

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tatjana KOŠTOMAJ

**VPLIV PROTEINSKIH HIDROLIZATOV
POLENOVKE IN PIŠČANCA NA OKSIDACIJSKI
STATUS IN MITOHONDRIJSKI PROTEOM
KVASOVKE VRSTE *Saccharomyces cerevisiae***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tatjana KOŠTOMAJ

**VPLIV PROTEINSKIH HIDROLIZATOV POLENOVKE IN
PIŠČANCA NA OKSIDACIJSKI STATUS IN MITOHONDRIJSKI
PROTEOM KVASOVKE VRSTE *Saccharomyces cerevisiae***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EFFECT OF COD AND CHICKEN PROTEIN HYDROLYSATES ON
OXIDATION STATUS AND MITOCHONDRIAL PROTEOME
OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae***

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu študijske komisije dodiplomskega študija mikrobiologije z dne 31. 5. 2016 ter na osnovi Pravilnika o dodiplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana izr. prof. dr. Polona Jamnik in za recenzenta izr. prof. dr. Blaž Cigić.

Mentorica: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Recenzent: izr. prof. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: izr. prof. dr. BLAŽ CIGIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

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

Tatjana Koštomač

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.112:547.96:637.5:636.5+637.56:582.282.23(043)=163.6
KG	proteini/proteinski hidrolizati/bioaktivni peptidi/antioksidativni peptidi/polenovka/piščanec/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> /proteomika/mitohondrijski proteom/proteinski profil/dvodimenzionalna gelska elektroforeza
AV	KOŠTOMAJ, Tatjana
SA	JAMNIK, Polona (mentorica) / CIGIĆ, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2016
IN	VPLIV PROTEINSKIH HIDROLIZATOV POLENOVKE IN PIŠČANCA NA OKSIDACIJSKI STATUS IN MITOHONDRIJSKI PROTEOM KVASOVKE VRSTE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 66 str., 22 pregl., 6 sl., 164 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru diplomskega dela smo preučevali učinke proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca na znotrajcelično oksidacijo, celično energijsko metabolno aktivnost in mitohondrijski proteom modelnega organizma kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Z namenom raziskovanja vplivov encimske razgradnje in drugih modulacij na peptide so bili vzorci proteinskih hidrolizatov predhodno izpostavljeni <i>in vitro</i> modelu gastrointestinalnega trakta. Učinke prebavljenih proteinskih hidrolizatov smo primerjali z neprebavljenimi proteinskimi hidrolizati na celični in proteomske ravni. Pri celicah kvasovke <i>S. cerevisiae</i> se je po izpostavitvi proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca znižala znotrajcelična oksidacija, pri čemer nismo zaznali razlik med posameznima vrstama proteinskih hidrolizatov. Prebavljeni proteinski hidrolizati so imeli, ne glede na vrsto, večjo antioksidativno učinkovitost v primerjavi z neprebavljeni proteinskimi hidrolizati, kar potrjuje vlogo gastrointestinalnega trakta pri povečanju antioksidativne učinkovitosti proteinskih hidrolizatov. Pri prebavljenih kot tudi neprebavljenih proteinskih hidrolizatih polenovke in piščanca nismo zasledili učinkov na celično energijsko metabolno aktivnost. Na proteomske ravni so proteinski hidrolizati obeh vrst povzročili spremembe v ravni proteinov, ki sodelujejo v različnih procesih v celici (oksidativni stresni odgovor, zvijanje proteinov, sinteza proteinov). Raven proteinov se je v večji meri po izpostavitvi zmanjšala, pri čemer so večje spremembe povzročili prebavljeni hidrolizati. Proteinski hidrolizati polenovke so povzročili nekoliko večje spremembe kot proteinski hidrolizati piščanca.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.112:547.96:637.5:636.5+637.56:582.282.23(043)=163.6
CX proteins/protein hydrolysates/bioactive peptides/antioxidative peptides/cod/chicken/*Saccharomyces cerevisiae*/proteomics/mitochondrial proteome/protein profile/two-dimensional gel electrophoresis
AU KOŠTOMAJ, Tatjana
AA JAMNIK, Polona (supervisor) / CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2016
TI EFFECT OF COD AND CHICKEN PROTEIN HYDROLYSATES ON OXIDATION STATUS AND MITOCHONDRIAL PROTEOME OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae*
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 66 p., 22 tab, 6 fig., 164 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In this graduation thesis, the impact of cod and chicken protein hydrolysates on the oxidative status, cell energy metabolic activity and mitochondrial proteome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* was examined. To study the effects of enzymatic degradation and other modulations on peptides, protein hydrolysates were first exposed to an *in vitro* model of gastrointestinal tract. The effects of the *in vitro* digested protein hydrolysates were then compared to non-digested ones, both at the cellular as well as the proteomic level. After the exposure of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to cod and chicken hydrolysates, intracellular oxidation decreased, whereby no differences between them were observed. Higher antioxidant activity was provided by digested hydrolysates compared to non-digested ones, which confirms the role of the gastrointestinal tract in an increase of the antioxidant effectiveness of protein hydrolysates. No effects on cell energy metabolic activity were observed. At the mitochondrial proteome level, cod and chicken protein hydrolysates caused changes of proteins involved in different cellular processes (oxidative stress response, protein folding, protein synthesis), where proteins were mostly downregulated. Digested hydrolysates gave a significantly stronger response than non-digested hydrolysates, with cod peptides giving a somewhat strong response compared to chicken.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI

1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 PROTEINSKI HIDROLIZATI	3
2.1.1 Nastanek proteinskih hidrolizatov	3
2.1.2 Kemijska hidroliza.....	4
2.1.3 Encimska hidroliza	4
2.2 BIOAKTIVNI PEPTIDI	5
2.2.1 Funkcionalnosti bioaktivnih peptidov.....	5
2.2.1.1 Antihipertenzisko delovanje.....	6
2.2.1.2 Antioksidativno delovanje	6
2.2.1.3 Imunomodulatorno delovanje	6
2.2.1.4 Protimikrobno delovanje.....	6
2.2.1.5 Opioidno delovanje.....	7
2.2.1.6 Protirakavo delovanje	8
2.2.2 Proteinski hidrolizati in bioaktivni peptidi rib	8
2.2.2.1 Sestava ribjih proteinov	9
2.2.2.2 Funkcionalnosti bioaktivnih peptidov rib	9
2.2.3 Proteinski hidrolizati in bioaktivni peptidi piščanca.....	10
2.2.3.1 Sestava piščančjih proteinov	10
2.2.3.2 Funkcionalnosti bioaktivnih peptidov piščanca	11

2.3	BIOAKTIVNI PEPTIDI IN OKSIDATIVNI STRES.....	11
2.3.1	Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	12
2.3.2	Oksidativni stres	13
2.3.3	Antioksidativni mehanizmi obrambe.....	13
2.3.4	Bioaktivni peptidi rib in piščanca kot vir antioksidantov	14
2.4	KVASOVKA <i>SACCAHAROMYCES CEREVISIAE</i> KOT MODELNI ORGANIZEM	16
2.4.1	Prednosti kvasovke <i>S. cerevisiae</i> kot modelnega organizma	17
2.4.2	Stacionarna faza kvasovke <i>S. cerevisiae</i>.....	17
3	MATERIAL IN METODE.....	19
3.1	POTEK DELA	19
3.2	MATERIALI	20
3.2.1	Proteinski hidrolizati polenovke in piščanca	20
3.2.2	Delovni mikroorganizem	21
3.2.3	Gojišča.....	21
3.2.4	Raztopine in reagenti.....	22
3.2.4.1	Kultivacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	22
3.2.4.2	Preverjanje <i>in vivo</i> antioksidativne učinkovitosti proteinskih hidrolizatov	22
3.2.4.3	Določanje celične energijske metabolne aktivnosti.....	23
3.2.4.4	Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov.....	23
3.2.4.5	Merjenje koncentracije proteinov	23
3.2.4.6	2-D elektroforeza.....	24
3.2.5	Laboratorijska oprema, aparature in pripomočki	27
3.2.5.1	Priprava gojišč, raztopin in regentov	27
3.2.5.2	Inokulacija, kultivacija in inkubacija kvasovk <i>S. cerevisiae</i>	27
3.2.5.3	Določanje znotrajcelične oksidacije	28
3.2.5.4	Določanje celične energijske metabolne aktivnosti.....	28
3.2.5.5	Ekstrakcija citosolnih in mitohondrijskih proteinov	29
3.2.5.6	Merjenje koncentracije proteinov v citosolni in mitohondrijski frakciji	29
3.2.5.7	Izoelektrično fokusiranje (IEF) – prva dimenzija	29
3.2.5.8	Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE) – 2. dimenzija.....	30
3.2.5.9	Slikanje gela in analiza slike gela.....	30

3.2.5.10	Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje raztopin, reagentov in vzorcev	31
3.3	METODE DELA	31
3.3.1	Priprava kulture kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v stacionarni fazi rasti	31
3.3.1.1	Priprava trdnega YEPD gojišča in precepljanje delovne kulture	31
3.3.1.2	Priprava tekočega YEPD gojišča in steklovine	31
3.3.1.3	Inokulacija in kultivacija	32
3.3.1.4	Priprava in prenos kulture v pufer PBS	32
3.3.2	Tretiranje kvasne suspenzije s proteinskimi hidrolizati	32
3.3.3	Določanje znotrajcelične oksidacije celic	33
3.3.4	Določanje celične energijske metabolne aktivnosti	34
3.3.5	Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov	34
3.3.6	Merjenje koncentracije proteinov	35
3.3.7	Dvo-dimenzionalna poliakrilamidna gelska elektroforeza (2-D PAGE)	35
3.3.7.1	Izoelektrično fokusiranje – 1. dimenzija	36
3.3.7.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS PAGE) – 2. dimenzija	37
3.3.7.3	Barvanje gelov	39
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	42
4.1	ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE PROTEINSKIH HIDROLIZATOV IN CELIČNA ENERGIJSKA METABOLNA AKTIVNOST	42
4.2	SPREMENEMBE PROTEOMA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> PO IZPOSTAVITVI PROTEINSKIM HIDROLIZATOM POLENOVKE IN PIŠČANCA	45
4.3	IDENTIFIKACIJA PROTEINOV	47
4.4	FUNKCIJE IDENTIFICIRANIH PROTEINOV	49
4.4.1	Elongacijski faktor 1beta (Efb1) in elongacijski faktor 2 (Eft2)	49
4.4.2	Protein Tma19	51
4.4.3	Proteini Tsa1, Ppi in Cox6	52
4.4.4	Proteina Bhm1 in Bhm2	53
5	SKLEPI	54
6	POVZETEK	55
7	VIRI	56
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Peptidi s protirakovim delovanjem (Shahidi in Zhong, 2008)	8
Preglednica 2: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993).....	21
Preglednica 3: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas in Lawrence, 1993).....	21
Preglednica 4: Sestava PBS pufra.....	22
Preglednica 5: Priprava 50 mM KH ₂ PO ₄	22
Preglednica 6: Priprava 50 mM K ₂ HPO ₄	22
Preglednica 7: Sestava 1 mM založne raztopine H ₂ DCFDA	23
Preglednica 8: Sestava rehidracijskega pufra.....	24
Preglednica 9: Sestava osnovnega pufra za uravnovešenje	24
Preglednica 10: Priprava 5x SDS elektroforeznega pufra.....	25
Preglednica 11: Priprava 1,5 M raztopine Tris-HCl (pH = 8,8).....	25
Preglednica 12: Sestava 10 % (w/v) raztopine SDS	25
Preglednica 13: Sestava 10 % (w/v) raztopine APS	25
Preglednica 14: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm:	26
Preglednica 15: Sestava agarozne raztopine	26
Preglednica 16: Sestava fiksacijske raztopine	26
Preglednica 17: Sestava raztopine za razbarvanje	27
Preglednica 18: Dodani volumni vzorcev proteinskih hidrolizatov za tretiranje kulture	33
Preglednica 19: Prikaz 4. faznega poteka izoelektričnega fokusiranja.....	37
Preglednica 20: Postopek barvanja gelov	39
Preglednica 21: Razmerji vrednosti normaliziranih volumnov glede na pripadajoče slepe vzorce po izpostavitevi proteinskim hidrolizatom in identificirani proteini. PHPIPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPOPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPO: prebavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPOPO: prebavljeni proteinski hidrolizati polenovke.....	47
Preglednica 22: Pregled zbranih podatkov o identificiranih proteinih s pomočjo bioinformacijske podatkovne zbirke UniProt (The Gene Ontology Consortium, 2015).	48

KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz dela.....	19
Slika 2:	Znotrajcelična oksidacija kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca. Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne vrednosti (F/OD) \pm sd dveh bioloških ponovitev glede na pripadajoče slepe vzorce. Povprečne relativne vrednosti (F/OD), ki so označene z različnimi črkovnimi indeksi (a, b), so glede na Duncan test statistično značilne ($p \leq 0,05$). PHPOPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPOPO: prebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPO: prebavljeni proteinski hidrolizati piščanca.....	43
Slika 3:	Celična energijska metabolna aktivnost kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urnem tretiraju z neprebavljenimi in prebavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke in piščanca. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti (L/OD) \pm sd dveh bioloških ponovitev glede na pripadajoče slepe vzorce. Povprečne relativne vrednosti, ki so označene s črkovnim indeksom a, glede na Duncan test niso statistično značilne ($p \leq 0,05$). PHPOPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPOPO: prebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPO: prebavljeni proteinski hidrolizati piščanca.....	44
Slika 4:	Proteinski profil mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi slepim vzorcem; A: voda, B: prebavni sok	45
Slika 5:	Proteinski profili mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi neprebavljenim proteinskim hidrolizatom piščanca (PHPIPR) in polenovke (PHPOPR).....	46
Slika 6:	Proteinski profili mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> po 2-urni izpostavitevi prebavljenim proteinskim hidrolizatom piščanca (PHPIPO) in polenovke (PHPOPO)	46

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja BSA za merjenje koncentracije proteinov po Bradford metodi.

