

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Petra TERPINC

ARHEJE IN ANTIOKSIDANTI

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ARCHAEA AND ANTIOXIDANTS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Veroniko Abram, za somentorico prof. dr. Natašo Poklar Ulrih in za recenzentko doc. dr. Barbaro Jeršek.

Mentorica: prof. dr. Veronika Abram

Somentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Recenzentka: doc. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra Terpinc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.1 : 579.22 : 543.61 : 547.96/.97.04 (043) = 863
KG arheje / hipertermofili / *Aeropyrum pernix* / biomasa / proteini / polifenolne spojine / proste -SH skupine / antioksidanti / antioksidativna aktivnost / Singleton-Rossi / DPPH / HPLC
AV TERPINC, Petra
SA ABRAM, Veronika (mentorica) / POKLAR ULRIH, Nataša (somentorica) / JERŠEK, Barbara (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN ARHEJE IN ANTIOKSIDANTI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 47 str., 1 pregl., 15 sl., 4 pril., 54 vir.
IJ sl
JI sl / en

AI V biomasi arhej smo želeli ugotoviti morebitno prisotnost antioksidantov. Delo je zajemalo kultivacijo hipertermofilne arheje vrste *Aeropyrum pernix*, ki optimalno raste pri temperaturi 92 °C, pripravo metanolnega ekstrakta in njegovo kemijsko analizo. Najprej smo z metodo po Sticklandu določili skupne proteine in sicer njihov delež predstavlja 47,3 % celotne biomase. Z metodo po Bradfordu smo določili tudi proteine v ekstraktu in ugotovili, da se je z metanolom ekstrahiralo le 7,6 % vseh proteinov. Zanimala nas je tudi vsebnost prostih -SH skupin, ki smo jo določili z metodo po Ellmanu in ugotovili, da vsebuje 1 g ekstrakta *A. pernix* 0,99 μmol prostih -SH skupin, kar je več kot jih je prisotnih v nekaterih glivah in kvasovkah. V nadaljevanju smo v ekstraktu določili skupne fenolne spojine in jih izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline; ta vrednost znaša 14,6 μg/mg suhega ekstrakta in je primerljiva z vsebnostjo teh spojin pri nekaterih rastlinah. Antioksidativno učinkovitost ekstrakta smo spremljali z radikalom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH*) in ugotovili, da imajo prisotne spojine z antioksidativno učinkovitostjo zgolj 4,5 % sposobnost inhibicije prostih radikalov. Temu je sledila še separacija polifenolnih spojin s HPLC. Večino potencialnih antioksidantov se je eluiralo s kolone v prvih dvajsetih minutah analize, med njimi tudi nekaj takšnih, ki že v manjših koncentracijah izražajo določen antioksidativen potencial.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Dn
DK UDC 577.1 : 579.22 : 543.61 : 547.96/.97.04 (043) = 863
CX archaea / hyperthermophiles / *Aeropyrum pernix* / biomass / proteins / polyphenolic compounds / free -SH groups / antioxidants / antioxidative activity / Singleton-Rossi / DPPH / HPLC
AU TERPINC, Petra
AA ABRAM, Veronika (supervisor) / POKLAR ULRIH, Nataša (co-advisor) / JERŠEK, Barbara (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana. Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2006
TI ARCHAEA AND ANTIOXIDANTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 47 p., 1 tab., 15 fig., 4 ann., 54 ref.
LA sl
AL sl / en

AB The aim of this project was to determine a possible presence of antioxidants in an archaeal biomass. The work itself included a cultivation of the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*, which has optimum growth temperature at 92 °C, preparation of a methanol extract and its chemical analysis. First we used Stickland assay to determine common proteins that make up to 47.3 % of entire biomass. We then used the Bradford assay to determine proteins in the extract and found out that only 7.6 % of entire protein mass extracted using methanol as the extract media. The concentration of free -SH groups was determined using the Ellman assay. The result was that 1 g of the extract contains 0.99 µmol of free -SH groups, which exceeds the concentration in some fungi and yeast. As we continued we determined total phenol compounds and expressed them as chlorogenic acid equivalent. The value is 14.6 µg/mg of dry extract and can be compared with the concentration of this particular chemical compounds in some plants. We monitored the antioxidative activity with 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazyl radical (DPPH[•]) and found out that present compounds with antioxidant activity only have a 4.5 % ability of inhibiting free radicals. This was followed with HPLC separation of polyphenol compounds. The majority of potential antioxidants were eluted from the column in first 20 minutes of the analysis, among them some that express ascertain antioxidative potential even in small concentrations.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ARHEJE	4
2.1.1 Arheje so samostojna domena	4
2.1.2 Osnovne značilnosti hipertermofilov	6
2.1.3 Prilagoditve arhej na življenje pri visokih temperaturah	7
2.1.4 <i>Aeropyrum pernix</i>	10
2.2 ANTIOKSIDANTI	11
2.2.1 Prosti radikali in oksidativen stres	11
2.2.2 Splošne značilnosti antioksidantov	13
2.2.3 Viri antioksidantov	14
2.2.4 Delitev antioksidantov	14
2.2.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti	18
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.2 PRIBOR IN OPREMA	21
3.3 GOJENJE <i>AEROPIRUM PERNIX</i>	23
3.3.1 Priprava gojišča	23
3.3.2 Gojenje	23
3.4 DOLOČANJE SUHE BIOMASE	23
3.5 EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJIN	24
3.6 KEMIJSKE ANALIZE	24
3.6.1 Določanje vsebnosti skupnih proteinov v biomasi	24
3.6.2 Določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu	25
3.6.3 Določanje vsebnosti prostih -SH skupin	26
3.6.4 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstraktu	26
3.6.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti ekstrakta	27
3.7 KROMATOGRAFIJA	28
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	30
4.1 GOJENJE <i>AEROPIRUM PERNIX</i>	30
4.2 DOLOČANJE SUHE BIOMASE	31
4.3 KEMIJSKE ANALIZE	31
4.3.1 Določanje vsebnosti skupnih proteinov	32
4.3.2 Določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu	33
4.3.3 Določanje vsebnosti prostih -SH skupin	34

4.3.4	Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstraktu.....	35
4.3.5	Določanje antioksidativne učinkovitost ekstrakta.....	36
4.4	SEPARACIJA POLIFENOLNIH SPOJIN S HPLC.....	38
5	SKLEPI	42
6	POVZETEK.....	43
7	VIRI	44

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekateri kemijske značilnosti arhej vrste *Aeropyrum pernix* - delež ekstrakta in vsebnost beljakovin v suhi biomasi; vsebnost beljakovin, reducirajočih spojin, skupnih fenolnih spojin v ekstraktu; antioksidativna aktivnost ekstrakta. **37**

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijske vezi v lipidih (Madigan in sod., 2003: 69)	4
Slika 2: Struktura arhejske membrane (Madigan in sod., 2003: 69)	5
Slika 3: <i>Aeropyrum pernix</i> (<i>Aeropyrum</i> , 2005)	10
Slika 4: Tokoferoli in tokotrienoli (Gordon, 2003: 286)	15
Slika 5: β -karoten (Gordon, 2003: 262).....	16
Slika 6: Osnovna struktura flavonoidov (Gordon, 2003: 262)	17
Slika 7: Rastna krivulja <i>Aeropyrum pernix</i>	30
Slika 8: Delež skupnih proteinov v biomasi arhej vrste <i>A. pernix</i>	32
Slika 9: Delež ekstrahiranih proteinov v biomasi in ekstraktu <i>A. pernix</i>	33
Slika 10: Primerjava deleža ekstrakta v suhi snovi z deležem ekstrahiranih proteinov med skupnimi proteini.....	33
Slika 11: Vsebnost prostih –SH skupin v ekstrahiranih proteinih in v skupnem ekstraktu <i>A. pernix</i>	34
Slika 12: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v metanolnem ekstraktu biomase arhej vrste <i>A. pernix</i>	35
Slika 13: Antioksidativna učinkovitost ekstrakta ter delež skupnih fenolnih spojin s sposobnostjo inhibicije prostih radikalov	36
Slika 14: Kromatogrami ekstrakta biomase <i>A. pernix</i> za kultivacijo I, II in III v paralelkah A in B.	39
Slika 15: Antioksidativne značilnosti posameznih kromatografskih vrhov.	40

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Sticklandu

Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradfordu

Priloga C: Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi

Priloga D: Umeritvena krivulja za določanje antioksidativne aktivnosti po DPPH metodi

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BHA	butil hidroksi anisol
BHT	butil hidroksi toluen
BSA	goveji serumski albumin
DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
DTNB	5,5-ditiobis-(2-nitrobenzojska kislina)
F.C.	Folin-Ciocalteu
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
KK	klorogenska kislina
PG	propil galat
SDS	natrijev dodecil sulfat
TBHQ	terc butil hidroksi kinon
TNB	2-nitro-5-tiobenzojska kislina

1 UVOD

Zanimanje za naravne antioksidante se je začelo že pred mnogimi leti, predvsem zaradi njihove sposobnosti, da v živilih zavirajo nastanek nezaželjenih priokusov. Do arome po žarkem pride zaradi oksidativnega kvara maščob, kar pa posledično pomeni tudi nižjo hranilno vrednost ter manjšo varnost takega živila. Slednja je namreč ogrožena zaradi tvorbe sekundarnih, potencialno škodljivih spojin. Dodatek antioksidantov precej pripomore k zaščiti barve in arome ter preprečuje razgradnjo vitaminov. V zadnjih letih pa znanstveniki antioksidante vedno pogosteje omenjajo kot preventivo pred boleznimi, povezanimi z reakcijami prostih radikalov v naših celicah. Uživanje naravnih antioksidantov naj bi tako znatno zmanjšalo možnost za razvoj raka, ateroskleroze, revmatoidnega artritisa, črevesnih obolenj, možganskih motenj, prav tako pa naj bi povečali odpornost organizma (Gordon, 2003).

Zadostno uživanje sadja in zelenjave, čigar zdravilen učinek povezujejo z vsebnostjo različnih antioksidantov, vitamina C, vitamina E, β -karotena in polifenolnih spojin, naj bi v veliki meri zmanjšalo možnost za pojav omenjenih bolezni. Med sintetičnimi vrstami antioksidantov se najbolj pogosto uporabljajo BHA, BHT, PG in TBHQ. Tako zaradi suma, da bi lahko bili nekateri med sintetičnimi toksični, kot tudi zaradi visokih stroškov izdelave ter manjše učinkovitosti nekaterih naravnih antioksidantov, npr. tokoferolov, obstaja veliko zanimanje za odkrivanje alternativnih, naravnih in varnejših antioksidantov, ki bi jih lahko uporabili v živilstvu. Ta veja industrije pa ni edina, ki se sooča s tem problemom. Polifenolom, kot glavnim spojinam z antioksidativno učinkovitostjo, pripisujejo namreč še antikancerogeno, antimutageno in antialergeno delovanje, nemalokrat pa jih strokovnjaki povezujejo tudi z upočasnitvijo staranja (Moure in sod., 2001).

Zamenjava sintetičnih antioksidantov z naravnimi je zaželjena predvsem zaradi vpliva na zdravje, pa tudi same funkcionalnosti, kot je hkratne topnosti v vodi in oljih, saj so živila pogosto emulzije. Uporaba nekaterih naravnih antioksidantov, kot so npr. iz zelišč in začimb, pa je kljub njihovi veliki antioksidativni učinkovitosti omejena, ker pustijo v živilih značilno aromo po zeliščih oz. začimbah in je deodorizacija mnogokrat neizogiben korak. Potrebno pa je preveriti tudi njihovo varnost, saj dejstvo, da so naravnega izvora še ne zagotavlja njihove domnevne neškodljivosti (Moure in sod., 2001).

Poleg antioksidantov ščitijo živ organizem pred oksidativnimi poškodbami še endogeni encimi kot so superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, katalaza in drugi (Madigan in sod., 2003).

Danes vir varnih antioksidantov predstavljajo mnoge rastline. Iz njih so izolirali številne spojine z antioksidativno učinkovitostjo, mnoge med njimi s polifenolno strukturo. Antioksidante pa lahko proizvajajo tudi nekateri mikroorganizmi (Moure in sod., 2001).

Arheje predstavljajo samostojno evlucijsko domeno. Znanstveniki so s proučevanjem zaporedja ribosomalne RNA ugotovili, da imajo vrsto lastnosti, zaradi katerih se temeljito

razlikujejo od preostalega živega sveta. Čeprav so jih na začetku uvrščali med prokariote, so po nekaterih lastnostih sorodnejše evkariontom kot bakterijam (Madigan in sod., 2003).

Hipertermofili so organizmi, ki najbolje rastejo pri temperaturi nad 80 °C (Stetter, 1998). Mnoge fiziološke lastnosti hipertermofilov so odsev njihove zgodnje evolucije, ko so na Zemlji vladale še anaerobne razmere in visoke temperature. Njihova izjemna odpornost na toploto je zanimiva tako za osnovne raziskave kot za razne aplikacije v biotehnologiji (Huber in sod., 2000).

Aeropyrum pernix je vrsta aerobnih hipertermofilnih arhej sferične oblike. Izolirali so jo iz morske vode v priobalnem termalnem »solfataru« vrelcu na otoku Kodakara na Japonskem (Sako in sod., 1996).

V hipotezi diplomske naloge smo predpostavili, da bi arheje vrste *A. pernix* tudi morale vsebovati antioksidante, tako kot jih imajo drugi organizmi. Eksperimentalno delo je zajemalo kultivacijo omenjenega organizma, pripravo metanolnega ekstrakta in njegovo kemijsko analizo.

1.1 NAMEN NALOGE

V okviru diplomskega dela smo želeli v biomasi arhej vrste *Aeropyrum pernix* ugotoviti prisotnost spojin z antioksidativno učinkovitostjo. Živilska industrija si namreč močno prizadeva za odkrivanje novih naravnih virov, s katerimi bi nadomestila sintetične antioksidante, pa tudi nekatere manj učinkovite naravne antioksidante.

Arheje imajo zaradi prilagoditev na življenje v ekstremnih razmerah vrsto specifičnih lastnosti. Antioksidanti iz hipertermofilne arheje, ki optimalno raste pri 92 °C, bi lahko bili zaradi svoje morebitne toplotne stabilnosti za živilsko tehnologijo še posebej zanimivi.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Mnoge spojine, ki so antioksidanti, spadajo med sekundarne metabolite. O teh vrstah spojin v arhejah zaenkrat še ni podatkov. Predvidevamo pa, da jih tako kot druga živa bitja, imajo tudi ti organizmi.

2 PREGLED OBJAV

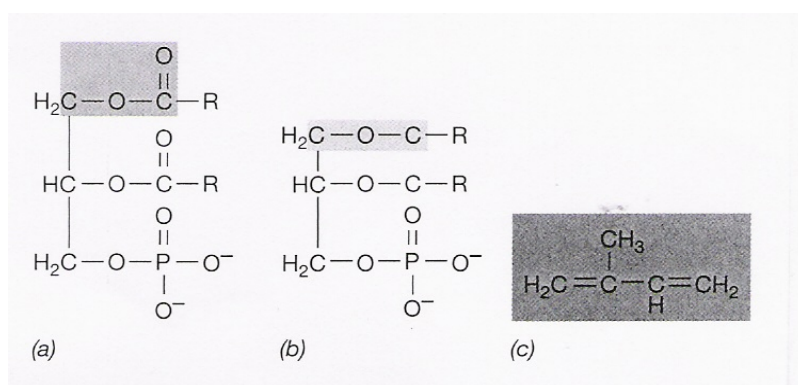
2.1 ARHEJE

2.1.1 Arheje so samostojna domena

Za arheje, podobno kot za prokariote, je značilno, da celice nimajo celičnega jedra ali drugih celičnih organelov. Celice teh organizmov se precej razlikujejo od evkariontskih, praviloma so precej manjše in merijo v premeru 1 do 10 μm . Celične komponente prokariotov so obdane s celično membrano in togo celično steno. Zunanja površina je večkrat prekrita z bički (flageli), ki so izrastki, potrebni za premikanje, in manjšimi izrastki, piliji, preko katerih si prokarioti izmenjujejo DNA med spolnim razmnoževanjem ali pa se z njimi pritrujujejo na razne površine. V notranjosti celice je citoplazma, ki je gelu podobna heterogena suspenzija bioloških molekul, tako manjših molekul kakor tudi topnih encimov, ribosomov in zvite DNA, ki je v jedrni regiji (nukleoidu) (Boyer, 2005).

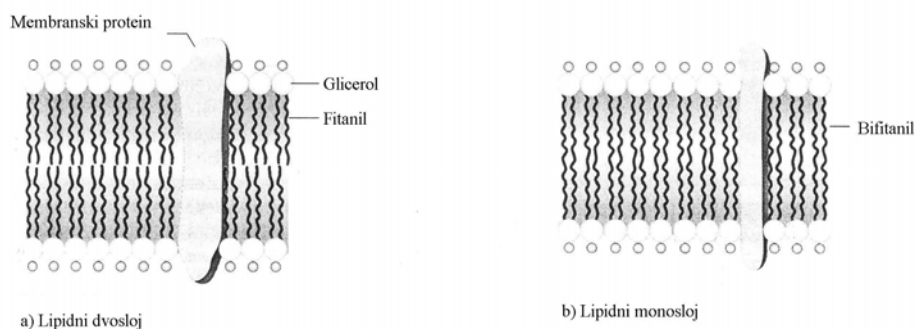
Prokarioti se preprosto prečno delijo, medtem ko se evkariontske celice množijo v sestavljenem procesu mitoze, običajno pa imajo v razmnoževanje vključen še ciklus redukcijske delitve, t.i. mejoze. Genom arhej je na prvi pogled podoben evkariontskemu in je velik od $8,4 \cdot 10^8$ bp do $2,3 \cdot 10^9$ bp. Posebnost arhejskega genoma so proteini, podobni histonom, in strukture, podobne nukleosomom, ki so sicer značilnost evkariontov. V vseh fenotipskih skupinah arhej dopolnjujejo genom plazmidi in tudi bakteriofagni ali virusom podobni elementi (Nekrep, 1996).

Citoplazemska membrana je najznačilnejši strukturni kriterij za razlikovanje. Membrano arhej sestavljajo razvejani ogljikovodiki, značilne so etrske vezi med glicerolom in hidrofobnim delom ogljikovodikov (slika 1), medtem ko v membranah vseh ostalih organizmov najdemo nerazvejane verige maščobnih kislin in etrske vezi (Madigan in sod., 2003).



Slika 1: Kemijske vezi v lipidih. (a) Etrska vez, ki jo najdemo v lipidih bakterij in evkariontov. (b) Etrska vez lipidov arhej. (c) Izoprenoidna struktura, ki tvori hidrofobno stransko verigo (R) arhejskih lipidov. Pri lipidih bakterij in evkariontov so R radikali maščobnih kislin (Madigan in sod., 2003: 68).

Arheje imajo namesto maščobnih kislin namreč na hidrofobni strani vezano izoprenoidno verigo. Glicerolni dieterski lipidi (fitanili) tvorijo prave dvoslojne membrane, medtem ko diglicerolni tetraetrski lipidi (bifitanili) oblikujejo enoslojne membrane, ki so sicer strukturni ekvivalent dvosloja in so hidrofobni konci fitanilne molekule kovalentno povezani (slika 2). Opisana enoslojna struktura je razširjena zlasti med hipertermofilnimi arhejami, saj je kot taka v primerjavi z običajnim lipidnim dvoslojem odpornejša pred denaturacijo pri ekstremnih temperaturah (Madigan in sod., 2003).



