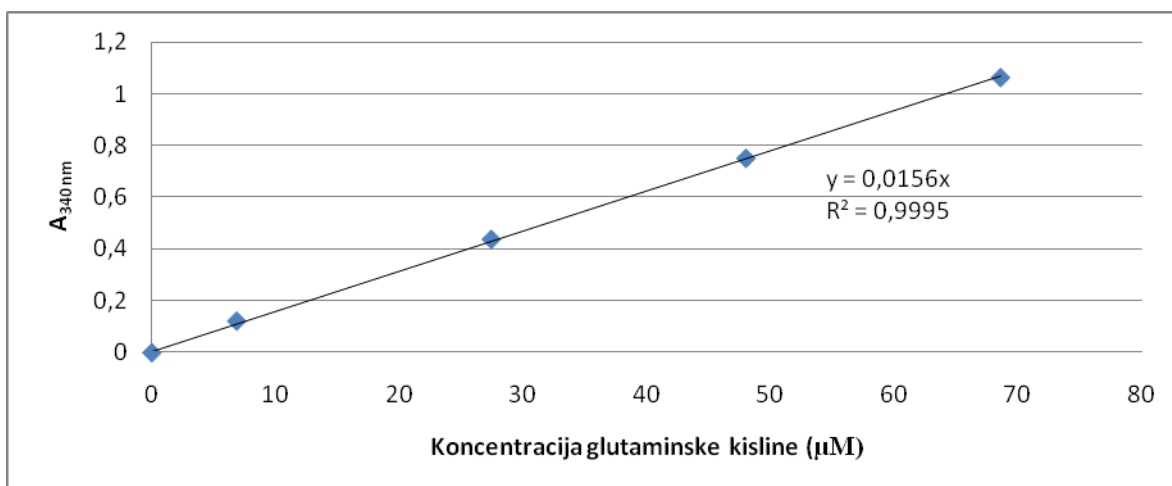
Najprej smo pripravili OPA reagent po Frister in sod. (1986). Za pripravo 25 mL reagenta je opis v točki 3.2 v preglednici 13. Reagent smo pripravljali vsak posebej, pred analizo. Steklenico, v kateri smo pripravili OPA reagent, smo ovili z aluminijasto folijo, da smo reagent zaščitili pred svetlobo. V UV kivete smo pipetirali reagent OPA (1 mL) in 20 μ L vzorca, zmešali, pustili stati 2 minuti pri sobni temperaturi ter izmerili absorbanco pri 340 nm in s pomočjo umeritve krivulje določili koncentracijo prostih amino skupin. Pred merjenjem vzorcev smo spektrofotometer najprej umerili s slepim vzorcem, v katerem je bila mešanica 20 μ L dH₂O in 1 mL OPA reagenta.

3.9.2 Umeritvena krivulja

Za umeritveno krivuljo smo pripravili raztopine glutaminske kisline kot je prikazano v preglednici 15. Koncentracijo prostih amino skupin smo določili z glutaminsko kislino kot standardom, saj ima eno amino skupino, tako da je molarna koncentracija v sorazmerju s koncentracijo prostih amino skupin. S pomočjo umeritvene krivulje za glutaminsko kislino smo v vzorcih določili koncentracijo, ki smo jo izrazili v $\mu\text{Ekv/L}$. Ekvivalent pomeni, kar je po vrednosti enako drugemu, zamenljivo z njim, torej pomeni, da je količina prostih amino skupin enaka oz. ekvivalentna molarni koncentraciji glutaminske kisline (Pripp in sod., 2006 in Rohm in sod., 1996).

Preglednica 15: Koncentracije raztopin glutaminske kisline (umeritvena krivulja)

	Koncentracija glutaminske kisline v reakcijski mešanici ($\mu\text{mol/L}$)
1.	0
2.	6,86
3.	27,45
4.	48,04
5.	68,63



Slika 6: Umeritvena krivulja za glutaminsko kislino: odvisnost absorbanca produkta, ki nastane pri reakciji z OPA, od koncentracije glutaminske kisline ($\lambda=340 \text{ nm}$)

3.10 EKSTRAKCIJA ACE IZ LIOFILIZIRANEGA TKIVA KUNČJIH PLJUČ

Za ekstrakcijo ACE iz liofiliziranega tkiva kunčjih pljuč smo uporabili metodo po Cushman-u in Cheung-u (1971) z manjšimi razlikami. Stehtali smo 1 g suhega kunčjega ekstrakta in dodali 5 mL fosfatnega pufra 0,1 M, $\text{pH}=8,3$, z 0,4 M NaCl ter ekstrahirali s pomočjo ultrazvoka 3 ure. Ves čas smo, z dodajanjem ledu, ohranjali temperaturo kopeli pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Po končanem ekstrahiranju smo ekstrakt centrifugirali 40 min pri $12800 \times g$ in $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Dobljen ekstrakt smo hranili v hladilniku pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.11 DOLOČANJE AKTIVNOSTI ACE

3.11.1 Spektrofotometrična metoda s FAPGG

V reakcijski mešanici smo kot substrat uporabili 1,75 mM raztopino FAPGG (koncentracija v reakcijski mešanici je bila 1,46 mM), raztopljen v 50 mM Tris-HCl pufru pH 7,5 z 0,3 M NaCl. Kot vir ACE smo v začetnih analizah uporabili analitsko čist ACE, kasneje pa ekstrakt liofiliziranih kunčjih pljuč. Absorbanco smo merili s čitalcem mikrotitrskih plošč pri valovni dolžini 340 nm in temperaturi 37 °C.

Za analizo smo v luknje na mikrotitrskih ploščah odpipetirali po 150 µL substrata FAPGG in 10 µL vzorca ali kaptoprila. Mikrotitrsko ploščo smo rahlo pretresli in jo vstavili v merilno celico. Po triminutnem inkubiranju na 37 °C reakcijske mešanice smo dodali 20 µL čistega ACE ali ekstrakta in takoj začeli z merjenjem absorbance ter vsakih 30 sekund ponavljali meritve še 30 min. Slepni vzorec je bil sestavljen iz 20 µL 50 mM Tris-HCl pufru pH 7,5 z 0,3 M NaCl, 150 µL 1,75 mM FAPGG in 10 µL dH₂O. Tako smo lahko spremljali razpad substrata med reakcijo (Shalaby in sod, 2006).

Koncentracija peptidov v reakcijski mešanici:

$$C = \frac{C_0 \times V_s \times R}{V}$$

C₀ predstavlja začetno koncentracijo peptidov, V_s je volumen vzorca v reakcijski mešanici, R je razredčitev vzorca in V je končni volumen reakcijske mešanice.

Računanje inhibicijske aktivnosti (%) vzorcev:

$$\text{Inhibicija ACE} = \left(1 - \left(\frac{dA_i}{dA_k}\right)\right) \times 100$$

dA_i predstavlja razliko absorbanc merjenega vzorca, dA_k je razlika absorbanc kontrole. Pri tej metodi smo vsak vzorec pomerili trikrat in nato izračunali povprečje.

3.11.2 Kromatografska metoda s HHL

V reakcijski mešanici smo kot substrat uporabili 5 mM HHL (koncentracija v reakcijski mešanici je bila 3,2 mM), raztopljen v 0,1 M fosfatnem pufru z 0,4 M NaCl in vrednostjo pH=8,3. Za vir encima ACE smo uporabili svež ekstrakt iz liofiliziranih kunčjih pljuč. S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo ločili HA od ostalih komponent reakcijske mešanice in jo nato kvantitativno določili.

V epice (1,5 mL) smo odpipetirali 20 μL vzorca in 180 μL substrata HHL. Nato smo mešanico premešali in pustili 5 min v vodni kopeli pri 37 °C. Za kontrolo smo uporabili različne razredčitve kaptoprila in pri slepem vzorcu dH_2O . Reakcijsko mešanico smo vzeli iz vodne kopeli, dodali 60 μL svežega ekstrakta iz liofiliziranih kunčjih pljuč ter ponovno dobro zmešali. Epico smo segrevali 30 min v vodni kopeli pri 37 °C. Po tem smo v reakcijsko mešanico dodali 20 μL 5 M HCl, da smo zaustavili reakcijo.

Pri reakciji so nastali manjši kosmiči, ki so pomotnili reakcijsko mešanico, zato smo jo pred HPLC analizo prefiltrirali s filtri z velikostjo por 0,22 μm v HPLC vialo (250 μL). Pri reakciji je HHL razpadel na HA, zato smo uporabili interni standard (5 mM raztopino HA), ki smo mu določili retencijski čas. Pripravljene vialo smo vstavili v avtomatski vzorčevalnik kromatografa in z UV/VIS detektorjem pri valovni dolžini 254 nm detektirali eluirane spojine. Iz kromatograma smo izračunali, koliko substrata je ACE razgradil na HA. Pri inhibiciji ACE z ACE-inhibitornimi peptidi je nastalo sorazmerno manj HA pri reakciji.

Kot vir ACE smo uporabili ekstrakt iz liofiliziranih kunčjih pljuč, saj se je izkazalo, da ima podobno aktivnost kot čisti encim, je pa veliko cenejši od slednjega. Med delom smo vse reagentne shranjevali v ledeni kopeli pri 4 °C.

Koncentracijo peptidov v reakcijski mešanici smo izračunali po enaki enačbi kot je prikazana v poglavju 3.10.1.

Izračun inhibicije (%) vzorcev:

$$\text{Inhibicija ACE} = \left(1 - \left(\frac{k + 1}{F + 1} \right) \right) * 100$$

F = razmerje med HHL in HA pri reakciji z dodatkom vzorca (inhibitorja)

k = razmerje med HHL in HA pri kontrolni reakciji brez vzorca

3.11.2.1 Pogoji kromatografske analize

Pri kromatografski metodi s HHL smo uporabljali tekočinski kromatograf Waters 2690 in imeli posebne pogoje, ki so zbrani v preglednicah 16 in 17.

Preglednica 16: Pogoji kromatografske analize

Lastnost	Količina
Pretok	2 mL/min
Čas trajanja analize	29 min
UV/VIS detektor	254 nm
Temperatura kolone	28 °C
Količina injiciranega vzorca	10 µL

Preglednica 17: Gradient eluentov A in B s časom

Čas (minute)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	99	1
24	12	88
26	12	88
29	99	1

3.11.2.2 Inhibitorna aktivnost kaptoprila

Kaptopril je učinkovina, ki jo vsebujejo zdravila za zdravljenje hipertenzije, zato smo ga uporabili kot referenčni inhibitor ACE in mu preverili aktivnost. Postopek dela je bil enak kot pri merjenju aktivnosti ACE, opisanem v poglavjih 3.10.1 in 3.10.2 le, da smo namesto vzorca dodali različne koncentracije kaptoprila.

Pri kromatografski metodi s substratom HHL smo vse vzorce merili v dveh ponovitvah in nato izračunali povprečje meritev. Rezultate meritev smo obdelali in integrirali s pomočjo programske opreme Millennium³² (version 3.05.01). Za HA ($t_{rHA} = 4,01$ min) smo integrirali vrh od 2,8 min do 4,8 min. Za HHL ($t_{rHHL} = 7,03$ min) smo integrirali vrh od 6,30 min do 7,60 min. Iz površine vrhov smo izračunali razmerja ter nato izračunali IC₅₀ iz regresijske premice.

4 REZULTATI

4.1 FERMENTACIJA VZORCEV

Potek fermentacije mleka smo spremljali z merjenjem vrednosti pH. Rezultati meritev so prikazani v preglednici 18.

Preglednica 18: Vrednost pH vzorcev mleka med fermentacijo z različnimi sevi

Čas fermentacije	Vrednost pH		
	0 h	18 h	48 h
Sevi bakterij			
BGRA43	6,52	3,45	3,05
L8	6,52	3,79	3,36
L12	6,52	3,52	3,33

4.2 KONCENTRACIJA PROSTIH AMINO SKUPIN V VZORCIH FERMENTIRANEGA MLEKA

Iz umeritvene krivulje, pripravljene z glutaminsko kislino (slika 6) smo za vse analizirane vzorce izračunali koncentracijo prostih amino skupin (c_{PAK}).

Koncentracijo prostih amino skupin v vzorcih smo izračunali po naslednjem postopku:

Primer za supernatant mleka, fermentiranega z BGRA43:

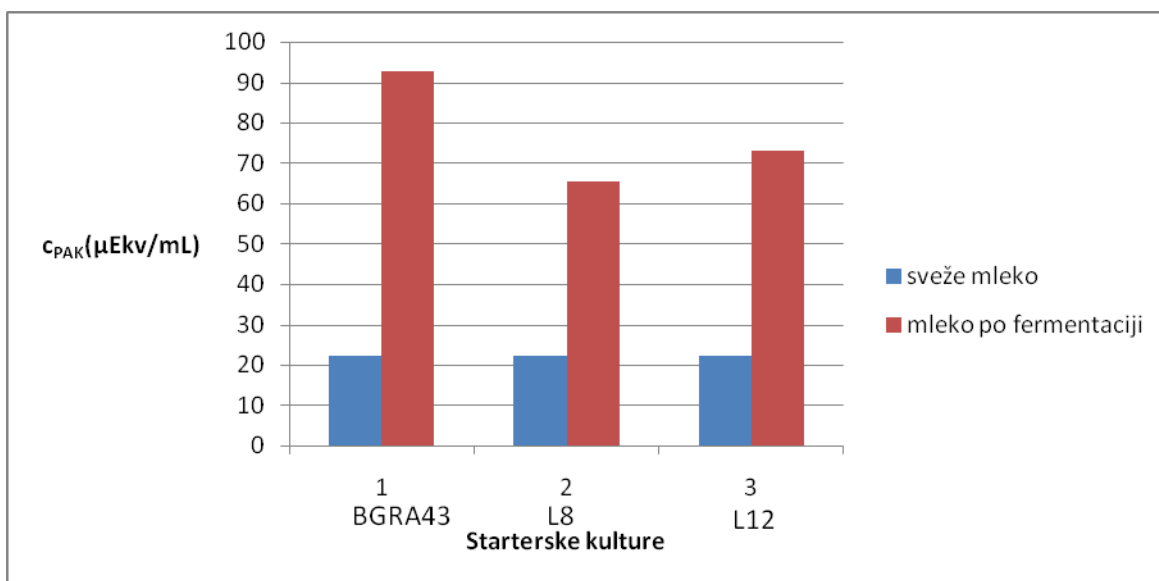
- Na podlagi OPA metode je bila absorbanca vzorca pri 340 nm $A=1,392$.
- Z uporabo enačbe $y = 0,015 x$ smo izračunali x , kar predstavlja koncentracijo prostih amino skupin v vzorcu izraženo v $\mu\text{Ekv/L}$.
- Enako smo izračunali koncentracije prostih amino skupin tudi ostalim vzorcem (preglednica 19).

4.2.1 Koncentracija prostih amino skupin pred in po fermentaciji mleka, v supernatantu

Po fermentaciji mleka s sevom BGRA43 je bila največja koncentracija prostih amino skupin (preglednica 19). Pri ostalih dveh vzorcih fermentiranega mleka je bila absorbanca manjša, posledično pa tudi manjša koncentracija prostih amino skupin (slika 7). Sklepali smo, da bo imel vzorec BGRA43 tudi največjo ACE-inhibitorno aktivnost v primerjavi z drugimi vzorci.