Priloga B: Relativne vrednosti (F/OD) glede na pripadajoče slepe vzorce za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) po 2-urnem tretiranju z neprebaavljenimi in prebaavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke in piščanca dveh bioloških ponovitev. PHPOPR: neprebaavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPOPO: prebaavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPR: neprebaavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPIPO: prebaavljeni proteinski hidrolizati piščanca.

Priloga C: Relativne vrednosti (L/OD) glede na pripadajoče slepe vzorce za določanje energijske metabolne aktivnosti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) po 2-urnem tretiranju z neprebaavljenimi in prebaavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke in piščanca dveh bioloških ponovitev. PHPOPR: neprebaavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPOPO: prebaavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPR: neprebaavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPIPO: prebaavljeni proteinski hidrolizati piščanca.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₅₉₅	absorbanca pri valovni dolžini $\lambda=595$ nm
ACE	angiotenzinska konvertaza
AMP	antimikrobní peptid
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin trifosfat
BFM	bromfenol modro
BHA	butiliran hidroksianizol
BHT	butil hidroksitoluen
BSA	goveji serumski albumin
CHAPS	3-[(3-kloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propan-sulfonat
CP	citosolni ekstrakcijski pufer
Da	dalton ($1,66 \times 10^{-24}$ g)
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DCF	diklorofluorescein
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
GI	gastrointestinalni trakt
GRAS	splošno spoznana kot varna skupina organizmov GRAS (ang. Generally Recognized As Safe).
H ₂ DCF	2',7'-diklorodihidrofluorescein
H ₂ DCFDA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
IEF	izoelektrično fokusiranje
IP	inhibitor proteaz
IPG	imobiliziran pH gradient
KCl	kalijev klorid
K ₂ HPO ₄	dikalijev hidrogenfosfat
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogenfosfat
mA	miliamper
NaOH	natrijev hidroksid
obr./min	obrati na minuto
OD	optična gostota
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PH	proteinski hidrolizat
PHPI	proteinski hidrolizat piščanca
PHPO	proteinski hidrolizat polenovke
PHPIPO	prebavljen proteinski hidrolizat piščanca
PHPIPR	neprebavljen proteinski hidrolizat piščanca
PHPOPO	prebavljen proteinski hidrolizat polenovke

PHPOPR	neprebaavljen proteinski hidrolizat polenovke
PI	izoelektrična točka
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
TBARS	s tiobarbiturno kislino reagirajoče spojine
TEMED	tetrametiletilendiamin
Tris HCl	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol vodikov klorid
v/v	ml/100 ml
W	vat
w/v	g/100 ml
YEFD	gojišče z dodanim kvasnim ekstraktom, peptonom in dekstrozo
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov
2-D PAGE	dvodimenzionalna poliakrilamidna gelska elektroforeza

1 UVOD

Proteinski hidrolizati, ki vsebujejo bioaktivne peptide so znani po svojih številnih fizioloških učinkih. Med drugim znižujejo visok krvni tlak, delujejo antioksidativno, protimikrobno, protitumorsko, imunomodulatorno, opioidno ter pomagajo pri zniževanju holesterola v krvi (Danquah in Agyei, 2012; Ryan in sod., 2011). To kaže na njihovo potencialno rabo v nutraceutiki in proizvodnji funkcionalnih živil za krepitev zdravja in zmanjševanja tveganja bolezni (Shahidi in Zhong, 2008).

V okviru raziskovalnega dela smo preučevali učinke proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca na znotrajcelično oksidacijo, celično energijsko metabolno energijsko aktivnost in mitohondrijski proteom kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* kot modelnega organizma. Z namenom raziskovanja vplivov encimske razgradnje in drugih modulacij na peptide so bili uporabljeni vzorci proteinskih hidrolizatov predhodno izpostavljeni *in vitro* modelu gastrointestinalnega trakta. Učinke prebavljenih proteinskih hidrolizatov smo primerjali z neprebavljenimi proteinskimi hidrolizati, tako na celični kot tudi na proteomske ravni.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Študije so pokazale, da tako piščančji kot tudi ribji peptidi, izražajo antioksidativne, antihipertenziske, antitrombične, antikoagulantne in imunomodulatorne učinke, zato tovrstni peptidi predstavljajo velik potencial kot vir bioaktivnih učinkovin. Kljub temu je na trgu zelo malo komercialno dostopnih živil, ki bi vsebovala bioaktivne peptide (Ryan in sod., 2011). Polega tega, pomen piščančjega in ribjega mesa, kot dragocenega vira mišičnih proteinov, narašča skupaj z ozaveščanjem o emisijah toplogrednih plinov, ki so posledica proizvodnje rdečega mesa. Proizvodnja piščančjega kot tudi ribjega mesa namreč dokazano povzroča manj emisij v zraku, kot jih povzroča proizvodnja rdečega mesa (Tilman in Clark, 2014).

Kljub nedavnim študijam, ki so pokazale biološko aktivnost peptidov, pridobljenih iz ribjih in piščančjih mišičnih tkiv, so študije na tovrstnem področju še vedno zelo redke. Podrobnejše študije, zlasti na molekularni ravni, nam namreč omogočajo vpogled v samo delovanje v celici ter njihovo biološko delovanje (Chakrabarti in sod., 2014).

Kakor nam je znano, ne obstaja nobena objavljena raziskava, ki povezuje peptide mišičnega izvora s proteomskim odzivom v celicah ter hkrati upošteva tudi kemijske spremembe peptidov, izpostavljenih gastrointestinalnemu traktu med prebavo. Slednje lahko vključuje derivatizacijo kot tudi cepitev glede na specifičnost encimov prisotnih v želodcu. Predhodne študije o ribjih proteinskih hidrolizatih so na primer pokazale povečanje *in vitro* antioksidativne aktivnosti skupaj z naraščanjem stopnje hidrolize.

1.2 CILJI NALOGE

Cilji in naloge diplomskega dela so bili sledeči:

- preveriti vpliv proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca na znotrajcelično oksidacijo,
- preveriti vpliv proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca na celično energijsko metabolno aktivnost,
- preveriti vpliv proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca na mitohondrijski proteom kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* kot modelnega organizma,
- primerjati učinke prebavljenih proteinskih hidrolizatov z neprebavljenimi proteinskimi hidrolizati, tako na celični kot tudi na proteomske ravni.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da:

- bo izpostavitev celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca znižala znotrajcelično oksidacijo in posledično povzročila spremembo nivoja ATP v celicah,
- bo izpostavitev celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca povzročila spremembe v ravni mitohondrijskih proteinov,
- bodo po izpostavitvi *in vitro* modelu prebavnega trakta učinki proteinskih hidrolizatov na celični in proteomske ravni večji kot pred izpostavitvijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTEINSKI HIDROLIZATI

Proteini, skupaj z ogljikovimi hidrati in maščobami, predstavljajo enega izmed treh glavnih makrohranil. Tekom prejšnjega stoletja so raziskave proteinov temeljile predvsem na odkrivanju pomena esencialnih aminokislin ter njihovega pomena v prehrani ter zdravju človeka (Schrezenmeir in sod., 2000), danes pa se raziskave osredotočajo predvsem na biološke aktivnosti proteinov in njihovih podenot ter kakšen vpliv imajo na splošno zdravje ljudi v pozitivnem smislu. Glede na zbrane podatke je največ študij opravljenih na mlečnih, jajčnih in sojinih hidrolizatih in peptidih, v porastu pa so tudi študije o hidrolizatih in peptidih morskih rib ter alg. Danes poteka vedno več raziskav o bioaktivnih peptidih ravno zaradi njihove učinkovite absorpcije in edinstvenih fizioloških funkcij (Shi in Chen, 2000). Pri bioaktivnih peptidih je bila identificirana široka paleta funkcij, kar omogoča različne aplikacije bioaktivnih peptidov v živilski, kozmetični in farmacevtski industriji.

Izraz proteinski hidrolizat je definiran kot »protein, razčlenjen na peptide različnih velikosti« (Herpandi in sod., 2011). Proteinske hidrolizate, mednje uvrščamo peptone in peptide, najdemo v številnih produktih biotehnološkega načina proizvodnje (Pasupuleti in sod., 2010). Izraz pepton je leta 1880 kot prvi uporabil bakteriolog Nagelli, ki je pepton označil kot pomemben vir za gojenje bakterijskih kultur. Temu je sledilo pomembno odkritje, da peptoni, ki nastanejo med delno razgradnjo proteinov, lahko zagotovijo bakterijskim kulturam pomemben vir dušika v dostopni obliki. Danes pa velja, da proteinski hidrolizati niso zgolj pomemben vir dušika za rast mikrobnih kultur, ampak so pomemben vir dušika tudi v komercialnih biotehnoloških procesih za proizvodnjo izdelkov z dodano biološko vrednostjo (terapevtiki, proteini, hormoni, cepiva itd.). Povečanje, razumevanje in dovršenost proizvodnje proteinskih hidrolizatov so priveli do njihove uporabe na številnih področjih znanosti in industrije (živilske tehnologije, biotehnologije, medicine, agronomije, veterine, proizvodnje rekombinantnih proteinov, bioremediacije) (Pasupuleti in sod., 2010).

2.1.1 Nastanek proteinskih hidrolizatov

Po definiciji proteinski hidrolizati nastanejo s hidrolizo oziroma razgradnjo proteinov. Pri proizvodnji hidrolizatov je trenutno najbolj v rabi metoda encimske hidrolize, zlasti v laboratorijskem merilu, kemijske metode, kot sta kislinska in alkalna hidroliza, pa se zaradi konkurenčne cene uporabljajo tudi v komercialne namene (Pasupuleti in Braun, 2010).

Proteinski hidrolizati so običajno okarakterizirani s stopnjo hidrolize, ki pove, v kolikšni meri je protein hidroliziran. Stopnjo hidrolize (SH) izrazimo kot število peptidnih vezi, ki so se razcepile, deljeno s celotnim številom peptidnih vezi ter pomnoženo s 100 (Pasupuleti in sod., 2010).

2.1.2 Kemijska hidroliza

Pod kemijske metode proizvodnje proteininskih hidrolizatov uvrščamo kislinsko in alkalno hidrolizo. Kislinska hidroliza se najpogosteje uporablja za analizo sestave aminokislinske sestave proteina, saj ne povzroča racemizacije ter razpad serina, treonina, arginina in cisteina. Kljub temu pa pri omenjeni metodi pride do uničenja aminokisline triptofan, zato kemijska metoda hidrolize ni vedno ustrezna in jo je treba zamenjati z drugimi obstoječimi metodami hidrolize (Garrett in Grisham, 2005). Kislinsko hidrolizo ribnih proteinov lahko dosežemo z izpostavljitvijo tkiva 18 ur 6 M klorovodikovi kislini (HCl) pri temperaturi 118 °C (Thomas in Loffler, 1994).