Slika 2: Struktura arhejske membrane: (a) lipidni dvosloj (b) lipidni monosloj (Madigan in sod., 2003: 69)

Celična stena je pri bakterijah iz peptidoglikana, pri arhejah pa tega ni, čeprav se lahko barvajo tako po Gramu pozitivno kot po Gramu negativno. Za nekatere evkarionte sta značilna celuloza in hitin, medtem ko je pri arhejah zgradba celične stene zelo raznolika: od psevdopeptidoglikana, do stene iz polisaharidov, proteinov ali glikoproteinov.

Psevdopeptidoglikan tvorijo ponavljajoče enote dveh aminosladkorjev: *N*-acetilglukozamina in *N*-acetitalosaminuronske kisline; namesto slednje je v peptidoglikanu prisotna mureinska kislina. Razlika med strukturama je tudi v vezeh. Za peptidoglikan je značilna β -1,4-glikozidna vez, medtem ko so ogljikovi hidrati psevdopeptidoglikana med seboj povezani z β -1,3-glikozidno vezjo. Zahvaljujoč taki zgradbi so arheje odporne proti lizocimu, ki je sposoben cepiti le β -1,4-vezi. Posebnost peptidoglikana bakterij je še prisotnost D-alanina in D-glutaminske kisline, medtem ko so verige aminosladkorjev, ki tvorijo celične stene arhej, prečno povezane izključno z L-aminokislinami (Madigan in sod., 2003).

Najpogostejša oblika celične stene arhej pa je t.i. sloj S, ki izgleda kot kristal in katerega sestavljajo proteinske ali glikoproteinske podenote običajno v heksagonalni simetriji. Kot posebnost velja omeniti še *Thermoplasma*, obliko arhejske celice brez celične stene, kjer je citoplazemska membrana okrepljena z glikoproteinom, bogatim z manozo. Za membrano je specifična lipopolisaharidna zgradba (Madigan in sod., 2003).

Arheje se od bakterij in evkariontov razlikujejo tudi po kofaktorjih, ki sodelujejo pri metabolizmu. Le-ti vključujejo koencim M (sodeluje pri C_1 metabolizmu), faktor F_{420} (sodeluje pri transportu elektronov), 7-merkaptiheptanoiltreonin fosfat (sodeluje pri

metanogenezi), tetrahidrometanopterin (namesto folata), metanofuran in retinal (Atlas in Bartha, 1998).

V vseh organizmih poteka transkripcija s pomočjo RNA-polimeraze. Celice bakterij vsebujejo eno vrsto omenjenega encima, dokaj enostavne zgradbe iz štirih polipeptidnih enot. Arhejske RNA-polimeraze pa so bolj kompleksne, vsebujejo osem ali več polipeptidov in zato bolj spominjajo na evkariontske, pri katerih glavno RNA-polimerazo (obstajajo trije tipi) sestavlja deset do dvanajst polipeptidov (Madigan in sod., 2003).

Kljub temu, da so ribosomi bakterij in arhej enake velikosti (70 S) ter manjši od evkariontskih (80 S), arheje po sintezi proteinov bolj spominjajo na evkarionte kot na bakterije. Začetni kodon pri bakterijah potrebuje N-formilmetionin, za razliko od arhej in evkariontov, kjer začetna tRNA nosi nemodificiran metionin (Madigan in sod., 2003).

Arheje so posebne tudi zaradi svojega življenjskega okolja, večina jih je namreč ekstremofilov, to je organizmov, ki živijo v ekstremnih razmerah. Mnoge uspevajo pri zelo visoki ali zelo nizki temperaturi, pri visoki koncentraciji soli, pri ekstremnem pH, pri visokem tlaku, ob prisotnosti težkih kovin, ob visoki stopnji sevanja itd. (Nicolaus in sod., 2004). V velikem številu jih lahko najdemo v toplih vrelicah, npr. v nacionalnem parku Yellowstone v ZDA ali na vulkanskih območjih pod morjem in na kopnem. Zaradi sposobnosti, da uspevajo pri izjemno visokih temperaturah (nekateri tudi pri 110 °C), so zelo zanimive za raziskave, saj se zgradba proteinov in DNA večine drugih organizmov poruši že pri temperaturah med 60 °C in 70 °C (Boyer, 2005).

Domeno arhej sestavljajo tri velika kraljestva: *Crenarchaeota* (čeprav so predstavniki predvsem termofili, hkrati v isto skupino spadajo tudi arheje, ki naseljujejo zelo hladna področja), *Euryarchaeota* (predvsem metanogene, ekstremno halofilne arheje in *Thermoplasma*) in kraljestvo *Korarchaeota* (Madigan in sod., 2003).

2.1.2 Osnovne značilnosti hipertermofilov

Hipertermofili najbolje rastejo pri temperaturi med 80 °C in 110 °C, pod 60 °C pa ne več. Najpogostejši biotopi omenjenih organizmov so termalni vreli globoko pod morjem, vulkansko ali geotermalno ogreta tla ali voda, gejzirji, nahajališča nafte itd. Pogosto so to z elementarnim žveplom ali pa s sulfidi bogata anoksična področja, za katere je značilna velika koncentracija natrijevega klorida in rahlo kisel do alkalen pH (5-8). Hkrati pa tudi zelo kislo okolje (pH 3) za hipertermofila ni nobena redkost (Stetter, 1998).

Do leta 2000 je bilo poznanih približno 75 vrst hipertermofilnih arhej in bakterij, ki so jih glede na njihove filogenetske in fiziološke lastnosti razvrstili v 32 rodov in 10 redov; le 2 rodova sta bila bakterijska (Stetter, 1996). Predstavnika bakterij, ki rastejo pri najvišjih temperaturah (med 95 °C in 90 °C) sta *Aquifex pyrophilus* in *Thermotoga*. Med arhejami so organizmi z najvišjo temperaturo rasti (med 103 °C in 110 °C) predstavniki rodov *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus* in *Methanopyrus*. Kulture z vegetativnimi celicami *Pyrolobus* in *Pyrodictium* so sposobne preživeti celo avtoklaviranje (Huber in sod., 2000).

Fiziološko pokrivajo ti organizmi zelo širok spekter, od obligatnih kemolitoavtotrofov do striktnih organotrofov, od aerobov do striktnih anaerobov, od zmernih acidofilov do alkalofilov (Huber in sod., 2000).

Med hipertermofili je poznanih le malo saharolitičnih vrst, zato je še ena nenavadna značilnost njihovega metabolizma ta, da namesto ogljikovih hidratov kot edinega vira ogljika raje izkoriščajo proteine. Tako je večina do danes poznanih hipertermofilov striktno anaerobnih, žveplo reducirajočih, proteolitičnih organizmov. Katabolizem proteinov vključuje delovanje transaminaz in glutamat-dehidrogenaz, skupaj s še nekaterimi neobičajnimi feredoksin-vsebujočimi oksidoreduktazami, ki pa jih pri mezofilih ne najdemo. Razgradnja ogljikovih hidratov do acetata, H₂ in CO₂ poteka po delno ne-fosforilirani Entner-Doudoroffovi poti, redkeje tudi po sicer bolj običajni Embden-Meyerhoffovi poti (Kelly in Adams, 1994).

Znanstvenikom je uspelo določiti že celo vrsto hipertermofilnih encimov, ki so si različni tako po funkciji kot izvoru: α -amilaze, α -glukozidaze, pululanaze, celobiohidrolaze, ksilanaze, galaktozidaze, proteinaze, acetil-CoA-sintetaze in še številne druge (Leuschner in Antranikian, 1995).

2.1.3 Prilagoditve arhej na življenje pri visokih temperaturah

Celica, ki se v svoji neposredni okolici sooči z nenadno spremembo, je podvržena stresu. Povzročitelj, stresni dejavnik, je lahko fizikalni (povišanje temperature) ali kemijski (dvig ali padec pH, sprememba slanosti ali koncentracije kisika) parameter. Ključni dogodek v celici, ki je podvržena stresu, je denaturacija proteinov. Mnogo proteinov izgubi svojo nativno konformacijo, s tem pa tudi svojo funkcijo in teži k agregaciji. Proces je do neke meje reverzibilen, nato pa postane ireverzibilen in takšna celica propade. Del odziva na stres je tudi upočasnjena regulacija sinteze določenih proteinov, delovanje nekaterih genov celo preneha; hkrati pa pride do aktivacije stresnih genov. Kot odgovor na stresni dejavnik, se v celici poveča koncentracija stresnih proteinov, ki naj bi preprečili destruktivne posledice stresa in pomagali pri post-stresni renaturaciji delno poškodovanih proteinov (Macario in sod., 1999).

Za mikroorganizem je poseben izziv vzdrževanje integritete in fluidnosti celične membrane pri različnih temperaturah. Pri visokih temperaturah membrana lahko razpade, pri nizkih pa zmrzne ali se spremeni v gel, kar močno vpliva na njene življenjske funkcije. Temperaturni nivo aktivnega metabolizma redko preseže 30-40 °C celo pri mikroorganizmih, ki so se sposobni zoperstaviti večjim temperaturnim razlikam in ta omejitev je najverjetneje povezana ravno z membransko integriteto in fluidnostjo. Mezofilne bakterije lahko do neke mere prilagodijo sestavo membrane in s tem nekoliko omilijo posledice visokih temperatur. S povišanjem temperature pride v celičnih membranah do podaljšanja maščobnokislinskih verig, stopnja nenasičenosti pa se zmanjša (Atlas in Bartha, 1998). Ker pa ima vsaka prilagoditev svojo mejo, zahteva življenje pri visokih temperaturah drastične spremembe. Tako naj bi pri višjih temperaturah ciklizacija stranskih verig in povečan delež tetraetrskih lipidov omejila gibanje stranskih verig, kar posledično pomeni večjo stabilnost membrane in s tem še manjšo možnost toplotne

denaturacije, zaradi česar je že prej opisana enoslojna membrana značilnost predvsem hipertermofilnih arhej (Cavicchioli in sod., 2000).

Pomemben parameter za ugotavljanje maksimalne temperature rasti je vsekakor tudi permeabilnost membrane. Na splošno velja, da se prepustnost membrane za protone veča z višanjem temperature rasti organizma. Termofili so posebnost, saj je pri njih permeabilnost za protone pri visokih temperaturah že naravno visoka. Drugače je za ione natrija, za katere je prepustnost nižja in narašča s temperaturo (Atlas in Bartha, 1998).

Poleg makromolekul s povečano toplotno stabilnostjo zagotavlja termofilom večjo toleranco do visokih temperatur tudi metabolizem, ki vodi v hitrejšo obnovo toplotno denaturiranih celičnih komponent (Moat in sod., 2002). Encimi so namreč zelo občutljivi na spremembo temperature. Začetna hitrost encimsko kataliziranih reakcij s temperaturo narašča, dokler se encim ne denaturira in zato postane manj aktiven. Za večino encimov je to območje med 50 in 60 °C, hipertermofilni organizmi, ki živijo v vročih vodnih vrelicah ali z vulkanskimi plini ogreti vodi na oceanskem dnu, pa imajo encime, ki so stabilni tudi pri temperaturi nad 80 do 90 °C (Boyer, 2005).

Kot zanimivost naj omenim tudi, da imajo metanogeni in halofili približno toliko ribosomskih proteinov kot evbakterije (54-56 proteinov), medtem ko jih imajo ekstremni termofili in tudi nekatere metanobakterije precej več- preko 60 (Nekrep, 1996).

Večja toplotna stabilnost termofilnih proteinov izhaja iz njihove sposobnosti, da močnejše vežejo določene ione, s čimer pripomorejo k bolj stabilni obliki. Proteini termofilov imajo v primerjavi z homolognimi proteini mezofilov tudi več hidrofobnih aminokislin. Čeprav so makromolekule, ki jih najdemo pri termofilih toplotno obstojnejše, imajo veliko skupnih lastnosti s svojimi mezofilnimi sorodniki. Med takšne skupne značilnosti spadajo podobna molekulska masa, podenote, ki jih sestavljajo, alosteričnimi efektorji, podobna aminokislinska sestava in njihovo osnovno zaporedje (Moat in sod., 2002). Slednje je še posebej zanimivo, če vemo, da so termostabilnost proteinov dolgo povezovali ravno z aminokislinsko sestavo. Vendar se je izkazalo, da je vpliv dipeptidne sestave na termostabilnost proteinov večji od aminokislinske, saj se proteini hipertermofilov v dipeptidni sestavi znatno razlikujejo od proteinov mezofilov (Ding in sod., 2004).

Vse več znanstvenikov je mnenja, da imajo pri toplotni stabilnosti proteinov odločilno vlogo praktično neznatne spremembe v sekundarni in terciarni zgradbi proteinov. Odgovor naj bi se skrival v vodikovih vezeh, povečani hidrofobnosti in močnejših ionskih interakcijah (Bustard in sod., 2000). Zato nekateri povezujejo termostabilnost proteinskih molekul z deležem specifičnih aminokislinskih ostankov, zlasti zaradi že omenjenih interakcij med aromatskimi aminokislinami in močnejšega hidrofobnega vpliva teh aminokislin. V proteinih hipertermofilov je v primerjavi z mezofilnimi tako več nabitih, aromatskih in hidrofobnih ostankov (Ding in sod., 2004). Ti naj bi bili Ile, Val, Tyr, Phe in Glu, medtem ko Asp, Asn in Cys ne kažejo te preference (Hensel, 1993).

Konformacijska stabilnost proteinov je v splošnem odvisna od intramolekulskih interakcij in od okolja. Pogosto se zgodi, da je termostabilnost izoliranih proteinov merjenih *in vitro* nepričakovano majhna, kar namiguje na to, da tem pogojem manjkajo stabilizacijski

faktorji, ki so prisotni *in vivo*. Pri termoadaptaciji naj bi pomembno vlogo igrala tudi K^+ in cDPG (ciklični 2,3-difosfoglicerat) ion, na stabilnost nativnega stanja intracelularnih encimov pri visokih temperaturah pa naj bi vplivala še vrsta drugih specifičnih interakcij z ostalimi sestavinami celice (Hensel, 1993).

Nobeno presenečenje ni, da temperatura vpliva tudi na stabilnost nukleinskih kislin, saj je od nje odvisna količina energije, ki je potrebna za taljenje dvojne vijačnice DNA. Pri neki določeni temperaturi pa je stabilnost dvojne vijačnice odvisna od deleža GC baznih parov in pa zvitosti vijačnice (Cavicchioli in sod., 2000). Večja vsebnost baznih parov gvanina in citozina zviša točko taljenja in poveča stabilnost DNA molekul pri visokih temperaturah. In čeprav ima mnogo termofilov v svoji DNA res relativno visok delež gvanina in citozina, imajo hkrati mnoge hipertermofilne arheje (*Sulfolobus*, *Acidianus*, *Desulfurolobus*, *Methanothermobacter*, *Pyrococcus* in *Staphylothermus*) in termofilne bakterije (*Clostridium* in *Thermotoga*) ta delež majhen (<40 mol % G+C) (Atlas in Bartha, 1998). Nekateri strokovnjaki pa pri termoadaptaciji ne zanemarjajo niti vpliva posttranskripcijsko modificiranih baz in ogljikovih hidratov (Stetter, 1998).

V principu naj bi bila kovalentno povezana dvojna vijačnica krožne DNA prokariontov že sama kot taka stabilnejša od linearne DNA. Posebnost vseh do danes poznanih hipertermofilnih prokariontov pa je edinstven tip DNA-topoizomeraze, imenovana reverzna giraza, ki omogoča pozitivno nadzvitje molekule DNA in tako dodatno pripomore k njeni stabilnosti. Pri večini organizmov je namreč molekula DNA negativno nadzvita. Pri termofilnih arhejah, ne pa tudi pri bakterijah, so našli zelo enostavne histone, ki so sicer značilnost evkariontskega genoma. Le-ti naj bi znatno povišali temperaturo taljenja DNA (Stetter, 1998). Na slednje naj bi vplivala tudi koncentracija soli (Grogan, 1998).

Za hipertermofile so življenjskega pomena tudi stresni proteini. Organizmi, ki so bili podvrženi toplotnemu šoku, so sintezo proteinov, običajnih za normalne pogoje nadomestili s sintezo omejenega števila proteinov toplotnega šoka (HSP). Običajno delimo HSP na osnovi različne molekulske mase v 5 skupin. Zlasti pogosti so HSP60s in HSP70s. Poleg toplotnega šoka njihov nastanek inducirajo tudi kemijska sredstva, ki tudi lahko spremenijo strukturo proteinov. HSP so sposobni prepoznati nezvite proteine. Z njihovo vezavo preprečujejo agregacijo proteinov. Tako pomagajo pri obnovi njihove konformacije, kar proteinom zagotavlja pravilno funkcioniranje. Ker naj bi bili nekateri med HSP v večjih količinah prisotni tudi v celicah v normalnih razmerah, jim pripisujejo vlogo šaperonov (Trent, 1996).

Molekulski šaperoni so skupina proteinov, ki drugim proteinom pomagajo, da se pravilno zvijejo ali pa sodelujejo pri združevanju proteinov v večje proteinske komplekse. Šaperoni imajo vlogo asistenta, sami namreč ne postanejo del nastalega kompleksa. Sodelujejo tudi pri ponovnem zvijanju delno denaturiranih proteinov (Madigan in sod., 2003). Pomembno pa je vedeti, da ni vsak stresni protein šaperon in nasprotno, da ni vsak šaperon tudi stresni protein (Atlas in Bartha, 1998).

Po kratkem temperaturnem šoku tudi arheje razvijejo termotoleranco. Študije so pokazale, da tiste, uvrščene v kraljestvo Euryarcheota (predvsem metanogene ter halofilne arheje) v stresnih razmerah sintetizirajo zelo različne proteine toplotnega šoka, medtem ko je za

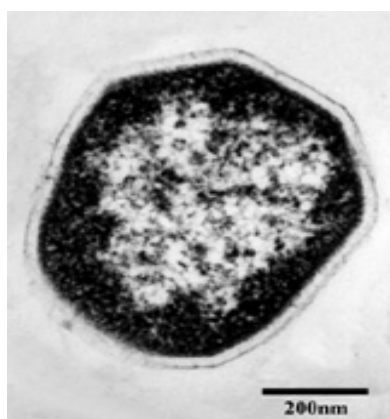
kraljestvo Crenarchaeota (predvsem hipertermofilne arheje) značilno omejeno število le-teh. Poteka sinteza predvsem 60-kDa stresnih proteinov, ki naj bi na prvi pogled tako strukturno kot funkcijsko spominjali na bakterijske šaperone. Nadaljnje raziskave so namreč s sekvenčno analizo pokazale, da so arhejski HSP60 bistveno bolj sorodni družini proteinov, imenovanih TCP1 (T-kompleks polipeptid 1), ki pa niso proteini toplotnega šoka, temveč so značilni za evkarionte. So zlasti v citosolu in imajo vlogo šaperonov za tubulin, aktin in verjetno še kak drug protein (Trent, 1996).

Poleg toplotne stabilnosti je za proteine hipertermofilov pogosto značilna tudi velika odpornost na druge potencialne denaturante: detergente, ureo, organska topila, oksidante itd. (Cowan, 1992).

2.1.4 *Aeropyrum pernix*

Aeropyrum pernix je aerobna hipertermofilna vrsta arhej, ki spada v kraljestvo Crenarchaeota. Celica je sferične oblike in v premeru velika 0,8-1,0 μm . Citoplazemsko membrano obdaja proteinska ovojnica (S-sloj), po Gramu se barva negativno. *Aeropyrum pernix* optimalno raste pri temperaturah od 90 do 95 $^{\circ}\text{C}$, pH 7,0 in 3,5 % slanosti (Sako in sod., 1996).