Preglednica 19: Koncentracija prostih amino skupin (c_{PAK}) pred in po fermentaciji mleka z različnimi sevi

Vzorec	Sevi bakterij		
	c_{PAK} ($\mu Ekv/L$)		
	BGRA43	L8	L12
Supernatant mleka pred fermentacijo	22,2	22,2	22,2
Supernatant mleka po fermentaciji	92,8	65,3	73,05



Slika 7: Odvisnost koncentracije prostih amino skupin v supernatantu svežega mleka in supernatantih fermentiranega mleka od različnih starterskih kultur

4.2.2 Koncentracija prostih amino skupin v permeatih in retentatih fermentiranega mleka, obdelanega s SPE ali dializo

Vzorcem fermentiranega mleka in nato obdelanih po postopku A in B smo določili koncentracijo prostih amino skupin (preglednica 20). Iz teh rezultatov smo lahko sklepali, višja je koncentracija prostih amino skupin, večja je ACE-inhibitorna aktivnost le-teh.

Preglednica 20: Koncentracija prostih amino skupin (c_{PAK}) v permeatih in retentatih fermentiranega mleka

Ekstrakcija s SPE	c_{PAK} (μ Ekv/L)		
	BGRA43	L8	L12
Permeat pod 2kDa	110,0	109,0	109,2
Retentat nad 2kDa	133,0	129,9	132,0
Dializa	BGRA43	L8	L12
Permeat pod 2kDa	119,2	111,8	112,7
Retentat nad 2kDa	153,9	148,7	150,9

4.2.3 Koncentracija prostih amino skupin v vzorcu fermentiranega mleka po simulirani prebavi

Izračunana koncentracija prostih amino skupin po simulaciji prebave in obdelavi permeata po postopku A je podana v preglednici 21. Simulacijo prebave smo naredili samo pri mleku, fermentiranem s sevom BGRA43 (preglednica 21).

Preglednica 21: Koncentracija prostih amino skupin (c_{PAK}) v permeatih in retentatih mleka, fermentiranega s sevom BGRA43, po simulirani prebavi in ekstrakciji s SPE

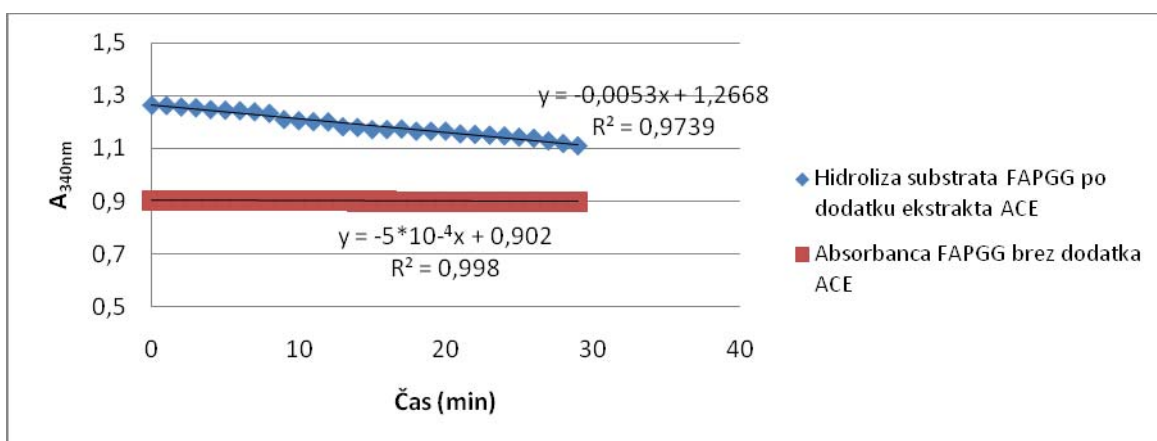
Ekstrakcija s SPE	c_{PAK} (μ Ekv/L)
	BGRA43
Permeat pod 2 kDa	118,2
Retentat nad 2 kDa	168,6

4.3 REZULTATI DOLOČANJA AKTIVNOSTI ACE

Med meritvami inhibicije ACE z vzorci, pripravljenimi po postopku A, smo kontrolirali aktivnost ACE s hidrolizo kromogenega substrata FAPGG ter substrata HHL z dodanim ACE. Določili smo tudi obseg hidrolize obeh substratov brez dodanega encima in z ekstraktom ACE iz liofiliziranih kunčjih pljuč, brez prisotnosti inhibitorjev.

4.3.1 Določanje aktivnosti encima ACE z FAPGG

Med meritvami inhibicije ACE z različnimi vzorci smo kontrolirali aktivnost ACE s hidrolizo kromogenega substrata FAPGG brez dodanega ACE in z ACE analitske čistosti, brez prisotnosti inhibitorjev iz vzorcev (slika 8). Absorbanco smo merili pri 340 nm.



Slika 8: Odvisnost absorbance od časa pri določanju encimske aktivnosti ACE

Kadar smo substratu FAPGG dodali ACE smo spremljali tako encimsko katalizirano razgradnjo substrata kot tudi neencimsko. Neencimsko hidrolizo FAPGG smo preverjali pri 80 meritvah, ko substratu ni bil dodan ACE. Na sliki 8 sta enačbi premice, ki ponazarjata enkrat potek encimske katalize razgradnje substrata in drugič neencimske hidrolize FAPGG. Neencimsko hidrolizo moramo upoštevati in zato smo izračunali hitrost same encimske hidrolize substrata FAPGG iz razlike naklonov obeh premic. Izračunana hitrost encimsko katalizirane reakcije je enaka $-4,5 \times 10^{-3} \Delta A/\text{min}$, kadar v reakcijski mešanici ni inhibitorjev.

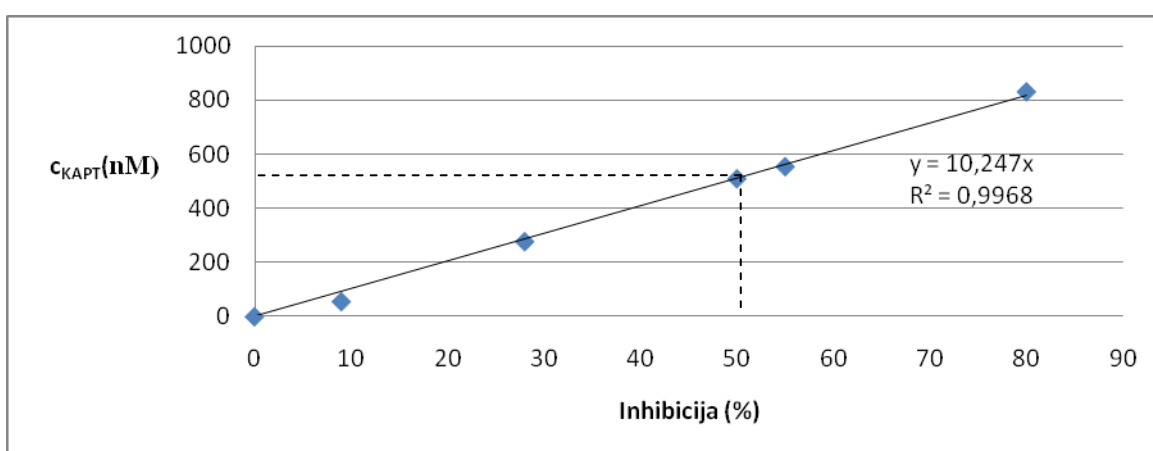
$$K \text{ povprečni naklon encimske hidrolize} = -5,0 \times 10^{-3} + 5,0 \times 10^{-4} = -4,5 \times 10^{-3} \Delta A/\text{min}$$

4.3.2 Določanje aktivnosti ACE s HHL

Aktivnost ACE smo izračunali iz razmerja površine vrhov nastalega produkta HA in substrata HHL po reakciji brez prisotnosti inhibitorja (preglednice od 25 do 30). Razmerje je povprečje vseh 30 meritev, ki smo jih opravili in znaša $7,5 \pm 0,2$.

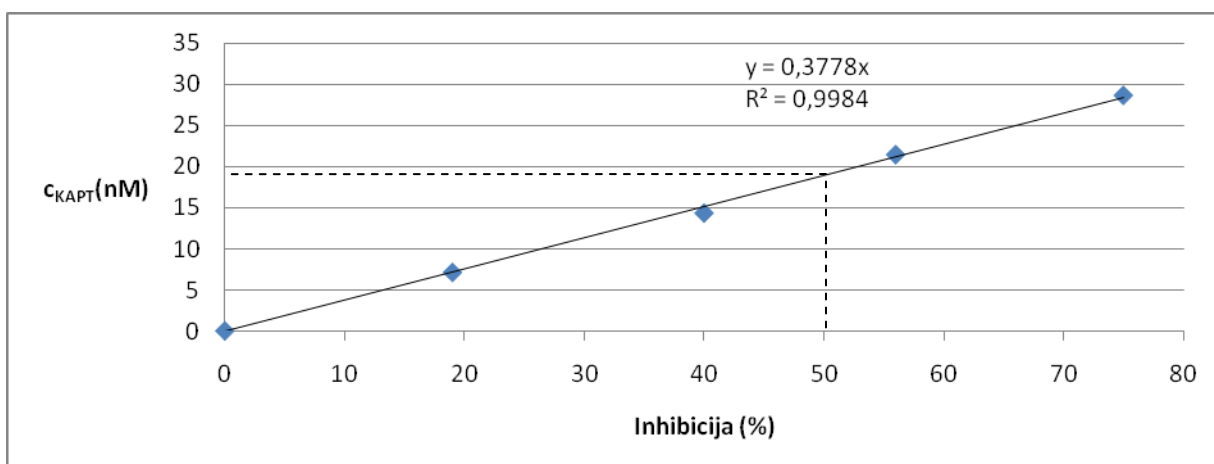
4.4 DOLOČANJE INHIBICIJE ACE S KAPTOPRILOM

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 512 nM, določena s spektrofotometrično metodo. Vrednost IC_{50} smo izračunali iz enačbe premice (slika 9) $y = 10,24x$.



Slika 9: Inhibicija ACE z različnimi koncentracijami inhibitorja kaptoprila. Spektrofotometrična metoda z uporabo substrata FAPGG

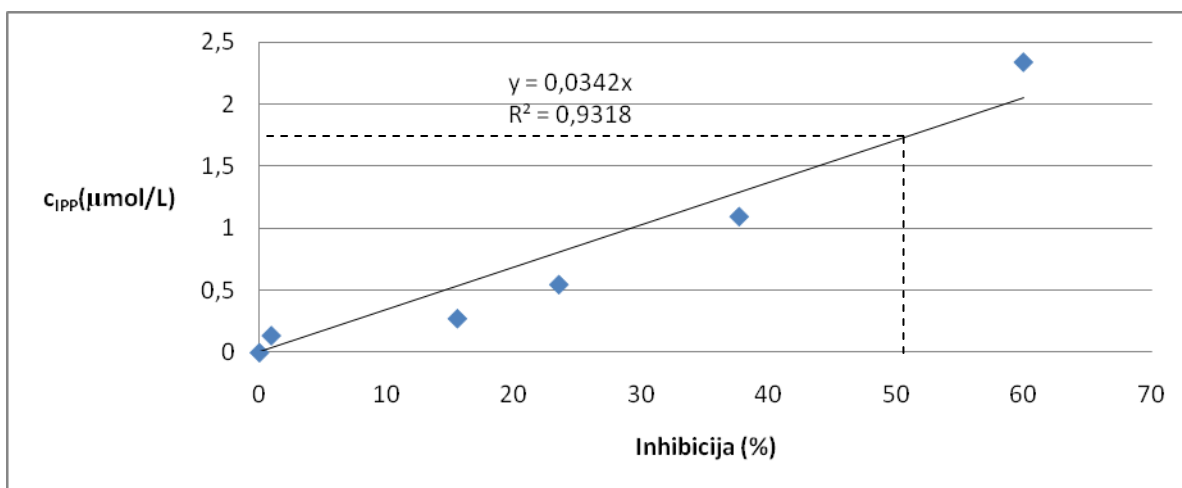
S slike 10 smo določili IC_{50} za kaptopril s kromatografsko metodo. Vrednost IC_{50} smo izračunali iz enačbe premice $y = 0,377x$ (slika 10) in je 18,9 nM.



Slika 10: Inhibicija ACE pri različnih koncentracijah inhibitorja kaptoprila, določena s kromatografsko metodo

To primerjavo spektrofotometrične in kromatografske metode določanje IC_{50} smo delali zato, da smo rezultate primerjali z rezultati, ki so bili navedeni v literaturi. Ugotovili smo, da rezultati pridobljeni s kromatografsko metodo manj odstopajo od navedenih rezultatov v literaturi. Iz tega smo sklepali, da je kromatografska metoda natančnejša od spektrofotometrične.

V raziskavo smo vključili tudi referenčni inhibitor tripeptid IPP, izoliran iz fermentiranega mleka (FritzGerald in Murray, 2006). Z uporabo referenčnega inhibitorja smo preverili, če peptidi inhibirajo encim ACE. Sklepali smo, da med hidrolizo mlečnih proteinov, ki poteka med fermentacijo, nastajajo referenčnemu standardu podobni tripeptidi. ACE-inhibitorno aktivnost smo določili s kromatografsko metodo.



Slika 11: Inhibicija ACE s tripeptidom IPP kot standardnim referenčnim inhibitorjem

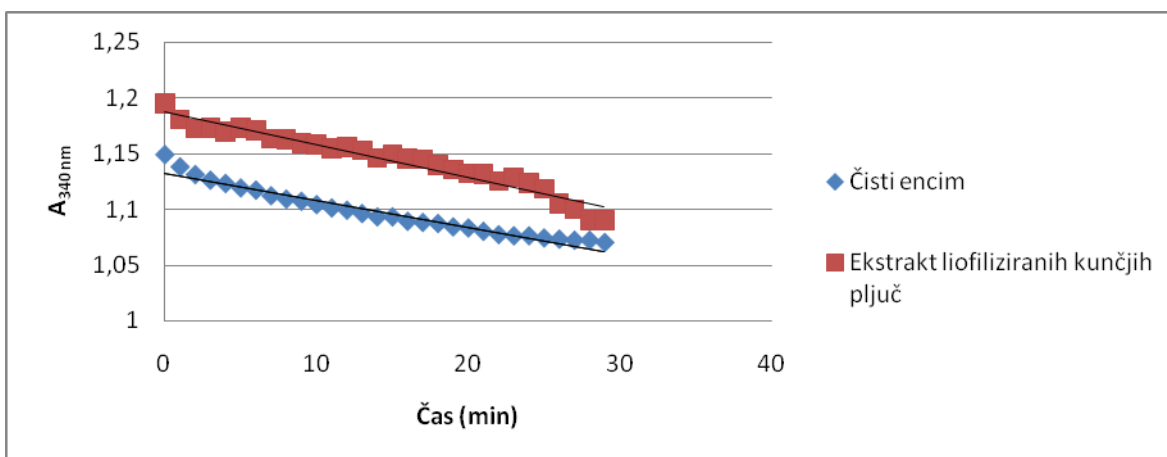
IC_{50} vrednost, oziroma koncentracijo referenčnega peptida IPP, ki inhibira ACE za 50 % je $1,7 \mu\text{mol/L}$.

4.5 ACE-INHIBITORNA AKTIVNOST VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA

ACE-inhibitorno aktivnost smo merili z dvema metodama, in sicer spektrofotometrično s FAPGG in kromatografsko s HHL.