Običajno se kislinska metoda hidrolize uporablja pri razgradnji proteinov v peptide in aminokisline, ki se uporablajo kot ojačevalci arome v živilski industriji ter pri proizvodnji hrane za male živali (Nagodawithana in sod., 2010)

V primerjavi s kislinsko hidrolizo je alkalna hidroliza manj pogosta, saj lahko poškoduje številne aminokisline, kot sta serin in treonin (Fountoulakis in Lahm, 1998).

Ker lahko tako kemijska kot tudi alkalna hidroliza poškodujeta oziroma uničita specifične aminokisline, so možnosti kemijske hidrolize proteininskih hidrolizatov pogosto omejene.

2.1.3 Encimska hidroliza

Encimska hidroliza proteinov ima v primerjavi s kemijsko hidrolizo številne prednosti:

- ohrani biološko aktivnost sestavnih peptidov z manjšim številom poškodb aminokisin (Wu in Ding, 2002).
- je specifična za določene aminokisline v peptidni vezi (Pasupuleti in sod., 2010), kar omogoča tudi večjo kontrolo nad stopnjo hidrolize.
- ne vključuje rabe organskih topil in drugih strupenih kemikalij, tako da je primerna tako za živilsko kot tudi farmacevtsko industrijo (Kim in Wijesekara, 2010).
- lahko se uporabi tudi za simulacijo prebave pri človeku, kar je bilo uporabljeno tudi v naši raziskavi.

Kljub vsemu so cene komercialnih encimov relativno visoke, kar omejuje rabo encimske hidrolize v komercialnem merilu.

Encimsko hidrolizo proteinov lahko dosežemo z uporabo endogenih in eksogenih encimov (Guerard in sod., 2001). Encimska hidroliza s pomočjo eksogenih encimov se uporablja veliko pogosteje, saj jo je lažje nadzorovati, hkrati pa lahko služi za simulacijo prebave pri

človeku. Najpogosteje uporabljeni proteolitični encimi so pankreatin, tripsin, papain, bromelain; in bakterijske ter glivne proteaze (Pasupuleti in Braun, 2010).

Izbor encima je odvisen od substrata za zahteve končnega produkta. Na učinkovitost procesa encimske hidrolize lahko vpliva več faktorjev, kot so selektivnost encima, temperatura, pH, reakcijski čas ter razmerje med encimom in substratom. Različni encimi imajo različne specifičnosti, kar vodi do proizvodnje oziroma nastanka različnih peptidov.

Poleg tradicionalnih metod encimske hidrolize je v porastu tudi uporaba imobiliziranih encimov ter membranskih bioreaktorskih sistemov z željo po zmanjšanju stroškov encimov in povečanju izkoristka (Holownia, 2008).

2.2 BIOAKTIVNI PEPTIDI

Bioaktivni peptidi, kot že samo ime pove, so peptidi, ki nosijo določeno biološko aktivnost in lahko vplivajo na zdravje ljudi (Kitts in Weiler, 2003). Ti peptidi so običajno neaktivni ali manj aktivni znotraj zaporedja matičnega proteina, zato je za doseg njihove biološke aktivnosti potrebna sprostitev. Do sprostitev lahko pride med prebavo v gastointestinalnem traktu, s proteinsko hidrolizo v *in vitro* modelu (Erdmann in sod., 2008) in tekom fermentacije živil z uporabo sevov proteolitičnih starter kultur (Phelan in sod., 2009). Poleg tega so bioaktivni peptidi lahko tudi umetno sintetizirani in sicer s kemijskimi metodami ali metodami rekombinantne DNA (Li, 2007).

Običajno so bioaktivni peptidi sestavljeni iz 2-20 aminokislin (Daffre in sod., 2008), vendar pa obstaja nekaj izjem. Peptid lunazin, za katerega je značilno antikancerogeno delovanje, sestoji iz 43-ih aminokislin (Jeong in sod., 2002). Najpomembnejša dejavnika, ki vplivata na delovanje bioaktivnih peptidov, sta število in zaporedje aminokislin.

Bioaktivni peptidi so v gastointestinalnem traktu razmeroma odporni na hidrolizo, zaradi svoje majhnosti (dipeptidi, tripeptidi) lažje potujejo skozi črevesno sluznico ali izrazijo svoje učinke lokalno v prebavilih (Fujita in sod., 2000).

Trenutno so na trgu najpogosteje uporabljeni sojni in mlečni bioaktivni peptidi, medtem ko so ribji in piščančji bioaktivni peptidi glede na velikost svetovnega trga na trgu zaznani v zelo nizki meri.

2.2.1 Funkcionalnosti bioaktivnih peptidov

Bioaktivni peptidi imajo številne funkcije. Najbolj pogoste med njimi so antihipertenzisko, antioksidativno, imunomodulatorno in protimikrobnno delovanje (Korhonen in Pihlanto, 2003). Znani so tudi peptidi z opioidnim in antitrombogenim delovanjem (Korhonen, 2009), novejše raziskave bioaktivnih peptidov pa so pokazale tudi učinkovito delovanje le-teh v boju proti raku, debelosti ter slatkorni bolezni (Kim in

Mendis, 2006; Shahidi in Zhong, 2008; Erdmann in sod., 2008). Nekateri peptidi lahko izražajo tudi multifunkcionalne lastnosti (Meisel, 2004). Podrobnejše so funkcionalnosti bioaktivnih peptidov opisane v točkah, ki sledijo.

2.2.1.1 Antihipertenzjsko delovanje

Antihipertenzjsko delovanje bioaktivnih peptidov je verjetno najbolj raziskana funkcija bioaktivnih peptidov (Shahidi in Zhong, 2008). Antihipertenzjski peptidi lahko zavirajo delovanje angiotenzinske konvertaze (ACE), ki je tesno povezana z visokim krvnim tlakom (Erdmann in sod., 2008). ACE namreč katalizira pretvorbo neaktivnega angiotenzina I v močan vazokonstriktor angiotenzin 2 (Petrillo in Ondetti, 1982), posledica česar je povišanje krvnega tlaka.

Za ugotavljanje antihipertenzjske aktivnosti so bili uporabljeni številni naravnvi viri, kot so mleko, jajca, ribe in soja. Raziskave so pokazale strukturno enakost med nekaterimi antihipertenzjskimi peptidi. Večina antihipertenzjskih peptidov predstavljajo kratke sekvence, ki vsebujejo od 2 do 12 aminokislin (Mine in Shahidi, 2005).

2.2.1.2 Antioksidativno delovanje

Antioksidativne vrste peptidov lahko zmanjšajo peroksidacijo lipidov in maščobnih kislin, odstranijo proste kisikove radikale in so kelatorji prehodnih kovinskih ionov (Moure in sod., 2006). Identificirani so bili številni antioksidativni peptidi iz različnih živalskih in rastlinskih virov. Med vsemi antioksidativni peptidi so morda najpomembnejši ravno peptidi morskega izvora. Številne študije namreč kažejo, da imajo lahko peptidi, pridobljeni iz proteinov rib, večjo antioksidativno aktivnost kot α -tokoferol (oblika vitamina E) (Jun in sod., 2004; Mendis in sod., 2005a).

2.2.1.3 Imunomodulatorno delovanje

Imunomodulatorno delovanje peptidov je prav tako ena izmed pogostih funkcij bioaktivnih peptidov. Imunomodulatorni peptidi se lahko iz izhodnega proteina sprostijo med razgradnjo v gastrointestinalnem traktu ter nato uravnavajo nastanek nekaterih citokinov ter spodbudijo fagocitno aktivnost makrofagov (Udenigwe in Aluko, 2012). Kot rezultat lahko regulirajo imunski sistem pri novorojenčkih (Korhonen in Pihlanto, 2006). Lahko pa se sprostijo *in vitro* s pomočjo encimske hidrolize ter delujejo na imunski sistem podobno kot prehranska in farmacevtska dopolnila. Običajno so največji vir imunomodularnih peptidov mleko, jajca in sojni proteini (Udenigwe in Aluko, 2012).

2.2.1.4 Protimikrobnno delovanje

Protimikrobeni peptidi lahko zavirajo rast ali povzročajo propad bakterij, gliv ali virusnih delcev. Nekateri izmed protimikrobnih peptidov se že uporabljajo v kmetijstvu, živilski

industriji in medicini (Meng in sod., 2010; Lazarev in Govorun, 2010). Protimikrobeni peptidi lahko zaradi svoje učinkovitosti nadomestijo običajne antibiotike ali komercialno odobrene konzervanse (Papagianni, 2003). Protimikrobeni peptidi pogosto obstajajo kot prvi v vrsti mikrobne obrame in v vseh živih organizmih, ne samo pri ljudeh, temveč tudi pri živalih, rastlinah in mikroorganizmih (Reddy in sod., 2004). Prav tako kot pri antihipertenzijskih peptidih, so se tudi pri protimikrobnih peptidih pokazale določene skupne značilnosti med njimi. Običajno gre za manjše molekule ranga velikosti manj kot 10 kDa. Večina njih je pri nevtralnem pH v kationski obliki in nepolarnih, kar jim omogoča, da se lahko vežejo z anionskimi površinami tako po Gramu pozitivnimi kot tudi po Gramu negativnimi vrstami bakterij (Izadpanah in Gallo, 2005). Najbolje raziskan peptid s protimikrobnim delovanjem je fragment 17-41 laktoferina (Lönnerdal, 2002), študije mlečnih peptidov pa so pokazale tudi protimikrobeno delovanje kazeinmakropeptidov (CMP), ki nastanejo med proizvodnjo sirov ali z razgradnjo κ -kazeina (106-169 fragment). Zanj je značilna vezava enterotoksinov bakterij vrste *E. coli* in *Vibrio cholerae*, uravnavanje imunskega odziva, zaviranje bakterijske in virusne adhezije, zaviranje želodčnih izločkov ter spodbujanje rasti bifidobakterij (Thomä-Worringer in sod., 2006).

2.2.1.5 Opioidno delovanje

Opiodini bioaktivni peptidi igrajo vlogo ligandov za vezavo na opioidne receptorje v živčnem sistemu ter so farmakološko podobni opiju (morfiju). Posamezni receptorji so odgovorni za specifične fiziološke učinke. Glede na delovanje ločimo agonistične in antagonistične opioidne peptide z značilnimi različnimi N-terminalnimi konci, po čemer se razlikujejo od tipičnih endogenih opioidnih peptidov (vedno enak N-terminalni konec). Opiodne peptide z različnimi N-konec sekvencami imenujemo tudi netipični opioidni peptidi (Teschemacher, 1994). Klub temu, da lahko nekatere opioidne peptide proizvaja telo samo (endorfini, enkefalini, dinorfini) za blokado bolečine v centralnem živčnem sistemu, je zmožno tudi absorpcije bioaktivnih peptidov iz delno razgrajenih živil (kazomorfini, eksorfini, rubiskolini) (Höllt, 1983). Učinki teh peptidov se razlikujejo, vendar so vsi podobni učinkom delovanja opiatov. Bioaktivni opioidni peptidi so običajno sestavljeni iz 4-ih od 8-ih aminokislin, tipični opioidni peptidi pa so običajno veliko večji. N-terminalni konec atipičnih peptidov predstavlja zaporedje Tyr-X-Phe ali Tyr-X-X-Phe, pri čemer predstavljata tirozin ter izbrana aromatska aminokislina (X) izredno pomemben strukturni element za prileganje na vezavno mesto opioidnih receptorjev (Meisel in Fitzgerald, 2003).

V poznih 70-ih letih prejšnjega stoletja so izdali prvo podrobno poročilo o izolaciji bioaktivnih peptidov. Peptid, ki so ga izolirali, je bil β -kazomorfin-7, opioidni kazeinski hidrolizat (Brantl in sod., 1979). Poleg kazeinskih kazomorfinov so v mleku prisotni tudi drugi eksorfini, kot so β -laktoglobulin, α -laktoalbumin, laktoferin. Ni pa mleko edini vir opioidnih bioaktivnih peptidov, saj so jih odkrili tudi v žitaricah, zlasti v pšenici (gliadini,

ki skupaj s glutenini sestavljajo gluten), ječmenu (hordein, avenin, secalin, zein) in rižu (albumin). V soji je glavni predstavnik opioidnih peptidov α -protein, v jajcih ovalbumin ter albumin, hemoglobin in γ -globulin v mesu in perutnini (EFSA, 2009).