Generacijski čas omenjene arheje je okrog 200 minut (*Aeropyrum*, 2005). Med aerobno rastjo izkorišča kot substrate različne kompleksne proteinske spojine. Tiosulfat stimulira rast brez tvorbe H_2S (Sako in sod., 1996). Za kultivacijo omenjenega organizma je pomembno tudi, da je v primeru prisotnosti reducirajočih ogljikovih hidratov in triptona rast *A. pernix* močno inhibirana. Pride namreč do tvorbe produktov Maillardove reakcije imenovane tudi neencimsko porjavenje, ki nastopi med reducirajočimi ogljikovimi hidrati (oz. njihovo karbonilno skupino) in aminokislinami (oz. njihovo prosto amino skupino) (Kim in Lee, 2003).



Slika 3: *Aeropyrum pernix* (*Aeropyrum*, 2005)

Vrsta *Aeropyrum pernix* je prva Crenarchaeota in prvi aerobni predstavnik arhej, ki so mu znanstveniki uspeli določiti zaporedje celotnega genoma in kot tak je zelo zanimiv za

laboratorijske raziskave (Faguy in Doolittle, 1999). V zadnjih nekaj letih so pri *A. pernix* odkrili in karakterizirali mnogo zanimivih encimov, kot na primer alkohol-dehidrogenazo, ADP-odvisno DNA-ligazo, ATP-odvisno glukokinazo, proteinaze in druge. Gene za večino teh so tudi uspešno klonirali in izrazili v mezofilnih gostiteljih, največkrat v bakterijah vrste *E. coli* (Milek, 2005).

Z 1,669,695 bp je krožni kromosom arheje vrste *A. pernix* več kot za polovico manjši od genoma bakterij vrste *E. coli*, majhen je tudi napram drugim arhejam. Ko so znanstveniki proučevali metabolične poti, ki *A. pernix* omogočajo aeroben način življenja, so pogrešali gen, ki kodira α -ketoglutarat-dehidrogenazo, ki sodeluje pri Krebsovem ciklu. Namesto tega so našli gene, ki kodirajo dve podenoti feredoksin oksidoreduktaze, z enako funkcijo kot jo ima prej omenjeni encim. Prav tako so našli tudi ostale gene, ki so pomembni za dihalno verigo, vključno s superoksid-dismutazo, ki je prisotna pri vseh aerobnih organizmih (*Aeropyrum*, 2005). Presenetljivo je bilo tudi odkritje, da genomu *A. pernix* manjkajo geni, ki kodirajo homologe histonov; te so našli tako pri evkariontih kot pri predstavnikih kraljestva Euryarchaeotes. Prisotne pa imajo gene za majhne, osnovne, na DNA vezane proteine, ki so primerljivi s tistimi, ki so jih našli pri bakterijah. Nadalje, pri *A. pernix* niso odkrili nobenih genov, ki bi bili homologe genom prokariotske celične delitve *ftsZ* in *minD*. Še več, *Aeropyrum* je bil prvi mikrob z znanim zaporedjem, ki mu je manjkal gen *ftsZ*, ki so ga do takrat našli pri vseh prosto živečih bakterijah in arhejah (Faguy in Doolittle, 1999). Kasneje so ugotovili, da istega gena nima še *Sulfolobus solfataricus*, ki prav tako spada v kraljestvo Crenarchaeota (*Aeropyrum*, 2005).

2.2 ANTIOKSIDANTI

2.2.1 Prosti radikali in oksidativen stres

Prosti radikali ali radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom. So zelo reaktivne kemijske zvrsti, ki lahko poškodujejo celične strukture. So rezultat normalne celične presnove (dihanja) in posledica dejavnikov okolja: UV in žarkov gama, toplote, kajenja, onesnaženega okolja, itd. Tudi nekatere snovi in zdravila (aflatoksin, alkohol, analgetiki, anestetiki...) povzročajo nastajanje prostih radikalov (Korošec, 2000).

Prosti radikali delujejo znotraj ali zunaj celice. Reagirajo z lipidi (peroksidacija maščobnih kislin, spremenjena prepustnost membran), beljakovinami (oksidacija -SH skupin, aktivacija encimov (kolagenaze), inaktivacija encimov (α_1 -antitripsina)) in DNA (cepljenje verige, povečana poraba NAD^+ , motena sinteza ATP). Prosti radikali na kaskadni način tvorijo nove proste radikale, ki dodatno poškodujejo celične strukture (Korošec, 2000).

V normalnih razmerah v celici so prosti radikali v stalnem ravnotežju z antioksidanti, ki jih z različnimi mehanizmi sproti odstranjujejo. Porušeno ravnotežje imenujemo oksidativni stres, ta pa je vpleten v patologijo raka ter ateroskleroze. Pomembno vlogo pa lahko odigra tudi pri nevrodegenerativnih boleznih in procesu staranja (Moure in sod., 2001).

Oksidativni stres je večkrat povezan ali pa vodi v nastanek reaktivnih zvrsti kisika, med katerimi so posebno zanimivi prosti radikali. Kisik je močan oksidant in pri respiraciji izjemen akceptor elektronov. V osnovnem stanju je v obliki kisikovega tripleta ($^3\text{O}_2$). Ena najbolj toksičnih oblik tega elementa pa je singlet kisika ($^1\text{O}_2$), energijsko bogatejša oblika, kjer lahko elektroni zunanje lupine postanejo zelo reaktivni in v notranjosti celice zakrivijo vrsto spontan in nezaželenih oksidacij. Kisikov singlet lahko nastane fotokemijsko, lahko pa tudi biokemijsko ob sodelovanju različnih peroksidaznih encimov. Organizmi, ki se pogosto srečujejo s to obliko kisika, ponavadi vsebujejo pigmente karotenoide, ki pretvarjajo toksično obliko v netoksično (Madigan in sod., 2003).

Najpomembnejši kisikovi prosti radikali so še hiperoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$), hidroperoksidni radikal ($\cdot\text{OOH}$), peroksidni radikal ($\cdot\text{OOR}$) ter vodikov peroksid (H_2O_2) (Korošec, 2000). Hiperoksidni anion je zelo reaktiven in lahko praktično oksidira katerokoli organsko spojino v celici, vključno z makromolekulami. Peroksidi kot je H_2O_2 lahko poškodujejo komponente celice, vendar na splošno niso tako toksični kot hiperoksidni anion ali hidroksilni radikal. Slednji je le prehodne narave, saj je glavni izvor $\cdot\text{OH}$ ionizirajoče sevanje, kateremu pa večina celic ni pogosto izpostavljena (Madigan in sod., 2003).

Organizmi so pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi razvili učinkovit sistem obrambe. Med najbolj znanimi encimi v tej kategoriji je katalaza, ki katalizira razpad vodikovega peroksida; naslednji takšen je peroksidaza, ki se od katalaze razlikuje po tem, da za svoje delovanje potrebuje reducent, običajno NADH, pri čemer kot produkt nastane voda. Hiperoksidni radikal se uniči s pomočjo encima superoksid-dismutaze; ta iz dveh molekul hiperoksida tvori molekulo peroksida in molekulo kisika (Madigan in sod., 2003).

Antioksidanti, ki varujejo telo pred učinki prostih radikalov so torej encimi (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, metioninsulfoksid-reduktaza, DNA popravljalni encimi), vitamini (A, E, C), betakaroteni, bioflavonoidi, katehini ter mikrorudnine kot so selen, cink, baker, mangan. Nekateri antioksidanti telo sintetizira samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (Korošec, 2000).

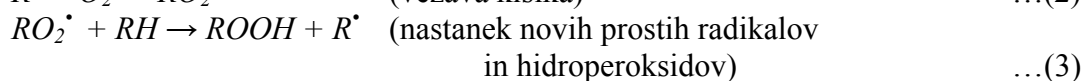
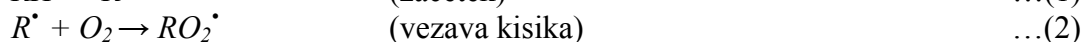
Tudi pri arhejah so znanstveniki proučevali odziv na oksidativni stres. Poskusni mikroorganizem je bila anaerobna hipertermofilna arheja vrste *Pyrococcus horikoshii*. Kultivirali so jo v aerobnih razmerah in ugotovili znatno povečanje prisotnosti specifičnega proteina, čigar nadaljna identifikacija je razkrila, da gre za antioksidativni encim peroksiredoksin (Prx), ki ga pogosto označujejo tudi kot alkilhidroksiperoksidaza. Katalizira tako redukcijo vodikovega peroksida do vode, kot redukcijo alkilnih vodikovih peroksidov do ustreznih alkoholov. Encim je termostabilen, saj ni izgubil svoje aktivnosti niti po 20 minutni inkubaciji na 90 °C (Kawakami in sod., 2004).

Nedavno tega so peroksiredoksin našli tudi pri striktno aerobni hipertermofilni arheji vrste *Aeropyrum pernix*. Zanimivo je bilo odkritje, da je encim del na novo identificiranega tioredoksin/tioredoksin reduktaznega sistema, zato ga navajajo tudi kot tioredoksin peroksidazo. Gen kaže določeno homolognost z Prx iz prej omenjene anaerobne arheje (Kawakami in sod., 2004).

2.2.2 Splošne značilnosti antioksidantov

Antioksidanti preprečujejo oksidativni stres z lovljenjem prostih radikalov, z lovljenjem lipidnih peroksilnih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravitom oksidativno poškodovanih biomolekul (Abram, 2000).

Funkcija antioksidantov je torej, da prestrežejo proste radikale in z njimi reagirajo pred substratom. Antioksidanti lahko pri oksidaciji odigrajo preventivno vlogo na dva načina. Če najprej pogledamo potek avtooksidacije maščob, ki ga prikazujejo naslednje reakcije:



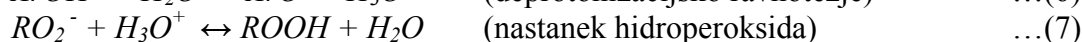
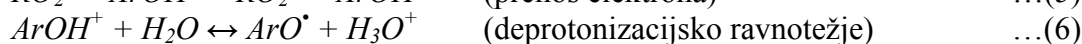
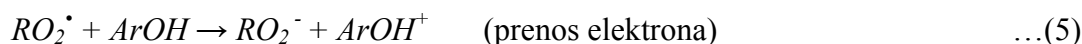
Ko enkrat nastane prosti radikal R^{\bullet} , reakciji 2 in 3 tvorita verižno reakcijo, pri čemer se številne molekule maščobnih kislin (R-H) pretvorijo v lipidne hidroperoksidge ROOH, kar se posledično odrazi v oksidaciji in žarkosti maščob.

Za fenolne antioksidante lahko uporabimo oznako ArOH, ker imajo po definiciji vsaj eno hidroksi skupino vezano na benzenov obroč. Vloga antioksidanta je, da prekine verižno reakcijo, s tem da odda vodikov atom radikal, sam pa preide v bolj stabilen prost radikal:



Za učinkovito delovanje morajo biti ArO^{\bullet} relativno stabilni prosti radikali, da reagirajo počasi s substratom RH, ampak hitro z RO_2^{\bullet} (Wright in sod., 2001). Učinkovitost radikalov je tem večja, čim manjša je jakost vezi A-H. Pri tem nastali fenoksilni radikal ne sme sprožiti novih radikalskih reakcij, niti se hitro oksidirati. Fenolni antioksidanti so dobri donorji vodika ali elektronov, poleg tega so njihovi radikali relativno stabilni zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov okrog aromatskega obroča (Abram, 2000).

Prenos elektronov je drug mehanizem, s katerim lahko antioksidant onesposobi prosti radikal. Najprej nastane kation radikala, čemur sledi hitra in reverzibilna deprotonizacija, kot je prikazano spodaj:



Oba mehanizma, prenos vodikovega atoma in prenos posameznega elektrona, morata vedno nastopiti paralelno, a z različno hitrostjo (Wright in sod., 2001).

Znanstveniki smatrajo, da so najpomembnejši parametri antioksidativne učinkovitosti neke spojine naslednji: konstanta hitrosti razpada in konstanta hitrosti pobiranja radikalov, redoks potencial in pK vrednost fenolnih -OH skupin. Prav tako pa je važna tudi polarnost

in nepolarnost same spojine in iz tega izvirajoča porazdelitev antioksidanta med polarnim in nepolarnim medijem ter kako dobro se določen antioksidant absorbira v organizmu (Abram, 2000).

2.2.3 Viri antioksidantov

Naravni antioksidanti so predvsem fenolne spojine, ki so lahko praktično v vseh delih rastline. V rastlinskem svetu so zelo razširjene, prispevajo zlasti k barvi, okusu in trpkosti sadja. Vsebnost fenolnih spojin lahko varira od 0,5 do 5,0 g na 100 g suhe mase rastlinskega tkiva. Fenolne spojine pogosto smatramo kot sekundarne metabolite rastlinskega metabolizma (Swanson, 2003). Nefenolne spojine, vključno s karotenoidi in fosfolipidi, lahko v določenih razmerah prav tako kažejo antioksidativno učinkovitost (Gordon, 2003).

Med različnimi deli rastlin zaslužijo listi (zeleni ječmen, različne vrbe, avokado, murva) posebno pozornost, antioksidante pa naj bi vsebovale celo korenine, pluta, lubje in brst. Antioksidativen potencial naj bi imelo tudi seme (sezam, lan, sončnice, žitarice) ter strok oz. luščina (kikiriki, ajda, fižol). Pri ekstrakciji olj iz oljnih semen se lahko antioksidativne spojine, ki so prisotne v luščinah, vključijo v olja; ta pojav so proučevali na kikirikiju, kjer je olje, ekstrahirano iz neoluščenih semen kikirikija imelo višjo oksidativno stabilnost v primerjavi z oljem iz oluščenih semen. Zunanje plasti semen namreč običajno vsebujejo večjo količino polifenolnih spojin, kar lahko razložimo s tem, da imajo pri rastlinah funkcijo zaščite (Moure in sod., 2001).

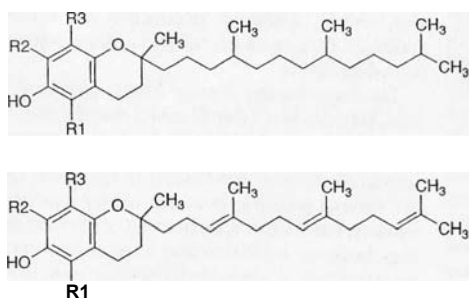
Poceni vir antioksidantov predstavljajo kmetijski in industrijski odpadki (olupki krompirja, tropine oliv, odpadna voda pri stiskanju oliv, jagodne kožice pri stiskanju grozdja, jabolčna pulpa, seme in olupki citrusov, stranski produkti kakava, lupine kozic). Za nekatere ekstrakte naravnih odpadnih materialov se je izkazalo, da je njihova antioksidativna učinkovitost celo primerljiva s sintetičnimi, kar vsekakor ni zanemarljiv podatek. Za izbiro ustreznega surovega materiala je potrebno narediti vrsto raziskav in ravno odpadki so zelo obetajoč vir antioksidantov v prihodnosti, zlasti zaradi nizkih stroškov predelave (Moure in sod., 2001).

Antioksidativen potencial kažejo tudi druge spojine, proteini, proteinski hidrolizati, topni peptidi elastina, vodotopni proteini, s tlakom obdelan β -laktoglobulin. Podobno se je izkazalo tudi za eterična olja, konjugirano linolno kislino in fosfolipide, z antioksidanti so povezovali celo nekatere produkte Maillardove reakcije. Antioksidante lahko proizvajajo tudi nekateri mikroorganizmi (Moure in sod., 2001).

2.2.4 Delitev antioksidantov

Čeprav se v normalnih mejah uživanja naravne antioksidante smatra za varne, ne smemo zanemariti možnosti, da lahko v prevelikih količinah nekateri izmed njih delujejo tudi mutageno in kancerogeno. Nekateri antioksidanti lahko v hrani pustijo barvo, priokus ali nezaželjeno aromo, kar še dodatno zmanjšuje njihovo vsesplošno uporabo (Gordon, 2003).

Vitamin E je generično ime za najmanj osem naravnih spojin, ki kažejo biološko aktivnost α -tokoferola. Poznamo α -, β -, γ -, δ - tokoferole in α -, β -, γ -, δ -tokotrienole (Abdalla, 2003). Tokoferole tvorita hidroksi substituiran aromatski obroč (2-metil-6-kromanol) z nasičeno stransko alifatsko verigo iz 16 ogljikovih atomov na položaju 2. Tokotrienoli se od tokoferolov razlikujejo v stranski alifatski verigi, ki je nenasičena (Butinar in Bučar-Miklavčič, 2000). Alfa-, beta-, gama-, delta-tokoferoli in tokotrienoli se razlikujejo po številu in mestu metilnih skupin na obroču, kot je prikazano na sliki 4.



SPOJINA	R1	R2	R3
α -tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tokoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tokoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tokoferol	H	H	CH ₃
α -tokotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tokotrienol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tokotrienol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tokotrienol	H	H	CH ₃

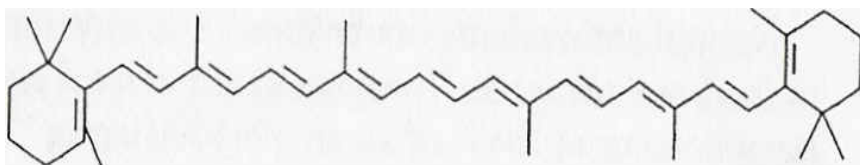
Slika 4: Tokoferoli in tokotrienoli (Gordon, 2003: 286)

Antioksidacijsko učinkovitost jim omogoča sposobnost, da lipidnim prostim radikalom dajo vodikove atome (Abdalla, 2003). Poleg tega, da vitamin E preprečuje oksidativno poškodbo celičnih membran, pomaga tudi pri zaščiti drugih aktivnih komponent (vitamina A, ubikinona, hormonov, encimov...) pred oksidacijo. Vitamin E pospešuje prekrvavitev, izboljšuje mišično storilnost, uravnava delovanje spolnih žlez, stimulira imunski odziv itd. Najbogatejši viri vitamina E so rastlinska olja, sojina moka, koruza, bombažno seme, žitni kalčki, orehi, nekoliko manj ga je v zelenolistni zelenjavi ter ribah in sadju. Biološko (vitaminsko) ter antioksidacijsko delovanje tokoferolov je odvisno od strukture in se spreminja takole:

- o biološko delovanje (aktivnost vitamina E): $\alpha \gg \beta, \gamma, \delta$
- o antioksidacijsko delovanje: $\delta \gg \beta > \gamma > \alpha$ (Belitz, 1999)

V živilu je aktivnost tokoferolov odvisna od njihove koncentracije in prisotnosti težkih kovin, ker lahko z ioni železa in bakra delujejo prooksidativno. Tokoferoli so kot antioksidanti zelo učinkoviti v emulziji, manj pa v oljih. Učinkovitost se še poveča v prisotnosti sinergistov kot sta askorbinska in citronska kislina (Gordon, 2003).