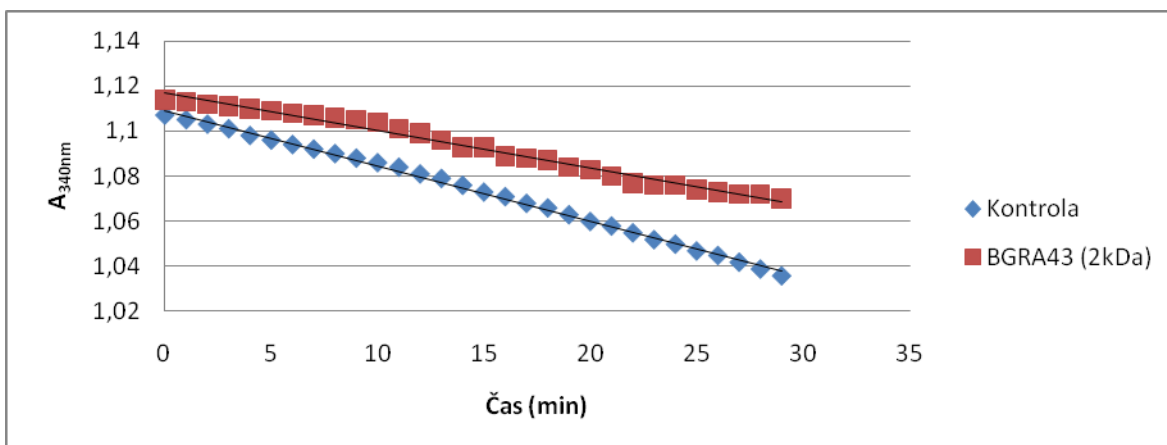
4.5.1 Določanje ACE-inhibitorne aktivnosti vzorcev na mikrotitrskih ploščah s FAPGG

Primer merjenja inhibitorne aktivnosti vzorca filtrata fermentiranega mleka je prikazan na sliki 12. Na sliki 12 se vidi razlika med delovanjem encima ACE ekstrahiranega iz liofiliziranih kunčjih pljuč in čistega ACE. Primerjali smo, kateri encim je aktivnejši. Rezultati so pokazali, da je ACE iz ekstrakta liofiliziranih kunčjih pljuč boljši. To se vidi tudi v razliki naklonov premic na sliki 12.



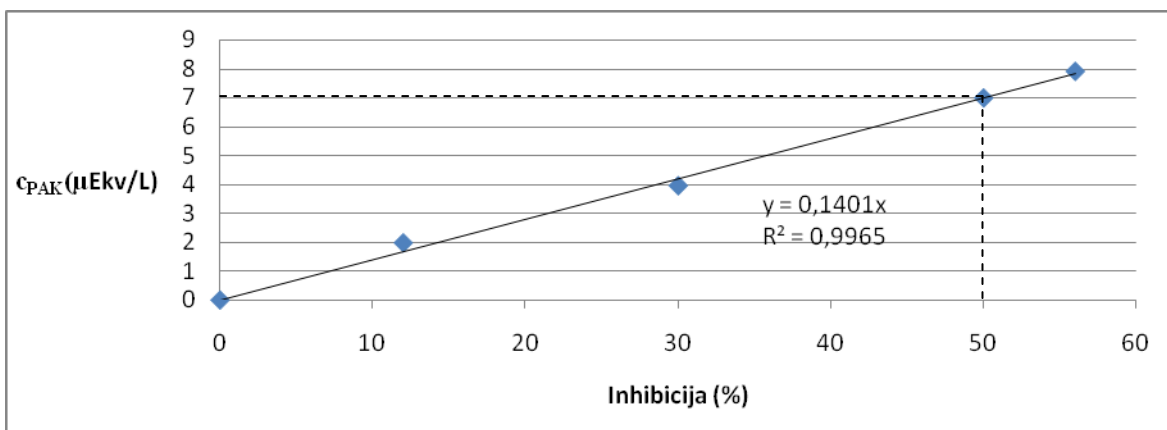
Slika 12: Potek encimsko katalizirane reakcije z različnim virom ACE in vzorcem fermentiranega mleka z BGRA43 (2kDa)

Pri merjenju ACE-inhibitorne aktivnosti vzorcev fermentiranega mleka smo merili tudi kontrolo. Kontrola je bila substrat FAPGG in ekstrakt ACE. Pozorni smo bili, da je bil pri kontroli padec absorbance največji, saj kontrola ni vsebovala peptidnih inhibitorjev ACE.



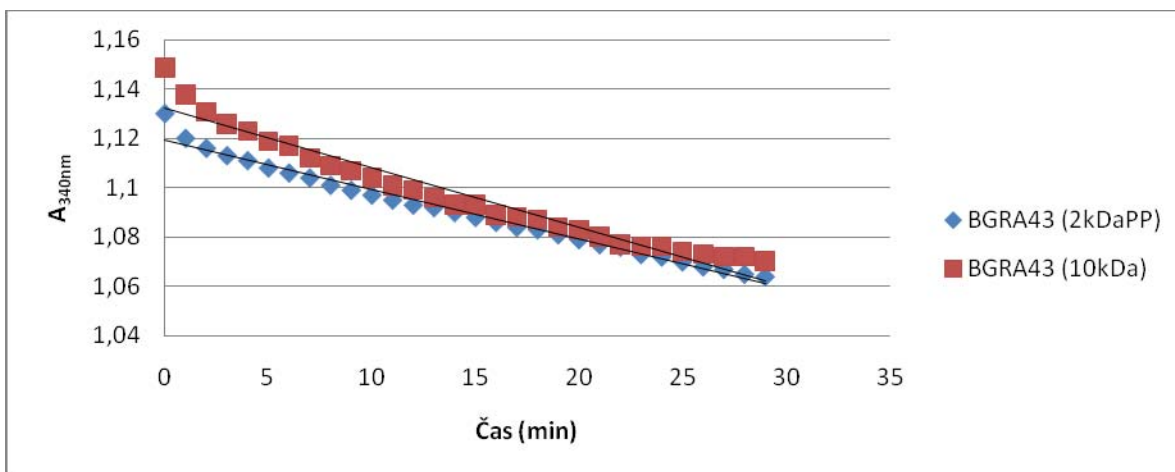
Slika 13: Potek reakcije z vzorcem BGRA43 (2kDa) in kontrolo (1,75 mM FAPGG)

S slike 13 je razvidno, da je naklon premice za BGRA43 (2kDa) manjši kot pri kontroli. Iz tega smo sklepali, da so v vzorcu BGRA43 (2kDa) ACE-inhibitorni peptidi. Nato smo izračunali še IC_{50} kot je opisano v poglavju 3.10.1 in je prikazano na sliki 14.



Slika 14: Inhibicija ACE z različnimi koncentracijami vzorca BGRA43 (2kDa)

Na sliki 15 je prikazana razlika padcev absorbance med dvema različnima vzorcema fermentiranega mleka. Manjši je padec absorbance, več ACE-inhibitornih peptidov je v vzorcu fermentiranega mleka.



Slika 15: Padec absorbance med reakcijo z vzorcema BGRA43 (10kDa) in BGRA43 (2kDaPP)

V preglednici 22 smo podali rezultate padca absorbance med 30 minutami encimske reakcije razpada substrata FAPGG. Padec absorbance smo prebrali s slike 15.

Preglednica 22: Padec absorbance (ΔA) med reakcijo

Vzorec	Padec absorbance med reakcijo ΔA_{340nm}
BGRA43 (10kDa)	0,079
BGRA43 (2kDaPP)	0,066

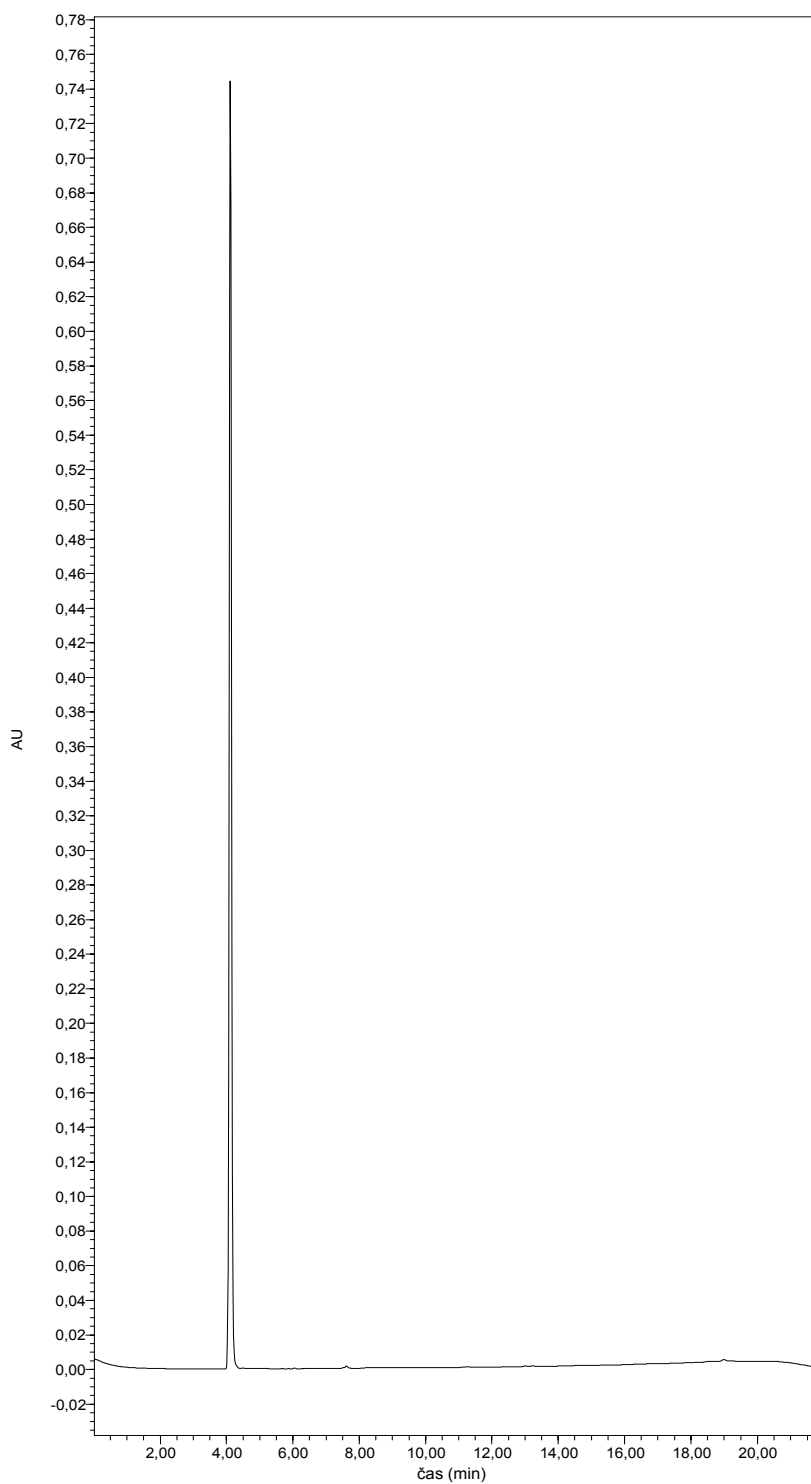
IC₅₀ vrednost oziroma koncentracije prostih amino skupin (c_{PAK} v μEkv/L), ki za 50 % inhibira aktivnost encima ACE smo razbrali iz grafov (slika 14), ki prikazujejo koncentracijo prostih amino skupin v analiziranih vzorcih in ustrezen odstotek inhibicije. Za računanje vrednosti IC₅₀ smo upoštevali padec absorbance med časoma 0 do 30 minut. Izračuni so zbrani v preglednici 23.

Preglednica 23: Vrednost IC₅₀ izračunana za različne vzorce

	IC₅₀ za različne vzorce
Vzorec	c_{PAK}(μEkv/L)
BGRA43 (2kDa)	7,83
BGRA43 (10kDa)	9,69
BGRA43 (2kDaPP)	8,23
BGRA43 (10kDaPP)	9,35

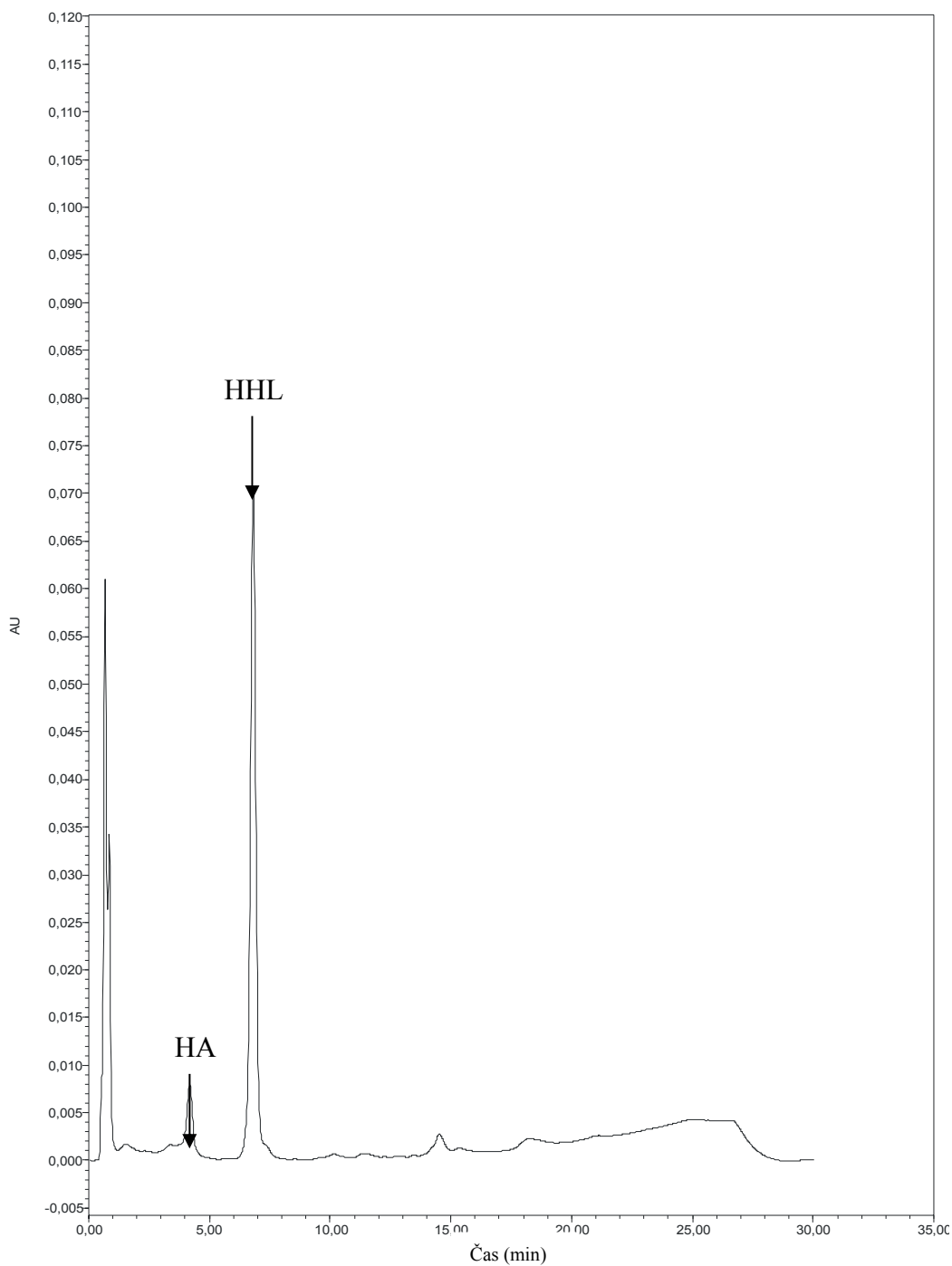
4.5.2 Določanje ACE-inhibitorne aktivnosti vzorcev s pomočjo HPLC

Najprej smo določili retencijski čas za hipurno kislino (slika 16), ker smo kislino določali pri razpadu substrata HHL v testiranih vzorcih fermentiranega mleka.