2.2.1.6 Protirakavo delovanje

Bioaktivne peptide s protirakovim delovanjem so začeli odkrivati šele v zadnjih dveh desetletjih. Številni peptidi iz različnih virov so preko različnih mehanizmov pokazali protirakave *in vivo* učinke. Preglednica 1 navaja nekatere izmed peptidov, pri katerih so zasledili protirakavo delovanje ter njihove funkcije iz obdobja zadnjih let.

Preglednica 1: Peptidi s protirakovim delovanjem (Shahidi in Zhong, 2008).

Peptidi	Protirakavo delovanje	Vir
Sojin lunazin	Zaviranje rakotvornih snovi v celicah sesalcev	(Galvez in sod., 2001)
Hidrolizati sojinih proteinov	Zaviranje tumorogeneze v debelem črevesu in jetrih	(Azuma in sod., 2000; Kanamoto in sod., 2001)
Sojni glikopeptidi	Citotoksičnost limfomskih celic	(Kim in sod., 1999)
Ajdovi peptidi	Zaviranje proliferacije hepatoma, levkemije in rakavih celic dojk	(Leung in Ng, 2007)
Peptidi iz gingsenga	Protitumorsko delovanje na limfomske celice	(Kim in sod., 2003)
Jajčni proteinski hidrolizati	Zaviranje proliferacije limfomskih celic	(Yi in sod., 2003)
Ribji proteinski hidrolizati	Zaviranje rakavih celic dojk	(Picot in sod., 2006)

2.2.2 Proteinski hidrolizati in bioaktivni peptidi rib

Ribe so lahko prebavljivo proteinsko živilo, ki je dragoceno tudi zaradi vsebnosti nenasičneih maščobnih kislin. Nedavne študije kažejo, da ribji proteini, zlasti peptidi, poleg hranilnih vrednosti nosijo tudi specifične biološke funkcije (Korhonen in Pihlanto, 2003).

Ribe so sestavljene iz proteinov in lipidov, ki so bogat vir polinenasičenih maščobnih kislin ter vitaminov in mineralov (Kelleher, 2005), kar pojasnjuje, zakaj se rive uvrščajo na seznam zdravih živil. Ribe zagotavljajo okoli 20%- potrebe po proteinih živalskega izvora kar 2,6 milijarde svetovne populacije. (Kelleher, 2005).

Hranilna vrednost proteinov je odvisna od njihovih vsebnosti aminokislin ter njihove razgradnje in absorpcije (Friedman, 1996). V zadnjih 60-ih letih so se raziskave na

področju ribjih proteinov osredotočile predvsem na preučevanje in optimizacijo pogojev za proizvodnjo proteininskih hidrolizatov in njihovih bioloških aktivnosti (Kristinsson in Rasco, 2002). Študije so pokazale, da imajo velikost in kemijske značilnosti peptidov ribjih proteininskih hidrolizatov velik vpliv na njihovo funkcionalnost.

Zaradi prekomernega ribolova in slabega upravljanja z morskimi viri je v svetu narasla potreba po pridobivanju ribjih proteinov iz trajnostnih virov, kot je ribogojništvo, posledično pa se je izboljšala tudi sama predelava ribjega mesa. Pri predelavi ribjega mesa nastane največ izgube pri odpadnem materialu, zato je trenutno glavni cilj nadgradnja ribjih odpadkov v dragocene prehrambene izdelke (Kelleher, 2005).

2.2.2.1 Sestava ribjih proteinov

Ribji proteini obsegajo miofibrilarne in sarkoplazemske proteine ter proteine vezivnih tkiv. Od 70-80 % vseh proteinov predstavljajo miofibrilarni proteini. V skupino miofibrilarnih proteinov uvrščamo miozin, aktin, tropomiozin in troponin, ki so odgovorni za krčenje mišic. Aminokislinska sestava ribjih miofibrilarnih proteinov je podobna sestavi mišičnih proteinov pri sesalcih. Sarkoplazemski proteini so majhni, v vodi topni globularni proteini. Mednje uvrščamo globuline in večino encimov. Z razliko od miofibrilarnih in sarkoplazemskih proteinov proteini vezivnega tkiva niso topni v vodi ali v solnih raztopinah, temveč je za njihovo razgradnjo potrebna kislinska, alkalna ali encimska hidroliza. Glavna komponenta proteinov vezivnega tkiva je kolagen, ki predstavlja zgolj 3-10 % vseh ribjih proteinov. Za primerjavo, pri sesalcih kolagen predstavlja 17 % vseh proteinov (Sato in sod., 1989).

2.2.2.2 Funkcionalnosti bioaktivnih peptidov rib

Bioaktivni peptidi, pridobljeni iz morskih virov, imajo različne koristne biološke funkcionalne značilnosti in izražajo številne fiziološke učinke v človeškem telesu. Študije so pokazale antihipertenzisko (Balti in sod., 2010), antioksidativno (Kim in sod., 2001; Hsu in sod., 2009; Farvin in sod., 2013), antidiabetično (diabetes tipa 2) (Lacroix in Li-Chan, 2012; Huang in sod., 2012) in protirakovo delovanje (Picot in sod., 2006; Hsu in sod., 2011) hidrolitično sproščenih peptidov.

Zadnje čase se največ pozornosti namenja ribjim proteinim hidrolizatom ravno zaradi njihovega potencialnega antioksidativnega delovanja in omejevanja lipidne oksidacije. Morska hrana, zlasti bogata z lipidi in močnimi pro-oksidanti, je namreč zelo dovetna za kvarjenje, ki nastane kot posledica lipidne oksidacije (Hultin, 1994). Ene izmed zgodnjih študij, ki so bile opravljene na miofibrilarnih proteinih sardin, so pokazale antioksidativni potencial ribjih proteininskih hidrolizatov, ki se je ob dodatku komercialnih antioksidantov še občutneje povečal (Hatake in sod., 1990).

Pri študijah vloge in delovanja ribjih bioaktivnih peptidov je veliko poudarka tudi na raziskovanju njihove vloge pri hipertenziji. Visok krvni tlak je namreč glavni krivec za številne srčnožilne bolezni, vključno s koronarno boleznijo srca, ki je eden od glavnih vzrokov smrti v industrijsko razvitih državah.

Eden od način zmanjšanja visokega krvnega tlaka je inhibicija angiotenzine konvertaze (ACE) (Jeon in sod., 1999). Prvi morski ACE inhibitorni peptidi so izolirali iz proteinov sardin. Za hidrolizo proteinov so uporabili proteaze iz filamentozne glice vrste *Aspergillus oryzae* (Suetsuna in Osajima, 1986). Kasneje so ACE inhibitorne peptide izolirali tudi iz lososa, palamid, aljaškega polaka, šparov in limand (Ono in sod., 2003). ACE inhibitorski peptidi so bili izolirani iz različnih ribjih delov, bodisi iz mišičnih proteinov bodisi iz odpadkov, ki nastanejo med predelavo. V nekaterih primerih so encimsko hidrolizirani proteini ribje kože (želatina) pokazali boljše biološke antihipertenzische in antioksidativne učinke v primerjavi s peptidi, ki izvirajo iz mišičnih proteinov (Kim in Mendis, 2006).

Uporaba bioaktivnih peptidov pri zdravljenju hipertenzije predstavlja morebitno alternativo sintetičnim zdravilom, ki lahko povzročajo nezaželene stranske učinke, za kar bodo potrebne tudi *in vivo* študije.

2.2.3 Proteinski hidrolizati in bioaktivni peptidi piščanca

Piščanče meso danes predstavlja izredno dobro dostopno živilo, razširjeno po celiem svetu. Zaradi svojih hranilnih vrednosti piščanče meso velja za dobro uravnotežen vir proteinov, ki je bogato z esencialnimi aminokislinami. Zaradi velike porabe piščančjega mesa na svetovni ravni, česar posledica so tudi velike količine neizkoriščenih odpadnih produktov, se novejše študije, poleg hranilnih vrednosti mesa, osredotočajo tudi na dodatne funkcionalnosti piščančjih proteinov in nove načine obdelave. V porastu so namreč tudi študije o piščančjih bioaktivnih peptidih, pridobljenih iz mišičnih proteinov kot tudi proteinov vezivnih tkiv (kolagen).

2.2.3.1 Sestava piščančjih proteinov

Proteinska sestava bistveno vpliva na postopke predelave, senzorične in hranilne vrednosti piščančjega mesa. Mesni proteini vsebujejo vse aminokisline, ki so bistvenega pomena za človeško telo, zaradi česar meso predstavlja živilo z visoko hranilno vrednostjo (Friedman, 1996).

Piščančji proteini predstavljajo približno od 16 % do 22 % mišičnega tkiva in obsegajo miofibrilarne in sarkoplazemske proteine ter proteine vezivnih tkiv. Miofibrilarni proteini predstavljajo približno 50-60 % vseh proteinov in so odgovorni za procese krčenja in sproščanja mišic. Sarkoplazemske proteine obsegajo približno 30-35 % vseh mišičnih proteinov. Mednje uvrščamo encime, ki sodelujejo v procesih metabolizma v mišičnih

tkivih. Proteini vezivnih tkiv, kot sta kolagen in elastin, predstavljata zgolj 3-6 % vseh piščančijih proteinov (Alavarado in Owens, 2006).

2.2.3.2 Funkcionalnosti bioaktivnih peptidov piščanca

V primerjavi s preučevanjem funkcionalnosti bioaktivnih rib, je študij, ki so bile opravljene na bioaktivnih peptidih piščanca, bistveno manj. Kljub temu so bile opravljene nekatere študije, ki so pokazale določene funkcionalnosti bioaktivnih peptidov piščanca. Prav tako kot pri ribah, so tudi tukaj v porastu študije, opravljene na stranskih produktih, ki nastanejo pri predelavi mesa. Le-ti predstavljajo slab izkoristek z gospodarskega vidika ter skrb s stališča okoljevarstva.

Saiga in sod. (2003) so v svoji raziskavi preučevali antihipertenzisko delovanje bioaktivnih peptidov, pridobljenih s hidrolizo ekstrakta piščančijih prsi. Antihipertenzisko delovanje so preučevali na podganah s spontano povišanih krvnim tlakom, pri katerih se je znižanje tlaka pokazalo že 1 uro po oralnem zaužitju hidroliziranega mišičnega ekstrakta in je trajalo vsaj še nadaljnje 4 ure. Saiga in sod. (2008) so preučevali tudi antihipertenzisko delovanje peptidov, ki so bili pridobljeni iz kolagena spodnjega keratinskega dela nožnih okončin piščanca. Kolagen, ki so ga ekstrahirali, so hidrolizirali z različnimi encimi in medsebojno primerjali anhypertenzisko delovanje posameznih hidrolizatov, pri čemer so zasledili največjo aktivnost hidrolizatov, ki so bili tretirani s proteazami pridobljenimi iz gliv rodu *Aspergillus*. Učinek delovanja peptidov so prav tako preverili na podganah s spontano povišanim tlakom, ki so peptide zaužile oralno, pri čemer je prišlo do znatnega znižanja krvnega tlaka. Dolgoročno oralno zauživanje peptidov je pri podganah hipertenzijo celo odpravilo. Z uporabo modela gastrointestinalnega trakta so preverili tudi učinek delovanja prebavnih encimov, pri čemer so zasledili povečano antihipertenzisko delovanje peptidov v primerjavi z neprebavljenimi vzorci. Aminokislinsko zaporedje peptida z največjo aktivnostjo so identificirali kot Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro. Podobno študijo so predhodno opravili tudi Fujita in sod. (2000), ki so preučevali antihipertenzisko delovanje bioaktivnih peptidov iz piščančijih mišičnih tkiv, ki so bili razgrajeni z uporabo termolizina. Aminokislinska zaporedja peptidov z antihipertenziskim delovanjem so identificirali kot Leu-Lys-Ala, Leu-Lys-Pro, Leu-Ala-Pro, Phe-Gln-Lys-Pro-Lys-Arg, Ile-Val-Gly-Arg-Arg-His-Gln-Gly, Phe-Lys-Gly-Arg-Tyr-Tyr-Pro, Ile-Lys-Trp.

Poleg antihipertenziskskega delovanja so študije pokazale tudi antioksidativno delovanje bioaktivnih peptidov piščančjega izvora, kar je podrobneje opisano pod točko 2.3.4.