Karotenoidi so pigmenti, ki jih najdemo le pri rastlinah in mikroorganizmih. Tako je njihov vir za človeka in živali zlasti intenzivno rumeno, oranžno in rdeče obarvano sadje in zelenjava. Ločimo dva glavna razreda: karotene in ksantofile (Belitz, 1999). Edinstvene kemijske značilnosti vsakega izmed njih, kot so oblika, velikost, hidrofobnost in polarnost, določajo njihovo sposobnost, da se vgradijo v mikrookolje molekule ter njihovo biološko funkcijo. Za nas sta pomembna predvsem α -karoten in β -karoten, ki sta prekurzorja vitamina A, ter likopen, lutein in β -kriptoksantin (Abdalla, 2003).



Slika 5: β -karoten (Gordon, 2003: 262)

Karotenoidi lahko pri majhnem parcialnem tlaku kisika delujejo kot antioksidanti - lovijo proste radikale ali med fotosintezo odstranjujejo singlet kisika. Epidemiološke študije so pokazale, da je uživanje sadja in zelenjave, ki vsebuje karotenoide, povezano z manjšim tveganjem za številne kronične bolezni, vključno s kardiovaskularnimi boleznimi, katarji in nekaterimi vrstami raka. Preprečujejo tudi fotooksidativne poškodbe (Gordon, 2003: 262).

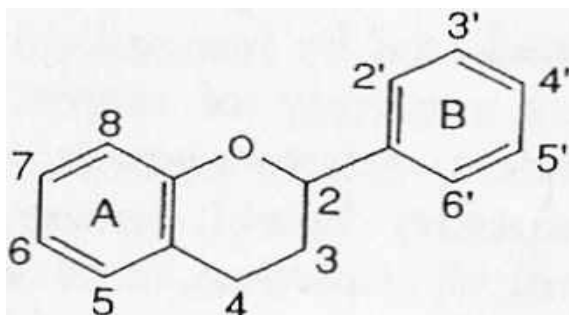
Vitamin C ali L-askorbinska kislina je za človeka esencialna spojina, ki omogoča normalen potek metaboličnih funkcij. Priporočen dnevni vnos je 45-80 mg, dobro je zastopan v svežem sadju, zlasti v citrusih in jagodičevju ter v sveži zelenjavi, predvsem v zelju, krompirju in zeleni papriki (Belitz, 1999). Pomanjkanje vitamina C vodi v skorbut, njegovo uživanje pa pomaga pri celjenju ran in zlomov, ohranja prožnost kože, krepi telesno odpornost in varuje pred stresom (Gordon, 2003). Askorbinska kislina lovi reaktivne zvrsti kisika in dušika, kot so radikali hiperoksida, hidroksila, dušikovega oksida in vodikovega peroksida, singlet kisika, ozon, peroksinitrit, dušikov dioksid itd. Glavni lastnosti, ki askorbinski kislini omogočata, da je močan antioksidant, sta:

- nizek eno-elektronski redukcijski potencial, tako askorbata kot njegovega eno-elektronskega oksidacijskega produkta, askorbilnega radikala, ki obema oblikama omogoča, da reagirajo in reducirajo praktično vse fiziološko pomembne oksidante;
- stabilnost in majhna reaktivnost askorbilnega radikala. (Abdalla, 2003).

Glutation (GSH) je tripeptid, ki ga sestavljajo glutamat, cistein in glicin (Korošec, 2000). S prosto sulfidrilno (-SH) skupino lahko reagira z antioksidanti in tako deluje kot lovilec prostih radikalov. Prisotnost glutaciona kot antioksidanta je ključnega pomena pri detoksifikaciji reaktivnih kisikovih zvrsti, kot tudi pri vzdrževanju reducirane oblike sulfhidrilnih skupin proteinov. Le-te so nujno potrebne za njihovo aktivnost (Grant, 2001).

Polifenoli, imenovani tudi fitokemikalije, so sekundarni metaboliti rastlin. Ime polifenoli vključuje več skupin, vsem spojinam pa je skupna osnovna fenolna struktura (Abdalla, 2003). Flavonoidi predstavljajo najpomembnejšo skupino, identificiranih je že več kot 5000 spojin (Gordon, 2003). So fenolne spojine zgrajene iz 15 C- atomov, osnovno spojino flavon sestavljajo strukture, ki jih označimo s $C_6C_3C_6$. Med flavonoide spadajo spojine, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega C_3 obroča, kot tudi po različnih

substituentah na obročih. V naravi so flavonoidi običajno glikozilirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide, ali pa tudi daljše verige na obroč (Abram, 2000).



Slika 6: Osnovna struktura flavonoidov (Gordon, 2003: 262)

Nesladkorni del molekule imenujemo aglikon; flavonoide ločimo po aglikonu na flavone, flavonole, katehine, flavanone, dihidroflavonole, flavan-3,4-diole, antocianidine, izoflavone, neoflavone, kalkone, dihidrokalkone in avrone. V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. Zaradi svojega grenkega okusa odganjajo parazite in, ker lahko absorbirajo UV svetlobo, delujejo kot zaščita rastline pred UV žarki (Abram, 2000).

Družino spojin, znano kot flavanoli, predstavljajo katehin, epigalokatehin, epikatehin-3-galat in epigalokatehin-3-galat. Strokovnjaki so si enotni, da je obroč B odgovoren za večino antioksidativne aktivnosti. Katehini so v zelenem čaju, najdemo pa jih tudi v grozdju, grozdnem soku, rdečem vinu, aroniji, borovnicah in v bezgovih sadežih. Epigalokatehin galat je ena najaktivnejših spojin v tej družini, mnoge klinične študije pa kažejo na njegove antikancerogene in antiviralne lastnosti (Wright in sod., 2001).

Antocianini, eden izmed najbolj razširjenih skupin med flavonoidi, so najbolj pomembni vodotopni pigmenti v rastlinah. Dajejo modro, rdečo in škrlatno barvo. Med užitnimi rastlinami je jagodičevje zagotovo eden njihovih pomembnejših virov. Z njimi je bogato grozdje, češnje, rozine, ribez, brusnice, pa tudi ostale rastline kot so rdeče zelje, rdeča čebula in jajčna lupina. K dnevni vnosu antocianinov znatno prispevajo tudi njihovi izdelki kot so sokovi, vino, marmelada in razna naravna barvila, ki jih najdemo v živilih. Zaradi njihovega potencialnega učinka na zdravje, izražali naj bi antioksidacijske lastnosti ter pozitivno vplivali na stene arterij, obstaja za njih veliko zanimanje (Kähkönen in sod., 2003). Med bolj poznanimi antocianidini so: pelargonidin, cianidin, delphinidin, peonidin, petunidin in malvidin. V naravi se antocianidini nahajajo v glikozilirani obliki, imenovani antocianini. Sladkorni del običajno predstavlja glukoza, ramnoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza ali fruktoza (Kähkönen in Heinonen, 2003). Barvne različice med antocianini odsevajo njihove strukturne razlike v številu hidroksilnih skupin, prisotnost oziroma odsotnost metilnih skupin, način glikozilacije. Antociani so podvrženi strukturnim spremembam, ki so odvisne od pH in ionske moči vodnega okolja (Swanson, 2003).

Strokovnjaki so proučevali antioksidativno učinkovitost šestih antocianidinov ter njihovih glikozidnih oblik v treh različnih lipidnih okoljih, v človeškem LDL, v emulgiranem olju in čistem metil linoleatu. Zanimala jih je tudi njihova sposobnost lovljenja radikalov, ki so

jo merili s testom DPPH'. Večina antocianinov in njihovih glikozidnih oblik so se v emulziji (voda/olje) in v LDL izkazali kot močni antioksidanti, učinkovitost mnogih je bila celo primerljiva z drugimi znanimi antioksidanti, α -tokoferolom, troloksom, katehinom, galno in klorogensko kislino. Iste spojine pa so imele v samem olju šibko antioksidativno učinkovitost ali pa so celo pospeševale oksidacijo. Na podlagi teh rezultatov predvidevajo, da poleg sposobnosti antocianinov, da dajo vodik in lovijo proste radikale, na njihovo antioksidacijsko učinkovitost vpliva še kopica drugih dejavnikov. V kompleksnejših lipidnih sistemih naj bi tako svoj del prispevali tudi sposobnost vezave ionov kovin, interakcije z emulgatorjem in proteini ter razporeditev antioksidanta med oljno in vodno fazo (Kähkönen in Heinonen, 2003).

Različne oblike glikozilacije so, odvisno od antocianidina, bodisi povečale bodisi zmanjšale antioksidacijsko moč. V emulziji (voda/olje) se pri večini učinkovitost glikozidov in aglikonov ni bistveno razlikovala. V LDL se je na splošno pri aglikonih pokazala višja učinkovitost kot pri glikozidih, kar je bilo ravno nasprotno kot v olju, kjer so bili glikozidi učinkovitejši od aglikonov. Te študije so potrdile, da lahko poleg različnih funkcionalnih skupin na obroču B, na antioksidativno in antiradikalno aktivnost antocianidinov značilno vplivajo tudi različne oblike glikozilacije ter da sta obseg in smer spremembe odvisna od aglikona. Vse skupaj pa je močno odvisno tudi od uporabljene metode (Kähkönen in Heinonen, 2003).

Obstaja tudi vrsta **sintetičnih antioksidantov** kot so: butil hidroksianisol (BHA), butil hidroksitoluen (BHT), propil galat (PG), terc-butilhidrokinon (TBHQ) itd. Ker pa nas zanimajo zgolj naravni antioksidanti, ki bi lahko bili prisotni v arhejah, sintetičnih ne bom podrobneje opisovala.

Druga dobro znana klasifikacija deli antioksidante na

- ◆ primarne antioksidante ali prekinjevalce verižnih reakcij ter na
- ◆ sekundarne antioksidante, ki upočasnjujejo začetek avtooksidacije; zanje je značilno, da zavirajo oksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo;

za nekatere spojine je značilna učinkovitost obojih. Najpogostejši merljivi produkti so konjugirani dieni hidroperoksidov za primarno oksidacijo in hlapne spojine za sekundarno (Moure in sod., 2001).

2.2.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti

Antioksidativno učinkovitost moramo vrednotiti z različnimi testi za različne mehanizme. Za ugotavljanje oksidativnih poškodb so običajno zanimivi naslednji parametri:

- skupna oksidativna poškodba DNA,
- vsebnost antioksidativnih encimov (katalaza, superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza),
- vsebnost antioksidantov z nizko molekulsko maso (flavonoidi, katehini, antocianini, sečna kislina, glutation),
- vsebnost vitaminov (E, C in β -karoten),

- oksidativne poškodbe lipidov (izoprostani, TBARS) in
- poškodbe proteinov (število proteinskih karbonilov in modificiranih tirozinskih ostankov) (Moure in sod., 2001).

Večina kemijskih metod je osnovana na sposobnosti lovljenja različnih prostih radikalov, vendar pa je v oljnih sistemih antioksidativno učinkovitost moč zaznati tudi s pomočjo UV absorpcije in kelatnih agensov. Za določanje sposobnosti lovljenja prostih radikalov se uporabljajo različni izzivalci, kot so hiperoksidni in hidroksilni radikal, radikal dušikovega oksida, alkilperoksilni radikal, ABTS^{•+} radikal (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiozolin-6-sulfonat)), DPPH radikal (α,α -difenil- β -pikril hidrazilni) itd. (Moure in sod., 2001).

Pri merjenju, kako močno nek antioksidant ščiti pred lipidno oksidacijo, se kot substrati uporabljajo čisti triacilgliceroli, rastlinska olja (sončnično, olivno, palmino), ribja olja ali masti, tudi fosfolipidi in lipoproteini ter liposomi in mikrosomi. Ker mnoga živila tvorijo emulzijo, temeljijo raziskave lipidne oksidacije v emulgiranem sistemu na proučevanju stabilnosti ter vpliva vodotopnih substanc vodne faze na antioksidativno učinkovitost. V pozitivni korelaciji z antioksidativnim delovanjem je tudi redoks potencial in hitrost razgradnja antioksidacijske spojine (Moure in sod., 2001).

Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin določa njihova kemijska struktura. Nanjo vpliva tudi vrsta in polarnost topila, ki ga uporabimo za ekstrakcijo, postopek izolacije, čistost izoliranih aktivnih spojin, analizna metoda kot tudi sam substrat, ki ga naj bi antioksidant zaščitil. Ravno ekstrakcija naj bi bila ključni korak pri pridobivanju antioksidantov s spremenljivim donosom. Pri izbiri topila so potrebne primerjalne študije za vsak substrat posebej. Poleg običajne ekstrakcije s topili kot so etanol, metanol, etil acetat, je vredno preizkusiti tudi druge metode, npr. superkrično ekstrakcijo, ker daje dobre rezultate, hkrati pa ohranja značilnosti antioksidantov. Nadalje je zelo pomembna temperatura sušenja in ekstrakcije, kar vpliva na stabilnost spojin zaradi kemijske in encimske degradacije, na izgube zaradi izhlapevanja ali toplotnega razkroja. Nekateri znanstveniki pa so prepričani, da je za aktivnost antioksidanta odločilna lipofilnost molekule ter afiniteta antioksidanta za lipide (Moure in sod., 2001).

Kvaliteta naravnih ekstraktov in njihov antioksidativen potencial sta odvisna od same rastline, geografskega porekla, klimatskih razmer, časa žetve in pogojev skladiščenja, kot tudi od tehnoloških dejavnikov predelave (Moure in sod., 2001).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

Vse uporabljene kemikalije so bile analitsko čiste.

- mikroorganizem: hipertermofilna arheja vrste *Aeropyrum pernix* K1 – JCM 9820 iz japonske zbirke mikroorganizmov (Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japonska)
- acetonitril (Rathburn, Škotska)
- akvarijska sol (Sigma, Nemčija)
- bakrov sulfat pentahidrat; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemčija)
- bidestilirana voda (ddH_2O)
- Bradfordov reagent (Bio-Rad, Nemčija)
- BSA; goveji serumski albumin (Sigma, Nemčija)
- destilirana voda (dH_2O)
- DPPH reagent; 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (Sigma, Nemčija)
- DTNB; 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzojska kislina) (Sigma, Nemčija)
- 96 % etanol; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Merck, Nemčija)
- Folin-Ciocalteujev reagent (Fluka, Švica)
- kalijev hidrogenfosfat; K_2HPO_4 (Merck, Nemčija)
- kalijev dihidrogenfosfat; KH_2PO_4 (Riedel-ole Haën, Nemčija)
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija)
- kvasni ekstrakt (Difco, Becton, Dickinson & Co., Sparks, ZDA)
- ledocetna kislina, CH_3COOH (Merck, Nemčija)
- metanol; CH_3OH (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid; NaOH (Merck, Nemčija)

- natrijev klorid; NaCl (Merck, Nemčija)
- natrijev karbonat, Na₂CO₃ (Merck, Nemčija)
- natrijev tiosulfat pentahidrat; Na₂S₂O₃ x 5H₂O (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- pepton (BBL, Becton, Dickinson, ZDA)
- pirogalol (Sigma, Nemčija)
- 20 mM pufer HEPES, pH 7,0 (Sigma, Nemčija)

3.2 PRIBOR IN OPREMA

- o avtoklav (Sutjeska, Beograd, SČG)
- o avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- o centrifuga BECKMAN J2-HS, rotor JA-14 (Beckman, ZDA)
- o centrifuga EPPENDORF 5415C
- o centrifuga z nihajočim rotorjem model Centric 322 B (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- o centrifugirke
- o centrifugirke 250 ml BECKMAN
- o Eppendorfove epruvete
- o gorilnik
- o grelna plošča (Intos, Hrvaška)
- o kivete
- o kultivacijska posoda
- o laboratorijska steklovina
- o magnetna mešala
- o magnetno mešalo IKA WERKE RCT basic
- o merilni valji

- o mešalnik (Vibromix 104EV, Tehnica Železniki, Slovenija)
- o parafilm
- o pH meter (MA 5705, Iskra, Slovenija)
- o plastične ladjice za tehtanje
- o povratni hladilnik
- o sistem za HPLC (kolona Lihrosorb RP 18, 250 x 4,6 mm (Thermo Hypersil, ZDA));
podrobnejši opis HPLC sistema v poglavju 4.5 Metode dela
- o spektrofotometer (UV-VIS, Hewlett-Packard HP 8453, ZDA)
- o stresalnik
- o sušilnik (Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija)
- o tehnica EXACTA 2200EB (Tehnica Železniki, Slovenija)
- o temperaturno čutilo IKA WERKE ETS-D4 fuzzy
- o termoblok
- o ultrazvočna kopel (Bandelin, Nemčija)
- o vakuumski centrifugalnik UNIVAPO 100H (UniEquip, Nemčija)
- o vodna kopel (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- o žlice za tehtanje in spatula

3.3 GOJENJE *AEROPYRUM PERNIX*

3.3.1 Priprava gojišča

Sestavine za pripravo tekočega gojišča za gojenje *A. pernix* so bile naslednje:

- akvarijska sol 27,2 g
- pepton 4,0 g
- kvasni ekstrakt 0,8 g
- Na₂S₂O₃ x 5H₂O 0,8 g
- pufer HEPES 3,81 g

Zatehtane količine smo raztopili v destilirani vodi in vsebino čaše dobro premešali s pomočjo magnetnega mešala. pH raztopine smo z dodatkom 4 M NaOH uravnali na vrednost 7, volumen pa v merilnem valju z destilirano vodo na 800 ml. 80 ml tako pripravljene raztopine smo prenesli v manjšo erlenmajerico, to je kasneje služilo za slepi vzorec, preostalih 720 ml pa smo prelili v kultivacijsko posodo in jo stekali. Sledilo je avtoklaviranje 20 min na 120 °C ter nato ponovno tehtanje; razliko med masama kultivacijske posode pred in po avtoklaviranju zaradi izhlapevanja pa smo nadomestili z ustrežno količino avtoklavirane destilirane vode. Nato smo gojišču aseptično dodali še 80 ml inokuluma *A. pernix*, za katerega smo uporabili kulturo omenjenih arhej v pozni eksponentni fazi rasti.

3.3.2 Gojenje

Gojenje je potekalo v 1 000 ml kultivacijski posodi na magnetnem mešalniku z grelno ploščo. Mešanje je bilo nastavljeno na 900 min⁻¹, temperatura na 92 °C, ta pa se je uravnavala s pomočjo temperaturnega čutila potopljenega v gojišče. Pretok zraka za prezračevanje je bil približno 0,5 L /min, konstantni volumen brozge pa smo zagotovili s povratnim hladilnikom nameščenim na odprtino za izhod zraka.

Prirast biomase smo spremljali z merjenjem absorbance pri 650 nm v enakomernih časovnih intervalih. Ko je ta dosegla vrednosti, ki so značilne za pozno eksponentno fazo rasti *A. pernix*, smo bioproces ustavili, brozgo ohladili in jo 10 min centrifugirali (centrifuga BECKMAN J2-HS, rotor JA-14) s hitrostjo 10 000 min⁻¹.

3.4 DOLOČANJE SUHE BIOMASE

Določanje suhe biomase je potekalo v dveh paralelkah. 10 ml brozge smo centrifugirali (centrifuga z nihajočim rotorjem model Centric 322 B) 10 min na 4 000 min⁻¹, supernatant smo nato odlili, sedimentu pa dodali še 10 ml brozge iz kultivacijske posode ter vse skupaj ponovno centrifugirali 10 min na 4 000 min⁻¹. Temu je sledilo trikratno spiranje sedimenta z raztopino za izpiranje biomase, da smo odstranili preostanke gojišča.

Raztopino za izpiranje biomase smo pripravili tako, da smo 0,4766 g pufru HEPES raztopili v 60 ml destilirane vode, uravnali pH na 7,0, temu dodali 3 g NaCl ter vse skupaj dopolnili z destilirano vodo do 100 ml.