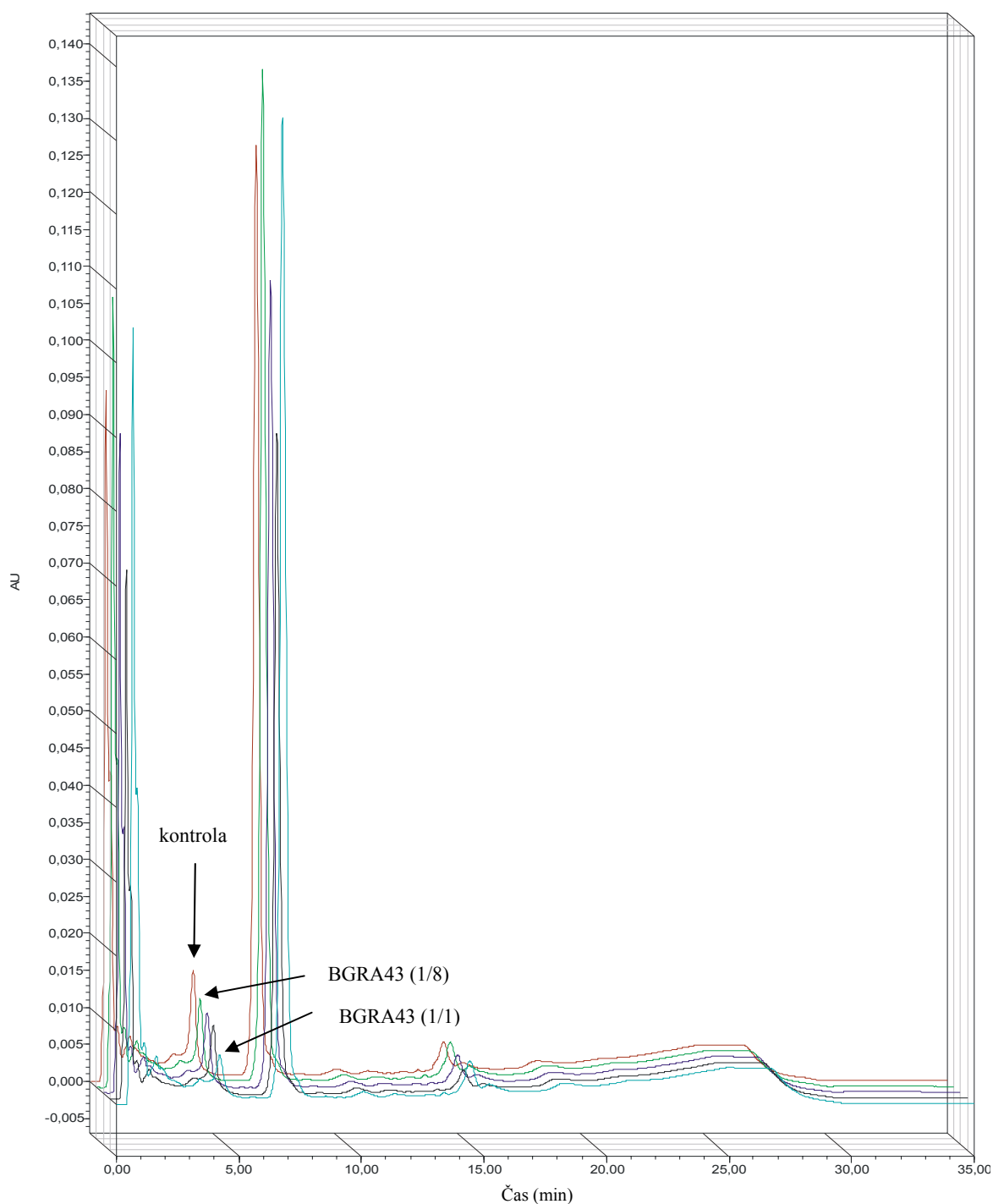
Slika 16: Kromatogram standardne raztopine hipurne kisline-HA ($t_r = 4,01$ min)

Retencijski čas hipurne kisline smo določili pri 4,01 min, HHL pa pri 7,03 min (slika 17). Na spodnjem kromatogramu je prikaz nastanka HA iz substrata HHL pri kontroli. To pomeni, da ni bilo dodanega inhibitornega vzorca fermentiranega mleka. S temi rezultati kontrolnega vzorca smo kasneje računali ACE-inhibitorno aktivnost peptidov prisotnih v vzorcih fermentiranega mleka.



Slika 17: Kromatogram hipurne kisline-HA ($t_r = 4,01$ min), ki je nastala iz substrata HHL ($t_r = 7,03$ min), pri kontroli (substrat HHL in encim ACE)

ACE-inhibitorno aktivnost peptidov v vzorcih fermentiranega mleka smo določali pri različnih koncentracijah vzorca. Na sliki 18 lahko vidimo, da z razredčitvijo narašča nastanek HA, kar pomeni, da je v vzorcu nižja koncentracija peptidov, ki inhibirajo ACE. Iz površine vrhov HA in HHL smo izračunali razmerja, nato pa smo iz razmerja (P_{HHL}/P_{HA}) kontrole in razmerja (P_{HHL}/P_{HA}) vzorca izračunali procent inhibicije ACE pri določeni koncentraciji peptidov.



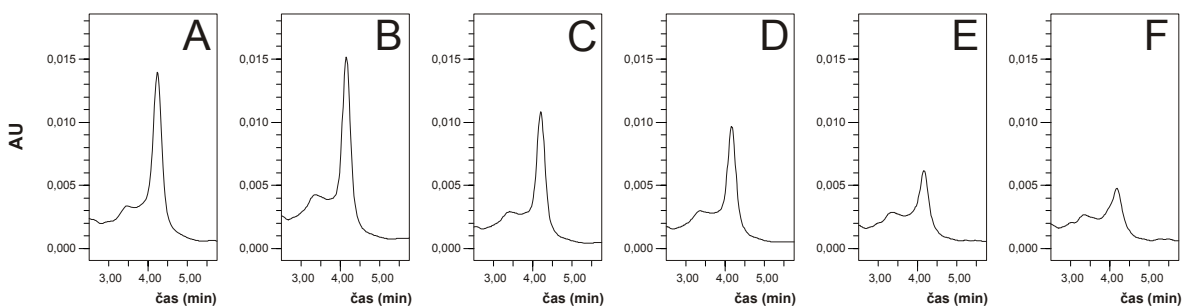
Slika 18: Kromatografska določitev HA ($t_r = 4,01$ min), ki se je sprostila iz substrata HHL ($t_r = 7,03$ min), pri različnih koncentracijah vzorca BGRA43 (2kDa) v reakcijski zmesi

Pri določanju ACE-inhibitorne aktivnosti vzorcev fermentiranega mleka smo vzorce razredčevali. V preglednici 24 so prikazane oznake kromatogramov posameznih razredčitev vzorca, ki smo jim določili inhibitorno aktivnost.

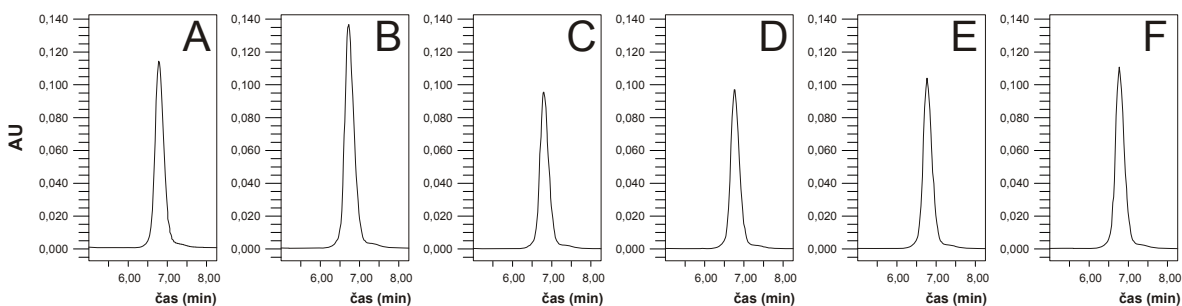
Preglednica 24: Razlaga oznak kromatogramov

Oznaka kromatogramov	Razlaga oznake
A	Kontrola (HHL in ACE)
B	Razredčitev vzorca 1/16
C	Razredčitev vzorca 1/8
D	Razredčitev vzorca 1/4
E	Razredčitev vzorca 1/2
F	Nerazredčen vzorec

Na naslednjih slikah so kromatogrami HA in HHL, ki jih je izrisal HPLC po končani ločbi. Vidimo, da pri višjih koncentracijah vzorca nastane manj HA, kar pomeni, da peptidi v vzorcih inhibirajo ACE. Na slikah 19a in 19b so kromatogrami vzorca fermentiranega mleka z BGRA43 (2kDa).



Slika 19a: Kromatogrami HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDa)



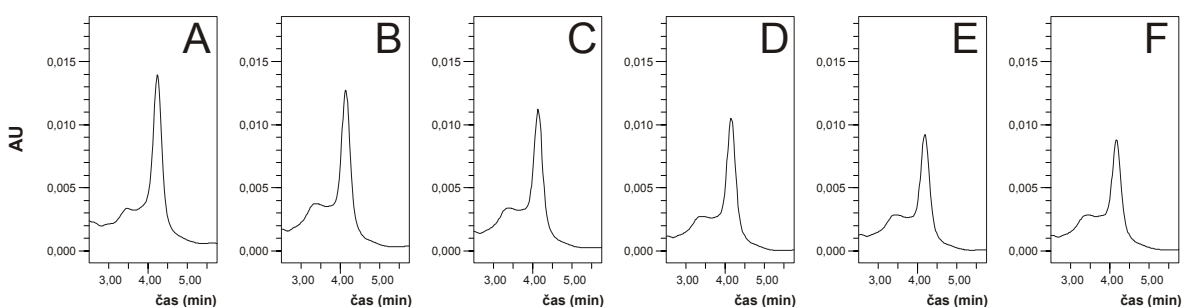
Slika 19b: Kromatogrami HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDa)

Dobljene kromatograme smo integrirali avtomatsko s pomočjo programske opreme Millennium³² (version 3.05.01) (preglednica 25). Za HA ($t_{rHA} = 4,01$ min) smo integrirali vrh od 2,8 min do 4,8 min. Za HHL ($t_{rHHL} = 7,03$ min) smo integrirali vrh od 6,30 min do 7,60 min. Iz površine vrhov smo izračunali razmerja ter nato izračunali IC_{50} iz regresijske premice.

Preglednica 25: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2kDa), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje

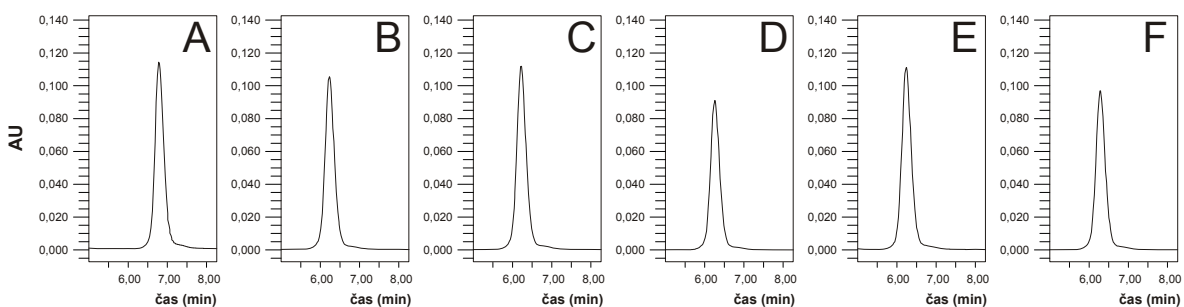
	A (kontrola)	B	C	D	E	F
c_{PAK} (mEkv/L)	0,00	0,03	0,06	0,12	0,24	0,49
P_{HA} (površina vrha)	191679	238207	212897	151241	43536	46986
P_{HHL} (površina vrha)	1500329	1985321	1889829	1958719	860303	1362049
Razmerje P_{HHL}/P_{HA}	7,83	8,33	8,88	12,95	19,76	28,99

Na slikah 20a so kromatogrami HA fermentiranega mleka z BGRA43 (2-10kDa). Oznaka A na kromatogramu pomeni, da gre za kontrolo (substrat FAPGG in encim ACE). S kromatogramov na sliki 20a vidimo, da pri kontroli nastane največ HA.



Slika 20a: Kromatogrami HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2-10kDa)

S kromatogramov na sliki 20b je razvidno, da ostanek substrata zelo varira med razredčitvami vzorca. Prav zaradi tega smo računali razmerja med ostalim substratom in nastankom hipurne kisline. Rezultati razmerij površine vrhov HHL in HA so podani v preglednici 26.



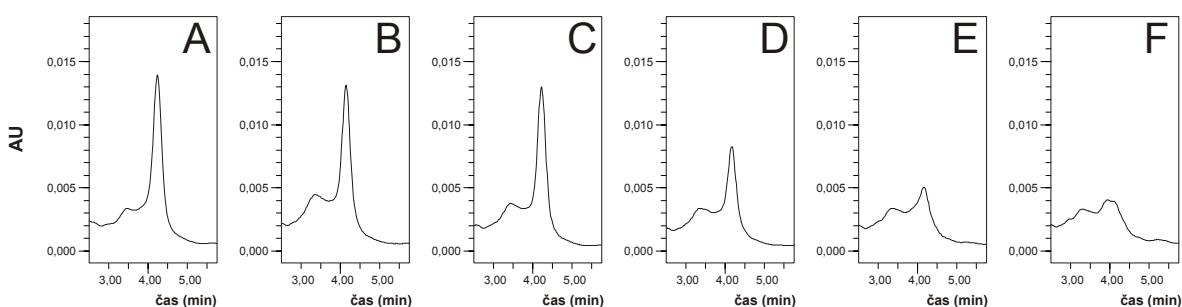
Slika 20b: Kromatogrami HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2-10kDa)

Preglednica 26: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2-10kDa), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje

	A (kontrola)	B	C	D	E	F
c_{PAK} (mEkv/L)	0,00	0,04	0,07	0,14	0,29	0,57
P_{HA} (površina vrha)	207444	229859	177407	154365	61172	66843
P_{HHL} (površina vrha)	1557904	1915973	1568880	2211531	1328819	1818097
Razmerje P_{HHL}/P_{HA}	7,51	8,34	8,84	14,33	21,72	27,20

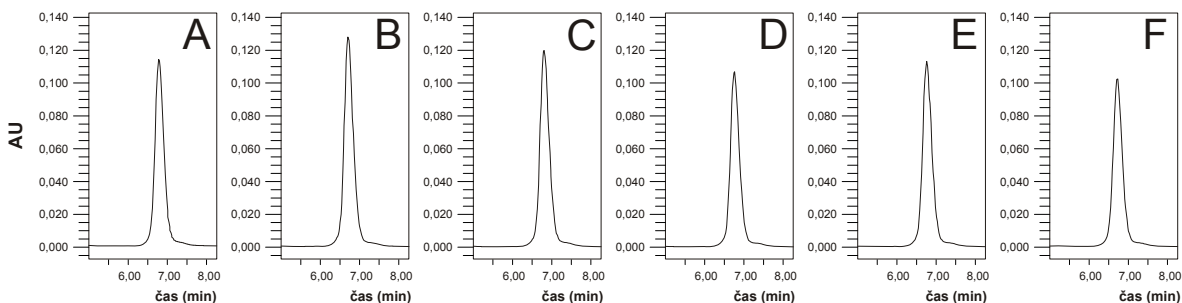
Iz razmerij P_{HHL}/P_{HA} zbranih v preglednicah 25, 26, 27, 28, 29 in 30 smo nato izračunali procent inhibicije iz enačbe, ki je podana na strani 29 za posamezni vzorec fermentiranega mleka. Rezultate smo podali v preglednici 32.