2.3 BIOAKTIVNI PEPTIDI IN OKSIDATIVNI STRES

Kljub temu da je kisik za življenje nujen element, ima lahko pod določenimi pogoji škodljive učinke na človeško delo (Bagchi in Puri, 1998). Potencialno najbolj škodljivi učinki kisika so posledica nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) (Aruoma, 1994), kar

lahko vodi v oksidativni stres in posledično privede do poškodbe biomolekul (lipidov, proteinov, DNA) (Farber, 1994). ROS in oksidativni stres so s tovrstnimi poškodbami biomolekul posredno ali pa neposredno glavni krivec tudi za mnoge kronične bolezni današnjega sveta, kot so kardiovaskularne bolezni, rak, slatkorna bolezen (Valko in sod., 2004).

2.3.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Molekularni kisik je nepogrešljiv element za optimalno delovanje vseh metabolnih procesov v telesu. Pri zaporedni redukciji kisika v vodo v celicah nastajajo različni reaktivni intermediati, radikalni in neradikalni, s skupnim imenom reaktivne kisikove zvrsti (ROS) (Sies, 1998; Halliwell in Cross, 1994).

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) je izraz, ki zajema vse visoko reaktivne molekule, ki vsebujejo kisik, vključno s prostimi kisikovimi radikali. Prosti radikali so molekule, ki vsebujejo vsaj en nesparjen elektron v zunanjih orbitalih, zaradi česar so nestabilni in lahko reagirajo z drugimi molekulami, s katerimi tvorijo bolj stabilno stanja. ROS lahko reagirajo tudi z drugimi, za naše telo pomembnimi molekulami, kot so proteini, lipidi in DNA ter jih tako poškodujejo, kar vodi v deaktivacije različnih celičnih komponent, kot so encimi, membrane in DNA (Halliwell in Cross, 1994; Valko in sod., 2004).

ROS lahko nastajajo tako endogeno kot tudi iz eksogenih virov (Srđić-Rajić in Konić-Ristić, 2016). ROS deloma nastajajo v našem telesu med procesom celičnega dihanja, nekaj pa jih lahko nastane tudi pri vnetnem odzivu (Boveris in Chance, 1973). V primeru vnetja, avtoimunske celice proizvedejo in sprostijo ROS, ki uničijo invazivne mikroorganizme (Rosen in sod., 1995). Veliko ROS nastane tudi zaradi izpostavljenosti zunanjim eksogenim virom kot so ionizirajoča sevanja, ozon, onesnaženje zraka ali z vnosom škodljivih snovi v naše telo (kajenje) (Bagchi in Puri, 1998).

Glavni endogeni vir nastanka ROS je mitohondrijska elektronska veriga. V njej nastane največ superoksidnega aniona (O_2^-), ki je ključni radikal, saj lahko povzroči nastanek številnih drugih reaktivnih kisikov intermediarov (Srđić-Rajić in Konić-Ristić, 2016). Del ROS nastane tudi s pomočjo nekaterih encimov, kot so NADPH oksidaza, ksantin oksidaza, lipoksigenaza, mieloperoksidaza, dušikov oksid sintaza, ciklooksigenaze.

Najbolj pomembne endogene ROS, ki sodelujejo pri poškodbah molekul, so radikalni superoksidni anion (O_2^-), hidroperoksilni radikal (HOO^\cdot), hidroksilni radikal (HO^\cdot) ali pa ne-radikali (vodikov peroksid (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$)) (Kohen in Nyska, 2002).

Naše telo vsebuje posebne antioksidativne obrambne mehanizme, ki lahko nevtralizirajo škodljive učinke ROS in vzdržujejo redoks ravnotesje v celicah. Od vseh obstoječih mehanizmov, antioksidativni obrambni mehanizmi predstavljajo najmočnejšo obrambo pred ROS (Kohen in Nyska, 2002). Obramba pred ROS radikalni ne sloni le na enem

samem antioksidantu, ampak so na voljo številne molekule (encimi in manjše molekule), ki se povezujejo v kompleksno delajočo antioksidativno mrežo (Pečar in Mravljak, 2015).

2.3.2 Oksidativni stres

Ko naravni antioksidativni obrambni sistemi niso več dovolj učinkoviti v boju proti ROS, lahko nastopi t.i. oksidativni stres.

Če antioksidanti dobro opravljajo svojo nalogo, oksidativni stres sicer poteka, vendar v zelo omejenem obsegu. To je pozitivni in fiziološko pomemben oksidativni stres. Njegovi učinki so za prilagajanje organizma na zunanje dejavnike ugodni in nujni. V primeru, ko se kapaciteta antioksidantov zmanjša, se razširijo nenadzorovane oksidacije. V tem primeru govorimo o oksidativnem stresu, ki ima vedno škodljive posledice (Pečar in Mravljak, 2015).

Pojem oksidativni stres je leta 1985 prvi natančno definiral Helmut Sies. Definira ga kot »motnjo v neravnovesju med oksidanti in antioksidanti v korist prvih, kar vodi v možne poškodbe« (Sies, 1998). Leta 2015 je prvotno definicijo nadgradil, oksidativni stres definira kot »motnjo v neravnovesju med oksidanti in antioksidanti v korist prvih, kar vodi v motnje v redoks signalizaciji in nadzoru in/ali molekularno škodo« (Sies, 2015).

2.3.3 Antioksidativni mehanizmi obrambe

Medtem ko je oksidacija del normalnih bioloških procesov, so antioksidanti v celicah bistvenega pomena pri zaščiti tkiv in organov pred oksidativnimi poškodbami. V celicah so vzpostavljeni antioksidativni mehanizmi (endogeni antioksidativni sistem), ki celicam nudijo zaščito pred škodljivimi učinki ROS, ki nastanejo v našem telesu ali pa jih v telo vnesemo iz okolja (eksogeni antioksidativni sistemi (Srđić-Rajić in Konić-Ristić, 2016).

Po definiciji je antioksidant vsaka snov, ki zavre oksidacijo *in vitro* in zmanjša oksidativni stres *in vivo*. Po mehanistični definiciji je antioksidant vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani možnost oksidativne poškodbe tarčne molekule (Pečar in Mravljak, 2015).

Glavne encimske komponente endogenskega antioksidativnega sistema so superoksid dismutaze (razgradnja O_2^- na O_2 in H_2O_2), glutation peroksidaze (razpad vodikovega peroksida in hidroperoksidov), glutation reduktaze (redukcija oksidiranega glutationa) in katalaze (razgradnja vodikovega peroksida) (Srđić-Rajić in Konić-Ristić, 2016).

Poleg encimskih komponent pri odstranjevanju prostih radikalov sodelujejo tudi neencimskie komponente, pri čemer imajo najbolj pomembno funkcijo glutation, karnozin, tioredoksin in melatonin (Srđić-Rajić in Konić-Ristić, 2016). Za uspešno vzdrževanje ravnovesa v celicah so poleg endogenih antioksidantov potrebni tudi eksogeni antioksidanti, ki jih v telo vnesemo s hrano ali s prehranskimi dopolnilni.

V primeru antioksidantov zunanjega izvora je naše telo stalno odvisno od njihove prisotnosti v hrani, njihove resorpcije iz prebavil in od njihove stabilnosti na jetrne encime. Z razliko od endogenih antioksidantov so eksogeni antioksidanti pretežno majhne molekule, ki se lahko gibljejo v celicah in med njimi.

Najpomembnejši antioksidanti, ki jih vnesemo v telo s hrano, so L-askorbinska kislina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), karetonoidi in (poli)fenoli rastlinskega izvora (Pečar in Mravljak, 2015).

Vir eksogenih antioksidantov predstavljajo tudi prehranska dopolnila, sestavljena iz vitaminov, mineralov, vlaknin, maščobnih kislin ali aminokislin, ki bodisi primanjkujejo v prehrani posameznika, bodisi jih ni moč dobiti v potrebnih količinah v hrani (Poljšak in sod., 2013).

Kljub temu da lahko tovrstna dopolnila izboljšajo sposobnost obvladovanja oksidativnega stresa, lahko v primeru prekomernega zaužitja in prekoračitve priporočenih dnevnih količin, izzovemo nasprotni učinek od pričakovanega, to je t.i. antioksidativni stres (Pečar in Mravljak, 2015).

2.3.4 Bioaktivni peptidi rib in piščanca kot vir antioksidantov

Sintetični in naravni antioksidanti so danes del rutine pri proizvodnji živil in zdravil, zlasti tistih, ki vsebujejo maščobne kisline (Papas, 1999). Antioksidanti v tem primeru igrajo ključno vlogo pri ohranjanju kakovosti končnega izdelka, saj preprečujejo lipidno oksidacijo (Yu in sod., 2002). Na trgu je veliko število sintetičnih antioksidantov, med njimi je največ poudarka na butil hidroksitoluenu (BHT) in butiliranemu hidroksianizolu (BHA). Spojini sta v vlogi antioksidantov pogosto uporabljeni v najrazličnejših živilih, kozmetičnih in terapevtskih izdelkih. Vendar pa so nekatere njune fizikalne lastnosti (nestabilnost pri povišani temperaturi, kancerogeno delovanje, hormonsko posnemanje) privedle do uvedbe strožje zakonodaje o aditivih (Papas, 1999), kar je povzročilo večje povpraševanje po naravnih antioksidantih zlasti z vidika dolgoročne varnosti (Yu in sod., 2002).

Tradicionalne metode pridobivanja naravnih antioksidantov temeljijo predvsem na rastlinah in njihovih produktih (Cao in sod., 1996). Zaradi velikih količin stranskih produktov, ki se pojavijo pri predelavi mesa, se je pojavil interes po raziskovanju živalskih peptidov kot enega izmed možnih virov naravnih antioksidantov, med drugim tudi iz rib in piščancev.

Študije so pokazale, da peptidi in proteinski hidrolizati prehranskih virov izražajo antioksidativne aktivnosti predvsem zoper encimske in neencimske peroskidacije lipidov in maščobnih kislin (Erdmann in sod., 2008). Antioksidativna aktivnost je v veliki meri odvisna od vrste, položaja in hidrofobnosti aminokisline v peptidu (Harnedy in Fitzgerald,

2012). Za aminokislinske ostanke cisteina, histidina, levcina, metionina in tirozina je bilo ugotovljeno, da sodelujejo pri lovljenju prostih radikalov tako, da oddajo svoje protone elektronsko deficitiranim radikalom in s tem okrepijo lovljenje prostih radikalov (Harnedy in FitzGerald, 2012).

Pri peptidih, pridobljenih z encimsko hidrolizo ribnih proteinov, so bile ugotovljene pomembne antioksidativne aktivnosti v različnih oksidativnih sistemih (Nalinanom in sod., 2011). Opravljenih je bilo veliko študij, ki so poskušale ovrednotiti antioksidativno delovanje hidrolizatov različnih vrst rib. Ena prvih tovrstnih študij je bila objavljena že leta 1990, in sicer so z uporabo proteininskih hidrolizatov sardin ugotovili, da proteiniki hidrolizati in komercialni antioksidanti sinergistično inhibirajo oksidacijo linolenske kisline (Hatake in sod., 1990). V zadnjem času mnogi poudarjajo potencialno rabo ribnih proteininskih hidrolizatov kot enega od alternativnih virov naravnih antioksidantov. Potencialni antioksidativni peptidi so bili identificirani v različnih vrstah rib (tuna, sardina, losos, modri repak, slanik).

Sannaveerappa in sod. (2007) so v svoji študiji preučevali antioksidativno učinkovitost stisnjene soka mišičnih tkiv slanika (*Clupea harengus*) v boju proti peroksilnim radikalom in oksidaciji človeškega LDL, ki jo povzročajo Cu²⁺ ioni. V okviru študije so preverili vpliv neprejavljenih in *in vitro* prejavljenih proteininskih hidrolizatov, pri čemer so spoznali, da se antioksidativni učinki večajo skupaj z večanjem števila nizkomolekularnih peptidov, ki nastanejo med presnovo.

V študijah mišičnih hidrolizatov lososa je bilo ugotovljeno, da z večjo stopnjo hidrolize nastane večje število nizkomolekularnih peptidov, ki sodelujejo pri lovljenju prostih radikalov (Ono in sod., 2006).

Theodore in sod. (2008) so v svoji študiji pokazali, da z večanjem stopnje hidrolize pada sposobnost lovljenja DPPH radikala in reducirajoča moč proteininskih hidrolizatov soma, medtem ko vrednost ORAC (ang. Oxygen radical absorbance capacity), keliranje kovinskih ionov in inhibiranje TBARS (ang. Thiobarbituric acid reactive substances) narašča.