Spiranje je potekalo tako, da smo na sediment nalili 10 ml omenjene raztopine za izpiranje, dobro premešali, vsebino centrifugirali 10 min na $4\,000\text{ min}^{-1}$, odlili supernatant in postopek še dvakrat ponovili. Sledilo je sušenje sedimenta v steklenih centrifugirkah na 105°C do konstantne mase, približno 2,5 ure.

3.5 EKSTRAKCIJA FENOLNIH SPOJIN

Preostalih 760 ml bioprocesne brozge smo najprej 10 minut centrifugirali na $10\,000\text{ min}^{-1}$, sediment pa je bilo nato potrebno sprati na enak način in z enako raztopino za izpiranje kot smo to storili že pri določanju suhe biomase. Spranemu sedimentu smo dodali 10 ml 50 % metanola, ki smo ga pripravili tako, da smo zmešali enak volumen čistega metanola in destilirane vode. Vsebino smo dobro premešali, nato pa jo postavili v vodno kopel s stresanjem, nastavljeno na 75°C za 2 uri, da je potekala ekstrakcija. Po končani ekstrakciji je sledilo centrifugiranje (centrifuga z nihajočim rotorjem model Centric 322 B) 15 min na $4\,000\text{ min}^{-1}$, po potrebi tudi filtriranje. Bister ekstrakt smo enakomerno (po 1 ml) porazdelili v predhodno stehtane 1,5 ml plastične centrifugirke. Sušenje ekstrakta je potekalo v vakuumskem centrifugalniku do konstantne mase, približno 5 ur. Centrifugirke smo ponovno zatehtali in določili maso suhega ekstrakta.

3.6 KEMIJSKE ANALIZE

Suho biomaso oz. suhe ekstrakte smo najprej raztopili v 1 ml destilirane vode

- za določanje proteinov v skupni biomasii po STICKLANDU
- za določanje proteinov v ekstraktu po BRADFORDU
- za določanje prostih –SH skupin v ekstraktu po ELMANNU, oziroma v 1 ml 50 % metanola
- ◆ za določanje skupnih fenolov po metodi SINGLETON in ROSSI
- ◆ za DPPH test, s katerim smo določali sposobnost lovljenja prostih radikalov

nato pa iz tako pripravljenih vzorcev odpipetirali ustrezne količine, kot so jih narekovale posamezne analize.

3.6.1 Določanje vsebnosti skupnih proteinov v biomasii

Vsebnost skupnih proteinov smo določili z metodo po Sticklandu (1951). Metoda v osnovi temelji na biuretski reakciji. Dodatek NaOH celicam in naknadno segrevanje omogoči razklop celic z izjemo glukanskih komponent celičnih sten, ki se nato odstranijo s centrifugiranjem skupaj z oborino bakrovega hidroksida, ki nastane po dodatku presežka $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$.

Za umeritveno krivuljo (priloga A) smo kot standard uporabili goveji serumski albumin (BSA) s koncentracijo 10 mg/ml. V 2 ml plastične centrifugirke smo odpipetirali od 100-1000 μ l standardne raztopine BSA in dopolnili z destilirano vodo do 1 ml. Standardnim raztopinam različnih koncentracij smo nato dodali 0,5 ml 3 M NaOH in vse skupaj segrevali 5 minut v termobloku pri $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, ohladili v mrzli vodi in nato dodali 0,5 ml 2,5 % (w/v) raztopine $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Po premešanju smo jih pustili 5 min na sobni temperaturi, da se je razvila barva, nato je sledilo centrifugiranje 10 minut pri 4000 min^{-1} (centrifuga z nihajočim rotorjem model Centric 322 B). V supernatantih smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 555 nm. S pomočjo dobljenih meritev in znanih mas standardnih raztopin smo narisali umeritveno krivuljo, iz katere smo kasneje odčitali maso proteinov v 1 ml ekstrakta. Vsako določitev absorbance smo opravili v treh ponovitvah.

Za analizo vzorca smo suho biomaso raztopili v 1 ml destilirane vode, dobro premešali, nato pa po Sticklandovi metodi dodali še preostale reagente in izmerili absorbanco pri 555 nm. Slep vzorec je namesto 1 ml suspenzije arhej vseboval 1 ml destilirane vode.

3.6.2 Določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu

Za določanje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu smo uporabili metodo po Bradfordu (1976). Metoda temelji na vezavi barvila Comassie brilliant modro G-250 na protein. Pri tem se rdeča barva barvila spremeni v modro, s tem pa se spremeni absorpcijski maksimum barvila s 465 na 595 nm. Vezava barvila na protein je zelo hitra (približno 2 minuti) in kompleks protein barvilo je stabilen relativno dolgo (1 ura). K intenziteti barve lahko delno prispevajo močni alkalni pufri, nekoliko večja interferenca je zaradi večjih količin detergentov, kot so: SDS, Triton X-100, komercialni detergent za steklovino. Velik molarni absorpcijski koeficient kompleksa nakazuje veliko občutljivost metode.

Metodo izvajamo v dveh izvedbah: standardna procedura (»standard assay«) za območje koncentracij od 0,1 do 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in mikro procedura (»micro assay«) za koncentracije proteinov od 0,01 do 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Uporabili smo standardno proceduro. Za umeritveno krivuljo (priloga B) smo kot standard uporabili goveji serumski albumin s koncentracijo 2 mg/ml. Odpipetirali smo 100 μ l ustrezno razredčenega BSA in sicer tako, da je masa BSA v kiveti znašala od 20 do 140 μg . Tako pripravljenim standardnim raztopinam smo dodali 5 ml Bradfordovega reagenta (5x razredčen koncentrat z bidestilirano vodo), premešali in po 5 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Iz izmerjenih absorbanc in znanih mas standardnih raztopin smo narisali umeritveno krivuljo, iz katere smo kasneje odčitali maso proteinov v 50 μ l ekstrakta.

Za analizo smo 50 μ l ekstrakta zmešali z 50 μ l dH_2O , v nadaljevanju pa z vzorcem postopali kot pri umeritveni krivulji. Pri slepem vzorcu smo namesto ekstrakta uporabili 100 μ l dH_2O .

3.6.3 Določanje vsebnosti prostih -SH skupin

Za določanje vsebnosti prostih -SH skupin smo modificirali metodo po Ellmanu (1959). Metoda je spektrofotometrična. 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzojska kislina), poznana tudi kot DTNB, reagira z -SH skupino, pri tem nastane 2-nitro-5-tiobenzojska kislina (TNB) oz. anion te kisline, ki ima izrazito rumeno barvo in jo lahko kvantitativno ovrednotimo. Na 1 mol -SH nastane 1 mol aniona. Prednosti te metode so visoka specifičnost za -SH skupine pri nevtralnih pH vrednostih, velik molarni absorpcijski koeficient ($13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pri 412 nm) in kratek reakcijski čas.

K 200 μl ekstrakta smo dodali 400 μl 100 mM fosfatnega pufru (pH = 8) in 10 μl Ellmanovega reagenta. Ellmanov reagent smo pripravili tako, da smo 10,00 mg DTNB raztopili v 2,5 ml 50 mM fosfatnega pufru (pH = 7,0). Nastalo mešanico smo za 5 minut postavili v temo, da se je razvila barva, nato pa smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 412 nm. Pri slepem vzorcu smo namesto vzorca dodali 200 μl 100 mM fosfatnega pufru (pH = 8). Vsebnost reducirajočih spojin oz. prostih -SH skupin smo izrazili v $\mu\text{mol/g}$ ekstrakta. Iz Beer-Lambertovega zakona lahko izrazimo koncentracijo -SH skupin oz. TNB aniona:

$$C_{SH} = C_{TNB}^{-} = A_{412} / \varepsilon * l * R \quad \dots(8)$$

kjer je C - koncentracija izražena v mol/l, A_{412} – absorbanca pri valovni dolžini 412 nm, ε – molarni absorpcijski koeficient = $13\,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, l – dolžina poti žarka (cm) in R – razredčitev.

Vsebnost prostih -SH skupin na maso ekstrakta (n_{SH} / m_E) smo izračunali s pomočjo naslednje relacije:

$$n_{SH} / m_E = C_{SH} * V_T / m_E \quad \dots(9)$$

kjer je V_T – volumen raztopine v kiveti in m_E – masa ekstrakta.

3.6.4 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstraktu

Določitev skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju ob pomoči Folin-Ciocalteujevega (F.C.) reagenta (fosfomolibdenska-fosfovolframova kislina) v modro obarvan kompleks, ki absorbira svetlobo pri 765 nm (Singleton in Rossi, 1965).

Za pripravo umeritvene krivulje (priloga C) smo uporabili standardno raztopino klorogenske kisline. 12,0 mg klorogenske kisline smo raztopili v 6,0 ml 50 % metanola. Ker so bile izmerjene absorbance previsoke glede na pričakovane vrednosti naših vzorcev, smo pripravljeno raztopino klorogenske kisline 10x razredčili, tako da je bila končna koncentracija klorogenske kisline, uporabljene za umeritveno krivuljo 0,2 mg/ml.

V 2,5 ml plastične epruvete smo odpipetirali 5 - 200 μ l standardne raztopine s koncentracijo 0,2 mg klorogenske kisline/ml, dopolnili s 50 % metanolom do končnega volumna 200 μ l, premešali, temu pa dodali 1 ml F.C. reagenta predhodno razredčenega z destilirano vodo v razmerju 1:10 ter nato še 0,8 ml 7,5 % raztopine Na_2CO_3 . Po 30 minutah smo na spektrofotometru izmerili absorbanco pri 765 nm. Vsako meritev smo opravili v treh paralelkah. Iz izmerjenih absorbanc in mase klorogenske kisline v standardnih raztopinah smo narisali umeritveno krivuljo, iz katere smo kasneje odčitali maso skupnih fenolnih spojin v 200 μ l ekstrakta, izraženo kot ekvivalent klorogenske kisline.

Za vzorec smo odpipetirali 200 μ l ekstrakta, v nadaljevanju pa z njim postopali kot pri umeritveni krivulji. Slepi vzorec smo pripravili tako, da smo namesto vzorca vzeli enako količino 50 % metanola.

3.6.5 Določanje antioksidativne učinkovitosti ekstrakta

Antioksidativno učinkovitost smo merili z reagentom 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH^\bullet) (Brand-Williams in sod., 1995). Metoda temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH^\bullet in spojino z antioksidativno učinkovitostjo antioksidanta. Metanolna raztopina radikala, ki ima absorpcijski maksimum pri 515 nm, je vijolično obarvana. Radikal se reducira po naslednji reakciji:



Med reakcijo spremlja redukcijo DPPH^\bullet padec absorbance pri karakteristični valovni dolžini, barva pa se iz vijolične spremeni v svetlo rumeno. Zmanjšanje absorbance je proporcionalno koncentraciji antioksidantov v vzorcu.

Interakcija potencialnega antioksidanta z DPPH^\bullet je odvisna od njegove strukture. Nekatere komponente reagirajo z DPPH^\bullet zelo hitro, vzajemno s številom prostih hidroksilnih skupin zmanjšajo število DPPH^\bullet ; medtem ko je za večino sestavin mehanizem delovanja kompleksnejši (Brand-Williams in sod., 1995).

Pri pripravi umeritvene krivulje (priloga D) smo, podobno kot pri metodi za določanje skupnih fenolnih spojin, kot standardno raztopino uporabili klorogensko kislino s koncentracijo 0,2 mg/ml. Odpipetirali smo 2,950 ml sveže pripravljene 0,1 mM metanolne raztopine DPPH^\bullet in k temu namesto 50 μ l vzorca dodali enako količino standarda in sicer tako, da je bila masa klorogenske kisline v kiveti od 0,5 do 10 μ g. Iz izmerjenih absorbanc, preračunanih kot inhibicija prostih radikalov (%) ter znanih mas standardnih raztopin smo narisali umeritveno krivuljo. Iz te smo lahko odčitali maso antioksidantov v 50 μ l ekstrakta, izraženo kot ekvivalent klorogenske kisline.

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo izrazili kot delež inhibicije (%):

$$\text{Inhibicija (\%)} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100 \quad \dots(12)$$

kjer je A_B – absorbcija slepega vzorca ($t = 0$ min); A_A – absorbcija testirane raztopine ali ekstrakta ($t = 15$ min) (Miliauskas in sod., 2004)

3.7 KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je fizikalno kemijska metoda, ki omogoča ločevanje snovi na osnovi različne porazdelitve spojin med stacionarno in mobilno fazo (Martin-Hernandez in Juarez, 1993).

HPLC ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je ena izmed najpogosteje uporabljenih kromatografskih tehnik. Osnovne komponente HPLC sistema so rezervoar z mobilno fazo, črpalka, injektor, kolona z detektorjem in rekorder za zapis signala. Poznani so različni sistemi detekcije ločenih spojin, npr. UV detekcija, merjenje električne prevodnosti, merjenje refrakcijskega indeksa, fluorescenčna detekcija itd. (Martin-Hernandez in Juarez, 1993).

Pri tovrstni kromatografiji vzorec raztopimo v mobilni fazi in ga nato pod visokim pritiskom, do 400 barov, potiskamo skozi kolono. Kolona je napolnjena z delci stacionarne faze, katerih velikost je manjša od 10 μm (Prošek, 1992). S to tehniko ločujemo snovi na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti in biološke afinitete (Kregar, 1996).

HPLC se zelo hitro razvija in sistem se sproti nadgrajuje. Širok spekter uporabe HPLC omogoča ravno raznolikost kolon in detektorjev, ki so dandanes naprodaj; tehnologija HPLC se uporablja tako za analizo aminokislin, zdravil, pesticidov, rastlinskih in živalskih hormonov, vitaminov, barvil, kot za separacijo kompleksnih zmesi makromolekul kot so proteini, polisaharidi itd. (Martin-Hernandez in Juarez, 1993).

Za potrebe kvalitativne analize primerjamo retencijske čase eluiranih vrhov (t.j. čas zadrževanja neke komponente v koloni in je pri danih pogojih karakterističen za določeno spojino) z retencijskimi časi standardov, za potrditev teh pa se poslužimo masne spektroskopije, IR spektroskopije ali jedrske magnetne resonance. Ožji kot so kromatografski vrhovi, natančneje je bila izvedena separacija (Kregar, 1996).

HPLC je prevladujoča metoda tudi za separacijo antioksidantov kot so fenolne spojine. V zadnjem času se za analizo oksidiranih produktov DNA, proteinov in lipidov ter določanje antioksidantov, ki bi to lahko preprečili, kot eno najprimernejših metod vse pogosteje omenja kombinacijo tekočinske kromatografije in masne spektroskopije. Ta naj bi bila praktično idealna tako za njihovo separacijo kot tudi detekcijo (Shui in Leong, 2005).

Analize vzorcev so bile izvedene na tekočinskem kromatografu, ki je bil opremljen z:

- dvema črpalkama (do 10 ml/min) in dinamično mešalno komoro KNAUER
- injektorjem NIBEST in injekcijsko zanko volumna 20 μl
- kolono Lichrosorb RP 18 z dimenzijami 250 mm x 4,6 mm in velikostjo delcev 10 μm
- spektrofotometričnim UV-VIS detektorjem KNAUER

- programom EUROCHROM 2000 za Windows

Sestava mobilne faze se je tekom analize spreminjala, začetno mobilno fazo pa je predstavljala mešanica 2 % ledocetno kisline in 100 % acetonitrila in sicer v razmerju 80:20. Gradientno izpiranje je potekalo tako, da se je delež acetonitrila v mobilni fazi od 0 do 50 minute povečal z 2 - 20 % ter nato od 50 do 60 minute z 20 - 80 %. Pretok mobilne faze je bil 0,6 ml/min, injekcijski volumen pa 20 μ l.

Suhe ekstrakte smo raztopili v 100 μ l mobilne faze začetne sestave, jih 5 min centrifugirali (centrifuga EPPENDORF 5415C) pri 10 000 min^{-1} ter jih prefiltrirali, nato pa bistro raztopino prenesli na kolono. Detekcija je potekala pri 280 nm.

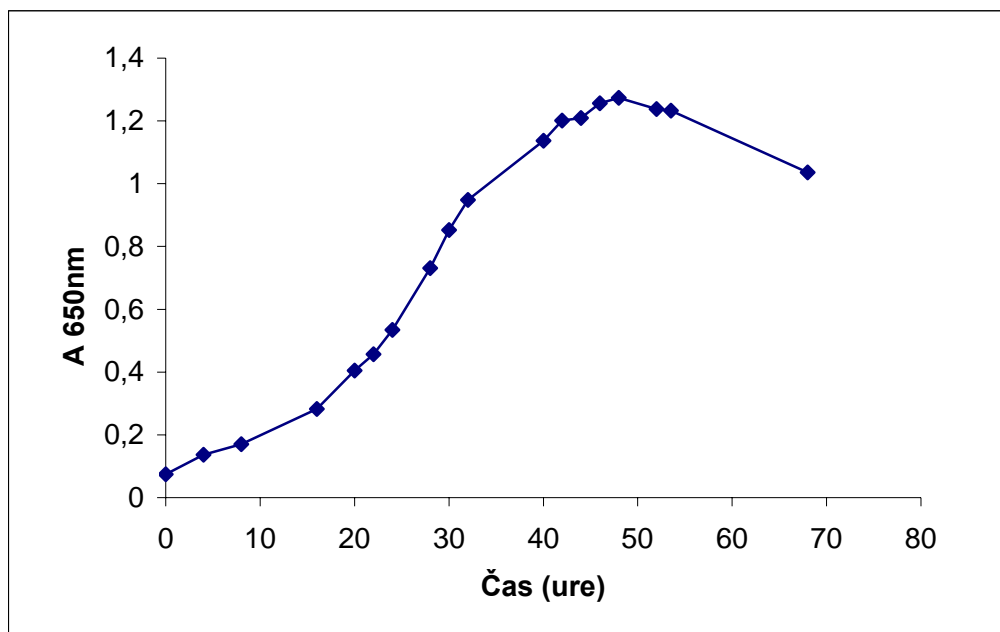
Vzorci smo analizirali v dveh paralelkah. Ko je mobilna faza zapuščala kolono, smo jo zbirali v plastičnih epruveh kot frakcije, ki so vsebovale bolj ali manj ločene komponente zmesi. Elucijski diagram je sestavljalo več med seboj bolj ali manj ločenih vrhov. Koncentracijo potencialnih fenolnih spojin smo določili s primerjavo površin kromatografskih vrhov ekstrakta s površinami vrhov različnih koncentracij standardnih raztopin klorogenske kisline.

Separaciji potencialnih antioksidantov s HPLC je sledilo sušenje epruveh z eluiranimi vrhovi, kjer pa se je moje delo tudi končalo. Za vsakega izmed zbranih kromatografskih vrhov smo še pred sušenjem naredili DPPH[•] test.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 GOJENJE *AEROPIYRUM PERNIX*

Rast hipertermofilne arheje vrste *A. pernix* smo spremljali med aerobnim bioprosesom z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem. Prirast biomase smo opazovali z merjenjem absorbance pri 650 nm v enakomernih časovnih intervalih, ti podatki pa so nam služili za rastno krivuljo, ki je prikazana na sliki 7.