Na sliki 21a so kromatogrami HA fermentiranega mleka z BGRA43 (10kDa). Oznaka A na kromatogramu pomeni, da gre za kontrolo (substrat FAPGG in encim ACE). S kromatogramov na sliki 21a vidimo, da nastane pri kontroli največ HA. Pri visokih razredčitvah je komaj opazna inhibicija ACE (oznaki B in C), nato pa pri višjih koncentracijah vzorca nastanek HA izrazito pade, kar pomeni, da koncentrirani peptidi inhibirajo ACE močnejše.



Slika 21a: Kromatogrami HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDa)

S kromatogramov na sliki 21b je razvidno, da ostanek substrata HHL po reakciji varira med razredčitvami vzorca. Opazimo lahko, da višina vrha HHL ne pada v sorazmerno.



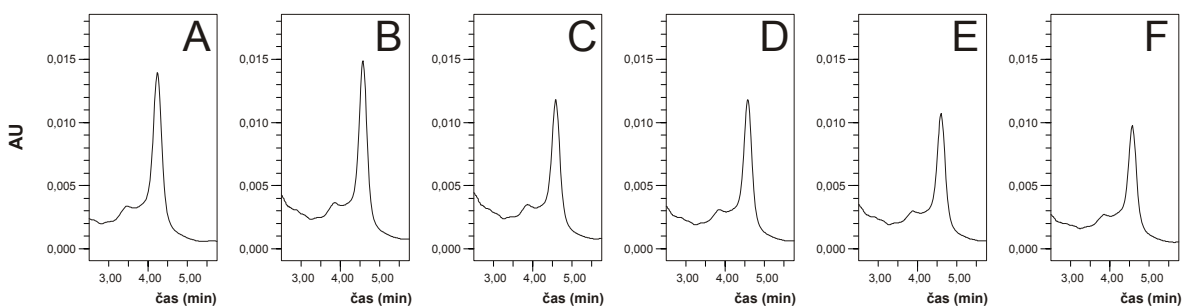
Slika 21b: Kromatogrami HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDa)

V preglednici 27 je podano razmerje P_{HHL}/P_{HA} , iz katerega smo izračunali procent ACE-inhibitorne aktivnosti peptidov v vzorcih fermentiranega mleka.

Preglednica 27: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (10kDa), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje

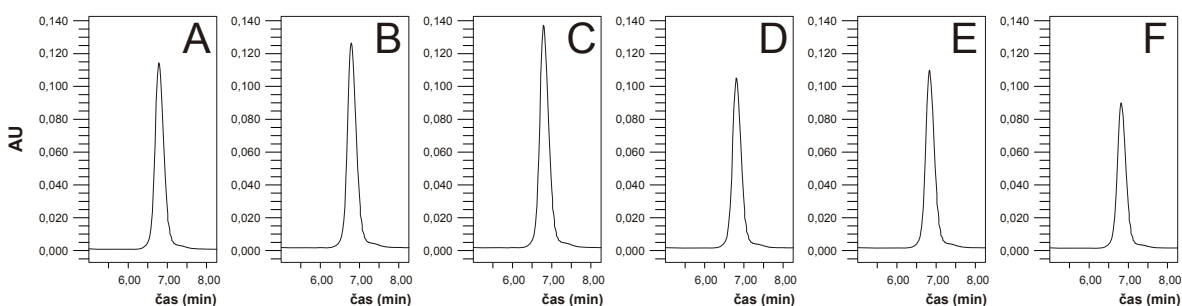
	A (kontrola)	B	C	D	E	F
c_{PAK} (mEkv/L)	0,00	0,04	0,07	0,14	0,28	0,57
P_{HA} (površina vrha)	168962	195543	187542	137084	52647	81411
P_{HHL} (površina vrha)	1240041	1738718	1952726	1862584	1087029	1970636
Razmerje P_{HHL}/P_{HA}	7,34	8,89	10,41	13,59	20,65	24,21

Na sliki 22a so kromatogrami HA fermentiranega mleka z BGRA43 (2kDaDIALIZA). Oznaka A na kromatogramu pomeni, da gre za kontrolo (substrat FAPGG in encim ACE). S slik 22a vidimo, da je višina vrhov višja od vrhov na slikah 20a in 21a. Vendar ta podatek ne pomeni, da v vzorcu BGRA43 (2kDaDIALIZA) ni prostih amino skupin, ki bi inhibirale ACE. Procent inhibicije smo izračunali iz razmerja P_{HHL}/P_{HA} (preglednica 28).



Slika 22a: Kromatogrami HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaDIALIZA)

S kromatogramov na sliki 22b je razvidno, da ostanek substrata HHL po reakciji varira med razredčitvami vzorca. Opazimo lahko, da višina vrha HHL ne pada v sorazmerju z večjim nastankom HA (slika 22a).

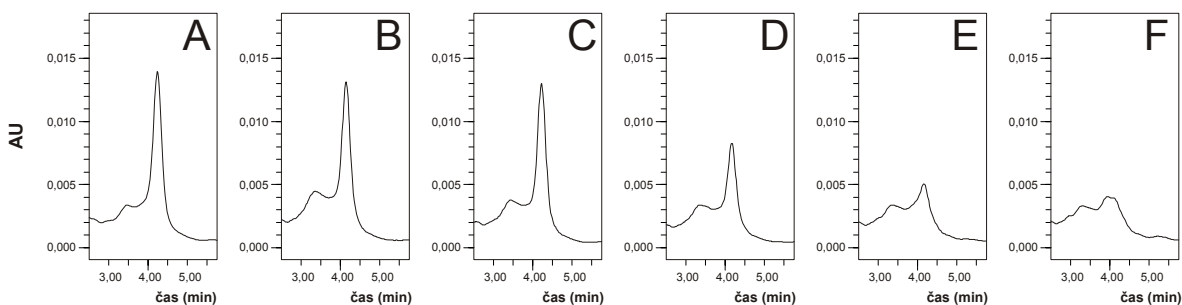


Slika 22b: Kromatogrami HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaDIALIZA)

Preglednica 28: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2kDaDIALIZA), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje

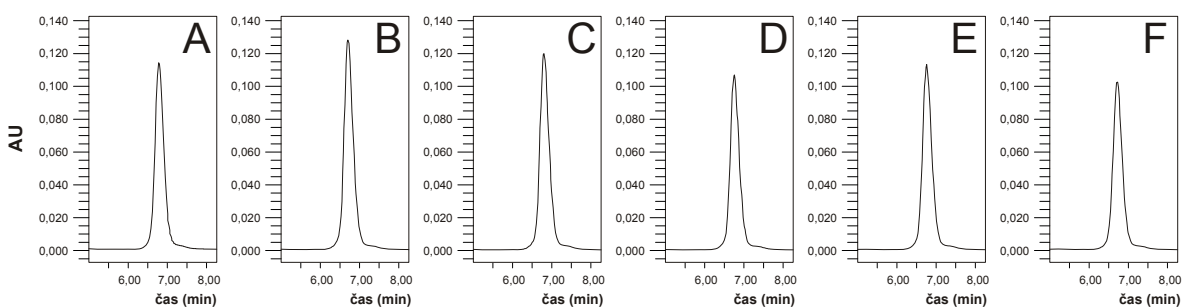
	A	B	C	D	E	F
c_{PAK} (mEkv/L)	0,00	0,02	0,03	0,06	0,12	0,25
P_{HA} (površina vrha)	90995	142102	204548	210782	112725	105522
P_{HHL} (površina vrha)	673837	1117888	1629526	1882060	1679731	1914632
Razmerje P_{HHL}/P_{HA}	7,41	7,87	7,97	8,93	14,90	18,14

Na sliki 23a so kromatogrami HA fermentiranega mleka z BGRA43 (10kDaDIALIZA).



Slika 23a: Kromatogrami HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDaDIALIZA)

S kromatogramov na sliki 23b je razvidno, da ostanek substrata HHL po reakciji ne varira z razredčitvami vzorca. Opazimo lahko, da višina vrha HHL ne pada v sorazmerju z večjim nastankom HA (slika 23a, B-F).



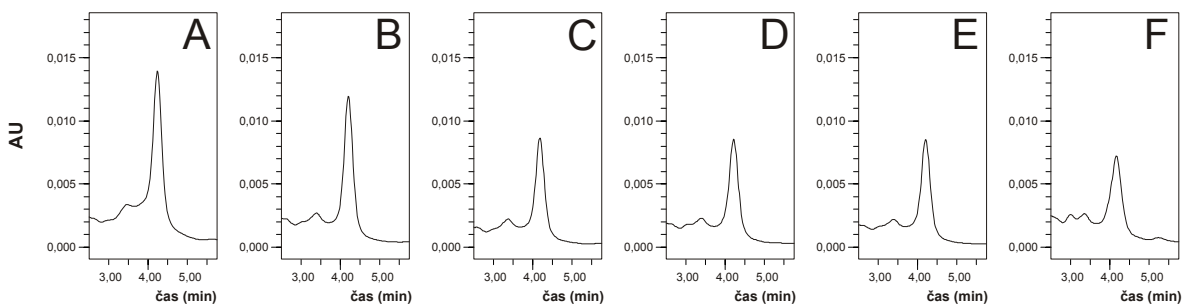
Slika 23b: Kromatogrami HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDaDIALIZA)

V preglednici 29 je podano razmerje P_{HHL}/P_{HA} , iz katerega smo izračunali procent ACE-inhibitorne aktivnosti peptidov v vzorcih fermentiranega mleka z BGRA43 (10kDaDIALIZA).

Preglednica 29: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (10kDaDIALIZA), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje

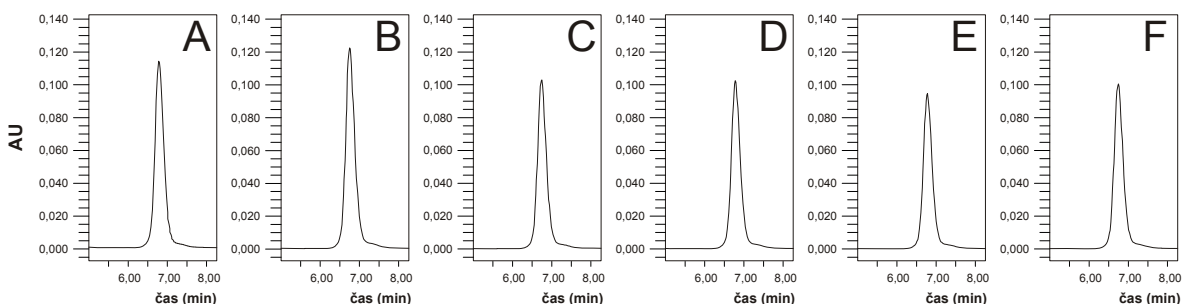
	A	B	C	D	E	F
	(kontrola)					
c_{PAK} (mEkv/L)	0,00	0,04	0,08	0,15	0,30	0,61
P_{HA} (površina vrha)	104472	251405	248121	159445	122635	118617
P_{HHL} (površina vrha)	801325	2102720	2221179	1803809	1998261	2371395
Razmerje P_{HHL}/P_{HA}	7,67	8,36	8,95	11,31	16,29	19,99

Na sliki 24a so kromatogrami HA fermentiranega mleka z BGRA43 (2kDaSPE). S slike 24a in iz kromatograma označenega C vidimo, da je že pri višjih razredčitvah vzorca prišlo do inhibicije encima ACE. To pomeni, da smo z ekstrakcijo na trdni fazi ekstrahirali peptide, ki inhibirajo ACE:



Slika 24a: Kromatogrami HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaSPE)

S kromatogramov na sliki 24b je razvidno, da ostanek substrata HHL po reakciji ne variira med razredčitvami vzorca. Opazimo lahko, da višina vrha HHL ne pada v sorazmerju z večjim nastankom HA (slika 24a, B-F).



Slika 24b: Kromatogrami HHL pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaSPE)

V preglednici 30 je podano razmerje P_{HHL}/P_{HA} , iz katerega smo izračunali procent ACE-inhibitorne aktivnosti peptidov v vzorcih fermentiranega mleka z BGRA43 (2kDaSPE).

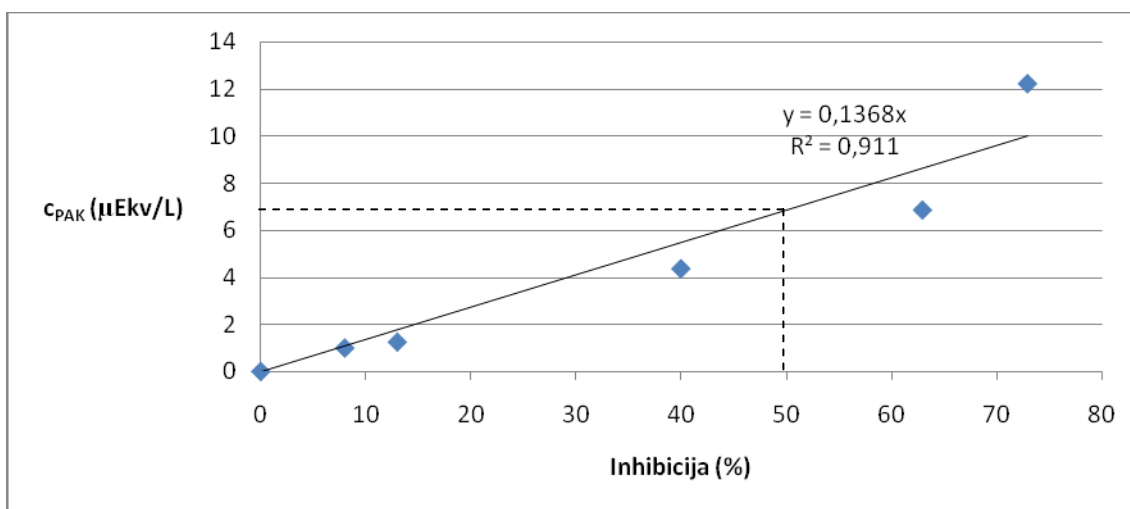
Preglednica 30: Koncentracije prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2kDaSPE), površine vrhov HA in HHL ter njuno razmerje

	A	B	C	D	E	F
c_{PAK} (mEkv/L)	0,00	0,004	0,007	0,014	0,028	0,057
P_{HA} (površina vrha)	207444	242102	204548	180782	112725	105522
P_{HHL} (površina vrha)	1525280	2102620	2199179	2213811	1997961	2369489
Razmerje P_{HHL}/P_{HA}	7,35	8,68	10,75	12,25	17,72	22,45

4.5.2.1

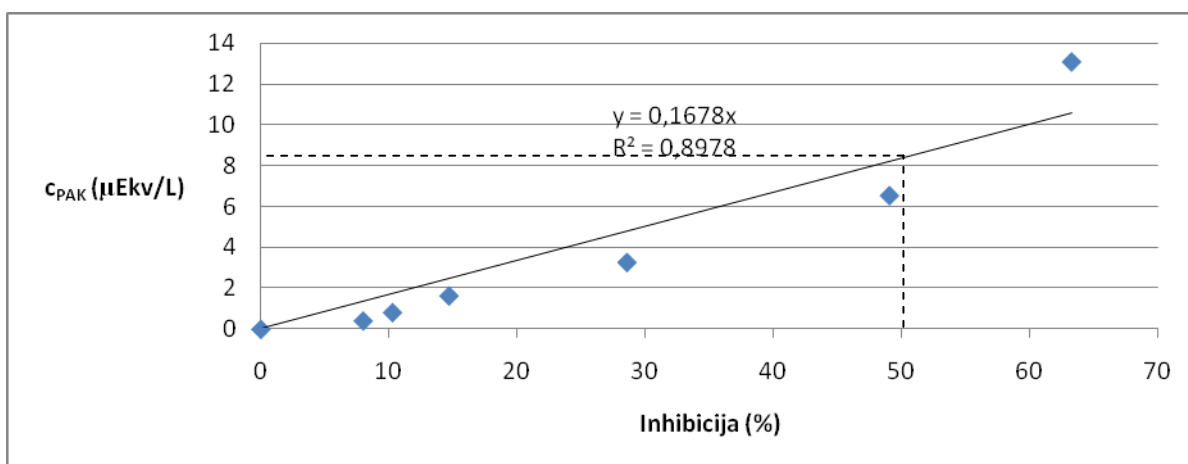
Iz preglednic od 25 do 30 smo iz izračunanih razmerij P_{HHL}/P_{HA} kontrole in vzorcev fermentiranega mleka izračunali procent inhibicije pri določeni koncentraciji prostih amino skupin v vzorcih fermentiranega mleka (slika 25 in 26). Na slikah 25 in 26 je prikazano kako smo dobili vrednosti IC_{50} , ki so zbrane v preglednici 32.