In vitro antioksidativna učinkovitost peptidov je odvisna od njihove velikosti, aminokislinske sestave in prisotnosti prostih aminokislinskih ostankov v hidrolizatu (Ryan in sod., 2011). Ko in sod. (2013) so na podlagi celičnih in *in vivo* študij celičnih linij Vero (epitelne celice afriške zelene opice) prišli do rezultatov, ki so pokazali antioksidativno in citoprotективno delovanje proteininskih hidrolizatov ribe iverke (*Paralichthys olivaceus*) proti tarčnim peroksilnim radikalom, katerih vir je 2,2'-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH).

Veliko pozornosti se pri preučevanju ribnih proteininskih hidrolizatov namenja tudi stranskim in odpadnim produktom, ki nastanejo pri proizvodnji ribjega mesa in izdelkov. Mendis

(2005b) je v študiji proteinskih hidrolizatov modrega repaka, ki so bili ekstrahirani iz kožne želatine, prav tako dokazal antioksidativno delovanje pridobljenih bioaktivnih peptidov. Njihovo delovanje se kaže v povečanem izražanju celičnih antioksidativnih encimov, vključno s katalazami, superoksid dismutazami in glutation peroksidazami v celicah človeškega hepatoma (Hep3B). Podobne učinke so dokazali tudi Nazeer in sod. (2012), ki so preučevali mišične proteinske hidrolizate morske vrane (*Otolithes ruber*). Peptidi so v primerjavi z negativno kontrolo s svojim antioksidativnim delovanjem izboljšali delovanje endogenega antioksidativnega sistema pri podganah seva vrste Wistar z zvišanjem aktivnosti katalaze, glutation-S-transferaze in superoksid dismutaze.

O bioaktivnih peptidih piščančjega izvora je narejeno bistveno manj študij, a kljub temu obstajajo študije, ki navajajo njihovo antioksidativno delovanje. Sun in sod. (2012) so v svoji študiji preučevali *in vivo* in *in vitro* antioksidativno delovanje proteinskih hidrolizatov piščančjih prsi, ki so jih hidrolizirali z uporabo papaina. *In vivo* študija je bila opravljena na miših, pri katerih so predhodno inducirali staranje s pomočjo D-galaktoze. Pri miših, pri katerih so inducirali proces staranja, se je po zauživanju proteinskih hidrolizatov, znatno povečala aktivnost antioksidativnih encimov, medtem ko se je raven malondialdehida, ki je indikator peroksidacije lipidov, zmanjšala tako v jetrih kot tudi plazmi.

In vitro študijo o antioksidativnem delovanju proteinskih hidrolizatov so opravili tudi Onuh in sod. (2013). Uporabili so proteine piščanče kože prsi in beder in jih hidrolizirali z alkalazo in kombinacijo pepsina in pankreatina v koncentracijah od 1-4 %, pri čemer se je razgradnja z alkalazo izkazala za bolj učinkovito. Rezultati so pokazali tudi, da so proteinski hidrolizirati kože prsi bistveno bolj učinkoviti pri lovljenju DPPH radikala kot proteinski hidrolizati kože beder, kar kaže na to, da je delovanje bioaktivnih peptidov odvisno od njihovega specifičnega vira in ne zgolj tipa. Študija je pokazala tudi, da se z večanjem molekulske mase peptidov zmanjša njihovo antioksidativno delovanje.

2.4 KVASOVKA *Saccharomyces cerevisiae* KOT MODELNI ORGANIZEM

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, bolje poznana tudi kot pivska ali pekovska kvasovka, se že stoletja uporablja pri proizvodnji hrane in pijače. Danes je njena raba razširjena tudi na področja farmacevtske in biotehnološke industrije, zaradi njene dovzetnosti za genetske modifikacije z uporabo rekombinantnih DNA tehnologij.

Kvasovke so evkariontski organizmi, ki jih uvrščamo v kraljestvo gliv. Danes je poznanih več kot 1000 vrst kvasovk (Simpson in sod., 2009), pri čemer je najbolje raziskana ravno kvasovka *S. cerevisiae*. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* velja za najbolje preučevani evkariontski mikroorganizem, saj je prvi v celoti sekveniran genom evkariontskega organizma ravno genom kvasovke, ki so ga v celoti sekvenirali že leta 1996. Velikost celotnega genoma znaša približno 12 milijonov baznih parov in nosi zapis za približno

6000 različnih proteinov, pri čemer introni predstavljajo zgolj 4 % genoma kvasovke (Goffeau in sod., 1996). Primerjalne študije genomov so pokazale, da ima 40 % proteinov kvasovke aminokislinska zaporedja, ki so podobna vsaj enemu človeškemu proteinu. 30 % človeških proteinov, ki sodelujejo pri nastanku bolezni, ima ortologe v kvasovkah (Foury, 1997; Parsons in sod., 2003).

Velikost mitohondrijskega genoma znaša približno 80000 baznih parov in kodira osem glavnih proteinov, ki igrajo ključno vlogo pri oksidativnih fosforilacijah. To so proteini citokrom b (podenota ubikinol-citokrom c oksidoreduktaze), Cox1, Cox2 in Cox3 (podenota citokrom c oksidaze), Atp6, Atp8, Atp9 (podenota F₀ dela ATP sintaze) in Vas1 (komponenta male podenot mitohondrijskih ribosomov) (de Zamaroczy, 1985). Z masno spektrometrijo so identificirali večino od 700-800 predvidenih proteinov kvasovke vrste *S. cerevisiae*, ki sestavljajo mitohondrijski proteom kvasovke. Mitohondrijske raziskave z uporabo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, kot modelnega organizma, so prav zagotovo pripomogle k obrazložitvi biogeneze in biološkega delovanja omenjenega organela (Prokisch in sod., 2004).

2.4.1 Prednosti kvasovke *S. cerevisiae* kot modelnega organizma

Čeprav se na prvi pogled enocelična kvasovka *S. cerevisiae* ne zdi reprezentativna, se je na podlagi dosedanjih študij izkazala za odličen modelni organizem za preučevanje najrazličnejših osnovnih celičnih funkcij. Zanjo je namreč značilna visoka stopnja ohranjenosti, kar pomeni, da potekajo številni celični procesi in metabolne poti pri kvasovki podobno kot pri višje razvitih organizmih. Ravno zaradi svojih številnih lastnosti in prednosti je kvasovka primerna tako za genetske, biokemijske kot tudi celične študije. Poleg tega je gojenje kvasovke ekonomično, saj za svojo rast ne potrebuje kompleksnih in dragih gojišč, njen generacijski čas pa je kratek (v optimalnih pogojih 90 min). Zaradi nezahtevne rasti jo lahko gojimo v obliki kolonij na trdnem gojišču ali kot suspenzijo v tekočem mediju, aerobno in anaerobno, hkrati pa za njihovo gojenje niso potrebne posebne sterilne tehnike (Guthrie in Fink, 1991). Slednje bistveno olajša izolacijo biološkega materiala v zadostnih količinah, ki so potrebne za nadaljnje študije (Sherman, 1991). Kvasovka *S. cerevisiae* je privlačen modelni organizem tudi zaradi svoje nepatogenosti, zaradi česar se uvršča v t.i. splošno spoznano kot varno skupino organizmov GRAS (ang. Generally Recognized As Safe).

2.4.2 Stacionarna faza kvasovke *S. cerevisiae*

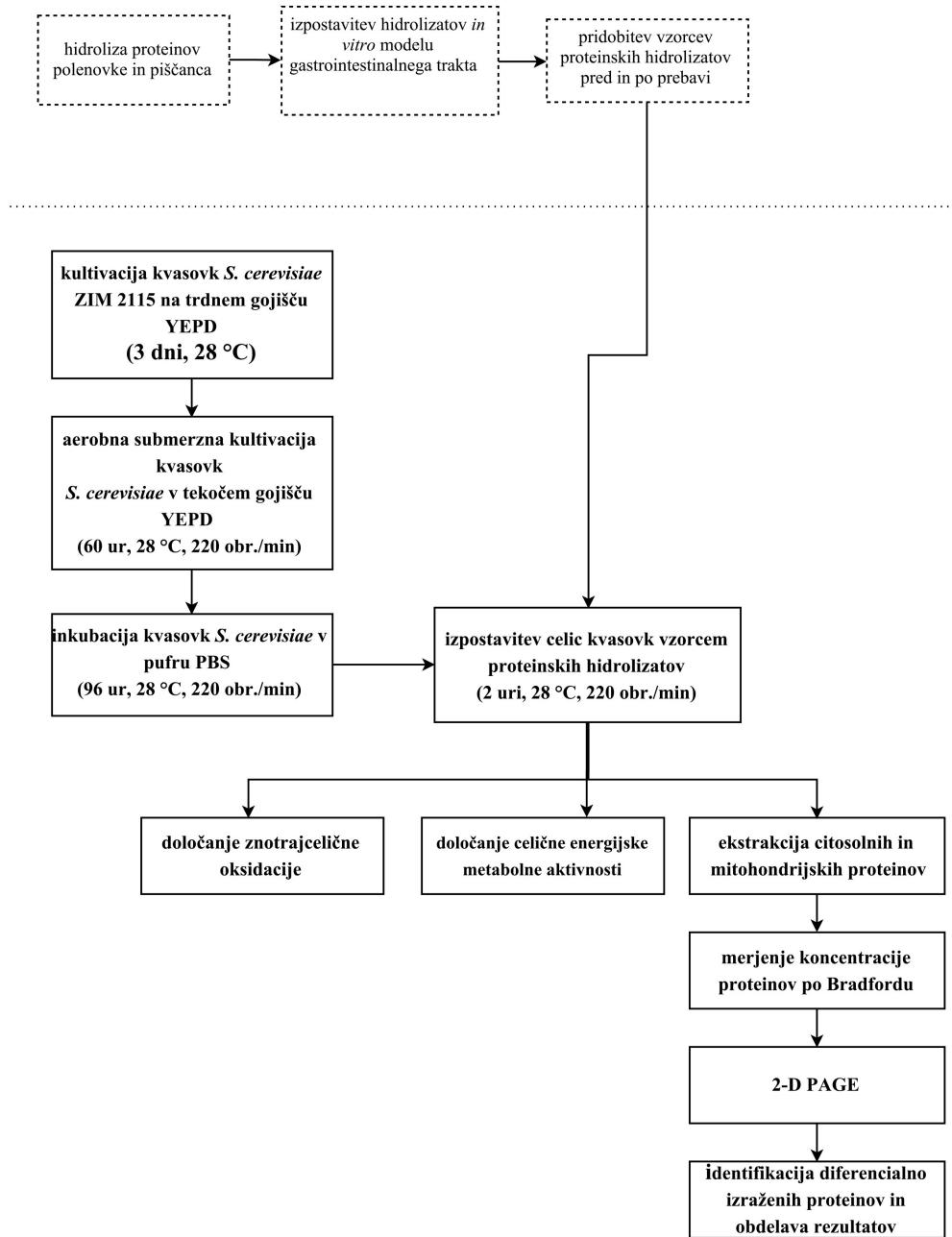
Po inokulaciji kulture kvasovk v obogateno gojišče z glukozo se celice najprej prilagodijo na nove pogoje, nato začno rasti in se vse hitreje deliti, pri čemer njihovo rast določajo rastni pogoji v mediju. Z njihovo rastjo se porablja glukoza kot razpoložljiv vir ogljika, dokler gojišče ni popolnoma izčrpano. Posledično se rast upočasni, kultura postane

nasičena in preide v stacionarno fazo, v kateri celice prenehajo z brstenjem (Gray in sod., 2004) (Fuge in sod., 1994).

Večina humanih celic tkiv in organov (npr. nevroni in celice skeletnih mišic) se ne razmnožuje in večino svojega življenja preživi v stacionarni fazi (Herman, 2002), zaradi česar so kvasovke ravno v stacionarni fazi ustrezni modelni organizem za preučevanje višje razvitetih ekvariontov. Kvasovke *S. cerevisiae* v stacionarni fazi rasti so zlasti primerne za študije oksidativnega stresa, saj imajo celice kvasovk v stacionarni fazi razvite enake mehanizme obrambe kot celice višje razvitetih evkariontov (Moradas-Ferreira in sod., 1996).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 1: Shematski prikaz dela.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Proteinski hidrolizati polenovke in piščanca

Vzorci proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca so bili pridobljeni v okviru mednarodnega projekta »Safe transportation of marine bioactives from source to active site«.