Slika 7: Rastna krivulja *Aeropyrum pernix*

Pri nadaljnjih kultivacijah *A. pernix*, kjer smo biomaso nato ekstrahirali, ekstrakt pa kemijsko analizirali, smo prekinili bioproses že bistveno prej, po približno 38 urah, ko je absorbanca presegla vrednost 1. Na podlagi rastne krivulje smo predvidevali, da je bila pri teh vrednostih absorbance, rast našega mikroorganizma že v pozni eksponentni fazi. Razlog za takšno odločitev se skriva v tem, da antioksidante uvrščamo med sekundarne metabolite. Slednji po definiciji nastajajo proti koncu rasti organizma, pogosto celo blizu oz. že v sami stacionarni fazi rasti (Madigan in sod., 2003). Sekundarni metaboliti niso bistveni za rast in razmnoževanje, njihova vsebnost je zelo odvisna od pogojev rasti, posebno od sestave medija, zato pogosto pride do zmanjšanja. Po drugi strani pa ni redka niti hiperprodukcija teh spojin za razliko od primarnih metabolitov, za katere ta pojav ni značilen (Madigan in sod., 2003).

V okviru mojega diplomskega dela smo proučevali morebitno prisotnost antioksidantov pri arheji *A. pernix*, katere gojitev je potekala v optimalnih razmerah rasti. Vsak dodaten stres bi najverjetneje precej spremenil rezultate.

4.2 DOLOČANJE SUHE BIOMASE

Določanje suhe biomase je potekalo v dveh paralelkah in sicer tako, da smo sprane sedimente sušili 2,5 ure v sušilniku pri 105 °C.

Aeropyrum pernix se ponaša z majhno tvorba biomase, poleg tega pa je rast te arheje v laboratoriju relativno težka (Milek in sod., 2005).

Ob proučevanju optimalnih pogojev za gojenje hipertermofilne arheje vrste *A. pernix*, so ugotovili, da daje najboljše rezultate kultivacija omenjenega mikroorganizma v enostavnem steklenem bioreaktorju na magnetnem mešalniku z grelno ploščo in ob uporabi Marine Broth 2216 kot osnovne sestavine gojišča. Po 40 urah kultivacije je prirast celic znašala 0,45 g suhe mase/l (Milek in sod., 2005). Mi smo namesto Marine Broth 2216 za gojišče uporabili akvarijsko sol in določili rahlo več suhe biomase. V povprečju za vse tri kultivacije je bila po približno 38 urah koncentracija biomase enaka 0,53 g suhe snovi/l. Razlog za to odstopanje je lahko v tem, ker smo mi suho snov določali po drugi metodi. Uporabili smo drugo raztopino za izpiranje centrifugirane biomase ter sprane sedimente sušili manj časa. Po 2,5 urah sušenja na 105 °C se masa naših vzorcev ni več spreminjala. Drugi možni vzrok za odstopanje od literaturnih podatkov je lahko tudi nezadostno izpiranje biomase, zaradi česar nismo odstranili vseh preostankov gojišča. Naslednji razlog za odstopanje od objavljenih rezultatov (Milek in sod., 2005) je možen tudi v samem inokulumu.

4.3 KEMIJSKE ANALIZE

V okviru diplomskega dela smo želeli v metanolnem ekstraktu arhej vrste *A. pernix* ugotoviti morebitno prisotnost spojin z antioksidativno učinkovitostjo in jim poskušali določiti sposobnost lovljenja prostih radikalov. Skupne fenolne spojine smo določali po metodi Singleton in Rossi (1965), izrazili pa kot ekvivalent klorogenske kisline. Ker pa to reakcijo lahko motijo tudi snovi kot so beljakovine, reducirajoči sladkorji in druge reducirajoče spojine (proste -SH skupine), smo naredili še nekaj dodatnih analiz, ki bi nam dale jasnejšo sliko o kemijskih spojinah arhej.

Podatek o vsebnosti beljakovin je pomemben tudi zaradi tega, ker je oksidativen stres povezan z najmanj osemdesetimi proteini, ki se pojavijo med izpostavitvijo organizma hiperoksidnemu anionu. Za pojav približno polovice od njih pa je odgovoren tudi vodikov peroksid. Nadalje, večino aerobnih organizmov pred škodljivimi vplivi reaktivnih kisikovih zvrsti varujejo specifični encimi, zlasti superoksid-dismutaza in katalaza, ki so kemijsko prav tako proteini (Moat in sod., 2002).

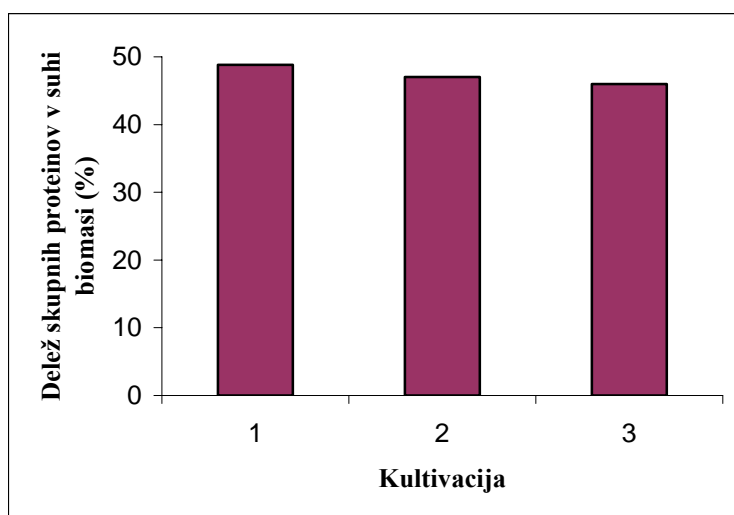
Sulfhidrilne skupine (-SH) so prisotne tako v proteinih kot v peptidih in imajo v celici pomembno vlogo. Redoks stanje cisteinskih ostankov lahko vpliva tako na strukturo kot funkcijo številnih encimov, receptorjev in transkripcijskih faktorjev (Grant, 2001). Cisteinske -SH skupine so ene izmed najlažje oksidiranih aminokislinskih ostankov v proteinih in pomembno vlogo pri vzdrževanju njihove reducirane oblike ima glutation, ki ga

uvrščamo med neencimske antioksidativne obrambne sisteme (Shenton in Grant, 2003). Zaradi slednjega je tudi vsebnost prostih –SH skupin v celici za nas zelo zanimiva.

V preglednici 1 so zbrani rezultati analiz za vse tri kultivacije. Delež metanolnega ekstrakta je v povprečju predstavljal 33 % suhe biomase.

4.3.1 Določanje vsebnosti skupnih proteinov

Skupne proteine smo določili z metodo po Sticklandu (1951). Po dodatku ustreznih reagentov smo izmerili absorbanco pri 555 nm, za vsak vzorec v treh paralelkah. S pomočjo umeritvene krivulje smo za vsako kultivacijo izračunali maso skupnih proteinov in jih izrazili kot delež v suhi snovi vzorca.



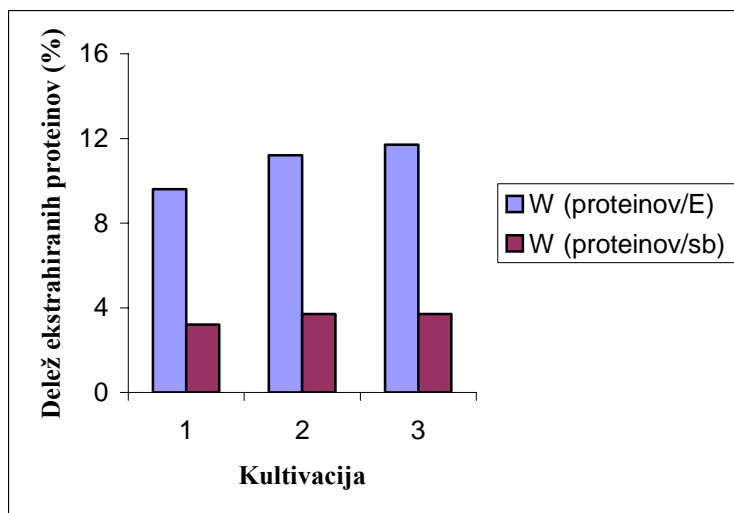
Slika 8: Delež skupnih proteinov v biomasi arhej vrste *A. pernix*

Med paralelkami je prihajalo do minimalnega odstopanja, prav tako se tudi rezultati posameznih kultivacij ne razlikujejo bistveno, kar je prikazano na sliki 8. Razlike med največjim in najmanjšim deležem znašajo 2,8 %.

Delež skupnih proteinov v suhi biomasi arheje vrste *A. pernix* je v povprečju za vse tri kultivacije znašal 47,3 %. Za primerjavo, utežni odstotek proteinov v suhi biomasi kvasovke *S. intermedia* je bil približno 34,5 % (Jamnik, 2002), torej precej manj kot pri *A. pernix* (47,3 %), je pa delež proteinov v suhi kvasni biomasi dosegel omenjeni delež proteinov v arhejah, ko so kvasovko *S. intermedia* za 90 minut izpostavili stresnim pogojem in sicer 50 μ M kromu, kar potrjuje sintezo stresnih proteinov (Jamnik, 2002). Relativno veliko vsebnost proteinov v celicah arhej pa lahko razumemo kot eno izmed prilagoditev hipertermofilov na življenje pri ekstremno visokih temperaturah.

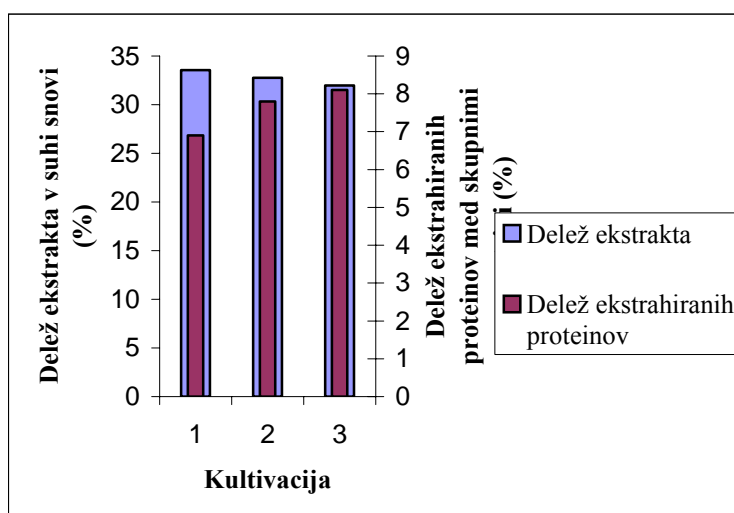
4.3.2 Določanje vsebnosti proteinov v celičnem ekstraktu

Ker smo predvidevali, da smo ekstrahirali z metanolom tudi nekaj proteinov, smo njihovo vsebnost v ekstraktu poskušali določiti z metodo po Bradfordu (1976). Barvilo Comassie brilliant modro G-250 ob vezavi na proteine spremeni barvo iz rdeče v modro. Za vsak vzorec smo po končani reakciji izmerili absorbanco pri 595 nm. S pomočjo umeritvene krivulje smo za vsako kultivacijo izračunali maso ekstrahiranih proteinov in jih izrazili kot delež suhega ekstrakta in kot delež v suhi snovi vzorca (slika 9).



Slika 9: Delež ekstrahiranih proteinov v biomasi in ekstraktu *A. pernix*

Kot je razvidno tudi iz preglednice 1 so med rezultati posameznih kultivacij minimalna odstopanja. Beljakovine ekstrakta so v povprečju za vse tri kultivacije predstavljale 3,5 % suhe biomase oziroma 10,8 % suhega ekstrakta. Slednje je relativno smiselni podatek, če upoštevamo, da ekstrakt predstavlja približno tretjino celotne biomase.

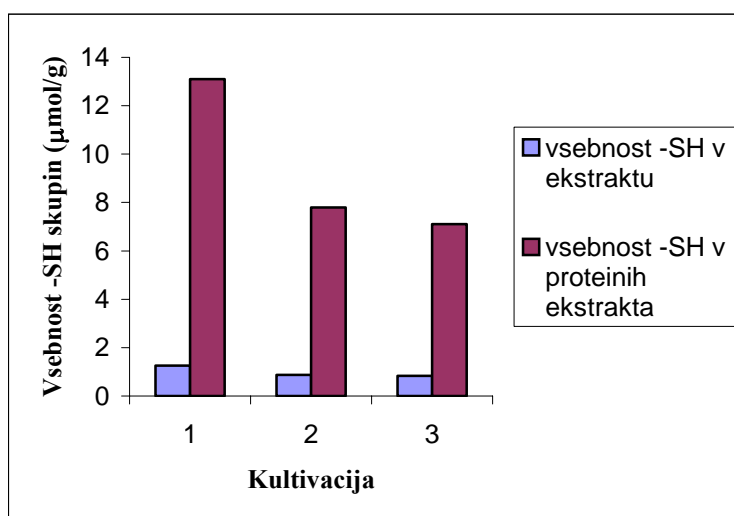


Slika 10: Primerjava deleža ekstrakta v suhi snovi z deležem ekstrahiranih proteinov med skupnimi proteini

Slika 10 prikazuje primerjavo med tem, koliko snovi se je ekstrahiralo iz celotne biomase in koliko proteinov se je ekstrahiralo od vseh proteinov, ki so bili prisotni v biomasi pred ekstrakcijo. Proteine v ekstraktu smo določili z metodo po Bradfordu, skupne proteine pa po Sticklandu. S primerjavo rezultatov obeh metod smo izračunali, da je v povprečju za vse tri kultivacije v ekstraktu (po Bradfordu) le 7,6 % vseh beljakovin (določenih po Sticklandu). Če ponovno izpostavimo delež ekstrakta, ki je v povprečju znašal tretjino biomase, lahko zaključimo, da ekstrakcija proteinov ni bila proporcionalna, večina se jih s 50 % metanolom ni ekstrahirala. Topnost proteinov je namreč raznolika, nanjo vpliva tako število polarnih in nepolarnih skupin kot njihova razporeditev vzdolž molekule. Na splošno so proteini topni samo v močno polarnih topilih kot so voda, glicerol, v manj polarnih topilih kot je etanol, pa je njihova topnost redkokdaj zaznavna (npr. prolamini). Topnost v vodi je odvisna od pH in koncentracije soli (Belitz, 1999).

4.3.3 Določanje vsebnosti prostih –SH skupin

Proste –SH skupine smo določali z metodo po Ellmanu (1959). Po dodatku ustreznih reagentov smo vzorcem izmerili absorbanco pri 412 nm, vsebnost –SH skupin pa izrazili v $\mu\text{mol/g}$ ekstrakta oz. v $\mu\text{mol/g}$ ekstrahiranih proteinov, ki smo jih določili z metodo po Bradfordu (slika 11).



Slika 11: Vsebnost prostih –SH skupin v ekstrahiranih proteinih in v skupnem ekstraktu *A. pernix*

Vsebnost sulfhidrilnih skupin v celici je pomemben indikator oksidativnega stresa. Običajno se redoks stanje –SH skupin določi z vsebnostjo glutaciona, vendar pa so zadnje raziskave pokazale, da so nekatere spojine (cistein, γ -glutamil-cistein in CoA) še občutljivejši parameter redoks stanja. Še več, vsebnost tradicionalnega glutaciona in njegove oksidirane oblike (GSSG) naj bi pogosto ostala nespremenjena celo po dramatičnih spremembah skupnega redoks stanja celice (Patsoukis in Georgiou, 2004).

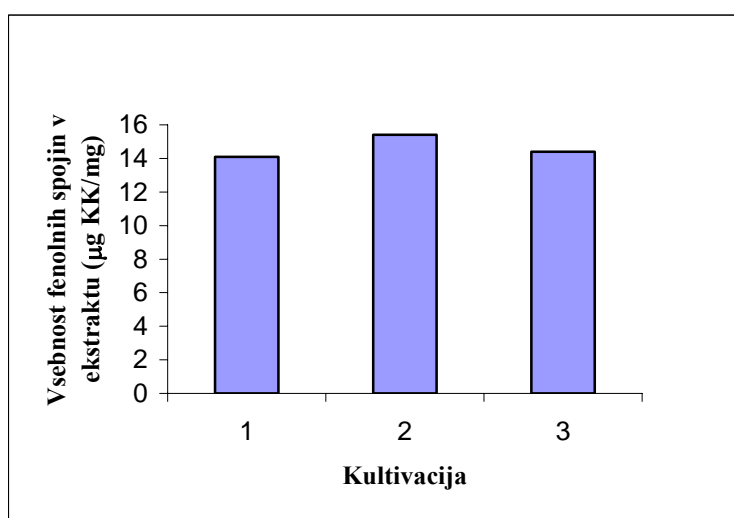
S pomočjo preglednice 1 lahko izračunamo, da je znašala povprečna vrednost za vse tri kultivacije 0,99 μmol prostih -SH skupin/g ekstrakta. Kot je razvidno s slike 11, dobimo

približno desetkrat večje vrednosti, če množino prostih –SH skupin namesto na maso celotnega ekstrakta izrazimo na maso proteinov tega ekstrakta. Ti so v povprečju vsebovali 9,3 μmol prostih -SH skupin/g proteinov ekstrakta.

Za primerjavo, delež glutationa v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* in glivi *Sclerotium rolfsii* je znašal 0,6 $\mu\text{mol/g}$ suhe biomase oziroma 5 $\mu\text{mol/g}$ proteinov (Patsoukis and Georgiou, 2004), kar pomeni, da vsebuje arheja vrste *A. pernix* v primerjavi s prej omenjenima organizmoma dosti več sulfhidrilnih skupin.

4.3.4 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstraktu

Določitev skupnih fenolnih spojin temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju ob pomoči Folin-Ciocalteujevega reagenta v modro obarvan kompleks. Absorbanco vzorcev smo izmerili pri 765 nm, za vsak vzorec v treh paralelkah. Skupne fenolne spojine v metanolnem ekstraktu smo izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline. Rezultati so podani v preglednici 1, prikazani pa so tudi na sliki 12.



Slika 12: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v metanolnem ekstraktu biomase arheje vrste *A. pernix*

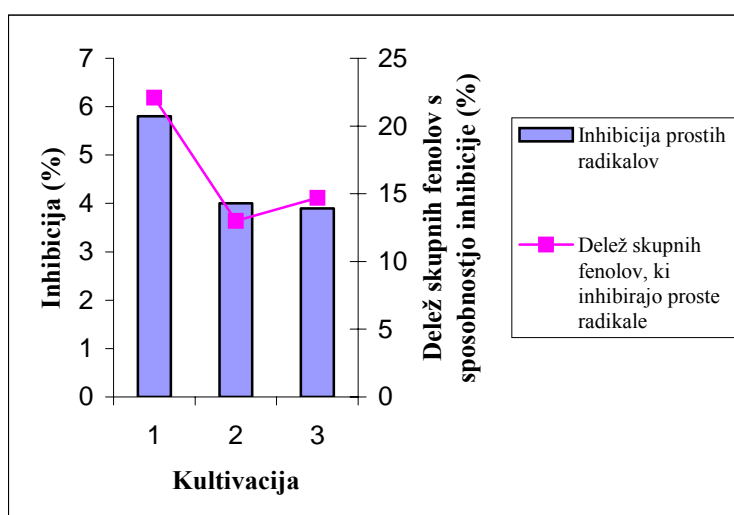
Povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi (1965) je v povprečju za vse tri kultivacije znašala 4,8 mg klorogenske kisline/g suhe biomase oziroma 14,6 μg klorogenske kisline/mg suhega ekstrakta. Vzorci posameznih kultivacij so se med seboj v vsebnosti skupnih fenolnih kislin le minimalno razlikovali, kar prikazuje tudi slika 12.