4.5.2.2 Določanje procenta inhibicije ACE pri različnih razredčitvah vzorcev fermentiranega mleka z BGRA43



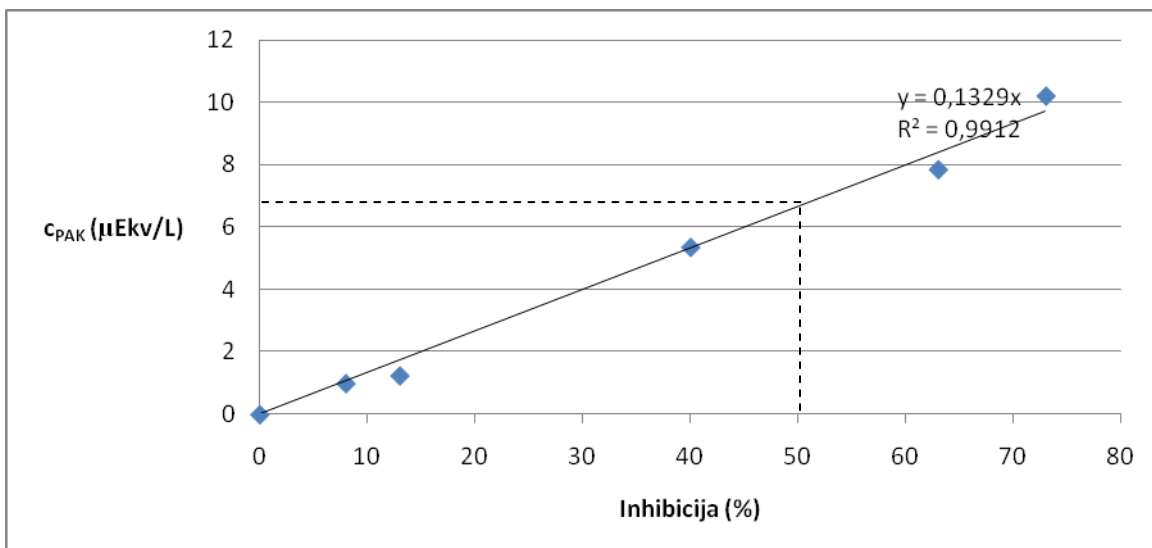
Slika 25: Inhibicija ACE pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaDIALIZA)

IC_{50} za sliko 25 smo izračunali iz enačbe premice $y = 0,136x$. Izračunana vrednost IC_{50} je $6,80 \mu\text{Ekv/L}$. Prav tako smo IC_{50} izračunali na sliki 26 iz enačbe premice za isti vzorec, vendar nedializiran, in sicer je vrednost $IC_{50} = 8,35 \mu\text{Ekv/L}$.



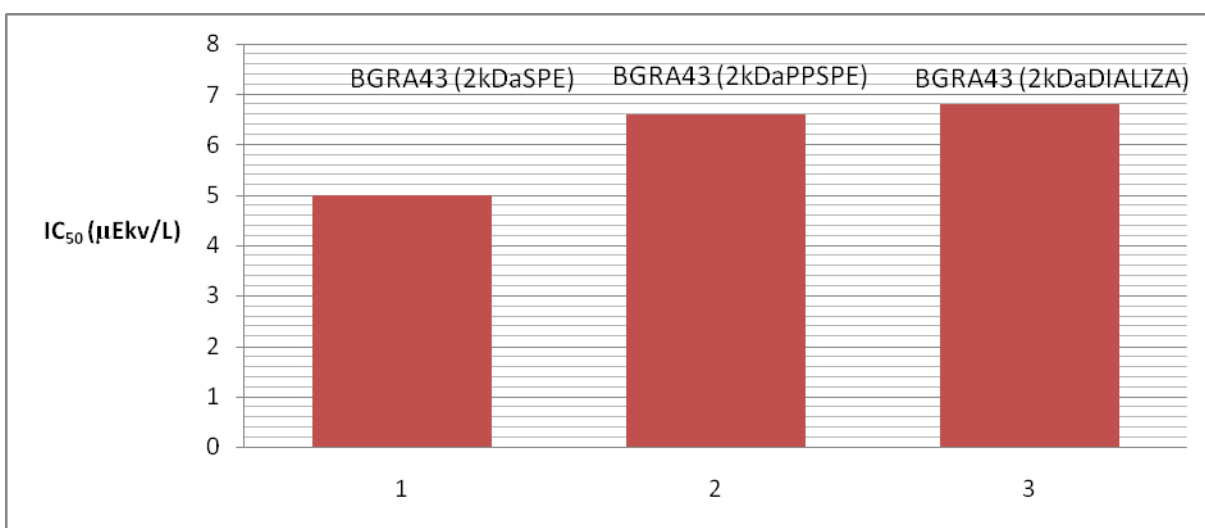
Slika 26: Inhibicija ACE pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDa)

Izračunali smo tudi IC_{50} vzorcev fermentiranega mleka po simulirani prebavi. Za vzorec BGRA43 (2kDaPPSPE) je IC_{50} 6,6 μ Ekv/L (slika 27).



Slika 27: Inhibicija ACE pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaPPSPE)

S slikami od 25 do 27 smo želeli pokazati razlike v vrednosti IC_{50} med posameznimi vzorci fermentiranega mleka, ter med vzorci fermentiranega mleka in fermentiranega mleka po simulirani prebavi. Nižja je vrednost IC_{50} , manjša je potrebna koncentracija prostih amino skupin, ki inhibira ACE za 50 procentov (slika 28). Prikaz vrednosti IC_{50} za različno obdelane vzorce fermentiranega mleka je na sliki 28 in nam pove, da je v vzorcu BGRA43 (2kDaSPE) prisotnih največ prostih amino skupin, ki najbolj aktivno inhibirajo encim ACE.



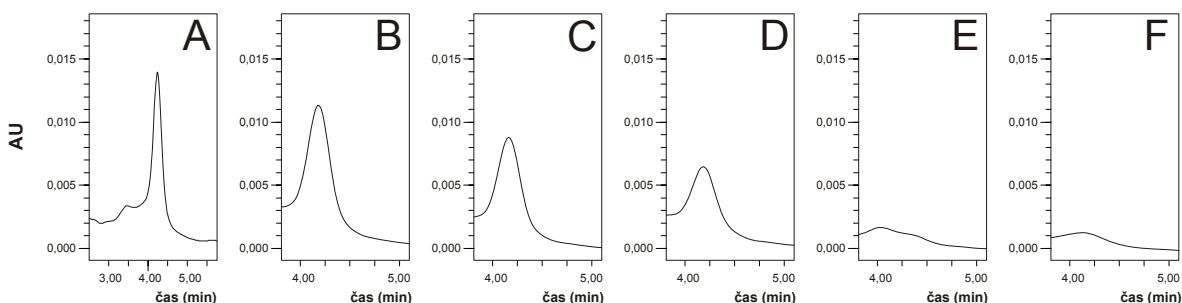
Slika 28: Prikaz IC_{50} za različno obdelane vzorce mleka, fermentiranega z BGRA43.

4.6 INHIBITORNA ACE-AKTIVNOST VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA PO SIMULIRANI PREBAVI

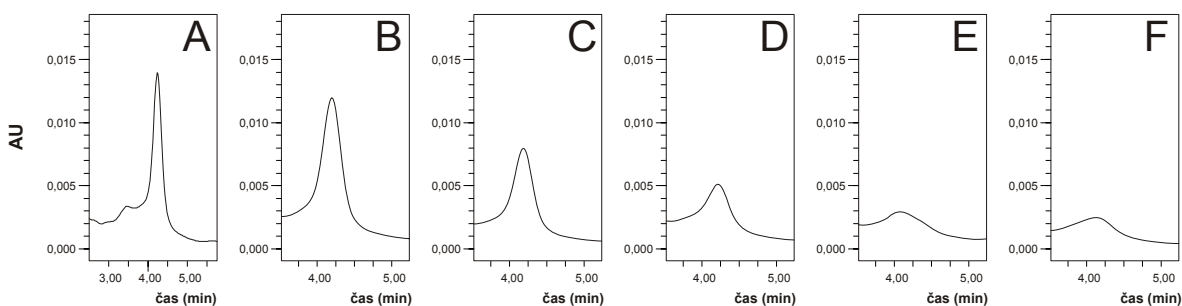
S kromatografsko metodo, s pomočjo substrata HHL, smo tudi ugotavljali ACE-inhibitorno aktivnost vzorcev fermentiranega mleka po simulirani prebavi. Zato smo uporabili vzorec BGRA43. Pred analizo smo vzorec izpostavili *in vitro* simulaciji prebave. Zbrali smo kromatograme HA vzorca fermentiranega mleka z BGRA43 in ekstrahiranega s SPE. Če primerjamo sliki 29 in 30 med seboj vidimo, da ima fermentirano mleko ultrafiltrirano z membrano pod 2 kDa boljše ACE-inhibitorno aktivnost kot fermentirano mleko ultrafiltrirano z membrano nad 10 kDa. Iz tega smo sklepali, da so najbolj ACE inhibitorni peptidi v vzorcih mleka, ki so fermentirani in ultrafiltrirani z membrano pod 2 kDa in ni pomembno, da je tudi največja koncentracija prostih amino skupin v tem vzorcu, kar kaže na pomembnost sestave peptidov (preglednica 32).

Preglednica 31: Razlaga oznak kromatogramov za vzorce fermentiranega mleka po simulirani prebavi

Oznaka diagram	Razlaga oznake
A	Kontrola (substrat HHL in ACE)
B	Razredčitev vzorca 1/16
C	Razredčitev vzorca 1/8
D	Razredčitev vzorca 1/4
E	Razredčitev vzorca 1/2
F	Nerazredčen vzorec



Slika 29: Kromatogrami HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (2kDaPPSPE)



Slika 30: Kromatogrami HA pri različnih razredčitvah vzorca BGRA43 (10kDaPPSPE)

4.7 REZULTATI, KI SMO JIH DOBILI PRI RAZISKOVALNEM DELU S KROMATOGRAFSKO METODO

V preglednici 32 smo zbrali rezultate, ki smo jih dobili s kromatografsko metodo s HHL. Ker smo v začetnih analizah ugotovili, da je kromatografska metoda natančnejša oziroma, da so rezultati bolj primerljivi z literaturnimi, smo v nadaljni analizi opustili spektrofotometrično metodo. Zato smo zbrali in primerjali rezultate med seboj samo rezultate, ki smo jih dobili s kromatografsko metodo.

Preglednica 32: Vrednost IC_{50} izračunana za različne vzorce

Vzorec	IC_{50} ($\mu Ekv/L$)	c_{PAK} ($\mu Ekv/L$)
BGRA43 (2kDa)	8,35	185,15
BGRA43 (2-10kDa)	9,35	199,48
BGRA43 (10kDa)	9,97	199,23
BGRA43 (2kDaDIALIZA)	6,80	119,24
BGRA43 (2-10kDaDIALIZA)	9,35	153,92
BGRA43 (10kDaDIALIZA)	12,47	206,22
BGRA43 (2kDaSPE)	5,0	109,97
BGRA43 (2kDaPPSPE)	6,6	118,08
BGRA43 (2-10kDaPPSPE)	6,73	168,69
Mleko (2kDaPPSPE)	14,96	148,62
Mleko (2-10kDaPPSPE)	15,58	169,07
Mleko*	24,31	/
L8 (2kDa)	9,60	177,54
L12 (2kDa)	9,97	176,42
Kaptopril (FAPGG)	0,512 μM	/
Kaptopril (HHL)	0,0189 μM	/
IPP	1,7 μM	/

*(Mleko) Mleka nismo koncentrirali, zato je bila vrednost IC_{50} izračunana iz mleka, ki smo ga samo centrifugirali in določili koncentracijo prostih amino skupin.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Osnova, da izdelku priznamo funkcionalnost so zanesljive metode odkrivanja funkcionalnih sestavin. V literaturi smo zasledili najpogosteje uporabljeni metodi, s katerima je mogoče ugotavljati aktivnost ACE. Odločili smo se za spektrofotometrično in kromatografsko metodo, ker potrebujeta relativno poceni substrat. Prva metoda po Shalaby in sod. (2006) uporablja substrat FAPGG. Je enostavna, hitra in poceni. Druga metoda, po Hyun-u in Shin-u (2000), pa vključuje kromatografsko določanje HA, ki nastane pri razpadu substrata HHL. Obe metodi smo uporabili z manjšimi modifikacijami. Pri meritvah smo se soočili tudi s težavami, ki pa jih v literaturi nismo zasledili.