Za pripravo proteinskih hidrolizatov so bili uporabljeni sveži fileji polenovke in piščančijih prsi. Fileji polenovke so bili kupljeni v trgovini z živili Noatun v Reykjaviku na Islandiji. Piščanje prsi islandskega proizvajalca Ferskir kjklingar so bile prav tako kupljene v trgovini z živili (Hagkaup).

Fileje polenovke in piščančijih prsi so najprej homogenizirali z vodo v razmerju 1:6. Z dodatkom 2 M NaOH so vrednost pH homogenata povečali na 11, da so raztopili miofibrilarne proteine. Netopne snovi so odstranili s centrifugiranjem (10 000 g, 20 minut, 4 °C). Topne proteine so pridobili z obarjanjem pri pH 5,5 z uporabo 2 M HCl in naknadnim centrifugiranjem pri 10 000 g 2 min.

Proteinski hidrolizati polenovke (PHPO) in piščanca (PHPI) so bili proizvedeni z encimsko hidrolizo z uporabo Protamex kompleksa (Novozymes, Bagsvaerk, Denmark). Promatex so dodali 3%-vodni raztopini ter pustili učinkovati 6 ur pri 45 °C in pH 8,1. Encim so nato inaktivirali z 10-minutnim segrevanjem pri temperaturi 95 °C. Vzorce so nato preko noči prestavili na led, čemur je sledilo centrifugiranje (30 minut pri 10000 g). Po centrifugiraju so zbrali topno frakcijo in naravnali njeni vrednosti pH na 7,2. Temu je sledila liofilizacija vzorcev. Tako pripravljene vzorce so nato hranili pri temperaturi -80 °C do njihove nadaljnje uporabe.

Da bi lahko primerjali razliko v učinkih proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca pred in po prebavi, so vzorce izpostavili tudi *in vitro* modelu gastrointestinalnega trakta (GI). PHPO in PHPI so razgradili v dvostopenjskem statičnem *in vitro* GI po metodi (Tibäck in sod., 2009). Model GI z dodatkom elektrolitov, prebavnih encimov in kislin (v nadaljevanju prebavni sok) posnema fiziološko delovanje v želodcu in tankem črevesju. Da bi se izognili nevarnosti, da bi žolčne soli kakorkoli vplivale na celice kvasovk, ki so bile uporabljeni v nadaljevanju, so bili vzorci razgrajeni z zgolj 25-imi % žolčnega izvlečka (Tibäck in sod., 2009). Vzorci so bili izpostavljeni stalni temperaturi 37 °C in stresanju 180 minut na orbitalnem stresalniku pri 400 obr./min. Vzporedno s hidrolizati se je pripravil tudi slepi vzorec, ki je namesto proteinskih hidrolizatov vseboval zgolj prebavni sok.

Končni vzorci (pred in po prebavi) so bili shranjeni pri temperaturi -80 °C do nadalnjih študij, ki so bile opravljene na kvasovki vrste *Saccharomyces cerevisiae* kot modelnemu organizmu.

3.2.2 Delovni mikroorganizem

Uporabili smo kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

V sklopu raziskovalnega dela smo uporabili tri dni staro kulturo, ki smo jo hrаниli na petrijevih ploščah s trdnim YEPD gojiščem v inkubatorju pri 28 °C.

3.2.3 Gojišča

Trdno gojišče YEPD

Trdno gojišče YEPD smo uporabili za hrانjenje in precepljanje kulture kvasovk *S. cerevisiae*.

Preglednica 2: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993).

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
agar (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
dodamo dH ₂ O do 1000 ml		

Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in ga v sterilni komori aseptično razlili v petrijevke.

Tekoče gojišče YEPD

Tekoče gojišče smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kulture do začetka stacionarne rasti.

Preglednica 3: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas in Lawrence, 1993).

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
kvasni ekstrakt (Biolife)	10 g	1 % (w/v)
pepton (Biolife)	20 g	2 % (w/v)
glukoza (Merck)	20 g	2 % (w/v)
dodamo dH ₂ O do 1000 ml		

Gojišče smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na sobno temperaturo.

3.2.4 Raztopine in reagenti

3.2.4.1 Kultivacija kvasovk *S. cerevisiae*

PBS pufer (ang. Phosphate Buffer Saline)

Pufer smo uporabili za vzdrževanje kulture v stacionarni fazi rasti.

Preglednica 4: Sestava PBS pufra.

Sestavina		Količina	Končna koncentracija
1 tabletka (Oxoid)	NaCl	8,0 g	8 % (w/v)
	KCl	0,2 g	0,2 % (w/v)
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g	1,15 % (w/v)
	KH ₂ PO ₄	0,2 g	0,2 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 100 ml			

PBS pufer smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,1 bar.

3.2.4.2 Preverjanje *in vivo* antioksidativne učinkovitosti proteininskih hidrolizatov

Kalijev fosfatni pufer (pH = 7,8)

50 mM kalijev fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo bazičnemu 50 mM kalijevemu hidrogenfosfatu (K₂HPO₄) dodajali kisli 50 mM kalijev dihidrogenfosfat (KH₂PO₄), dokler nismo dosegli vrednosti pH 7,8. Kalijev fosfatni pufer smo sterilizirali 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,1 bar. Pred vsako uporabo smo pufer dodatno sterilizirali s filtriranjem preko sterilnega membranskega filtra z velikostjo por 0,2 µm.

Preglednica 5: Priprava 50 mM KH₂PO₄.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
KH ₂ PO ₄ (Merck)	3,40 g	50 mM
dodamo ddH ₂ O do 500 ml		

Preglednica 6: Priprava 50 mM K₂HPO₄.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
K ₂ HPO ₄ (Merck)	4,35 g	50 mM
dodamo ddH ₂ O do 500 ml		

2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA)

Preglednica 7: Sestava 1 mM založne raztopine H₂DCFDA.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
H ₂ DCFDA (Sigma)	0,0049 g	1 mM
96 % etanol (Merck) do 10 ml		

Uporabili smo sveže pripravljeno 1 mM raztopino H₂DCFDA.

3.2.4.3 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti

Komplet "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay" (Promega)

Za določanje celične energijske metabolne aktivnosti smo uporabili komplet "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay" (Promega).

Rekonstituiran reagent (pufer + substrat) je stabilen 8 ur na sobni temperaturi, 4 dni pri T = 4 °C, 1 teden pri T = - 20 °C in 1 mesec pri T = - 70 °C, pri čemer izgubi manj kot 20 % svoje aktivnosti. Reagent smo shranjevali pri -80 °C ter ga 15 minut pred uporabo segreli na sobno temperaturo.

3.2.4.4 Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov

Komplet "Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit" (Calbiochem)

"Cytosol/mitochondria fractionation" komplet (Calbiochem) je vseboval:

- 5x citosolni ekstrakcijski pufer (CP) - pripravili smo 1x citosolni ekstrakcijski pufer (redčenje z ddH₂O),
- 1x mitohondrijski ekstrakcijski pufer (MP),
- 500 x raztopino proteaznega inhibitorja in
- 1 M raztopino DTT.

3.2.4.5 Merjenje koncentracije proteinov

Bradfordov reagent

Za merjenje koncentracije proteinov smo uporabili Bradfordov reagent (BioRad), ki smo ga pred uporabo 5x redčili z ddH₂O.

3.2.4.6 2-D elektroforeza

3.2.4.6.1 Izoelektrično fokusiranje (IEF) – 1. dimenzija

Rehidracijski pufer (RP)

Preglednica 8: Sestava rehidracijskega pufra.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	0,5 g	2 % (w/v)
IPG pufer (GE Healthcare)	500 µl	2 % (w/v)
bromfenol modro (Sigma)	1 kristal	0,002 %
dodamo ddH ₂ O do 25 ml		

Rehidracijski pufer smo alikvotirali po 2 ml ter ga hranili na -20 °C. Pred uporabo smo RP odtajali na sobni temperaturi ter ga prelili v novo mikrocentrifugirko, v katero smo predhodno odtehtali 0,006 g ditiotreitol (DTT, Sigma), tako da je končna koncentracija DTT znašala 18 mM.

Mineralno olje (Sigma)

Za prekritje IPG trakov smo uporabili mineralno olje (Sigma).

Trakovi z imobiliziranim pH gradientom-IPG trakovi (pH 4-7, dolžina 13 cm) (GE Healthcare)

3.2.4.6.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE) – 2. dimenzija

Osnovni pufer za uravnovešenje

Preglednica 9: Sestava osnovnega pufra za uravnovešenje.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl (pH = 8,8)	5,0 ml	75 mM
sečnina (urea) (Sigma)	36,0 g	6 M
glicerol (Sigma)	30,0 ml	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2,0 g	2 % (w/v)
bromfenol modro (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 100 ml		

Osnovni pufer za uravnoveženje smo alkotirali po 40 ml ter ga hranili na -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi.

Pufer za uravnoveženje I smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,2 g DTT in ga raztopili v 20 ml osnovnega pufra za uravnoveženje. Pufer za uravnoveženje II smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,96 g jodacetamida (JAA) in ga raztopili v 20 ml osnovnega pufra za uravnoveženje.

SDS elektroforezni pufer

Preglednica 10: Priprava 5x SDS elektroforeznega pufra.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	15,0 g	260 mM
glicin (Merck)	72,0 g	960 mM
SDS (Sigma)	5,0 g	0,5 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

Raztopine za pripravo ločilnega gela

Preglednica 11: Priprava 1,5 M raztopine Tris-HCl (pH = 8,8)

Sestavina	Količina
Tris-baza (Sigma)	72,6 g
ddH ₂ O	do 300 ml
koncentrirana HCl	do pH = 8,8
ddH ₂ O	do 400 ml

Preglednica 12: Sestava 10 % (w/v) raztopine SDS.

Sestavina	Količina
SDS (Sigma)	10,0 g
ddH ₂ O do 100 ml	

Preglednica 13: Sestava 10 % (w/v) raztopine APS.

Sestavina	Količina
APS (Sigma)	0,1 g
dodamo ddH ₂ O do 1 ml	

Vedno pripravimo svežo raztopino APS ali pa svežo raztopino alkotiramo in hranimo pri T = -20 °C.

Ločilni gel z debelino 1 mm

Preglednica 14: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm.

Sestavina	Količina za 2 gela
akrilamid 30 % (w/v) / bisakrilamid 0,8 % (w/v)	15,7 ml
1,5 M raztopina Tris-HCl (pH = 8,8)	9,8 ml
10 % raztopina SDS	0,4 ml
ddH ₂ O	13 ml
10 % raztopina APS	195 µl
TEMED	13 µl

Raztopini APS in TEMED dodamo k raztopini po predhodnem 10-minutnem razplinjevanju v ultrazvočni kopeli.

Agarozna raztopina

Preglednica 15: Sestava agarozne raztopine.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
agaroza (Sigma)	0,5 g	0,5 % (w/v)
1x SDS elektroforezni pufer	100 ml	
Bromfenol modro	1 kristalček	

Bromfenol modro smo dodali raztopini šele, ko smo jo, zaradi lažjega razapljanja agaroze, prehodno segreli v mikrovalovni pečici. Raztopino smo razdelili v centrifugirke (po 11 ml) in jo hranili na sobni temperaturi 1 mesec.

3.2.4.6.3 Barvanje gelov

Fiksacijska raztopina

Preglednica 16: Sestava fiksacijske raztopine.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	500 ml	50 % (v/v)
100 % ocetna kislina (Merck)	70 ml	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

Barvilo SYPRO® Ruby (Invitrogen)

Za barvanje gelov smo uporabili barvilo SYPRO® Ruby proizvajalca Invitrogen.

Raztopina za razbarvanje

Preglednica 17: Sestava raztopine za razbarvanje.

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
100 % metanol (Merck)	100 ml	10 % (v/v)
100 % ocetna kislina (Merck)	70 ml	7 % (v/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 ml		

3.2.5 Laboratorijska oprema, aparature in pripomočki

Pri delu smo za doseg končnih rezultatov poleg standardne laboratorijske opreme uporabljali različne aparature in bioinformacijska orodja (podrobnejši seznam je naveden v naslednjih točkah).