Za primerjavo, v mladih listih paradižnika je bila ta vrednost približno 4,3 mg klorogenske kisline/g suhe biomase (Donko, 2001), kar pomeni, da arheje vrste *A. pernix* vsebujejo več skupnih fenolnih spojin, če te izrazimo kot ekvivalent klorogenske kisline. Vendar pa skupne fenolne spojine v mladih listih paradižnika presežejo vrednost skupnih fenolnih spojin v biomasi arheje (4,8 mg klorogenske kisline/g suhe biomase) že po prvi uri indukcije z 10 % etanolno raztopino metil jasmonata (Donko, 2001).

4.3.5 Določanje antioksidativne učinkovitost ekstrakta

Antioksidativno učinkovitost metanolnega ekstrakta *A. pernix* smo določali z metodo, ki temelji na reakciji stabilnega radikala 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH[•]) v raztopini metanola z antioksidanti iz vzorca. Redukcijo smo spremljali pri valovni dolžini 515 nm.

Čeprav je opisana metoda hitra, splošno razširjena in uporabna za proučevanje antioksidativne učinkovitosti, nam je žal predstavljala nekaj preglavic, ker je med posameznimi kultivacijami, še zlasti pa med paralelkami prihajalo do odstopanj. Kakšno sposobnost inhibicije prostih radikalov so imeli vzorci posameznih kultivacij, podaja preglednica 1. Končni povprečni rezultati so sledeči: snovi z antioksidativno učinkovitostjo, ki smo jih našli pri arheji vrste *A. pernix* imajo 4,5 % sposobnost inhibicije (sposobnost lovljenja) prostih radikalov. Ta podatek lahko podamo tudi drugače, kot ekvivalent klorogenske kisline, izražen v µg klorogenske kisline/ mg ekstrakta. Tako preračunana vrednost v povprečju znaša 2,4 µg KK/mg ekstrakta. Ker smo na podoben način izrazili tudi delež skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi, lahko s primerjavo ekvivalentov klorogenske kisline izračunamo, da ima sposobnost lovljenja prostih radikalov zgolj 16,6 % skupnih fenolnih spojin določenih s pomočjo F.C. reagenta.



Slika 13: Antioksidativna učinkovitost ekstrakta ter delež skupnih fenolnih spojin s sposobnostjo inhibicije prostih radikalov

Antioksidativna učinkovitost arheje vrste *A. pernix* je glede na naše rezultate relativno majhna, vendar pa moramo opozoriti, da smo suh ekstrakt najprej raztopili v 1 ml 50 % metanola, za analizo po DPPH[•] metodi pa uporabili zgolj 50 µl tako pripravljenega vzorca. Zmanjšanje absorbance pri 515 nm oziroma ustrezen delež inhibicije prostih radikalov, bi tako lahko bil bistveno drugačen, če bi ekstrakt raztopili v manjši količini topila. Tudi primerjava z ostalimi objavami (Miliauskas in sod., 2004) je zaradi različnih predpriprav vzorcev precej otežena. Nujno pa bi morali poskusiti z gojenjem arheje v zanjo stresnih razmerah in bi potem spremljali skupne fenolne spojine in antioksidativno učinkovitost ekstrakta.

Preglednica 1: Nekatere kemijske značilnosti arhej vrste *Aeropyrum pernix* - delež ekstrakta in vsebnost beljakovin v suhi biomasi; vsebnost beljakovin, reducirajočih spojin, skupnih fenolnih spojin v ekstraktu; antioksidativna aktivnost ekstrakta.

	Kultivacija I	Kultivacija II	Kultivacija III
➤ Absorbanca 650nm	1,262 ± 0,002	1,317 ± 0,003	1,243 ± 0,002
➤ Masa suhe snovi [mg]	433 ± 22	404 ± 15	375 ± 4
➤ Masa ekstrakta [mg]	145,50 ± 0,01	132,41 ± 0,01	119,93 ± 0,01
➤ Delež ekstrakta v suhi snovi [%]	33,56 ± 0,01	32,75 ± 0,01	31,97 ± 0,01
➤ STICKLAND W (proteini/sb) [%]	48,8 ± 0,5	47,0 ± 0,6	46,0 ± 0,5
➤ BRADFORD W (proteini/sb) [%] W (proteini/E) [%] W (prot. ekstrakta/skupni prot.) [%]	3,2 ± 0,2 9,6 ± 0,6 6,9 ± 0,5	3,7 ± 0,0 11,2 ± 0,4 7,8 ± 0,3	3,7 ± 0,1 11,7 ± 0,1 8,1 ± 0,1
➤ SINGLETON in ROSSI W (Fs/sb) [μg KK/g sb] W (Fs/E) [μg KK/mg E]	4702 ± 131 14,0 ± 0,4	5058 ± 30 15,4 ± 0,1	4598 ± 41 14,4 ± 0,1
➤ ELLMAN n_{SH}/m_E [μmol/g] n_{SH}/m_{p-Bradford} [μmol/g p_B]	1,26 ± 0,02 13,1 ± 0,2	0,87 ± 0,10 7,8 ± 0,9	0,83 ± 0,01 7,1 ± 0,1
➤ DPPH Inhibicija prostih radikalov (%) W (μg KK/E) [μg KK/mg E] W (k_{ke DPPH} / k_{ke F.C.}) [%]	5,8 ± 1,6 3,1 ± 0,9 22,1 ± 0,1	4,0 ± 0,7 2,0 ± 1,1 13,0 ± 0,1	3,9 ± 0,7 2,1 ± 0,8 14,7 ± 0,1

Legenda:

W–delež,

prot-proteini;

sb-suha biomasa,

E-ekstrakt,

Fs-fenolne spojine;

KK-klorogenska kislina,

n_{SH}/m_E-vsebnost -prostih SH skupin v ekstraktu,

n_{SH}/m_{p-Bradford}-vsebnost prostih -SH skupin v proteinih ekstrakta, določenih po Bradfordu,

kke-ekvivalent klorogenske kisline, določen z metodo DPPH oz. F.C.

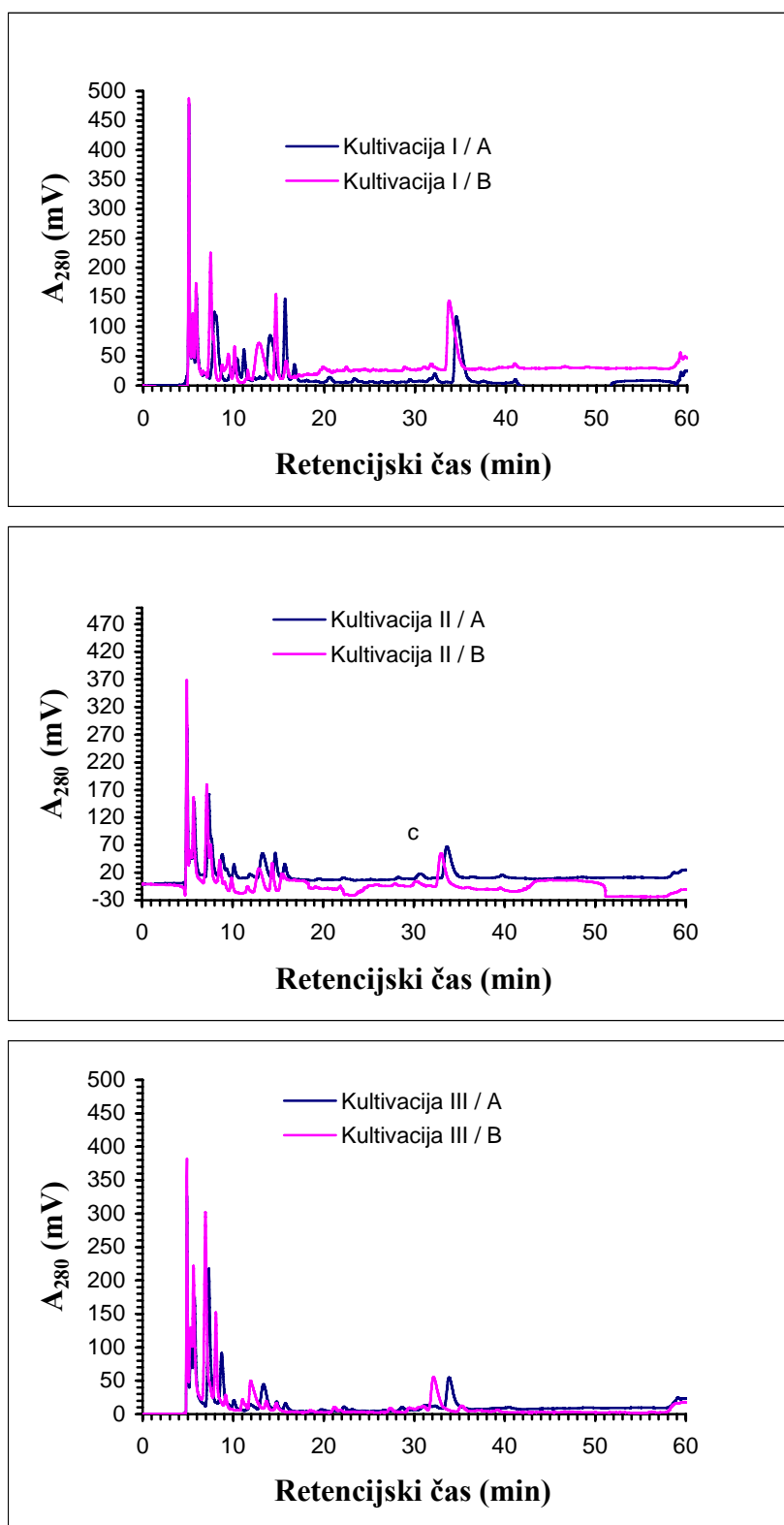
4.4 SEPARACIJA POLIFENOLNIH SPOJIN S HPLC

Suhe metanolne ekstrakte smo raztopili v začetni mobilni fazi in po končani kromatografski ločbi na reverzno fazni koloni smo dobili dokaj lepo ločene ozke kromatografske vrhove (slika 14). Pri vseh treh kultivacijah so se potencialni antioksidanti eluirali približno ob enakih retencijskih časih, kar dokazuje, da gre za ekstrakt istega organizma.

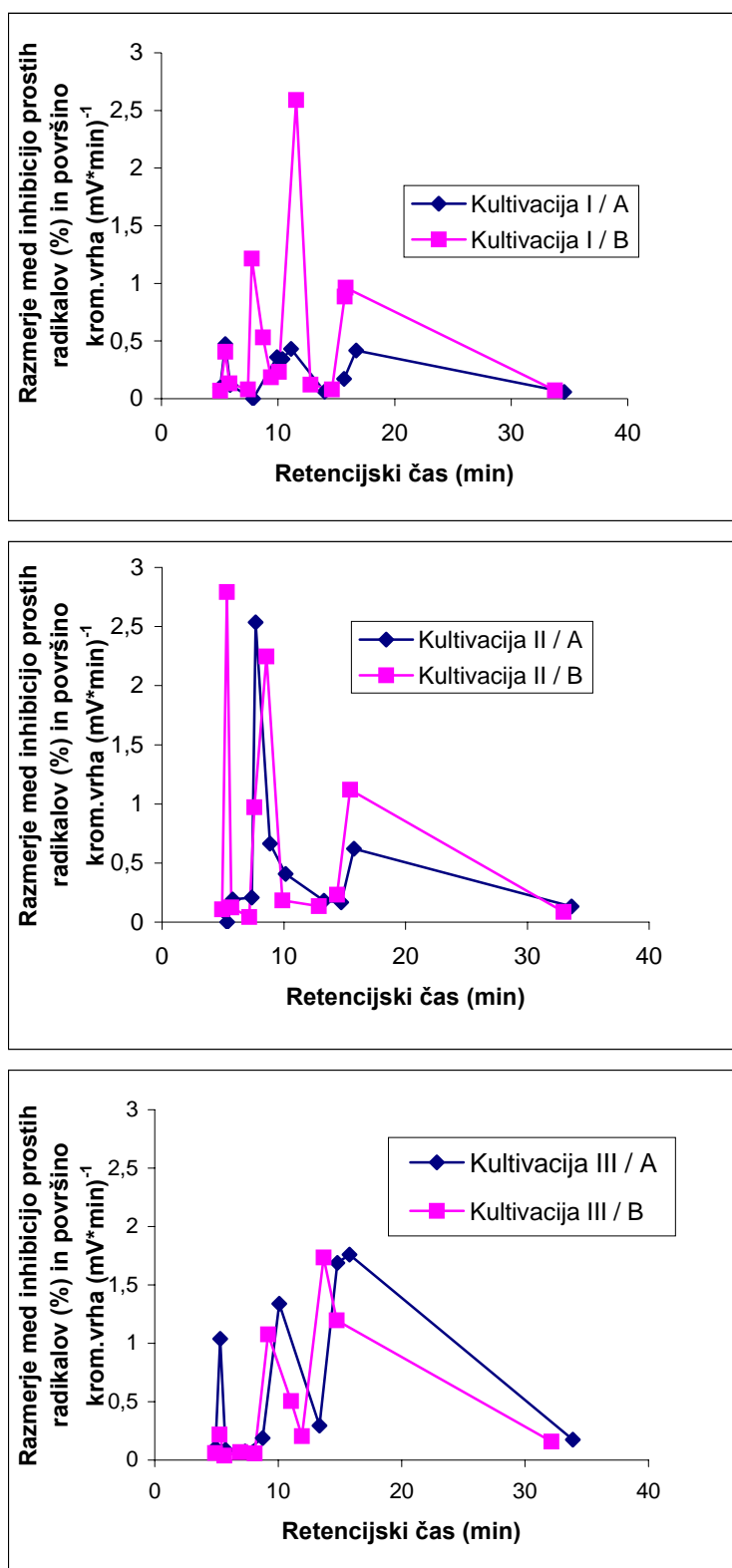
Prirast biomase smo spremljali z merjenjem absorbance pri 650 nm, z gojenjem hipertermofilne arheje pa prenehali po približno 38 urah. Razpon absorbance, ko smo pri posameznih kultivacijah prekinili bioproces (od 1,24 do 1,32) je relativno majhen, zato vpliva različne faze rasti na retencijske čase eluiranih spojin ne moremo komentirati. Predvidevali smo, da je v pozni eksponentni fazi rasti mikroorganizma, produkcija antioksidantov kot sekundarnih metabolitev največja. Rezultati kromatogramov bi bili lahko povsem drugačni, če bi bioproces ustavili bistveno prej ali kasneje. Za vsako fazo rasti je namreč specifična sinteza določenih spojin; tako bi lahko nekateri kromatografski vrhovi manjkali, spet drugi pa bi se v primerjavi z našimi rezultati lahko pojavili na novo.

Tako med paralelkami iste kultivacije, kot tudi med posameznimi kultivacijami je prihajalo do minimalnega odstopanja retencijskih časov, med samo analizo pa tudi do zamika bazne linije, vendar so si kromatogrami kljub vsemu precej slični. Iz vseh treh je razvidno, da so spojine s pričakovano antioksidativno aktivnostjo kolono zapustile zlasti med 4. in 18. minuto separacije na HPLC-ju ter nato okrog 33 minute.

Kromatografski vrhovi se med seboj razlikujejo zlasti po površini (predvsem višini), vendar tudi tukaj ni opaziti bistvenih razlik niti med paralelkami niti med posameznimi kultivacijami. Rahlo izstopa prvi kromatogram, to je analiza vzorca prve kultivacije, pri kateri smo bioproces prekinili pri absorbanci 1,26, kjer so eluirani vrhovi višji oz. temu pripadajoče sorazmerne koncentracije eluiranih snovi večje kot pri kromatogramih ostalih dveh kultivacij. Sicer pa je do minimalnih odstopanj med rezultati za posamezne kultivacije prišlo prav pri vseh analizah. Še enkrat pa moramo poudariti, da smo vsebnost potencialnih antioksidantov ugotavljali tako rekoč v isti fazi rasti pri vseh treh kultivacijah *A. pernix* in so majhna odstopanja med posameznimi kromatogrami tako kot tudi med rezultati preostalih analiz verjetno posledica drugih dejavnikov in ne faze rasti, pri kateri smo prekinili bioproces.

Slika 14: Kromatogrami ekstrakta biomase *A. pernix* za kultivacijo I, II in III v paralelkah A in B.

Pogoji HPLC analize: kolona Lihrosorb RP 18, 250 x 4,6 mm, Thermo Hypersil; mobilna faza: raztopina A: 2 % ledocetna kislina, raztopina B: 100 % acetonitril.



Slika 15: Antioksidativne značilnosti posameznih kromatografskih vrhov, podane kot odvisnost razmerja med sposobnostjo lovljenja prostih radikalov za določen kromatografski vrh (določena z DPPH testom, v procentih) in površina tega vrha (mV*min)⁻¹ od pripadajočih retencijskim časov.

Na sliki 15 so prikazane antioksidativne značilnosti posameznih eluiranih vrhov, pri čemer smo vsakemu izmed njih določili sposobnost lovljenja prostih radikalov s pomočjo DPPH testa in to vrednost (v %) delili s površino kromatografskega vrha (v $mV \cdot min$). Za lažjo primerjavo med vzorci smo potem to razmerje nanašali na ordinatno os, na abscisno pa retencijske čase. Ti podatki nam približno povedo kakšen antioksidativen potencial se skriva v neki spojini, ki je ob določenem času zapustila kolono. Večja kot je vrednost odvisne spremenljivke, boljše je razmerje med sposobnostjo inhibicije prostih radikalov in površino kromatografskega vrha ali povedano drugače, neka spojina kaže že v majhni koncentraciji velik antioksidativen potencial.

Po tej teoriji bi bilo glede na naše rezultate vredno podrobneje raziskati predvsem polifenolne spojine, ki so se eluirale okrog 5., 8., 11. in 15. minute, točen čas je odvisen od analiziranega vzorca. Čeprav so tako med posameznimi kultivacijami kot tudi med paralelkami znotraj ekstrakta z isto absorbanco vidna večja odstopanja, je na vseh treh grafikoni (slika 15) opazen podoben trend gibanja.

Za nadaljne zaključke bi bilo vsekakor potrebnih mnogo več analiz. Najprej bi morali vsebnost spojin z antioksidativno učinkovitostjo določiti v različnih fazah rasti *A. pernix* in ugotoviti kje je njihova tvorba dejansko največja. Omenjeno arhejo bi lahko izpostavili različnim stresnim pogojem in nato opazovali vsebnost antioksidantov. Nadalje, fenolne spojine bi iz biomase lahko poskušali ekstrahirati še z drugimi topili ali pod drugačnimi pogoji. Prav tako bi antioksidante lahko poskušali določiti še s kakšno drugo metodo. Vsekakor so antioksidanti arhej področje, ki smo ga komaj začeli raziskovati in ki zahteva še precej dela.

5 SKLEPI

- Arheje vsebujejo snovi z antioksidativno učinkovitostjo.
- Koncentracija skupnih fenolnih spojin, prisotnih v metanolnem ekstraktu arhej vrste *Aeropyrum pernix* je primerljiva z vsebnostjo teh spojin pri nekaterih rastlinah, če le-te izrazimo kot ekvivalent klorogenske kisline.
- Polifenolne spojine iz ekstrakta arhej vrste *A. pernix* izražajo relativno majhno sposobnost lovljenja prostih radikalov. Nadalje, le slaba petina skupnih fenolov ekstrakta lahko inhibira proste radikale, če oboje podamo kot ekvivalent klorogenske kisline.
- Delež proteinov v suhi biomasi arhej vrste *A. pernix* je večji kot pri nekaterih kvasovkah, kar je verjetno posledica življenja pri ekstremno visokih temperaturah, ki zahteva posebne prilagoditve, med drugim sintezo specifičnih proteinov.
- Biomasa arhej vrste *A. pernix* vsebuje več prostih -SH skupin, kot jih je prisotnih v celicah nekaterih gliv in kvasovk.
- Večina polifenolnih spojin, prisotnih v metanolnem ekstraktu *A. pernix*, se eluira s kolone sistema za HPLC v prvih dvajsetih minutah separacije; med njimi je tudi nekaj takšnih, ki že v manjših koncentracijah izražajo določen antioksidativen potencial.