Glavne težave smo imeli z encimom ACE. Raztopina ACE ni bila stabilna in zaradi tega se je zmanjševala aktivnost encima s starostjo pripravljene raztopine. Spremenili smo pogoje shranjevanja tako, da smo ga med poskusom hranili v ledeni kopeli in v hladilniku. S spremembo pogojev smo dobili boljše rezultate. V literaturi (Vermeirssen in sod., 2002 in Minervini in sod., 2003) smo tudi opazili, da nekateri raziskovalci uporabljajo ekstrakt iz liofiliziranega tkiva kunčjih pljuč, ki je 10-krat cenejši od čistega encima ACE, zato smo se odločili za slednjega. ACE-inhibitorno aktivnost peptidov v naših vzorcih smo tako določali z ekstraktom iz liofiliziranih kunčjih pljuč. Edino pri vzorcu BGRA43 (2kDa), smo uporabili čisti encim in spektrofotometrično metodo. ACE iz ekstrakta se je izkazal za zelo aktivnega in obstojnega. Ekstrakt smo shranjevali v hladilniku, med poskusom pa smo ga shranili v ledeni kopeli. Aktivnost ekstrakta se ni zmanjšala niti po 14-tih dneh skladiščenja ob opisanih pogojih. Pomanjkljivost ekstrakta je bila, da zmes liofiliziranih kunčjih pljuč ni bila homogena in se je med samo ekstrakcijo ekstrahirala različna količina ACE. To je bil glavni razlog za variiranje nastanka HA med določanjem pri kontroli.

Pri nabavi kunčjega pljučnega tkiva za ekstrakcijo ACE smo bili pozorni, da smo kupili liofilizirano kunčje pljučno tkivo, ki je bilo pakirano v 5 gramski in ne v 1 gramski embalaži. Opazili smo, da je bil ekstrakt iz 5 g bolj temno rdeče, skoraj rjave barve, pri analizi pa se je izkazalo, da je vseboval tudi bolj aktiven ACE medtem, ko je bil drugi ekstrakt iz 1 g manj aktiven, barva ekstrakta pa je bila bistveno svetlejša (svetlo rdeče, oranžne barve). Pomembno je poudariti, da smo opazili razliko v barvi, tudi če smo ekstrahirali z ali brez ultrazvoka. Ekstrakt, pripravljen z ekstrakcijo brez ultrazvoka, je bil blede rjave barve, medtem ko je bil ekstrakt, pridobljen z ultrazvokom, temno rdeče barve.

Tudi kromogeni substrat FAPGG se je izkazal za dokaj nestabilnega. Boljše rezultate smo dosegli tako, da smo dnevno pripravljali svežo raztopino substrata ter jo hranili na ledu. Shalaby in sod. (2006) so navajali, da pri delu niso imeli težav z razpadom substrata. Za merjenje ACE-inhibitorne aktivnosti smo uporabili metodo z uporabo mikrotitrskih plošč kot Hou in sod. (2003) in Shalaby in sod. (2006). Aktivnost vzorcev smo merili pri temperaturi 37 °C, intervali merjenja absorbance vzorca so se ponavljali na 30 sekund, medtem pa smo vzorec ves čas stresali s pomočjo integriranega stresalnika v spektrofotometr. Rezultati so prikazani na slikah 12, 13 in 15.

Kot referenčni ACE inhibitor smo v testih uporabili kaptopril. Pri teh testih smo uporabili ACE iz kunčjih pljuč. Dodane koncentracije kaptoprila pri spektrofotometrični metodi z FAPGG so bile, v primerjavi s koncentracijami, ki jih navaja literatura (Murray in sod., 2004, Vermeirssen in sod., 2002) visoke. Vrednost IC_{50} , ki smo jo določili, je znašala 0,5 μ M (slika 9), kar je za 50-krat več od IC_{50} vrednosti, ki so jo določili Murray in sod. (2004), vendar podatki za vrednost IC_{50} v literaturi nihajo tudi do 100-krat. V testih smo uporabili visoke koncentracije kaptoprila (1-1000 nM v reakcijski mešanici), da smo dosegli ustrezno ACE-inhibitorno aktivnost. Pri kromatografski metodi s substratom HHL so bile dodane koncentracije kaptoprila v testih manjše (1-30 nM v reakcijski mešanici), ker je inhibitor relativno hitro zavrl delovanje ACE. Določena IC_{50} vrednost kaptoprila je bila 19 nM (slika 10), kar je samo dvakrat večja IC_{50} vrednost od navedene v literaturi (Shalaby in sod., 2006) ter enaka, kot so jo določili Li in sod. (2005). Ker so dobljeni rezultati s spektrofotometrično metodo zelo odstopali od navedenih v literaturi, smo se odločili, da uporabimo tudi kromatografsko metodo pri določanju ACE-inhibitorne aktivnosti. Dobljeni rezultati spektrofotometrične metode s FAPGG so odstopali od navedenih v literaturi, mogoče zato, ker je bila previsoka koncentracija kaptoprila in ker so bili moteči mehurčki, ki so nastali pri mešanju.

5.1 ACE-INHIBITORNA AKTIVNOST VZORCEV FERMENTIRANEGA MLEKA

Najprej smo v vzorcih fermentiranega mleka določili koncentracijo prostih amino skupin z OPA metodo. OPA metodo so v svojih raziskavah uporabili Roth (1971), Frister in sod. (1986) in Zuman (2005). Metoda je hitra, občutljiva, reagent je hitro pripravljen, za analizo uporabimo malo vzorca. Za nas je bila pomembna koncentracija prostih amino skupin v reakcijski mešanici in te so bile zelo nizke, od 7,86 do 14,71 μ Ekv/L. Ker smo pričakovali nizke koncentracije prostih amino skupin permeata po ultrafiltraciji in ekstrakciji s SPE ali po dializi, smo po liofilizaciji rehidrirali vzorec v minimalni količini vode (750 μ L) in ga tako koncentrirali.

Po končani fermentaciji mleka z različnimi kulturami (preglednici 18 in 19) smo določali koncentracijo prostih amino skupin v supernatantih fermentiranega mleka in ugotovili, da je največ peptidov nastalo med fermentacijo s kulturo *Lactobacillus helveticus* BGRA43 (slika 7). Z nadaljnimi analizami smo prišli do rezultata, da hidrolizati kultur *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8 in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L12 slabše inhibirajo ACE od BGRA43, zato smo v nadaljnjo analizo vključili samo BGRA43. V mleku, fermentiranem z *Lactobacillus helveticus* BGRA43, je fermentacija potekala najbolj intenzivno, kar je razvidno iz vrednosti pH, ki je pri tem vzorcu padala najhitreje, dosegla pa je tudi najnižjo vrednost (preglednica 18). Iz preglednice 19 je razvidno, da je bila koncentracija prostih amino skupin po fermentaciji najvišja pri BGRA43. Pri ostalih dveh vzorcih je bila nižja koncentracija prostih amino skupin. Iz tega smo lahko sklepali, da je imel sev *Lactobacillus helveticus* BGRA43 najvišjo proteolitično aktivnost. S slike 7 vidimo, da se je koncentracija prostih amino skupin, v primerjavi z vzorcem svežega mleka, v vseh vzorcih mleka med fermentacijo povečala.

Vse vzorce smo ultrafiltrirali z membrano 2 kDa in 10 kDa, da smo peptide ločili po velikosti in v permeatih in retentatih določili koncentracijo prostih amino skupin. Najvišjo

koncentracijo prostih amino skupin smo določili v vzorcih, pripravljenih s postopkom B (dializa) in z molekulsko maso peptidov nad 2 kDa ter v vzorcih po simulirani prebavi (preglednici 20 in 21). V vzorcih, pripravljenih s postopkom A (SPE), je bila koncentracija prostih amino skupin enkrat nižja (preglednici 20 in 21). Večjo pozornost smo namenili vzorcu mleka, fermentiranem s sevom BGRA43, ker se je že na podlagi začetnih testov izkazalo, da ima največjo ACE-inhibitorno aktivnost. Z ekstrakcijo peptidov s SPE smo ekstrahirali manj polarne peptide, ker smo kolono sprali z acetonitrilom, ki je manj polaren kot voda, z dializo pa smo odstranili soli. Če primerjamo koeficient korelacije med reakcijo vzorcev, kaptoprila ali IPP je bila najboljša pri kaptoprilu in IPP (slike 9, 10 in 11), saj sta to izolirana analitsko čista ACE-inhibitorna peptida. Iz rezultatov, ki smo jih dobili, je bila po SPE ali dializi v vzorcih manjša koncentracija prostih amino skupin, kot pa v vzorcih, ki jih po ultrafiltraciji nismo obdelali, vendar je bila tudi njihova IC_{50} vrednost nižja (višja inhibitorna aktivnost). Na ACE-inhibitorno aktivnost je vplivala tudi ultrafiltracija. Pri ultrafiltraciji je preko membrane z 2 kDa prešlo manj spojin s prostimi amino skupinami, kot pa jih je ostalo v retentatu. Vendar pa so ti vzorci dosegli v povprečju za 40 % boljšo inhibicijo (nižji IC_{50}), kot pa ostali vzorci, ki so vsebovali večje peptide. Ugotovljena koncentracija prostih amino skupin v retentatih (ultrafiltracija z membrano 10 kDa) je bila višja, kot v permeatih, vendar moramo upoštevati dejstvo, da se je koncentracija peptidov nad membrano med procesom ultrafiltracije povečala.

Med *in vitro* prebavo fermentiranega mleka lahko nastanejo novi peptidi. Naš namen je bil ugotoviti, kako je z ACE aktivnostjo vzorcev fermentiranega mleka po simulirani prebavi. Zanimalo nas je, ali so se med simulirano prebavo *in vitro* tvorili dodatni ACE-inhibitorni peptidi. Po izračunih smo ugotovili (preglednica 21), da se je po dodatku pepsina in pankreatina v fermentirano mleko, tvorilo še nekaj krajših peptidov, ki so prehajali skozi pore membrane pod 2 kDa. Po simulaciji prebave in ekstrakciji s SPE je bila koncentracija prostih amino skupin 118 $\mu\text{Ekv/L}$, kar je za 10 % višja koncentracija kot pa je bila pri vzorcu, ekstrahiranemu s SPE, brez simulacije prebave. Vrednost IC_{50} zgoraj omenjenih vzorcev pa je bila zelo nizka (5,0 in 6,6 $\mu\text{Ekv/L}$, preglednica 32). Podobno vrednost IC_{50} (6,8 $\mu\text{Ekv/L}$, preglednica 32) je imel dializiran vzorec, vendar je bila koncentracija prostih amino skupin v reakcijski mešanici 119 $\mu\text{Ekv/L}$ (preglednica 32). To pomeni, da večja koncentracija prostih amino skupin, ne pomeni tudi boljše ACE-inhibitorne aktivnosti.

Najvišjo ACE-inhibitorno aktivnost med vsemi vzorci je dosegel vzorec rekonstituiranega mleka, fermentiran z BGRA43, ultrafiltriran z membrano 2 kDa in pripravljen s postopkom SPE ($IC_{50} = 5,0 \mu\text{Ekv/L}$, preglednica 32). Naše vzorce fermentiranega mleka smo primerjali s svežim rekonstituiranim mlekom, ki smo ga obdelali enako kot ostale vzorce fermentiranega mleka. Rezultati so pokazali, da prav tako inhibira ACE, vendar 5-krat slabše kot vzorec, ki smo ga fermentirali. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da se med fermentacijo tvorijo bioaktivni peptidi, ki inhibirajo ACE.

Primerjava vzorcev BGRA43 (2kDaSPE) in BGRA43 (2kDaPPSPE) je pokazala, da je bila koncentracija prostih amino skupin v vzorcu BGRA43 (2kDaPPSPE) višja (preglednica 32), vendar se je vrednost IC_{50} tega vzorca razlikovala od BGRA43 (2kDaSPE) le za 1,6 $\mu\text{Ekv/L}$. Zaključili smo lahko, da vzorci fermentiranega mleka po izpostavitvi simulirani prebavi inhibirajo ACE podobno, kot vzorci fermentiranega mleka pred simulirano *in vitro* prebavo. Torej simulirana prebava bistveno ni vplivala na nastanek novih bioaktivnih

peptidov iz fermentiranega mleka. Razlike v koncentraciji prostih amino skupin so najverjetneje nastale kot posledica dodatne hidrolize proteinov fermentiranega mleka. Glede na naše rezultate, simulacija prebave ni bistveno povečala ACE-inhibitorne aktivnosti, lahko pa, da je bil pH fermentiranega mleka previsok in pepsin ni bil ves čas optimalno aktiven. Vrednost pH bi bilo smotno spremljati ves čas med procesom prebave. Če pa smo primerjali IC_{50} mleka (2kDaPPSPE), ki je bilo izpostavljeno prebavi, z vzorcem BGRA43 (2kDaSPE), ugotovimo, da je bila vrednost IC_{50} 3-krat višja. IC_{50} je definirana kot tista koncentracija bioaktivnih peptidov, ki inhibira aktivnost ACE za 50 %. To pomeni, da so med prebavo mleka nastajali ACE-inhibitorni peptidi, vendar v veliko manjši meri, kot med samo fermentacijo (preglednica 32). ACE-inhibitorna aktivnost je odvisna od aminokislinske zgradbe kratkih peptidov, le-te pa od proteolitične oziroma peptidazne aktivnosti encimskega sistema bakterij. V literaturi navaja Pripp (2005), da je možnost nastanka bioaktivnih peptidov s pomočjo prebavnih encimov večja. Razlike med izmerjenimi in izračunanimi podatki pripisuje peptidaznim inhibitorjem v realnih vzorcih. V primerjavi z njegovimi rezultati so naše IC_{50} vrednosti v povprečju za stokrat višje, kar pomeni, da imajo dobljeni hidrolizati nižjo ACE-inhibitorno aktivnost.

S spektrofotometrično metodo, z uporabo substrata FAPGG, smo dobili primerljive rezultate (preglednica 23) z rezultati, ki smo jih dobili s kromatografsko metodo (preglednica 32). Vzorca BGRA43 (2kDa) in BGRA43 (10kDa) sta imela skoraj enake vrednosti IC_{50} pri obeh metodah merjenja ACE-inhibitorne aktivnosti. Pri spektrofotometrični metodi je bilo težko določiti naklon linearne premice, ker je bila zelo majhna razlika med začetno in končno absorbanco, iz katere smo nato izračunali ACE-inhibitorno aktivnost. Če smo primerjali spektrofotometrično s kromatografsko metodo, smo videli, da smo za kaptopril določili različne vrednosti IC_{50} . Vrednost IC_{50} kaptoprila pri spektrofotometrični metodi je bila precej višja (0,512 μ M) od vrednosti, ki smo jo določili s kromatografsko metodo (0,0189 μ M). Ker smo dobili tako različne rezultate pri določanju IC_{50} za kaptopril in ker smo na začetku ugotovili, da je FAPGG nestabilen, smo se odločili, da bomo uporabljali kromatografsko metodo, čeprav spektrofotometrično uporablja veliko raziskovalcev. Metodi so med sabo preučevali tudi Shalaby in sod. (2006) in ugotovili, da so rezultati dobljeni z obema metodama zelo primerljivi. Edina prednost spektrofotometrične metode je, da jo lahko meriš na mikrotitrskih ploščah, kar pomeni, da lahko v krajšem času analiziraš več vzorcev kot s kromatografsko metodo.

Pri kromatografski metodi po Hyun-u in Shinu-u (2000) z manjšimi modifikacijami smo ločili hipurno kislino od ostalih komponent reakcijske mešanice in jo nato kvantitativno določili. Pri spektrofotometrični metodi smo spremljali kinetiko med samo reakcijo. Problem pa je bil, da je bila vidna zelo majhna razlika med kontrolo (substrat in ACE) in vzorci, saj smo zelo težko določili vrednost IC_{50} . Če primerjamo realni naklon premice ($-4,5 \times 10^{-3} \Delta A/\text{min}$) in padec absorbance s Shalaby-em in sod. (2006), je bil padec začetne absorbance na končno pri naših rezultatih vsaj dvakrat nižji. Podobne rezultate je dobil tudi Cankar (2007), ki je ugotovil, da imajo najboljšo ACE-inhibitorno aktivnost peptidi, ultrafiltrirani z membrano nad 0,5 kDa. Glede na naše in njegove rezultate lahko sklepamo, da so najbolj aktivni peptidi med 0,5 in 2 kDa.

S kromatografsko metodo smo lahko spremljali nastanek hipurne kisline, ki je končni produkt reakcije. Na sliki 17 se lahko vidi primer kontrolnega vzorca (substrat HHL in

ACE). Na tej sliki sta označena vrhova za substrat HHL in nastali produkt HA. Na sliki 18 se vidi, da je nastanek HA odvisen od koncentracije vzorca. Višji je bil vrh HA, manjša je bila koncentracija prostih amino skupin v vzorcu. S slik 19a do 24b lahko vidimo, da je bila ponovljivost površin HA pri kontroli zelo slaba. Ker je bila tako visoka variacija nastanka produkta HA pri kontrolnem vzorcu med posameznimi meritvami, smo uporabili razmerje površin med substratom HHL in HA. V preglednicah od 25 do 30 je prikazan izračun razmerij površin (HHL/HA), na podlagi katerih smo potem izračunali procent inhibicije za vsako razredčitev vzorca. Iz grafa (odvisnost inhibicije od koncentracije prostih amino skupin) smo nato odčitali vrednost IC_{50} za vsak vzorec. Za določitev retencijskega časa HA smo uporabili 2 mM raztopino HA. Iz tega smo lahko izračunali, da je pri kontroli (ACE in substrat) v povprečju nastalo 0,04 mM HA.

Na samo vrednost IC_{50} so vplivali tudi postopki priprave vzorcev. Vzorci, ekstrahirani s pomočjo SPE, so imeli najboljšo ACE-inhibitorno aktivnost, sledijo vzorci, ki so jih dializirali, najslabšo ACE-inhibitorno aktivnost pa so imeli vzorci, ki so bili samo ultrafiltrirani ter liofilizirani. Inhibitorno aktivnost ACE smo določili tudi standardu IPP. Ker je bil čisti standard, smo mu določili inhibitorno aktivnost, in sicer $IC_{50} = 1,7 \mu M$. IPP inhibira vsaj 2-krat bolje kot vzorec BGRA43 (2kDaSPE), ki je bil inhibitorno najbolj aktiven od vseh vzorcev fermentiranega mleka. Nakamura in sod. (1995) in Fitzgerald in Murray (2006) so določili vrednost IC_{50} za IPP od 5 do 9 μM .

5.2 SKLEPI

- Mleko, fermentirano z *Lactobacillus helveticus* BGRA43, je vsebovalo najvišjo koncentracijo prostih amino skupin po fermentaciji, v primerjavi z ostalimi sevi.
- Najboljšo ACE-inhibitorno aktivnost je imel vzorec fermentiran z *Lactobacillus helveticus* BGRA43, ultrafiltriran z membrano do 2 kDa in ekstrahiran s pomočjo SPE.
- Na ACE-inhibitorno aktivnost je vplivala priprava vzorcev. Vzorci, ekstrahirani s SPE, so imeli najboljšo ACE-inhibitorno aktivnost, sledijo vzorci, ki so jih dializirali, najslabšo ACE-inhibitorno aktivnost pa so imeli vzorci, ki so bili samo ultrafiltrirani ter liofilizirani.
- Vzorci fermentiranega mleka, ki so jih izpostavili simulaciji prebave so inhibirali ACE podobno kot vzorci pred simulirano prebavo. Simulacija prebave bistveno ni vplivala na nastanek ACE-inhibitornih peptidov oziroma v veliko manjši meri, kot fermentacija.
- Kromatografska metoda z uporabo substrata HHL se je izkazala za primernejšo v primerjavi s spektrofotometrično metodo. Kromatografska metoda je avtomatizirana in zato hitrejša. Pridobljeni rezultati za kaptopril niso veliko odstopali od navedenih v literaturi, zato smo metodo ocenili kot natančnejšo.

6 POVZETEK

ACE je encim, ki je vključen v renin-angiotenzinski sistem, ki skrbi za uravnavanje krvnega tlaka. Znano je, da številni bioaktivni peptidi nastajajo med fermentacijo mleka, med hidrolizo proteinov s prebavnimi encimi ter med hidrolizo proteinov s proteinazami mikroorganizmov. Na nastanek bioaktivnih peptidov vpliva uporabljena starterska kultura in pogoji fermentacije. Kazeini, kot glavna proteinska komponenta mleka, imajo pomembno vlogo pri nastanku bioaktivnih peptidov z multifunkcijskimi lastnostmi. Namen naše naloge je bil ugotoviti ali med fermentacijo mleka s sevi *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L8, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L12 in *Lactobacillus helveticus* BGRA43 nastanejo ACE-inhibitorni peptidi. Aktivnost nastalih hidrolizatov oz. peptidov smo določali s spektrofotometrično metodo, ki je vključevala spremljanje kinetike encimske reakcije in nastanek produkta iz substrata FAPGG in ACE ter s kromatografsko metodo, s katero smo kvantitativno ovrednotili produkt reakcije med substratom HHL in ACE. Ugotavljali smo tudi, če simulirana prebava fermentiranega mleka in fermentiranega mleka še poveča inhibitorno aktivnost nastalih peptidov.

Pri našem raziskovalnem delu smo najprej proučevali spektrofotometrično metodo določanja aktivnosti ACE po Shalaby-ju in sod. (2006) z uporabo mikrotitrskih plošč in jo primerjali s kromatografsko metodo po Hyun-u in Shin-u (2000) s HHL. Kromatografska metoda je bila primernejša, saj smo lahko nastali produkt encimske reakcije, hipurno kislino, natančneje kvantitativno določili. Kot vir encima smo uporabili ekstrakt iz liofiliziranega tkiva kunčjih pljuč ter kaptopril kot referenčni inhibitor.

Po optimizaciji metode smo pripravili fermentirano mleko s tremi različnimi sevi laktobacilov. Najboljšo proteolitično aktivnost je imel *Lactobacillus helveticus* BGRA43. Fermentirano mleko smo centrifugirali, ultrafiltrirali in ga pripravili po dveh postopkih. Postopek A je vključeval ekstrakcijo s pomočjo SPE, prepričevanje z dušikom ter liofilizacijo. S postopkom B smo vzorce liofilizirali, rehidrirali ter dializirali. Pripravili smo tudi vzorce fermentiranega mleka, ki smo ga izpostavili *in vitro* simulirani prebavi, ga ultrafiltrirali in ekstrahirali s SPE. Koncentracijo prostih amino skupin smo določili z OPA metodo (Frister in sod., 1986). Ugotovili smo, da imajo vzorci, ultrafiltrirani z membranami 2 kDa, najnižjo koncentracijo prostih amino skupin, vendar so imeli tudi najnižjo vrednost IC_{50} (najvišjo inhibitorno aktivnost).

Vzorec BGRA43 (2kDaSPE) je bil najboljši inhibitor ACE ($IC_{50} = 5,0 \mu\text{Ekv/L}$). Vrednost IC_{50} je za vzorca BGRA43 (2kDaDIALIZA) in BGRA43 (2kDaPPSPE) znašala 6,8 $\mu\text{Ekv/L}$. BGRA43 (2kDa) je imel vrednost $IC_{50} = 8,35 \mu\text{Ekv/L}$. Vsi ostali vzorci so imeli višje vrednosti IC_{50} . Najvišjo vrednost IC_{50} pa je imelo fermentirano mleko in fermentirano mleko, izpostavljeno simulirani prebavi (preglednica 32). Simulacija prebave ni bistveno vplivala na nastanek ACE-inhibitornih peptidov oziroma v veliko manjši meri, kot fermentacija.

Z eksperimentalnim delom smo potrdili hipotezo, da med fermentacijo nastajajo ACE-inhibitorni hidrolizati. S pripravo vzorcev s pomočjo ekstrakcije s SPE in dializo, smo določili najboljšo ACE-inhibitorno aktivnost.

7 VIRI

Abraham A. G., Antoni G. L., Añon M. C. 1993. Proteolytic activity of *Lactobacillus bulgaricus* grown in milk. *Journal of Dairy Science*, 76: 1498-1505

Anzelc T. 2006. Fizikalne lastnosti arheosomov pripravljenih iz lipidov hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* K1. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 43-43

Bruck W. M., Graverholt G., Gibson G. R. 2003. A two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental α -lactalbumin and glycomacropptide on mixed cultures of human gut bacteria challenged with enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* serotype *typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 44-53

Cankar R. 2007. Peptidni inhibitorji angiotenzinske konvertaze v fermentiranem mleku. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: str. 24-24

Christensen J. E., Dudley E. G., Pederson J. A., Steele J. L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 217-246

Church F. C., Swaisgood H. E., Porter D. H., Catignani G. L. 1983. Spectrofotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66: 1219-1227

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

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

Coates D. 2003. 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

Doig M. T., Smiley J. W. 1993. Direct injection assay of angiotensin-converting enzyme by high-performance liquid chromatography using a shielded hydrophobic phase column. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 613: 145-149

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

El-Salam A., El-Shibiny S., Buchheim W. 1996. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6: 327-341

Fira D., Kojic M., Banina A., Spasojevic I., Strahinic I., Topisirovic L. 2001. Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 123-130

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

Frister Von H., Meisel H., Schlimme E. 1986. Modifizierte OPA-Methode zur Charakterisierung von Proteolyse-Produkten. *Milchwissenschaft*, 41: 483-487

Froetschel M. A. 1996. Bioactive peptides in digesta that regulate gastrointestinal function and intake. *Journal of Animal Science*, 74: 2500-2508

Gill H. S., Doull F., Rutherford K. J., Cross M. L. 2000. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84: 111-117

Gilmour A., Rowe M. T. 1990. Micro-organisms associated with milk. V: Dairy microbiology. vol.2 : The microbiology of milk. 2nd ed. Robinson R. K. (ed.). London, Elsevier Science Publishers: 37-76

Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F., Addeo F. 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3898-3904

Hernández-Ledesma B., Recio I., Ramos M., Amigo L. 2002. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal*, 12: 805-812

Hernández-Ledesma B., Amigo L., Ramos M., Recio I. 2004. Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Chromatography*, 1049: 107-114

Hernández-Ledesma B., Quirós A., Amigo L., Recio I. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17: 42-49

Hernández M. J. M., Domingo E. B., Camanas V., Alvarez-Coque M. C. G. 1990. Evaluation of the proteolysis degree with the o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagent. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 338: 62-65

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

Hou C. W., Chen H. J., Yaw-Huei L. 2003. Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin-I-converting enzyme purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1706-1709

Hyun C.-K., Shin H.-K. 2000. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, 36: 65-71

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

Kitts D. D., Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309-1323

Knez Ž. 1996. Termodifuzijski separacijski procesi. V: *Biotehnologija: Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 591-608

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

Korhonen H., Pihlanto–Leppälä A., Rantamäki P., Tupasela T. 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science & Tehnology*, 9: 307-319

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

Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: *Biotehnologija: Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 610-632

Lakota A., Pavko A. 2000. Praktikum iz kemijskega inženirstva. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo: 63-66

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

Li G.-H., Liu H., Shi Y.-H., Le G.-W. 2005. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37: 219-224

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

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*: 193, 265-275

Marić V. 1996. Priprava in ohranjanje biotehnoloških proizvodov. V: *Biotehnologija: Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 633-645

Mehanna A. S., Dowling M. 1999. Liquid chromatographic determination of hippuric acid for the evaluation of ethacrynic acid as angiotensin converting enzyme inhibitor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19: 967-973

Meisel H., FitzGeralt R. J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1289-1295

Miller J. M. 1975. *Separation methods in chemical analysis*. Philadelphia, John Wiley & Sons: 309 str.

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

Mizuno S., Nishimura S., Matsuura K., Gotou T., Yamamoto N. 2004. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *Journal of Dairy Science*, 87: 3183-3188

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., Yamamoto M., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T. 1995. Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78: 777-783

Nakamura Y., Takano T. 1995. Angiotensin converting enzyme inhibitor and method for preparing same. United States Patent No. 5449661: 14 str.

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

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

Pan D, Luo Y., Tanokura M. 2005. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. Food Chemistry, 91: 123-129

Parrot S., Degraeva P., Curia C., Martial-Gros A. 2003. *In vitro* study on digestion of peptides in Emmental cheese: analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. Nahrung, 47: 87-94

Persson A., Wilson I. B. 1977. A fluorogenic substrate for angiotensin-converting enzyme. Analytical Biochemistry, 83: 296-303

Phenomenex. 2008. Strata-X SPE, Aschaffenburg, Phenomenex.

<http://www.phenomenex.com/products/brands/view.aspx?id=188> (april 2008): 1 str.

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

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

Pihlanto-Leppälä A., Rokka T., Korhonen H. 1998. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. International Dairy Journal, 8: 325-331

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., Sorensen R., Stepaniak L., Sorhaug T. 2006. Relationship between proteolysis and angiotensin-I-converting enzyme inhibition in different cheeses. Food Science and Technology, 39: 677-683

Ryan J. W., Chung A., Ammons C., Carlton M. L. 1977. A simple radioassay for angiotensin-converting enzyme. Biochemical Journal, 167: 501-504

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. *International Journal of Gastroenterology*, 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

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

Rohm H., Tschagr E., Jaros D. 1996. Determination of proteolysis in swiss cheese: comparison of the Kjeldahl method and a spectrophotometric OPA assay. *Food Science and Tehnology-Lebensmittel.-Wissenschaft und Technologie*, 29: 191-194

Roth M. 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry*, 43: 880-882

Schlimme E., Meisel H. 2006. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Food / Nahrung*, 39: 1-20

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

Sigma-Aldrich. 2008. Pepsin, Aschaffenburg, Sigma-Aldrich.
http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Analytical_Enzymes/Pepsin.html (maj 2008): 1 str.

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

Simpson N. J. K., Van Horne K. C. 1985. *The handbook of sorbent extraction technology*. Harbor City, Analytichem International: 45-46

Smacchi E., Gobbetti M. 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*, 17: 129-141

Spellman D., McEvoy E., O'Cuinn G., FitzGerald R. J. 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH-stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13: 447-453

Suh H. J., Whang J. H., Kim Y. S., Bae S. H., Noh D. O. 2003. Preparation of angiotensin I converting enzyme inhibitor from corn gluten. *Process Biochemistry*, 38: 1239-1244

Sutas Y., Hurme M., Isolauri E. 1996. Down-regulation of anti-CD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolysed with *Lactobacillus* GG-derived enzymes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 43: 687-689

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

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

Zhang R., Xu X., Chen T., Li L., Rao P. 2000. Assay for angiotensin-converting enzyme using capillary zone electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 280: 286-290

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

Wu J., Ding X. 2001. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 501-506

Yamamoto N., 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

8 ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ireni Rogelj za trud, strokovni in kritični pregled diplomske naloge. Za pregled naloge se zahvaljujem tudi recenzentki prof. dr. Veroniki Abram in doc. dr. Blažu Cigiću.

Hvala asist. dr. Alenki Levart za izposojlo HPLC-ja.

Za potek raziskovalnega dela, za priporočeno literaturo, za podroben pregled diplomske naloge, za vse kritike in pohvale se zahvaljujem Gorazdu Tompa.

Hvala Simonu za potrpežljivost in za vsestransko podporo pri pisanju diplomske naloge.

Hvala mami za zaupanje in podporo v vseh letih študija.