6 POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo želeli v biomasi arhej ugotoviti morebitno prisotnost spojin z antioksidativno učinkovitostjo. Testni mikroorganizem je bila hipertermofilna arheja vrste *Aeropyrum pernix*, z optimalno temperaturo rasti pri 92°C. Ker so med antioksidanti polifenolne spojine še posebej razširjene, smo v metanolnem ekstraktu arhej najprej določili njihovo skupno vsebnost, spojinam ekstrakta pa določili tudi antioksidativno učinkovitost.

Rast hipertermofilne arheje vrste *A. pernix* smo spremljali med aerobnim bioprosesom z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem. Prirast biomase smo opazovali z merjenjem absorbance pri 650 nm v enakomernih časovnih intervalih, gojenje pa prekinili, ko je omenjeni mikroorganizem prešel v pozno stacionarno fazo rasti. Sledilo je centrifugiranje bioprosesne brozge ter spiranje sedimenta, da smo odstranili preostanke gojišča. Temu je sledila dveurna ekstrakcija polifenolnih spojin s pomočjo 50 % metanola pri 75 °C, centrifugiranje ter sušenje bistrega ekstrakta.

V nadaljevanju smo v vodi raztopljeni suhi biomasi arhej vrste *A. pernix* določali vsebnost skupnih proteinov (po Sticklandu), zanimala nas je tudi vsebnost beljakovin v ekstraktu (po Bradfordu) in vsebnost prostih -SH skupin (po Ellmanu). Za določanje že omenjenih skupnih fenolov (po metodi Singleton in Rossi) ter za ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti prisotnih spojin s pomočjo DPPH* testa smo posušene ekstrakte namesto v vodi raztopili v 50 % metanolu.

Ekstrakte smo nato analizirali še s pomočjo HPLC.

V okviru mojega diplomskega dela smo ugotovili, da arheje vsebujejo snovi z antioksidativno učinkovitostjo ter da je delež skupnih fenolnih spojin v njihovem ekstraktu primerljiv z deležem polifenolov v nekaterih rastlinah. Antioksidativna učinkovitost prisotnih spojin, ki smo jo izrazili kot sposobnost lovljenja prostih radikalov (v procentih), se je izkazala za dokaj nizko. Tudi, ko smo slednje izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline, se je pokazalo, da lahko zgolj slaba petina vseh polifenolnih spojin inhibira proste radikale.

V biomasi arhej vrste *A. pernix* smo določili tudi višjo vsebnost beljakovin ter celo večji delež prostih -SH skupin, kot jih najdemo pri nekaterih kvasovkah in glivah.

Separacija polifenolnih spojin s pomočjo sistema HPLC je bila uspešna, saj so kromatogram analiziranega ekstrakta *A. pernix* sestavljali med seboj bolj ali manj lepo ločeni, ozki vrhovi. Večina spojin s potencialno antioksidativno učinkovitostjo se je eluirala s kolone v prvih dvajsetih minutah analize, med njimi tudi nekaj takšnih, ki so že v majhni koncentraciji kazale relativno velik antioksidativen potencial.

7 VIRI

- Abdalla D.S.P. 2003. Antioxidant status. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 3. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 1654-1663.
- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32.
- Aeropyrum*. 2005. Gambier, Kenyon College (4. avg. 2005)
http://biology.kenyon.edu/Microbial_Biorealm/archaea/aeropyrum/aeropyrum.html (17. mar. 2006): 1 str.
- Atlas R.M., Bartha R. 1998. Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th ed. Menlo Park, Benjamin Cummings Publishing Company: 27-59, 281-332.
- Belitz H.D., Grosch W. 1999. Food chemistry. 2nd ed. Berlin, Springer: 60-61, 206-210, 222-230, 764-777.
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 5-28.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology, 28: 25-30.
- Bustard M.T., Burgess J.G., Meeyoo V., Wright P.C. 2000. Novel opportunities for marine hyperthermophiles in emerging biotechnology and engineering industries. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 75: 1095-1109.
- Butinar B., Bučar-Miklavčič H. 2000. Tokoferoli in polifenoli v oljčnem olju. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77-92.
- Cavicchioli R., Thomas T., Curmi P.M.P. 2000. Cold stress response in Archaea. Extremophiles, 4: 321-331.
- Cowan D.A. 1992. Biotechnology of the Archaea. Tibtech, 10: 315-323
- Ding Y., Cai Y., Zhang G., Wenbo X. 2004. The influence of dipeptide composition on protein thermostability. FEBS Letters, 569: 284-288.

- Donko M. 2001. Indukcija oksidoreduktaz v listih paradižnika z metil jasmonatom. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 71-71.
- Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82: 70-77.
- Faguy D.M., Doolittle W.F. 1999. Lessons from the *Aeropyrum pernix* genome. *Current Biology*, 9: 883-886.
- Gordon M.H. 2003. Antioxidants. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol.1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 261-289.
- Grant C.M. 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin system in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology*, 39, 3: 533-541.
- Grogan D.W. 1998. Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. *Molecular Microbiology*, 28, 6: 1043-1049.
- Hensel R. 1993. Proteins of extreme thermophiles. V: *The biochemistry of archaea (archaeobacteria)*. Kates M., Kushner D.J., Matheson A.T. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 209-223
- Huber R., Huber H., Stetter K.O. 2000. Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 615-623.
- Jamnik P. 2002. Odziv kvasovke *Candida intermedia* na Cr (IV) kot stresni dejavnik. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 88-89, priloga H2.
- Kähkönen M.P., Heinämäki J., Ollilainen V., Heinonen M. 2003. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1403-1411.
- Kähkönen M.P., Heinonen M. 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51: 628-633.
- Kawakami R., Sakuraba H., Kamohara S., Goda S., Kawarabayasi Y., Ohshima T. 2004. Oxidative stress response in an anaerobic hyperthermophilic archaeon: presence of functional peroxiredoxin in *Pyrococcus horikoshii*. *Journal of Biochemical Society*, 136, 4: 541-547.
- Kelly R.M., Adams A.W.W. 1994. Metabolism in hiperthermophilic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 247-270.

- Kim W.K., Lee S.B. 2003. Inhibitory effect of Maillard reaction products on growth of the aerobic marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7: 4325-4328.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-22.
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632
- Leuschner C., Antranikian G. 1995. Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11: 95-114.
- Macario A.J.L., Lange M., Ahring B.K. De Macario E.C. 1999. Stress genes and proteins in the archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 4: 923-967.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. New York, Prentice Hall:1019 str.
- Martin-Hernandez M.C., Juarez M. 1993. Chromatography. V: *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. Vol.2. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 954-972
- Milek I. 2005. Termična inaktivacija in biokemična karakterizacija biološko aktivnih substanc hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 18-19.
- Milek I., Cigić B., Skrt M., Kaletunc G., Ulrih Poklar N. 2005. Optimization of growth for hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* on a small-batch-scale. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 9: 805-809.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237
- Moat A.G., Foster J.W., Spector M.P. 2002. *Microbial physiology*. 4th ed. New York, Wiley-Liss: 582-612.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez M., Sineiro J., Dominguez H., Nuñez J., Parajo J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.
- Nekrep F.V. 1996. Bakterije in arheje. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 15-50

- Nicolaus B., Moriello Schiano V., Lama L., Poli A., Gambacorta A. 2004. Polysaccharides from extremophilic microorganisms. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 34: 159-169.
- Patsoukis N., Georgiou C.D. 2004. Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378: 1783-1792.
- Prošek M. 1992. Kromatografske metode v biotehnologiji. V: *Biotehnologija*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 341-354.
- Sako Y., Nomura N., Uchida A., Ishida Y., Morii H., Koga Y., Hoaki T., Maruyama T. 1996. *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp.nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 degrees C. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 1070-1077.
- Shenton D., Grant C.M. 2003. Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 374: 513-519.
- Shui G., Leong L.P. 2005. Screening and identification of antioxidants in biological samples using High-Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry and its application on *Salacca edulis* Reinw. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53: 880-886.
- Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 3: 144-158.
- Stetter K.O. 1996. Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 18: 149-158.
- Stetter K.O. 1998. Hyperthermophiles: isolation, classification, and properties. V: *Extremophiles*. Horikoshi K., Grant W.D. (eds.). New York, Wiley-Liss:1-24
- Stickland L. 1951. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *Journal of General Microbiology*, 5: 698-700.
- Swanson B.G. 2003. Tannins and polyphenols. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 9. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: Elsevier Science: 5729-5733.
- Trent J.D. 1996. A review of acquired thermotolerance, heat-shock proteins, and molecular chaperones in archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 18: 249-258.
- Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123: 1173-1183.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Veroniki Abram za vse strokovne nasvete in kritičen pregled diplomske naloge.

Za ves trud, vzpodbudo in pomoč pri izdelavi svojega diplomskega dela se še posebej zahvaljujem asis. dr. Mihaeli Skrt.

Za pregled naloge se zahvaljujem tudi somentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich in recenzentki doc.dr. Barbari Jeršek.

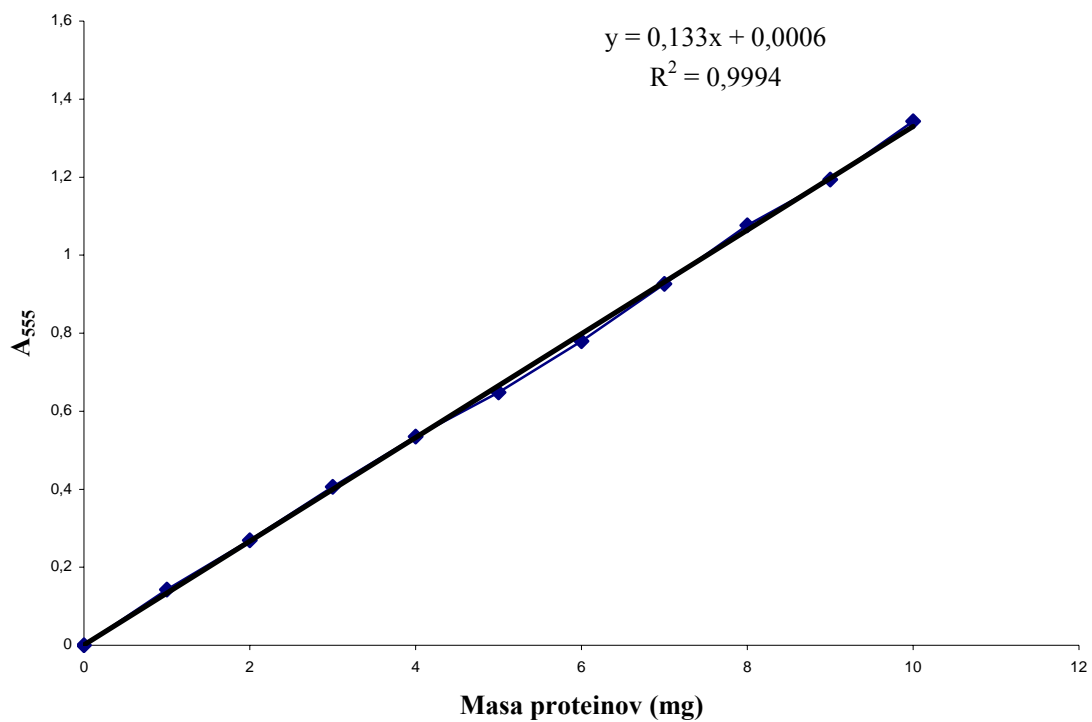
Hvala tudi preostalim zaposlenim na Katedri za kemijo, ki ste mi kakorkoli priskočili na pomoč pri delu v laboratoriju.

Iskreno hvala mojima staršema za vsestransko podporo med študijem.

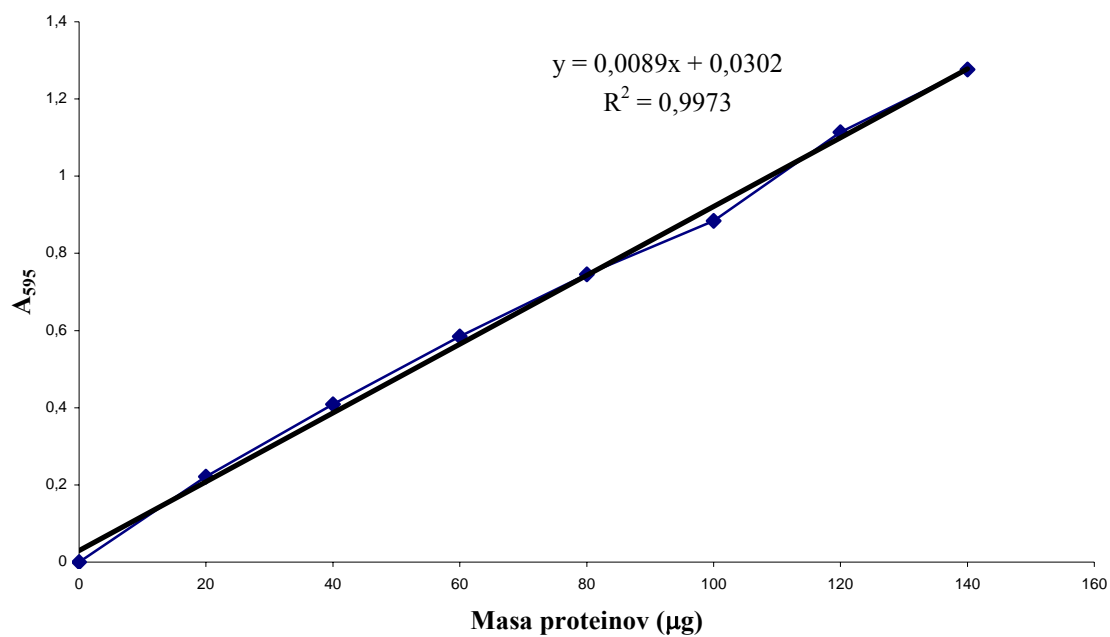
Nenazadnje pa hvala tudi Mirotu in vsem dobrim prijateljem za vso potrpežljivost in nepozabna študentska leta.

Hvala vsem!

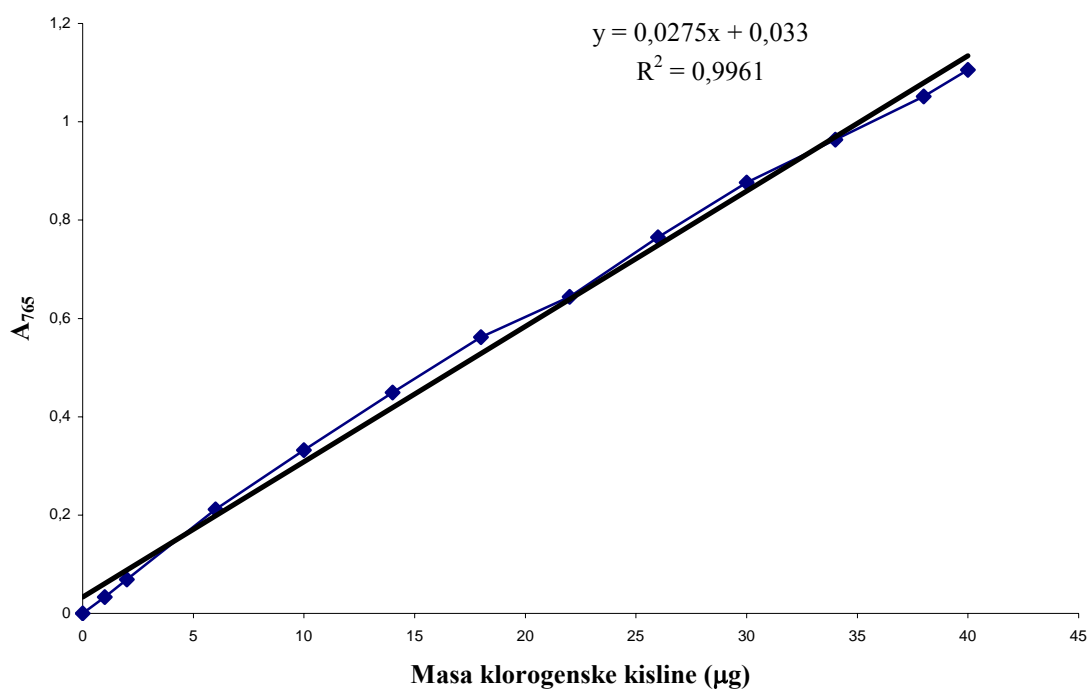
PRILOGE



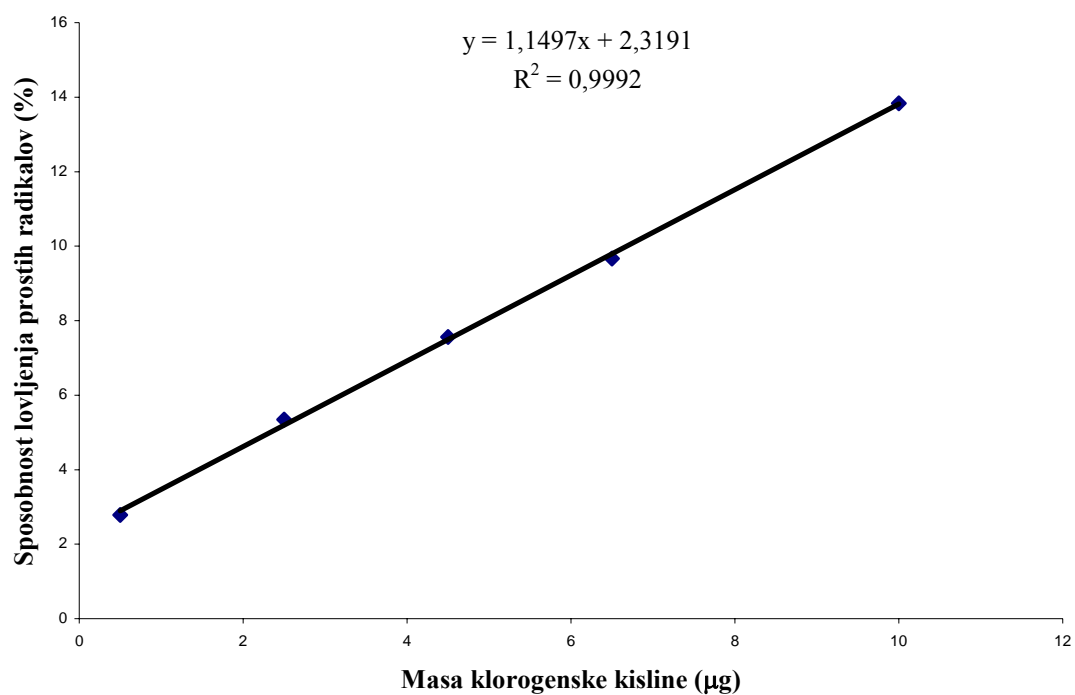
Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Sticklandu



Priloga B: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradfordu



Priloga C: Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi



Priloga D: Umeritvena krivulja za določanje antioksidativne aktivnosti po DPPH metodi