3.2.5.1 Priprava gojišč, raztopin in regentov

- žlička za odmerjanje vhodnih sestavin
- 2000-ml steklena čaša
- 500-ml steklenica z zamaškom
- tehnicka Sartorius excellence
- tehnicka PS 1200/C/2 (Radwag)
- magnetno mešalo MM-540 (Tehnicka Železniki)
- magneti
- parni sterilizator – avtoklav (Sutjeska)
- gorilnik
- petrijeve plošče (Golias)
- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)
- inkubator IG 150 (Jouan)
- pH meter Seven multi (Mettler Toledo)

3.2.5.2 Inokulacija, kultivacija in inkubacija kvasovk *S. cerevisiae*

- 1000-ml erlenmajerice s stransko roko in enim utorom (Shot Duran)
- 100-ml erlenmajerice s stransko roko in enim utorom (Borosilicat)
- 500-ml erlenmajerice s stransko roko (Simex)
- 100-ml merilni valj

- 50-ml merilni valj
- avtoklavirni trak
- aluminijasta folija
- penasti zamaški (Daibo)
- gorilnik
- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)
- cepilne zanke za enkratno uporabo (Golias)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- spektrofotometer MA 9150 (Iskra)
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- centrifuga 322A (Tehtnica)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- inkubator IG 150 (Jouan)

3.2.5.3 Določanje znotrajcelične oksidacije

- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)
- 2-ml mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- 50-ml falkonke (TPP)
- avtomatske pipete (Gilson)
- nastavki za pipete
- centrifuga 5415 C (Eppendorf)
- membranski filter z velikostjo por 0,2 µm (Sartorius)
- stresalnik Multitron (Infors HT)
- vrtičnik TTS2 (Ika)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- črne 96-mestne mikrotitrskie ploščice (Nunc)
- računalniški program Magellan

3.2.5.4 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti

- brezprašna komora LFV P122 (Iskra pio)
- avtomatske pipete (Gilson)

- nastavki za pipete
- multikanalna pipeta (Eppendorf)
- nastavek za multikanalno pipeto (Eppendorf)
- bele 96-mestne mikrotitrskie ploščice (Nunc)
- vrtičnik TTS2 (Ika)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Safire II (Tecan)
- računalniški program Magellan

3.2.5.5 Ekstrakcija citosolnih in mitohondrijskih proteinov

- avtomatske pipete
- nastavki za pipete
- 2-ml mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)
- 12,5-ml plastične falkonke z ovalnim dnom (TPP)
- 0,5 mm cirkonij-kremenčeve kroglice (BioSpec Products)

3.2.5.6 Merjenje koncentracije proteinov v citosolni in mitohondrijski frakciji

- avtomatske pipete
- nastavki za pipete
- 2-ml mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- prozorne 96-mestne mikrotitrskie ploščice (Nunc)
- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- računalniški program Magellan

3.2.5.7 Izoelektrično fokusiranje (IEF) – prva dimenzija

- avtomatske pipete
- nastavki za pipete
- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- centrifuga miniSpin (Eppendorf)

- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- elektroforetska enota Multiphor II (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (Pharmacia Biotech)
- plastična plošča z vdolbinami
- elektrodni trakovi (GE Healthcare)
- elektrodi (anoda in katoda) (Pharmacia Biotech)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

3.2.5.8 Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE) – 2. dimenzija

- steklene plošče (16 x 18 cm)
- distančniki (1 mm)
- nosilci z vijaki
- nosilci
- stiščki
- fen
- papirnate brisačke/brezprašne krpice
- steklena pipeta
- ultrazvočna kopel (Sonis-Pio)
- mikrovalovna pečica (Sanyo)
- SDS-PAGE posoda (zgornja in spodnja) (GE Healthcare)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)
- plastične posode (19,5 x 20,8 cm) (Rotho)
- stresalna plošča (Biometra)

3.2.5.9 Slikanje gela in analiza slike gela

- stresalna plošča (Biometra)
- sistem za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI-HRA16 (Syngene)
- računalniški program za obdelavo gelov 2-D Dymension 2.02 (Syngene)

3.2.5.10 Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje raztopin, reagentov in vzorcev

- hladilnik (4°C) (LTH)
- zamrzovalna omara (-20°C) (LTH)
- zamrzovalna omara (-80°C) (LTH)

3.3 METODE DELA

3.3.1 Priprava kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v stacionarni fazi rasti

Za precepljanje kulture kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* smo uporabili trdno gojišče YEPD (Preglednica 2), za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase pa smo uporabili tekoče gojišče YEPD (Preglednica 3). PBS pufer smo uporabili za vzdrževanje celic kvasovke v stacionarni fazi rasti (Preglednica 4).

3.3.1.1 Priprava trdnega YEPD gojišča in precepljanje delovne kulture

Za pripravo trdnega YEPD gojišča smo naprej v stekleno čašo natehtali vse potrebne sestavine (Preglednica 2) in odmerili volumen destilirane vode, ki je bil potreben do končnega skupnega volumena 1000 ml. V čašo smo dodali magnetno mešalo in pustili na mešalniku toliko časa, da so se sestavine popolnoma raztoplile. Po končanem raztapljanju smo gojišče pretočili v infuzijske steklenice ter jih zaprli z zamaškom. Tako pripravljeno gojišče smo nato avtoklavirali 20 min pri temperaturi 121°C in nadtlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo še precej vroče gojišče prelimi v petrijeve plošče in pustili čez noč, da se je strdilo. Gojišča smo do nadaljnje rabe hranili v temnem in suhem prostoru sobne temperature.

Delovno kulturo *S. cerevisiae* smo precepljali tedensko ob približno istem času ter jo nato hranili v inkubatorju pri 28°C .

3.3.1.2 Priprava tekočega YEPD gojišča in steklovine

Tekoče gojišče YEPD smo pripravili podobno kot trdno gojišče YEPD. Razlika med njima je zgolj v tem, da pri tekočem YEPD gojišču ne dodamo agarja za strjevanje. Za pripravo tekočega gojišča YEPD smo najprej v čašo natehtali vse potrebne sestavine (Preglednica 3) in jim dodali destilirano vodo. Sestavine smo nato popolnoma raztoplili na magnetnem mešalu. Po končanem raztapljanju smo z uporabo merilnega valja dvakrat odmerili po 360 ml tekočega gojišča YEPD in ga prelimi v dve 1000-ml erlenmajerici s stransko roko in 1 utorom. Eno erlenmajerico smo zaprli z zamaškom in pokrili z alu folijo (kasneje je ta služila za inokulacijo kulture), drugo erlenmajerico pa smo pokrili samo z alu folijo (slepi vzorec). Z merilnim valjem smo nato odmerili še dvakrat po 50 ml gojišča in ga prelimi v dve 100-ml erlenmajerici z enim utorom ter ju pokrili z alu folijo.

To gojišče smo nato prav tako avtoklavirali 20 min pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,1 bar.

3.3.1.3 Inokulacija in kultivacija

Za inokulacijo smo vedno uporabili 3 dni staro kulturo *S. cerevisiae* ZIM 2155 na trdnem gojišču YEPD. Inokulacija je potekala v brezprašni komori, pri čemer smo uporabili aseptično tehniko. S cepilno zanko smo kulturo postopoma dodajali v tekoče gojišče do optične gostote pri 650 nm (OD_{650}) 0,95. Ko smo dosegli želeno absorbanco, smo nacepili 40 ml suspenzije v 360 ml gojišča ter ponovno izmerili optično gostoto pri 650 nm. Temu je sledila 60-urna kultivacija celic kvasovk na stresalniku pri 28 °C in 220 obr./min do začetka stacionarne faze rasti.

3.3.1.4 Priprava in prenos kulture v pufer PBS

Pufer PBS smo pripravili tako, da smo v enem litru bidestilirane vode raztopili 10 tabletk PBS (Preglednica 4). Ena tabletka namreč zadostuje za pripravo 100 ml PBS.

V čašo z desetimi tabletkami smo nalili približno 800 ml bidestilirane vide in jo postavili na mešalo ter pustili toliko časa, da so se tabletke popolnoma raztopile. Nato smo vso raztopino prelili v 1000-ml bučko ter prilili bidestilirano vodo do 1000 ml. Pufer smo dobro premešali in ga avtoklavirali 20-minut pri temperaturi 121 °C in nadtlaku 1,1 bar. Avtoklaviran pufer smo nato do nadaljnje uporabe hranili v inkubatorju na 28 °C.

Po 60-urni inkubaciji kulture na stresalniku smo nadaljevali s prenosom v pufer PBS.

50 ml brozge smo centrifugirali 3 minute pri 4000 obr./min, odlili supernatant in biomaso 2x sprali s puferom PBS. Po drugem izpiranju smo biomasi dodali 50 ml pufera PBS, celice resuspendirali in prenesli 40 ml suspenzije k 160 ml pufera PBS, ogretega na 28 °C, ki smo ga pripravili v 500-ml erlenmajerici s stransko roko in 1 utorom. Temu je sledila inkubacija kvasne suspenzije na stresalniku nadalnjih 96 ur pri 28 °C in 220 obr./min.

3.3.2 Tretiranje kvasne suspenzije s proteinskimi hidrolizati

Po 96-ih urah inkubacije smo 10 ml celične suspenzije prenesli v 50-ml centrifugirke in dodali določen volumen proteinskega hidrolizata, da smo dosegli koncentracijo v suspenziji 1,0 mg/ml (Preglednica 18). Volumen dodanega slepega vzorca je bil enak volumnu dodanega proteinskega hidrolizata. Spleti vzorec pred prebavo je predstavljal voda, po prebavi pa prebavni sok. Po dodatku vzorcev smo centrifugirke zaprli z gobastimi zamaški in jih inkubirali 2 uri na stresalniku pri 220 obr./min in temperaturi 28 °C.

Preglednica 18: Dodani volumni vzorcev proteinskih hidrolizatov za tretiranje kulture.

Vzorec	Začetna koncentracija	Dodan volumen vzorca v celično suspenzijo	Končna koncentracija vzorca v celični suspenziji
Proteinski hidrolizati polenovke (pred prebavo) (PHOPR)	32,31 mg/ml	309,5 µl	1,0 mg/ml
Proteinski hidrolizati polenovke (po prebavi) (PHPOPO)	10,06 mg/ml	994,04 µl	1,0 mg/ml
Proteinski hidrolizati piščanca (pred prebavo) (PHPIPR)	34,44 mg/ml	290,4 µl	1,0 mg/ml
Proteinski hidrolizati piščanca (po prebavi) (PHIPO)	10,44 mg/ml	957,9 µl	1,0 mg/ml

3.3.3 Določanje znotrajcelične oksidacije celic

Znotrajcelično oksidacijo celic kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* smo določali z barvilom 2',7'-diklorodihidrofluorescein (H_2DCF), ki reagira z oksidanti po metodi, ki so jo opisali Jakubowski in sod. (2000). Spojino smo celičnim suspenzijam dodali v obliki diacetat estra 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H_2DCFDA), ki zaradi svoje nepolarnosti lažje prodira skozi plazemske membrane celic. Znotraj celic nespecifične esteraze H_2DCFDA deacetilirajo do H_2DCF , ki je bolj polaren, zaradi česar ne more prehajati skozi membrane in se posledično zadrži v celicah. Ob prisotnosti ROS se H_2DCF oksidira v diklorofluorescein (DCF), ki fluorescira, kar služi za indikacijo znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in sod., 2000).

Po končanem 2-urnem tretiranju celic smo iz vsake 50-ml centrifugirke odpipetirali 2 ml celične suspenzije, jo prenesli v 2-ml centrifugirke ter centrifugirali 4 minute pri 14000 obr./min. Po centrifugiranju smo odstranili supernant, sedimentu pa dodali 2 ml 50 mM filtriranega kalijev fosfatnega pufra ($pH = 7,8$) ter suspenzijo dobro resuspendirali. 100 µl suspenzije celic smo nato prenesli v 890 µl kalijevega fosfatnega pufra za merjenje OD pri 650 nm ter inkubirali 5 minut pri 28 °C. Po končani inkubaciji smo dodali 10 µl 1 mM raztopine sveže pripravljenega H_2DCFDA . Vzorce smo nato inkubirali dalje na stresalniku v temi pri 28 °C, 20 minut. Po končani inkubaciji smo vzorce v štirih ponovitvah po 200 µl nanesli na črno 96-mestno mikrotitersko ploščico. Temu je sledilo 80-minutno merjenje fluorescence s pomočjo čitalca mikrotiterskih plošč Safire II (Tecan) in računalniškega programa Magellan. Valovna dolžina vzbujevalne svetlobe je znašala 488 nm, emijske pa 520 nm. Rezultate smo predstavili kot relativne vrednosti (fluorescenčna intenziteta/optična gostota; F/OD) glede na pripadajoče slepe vzorce (tretirana kultura z ustreznim slepim vzorcem).

3.3.4 Določanje celične energijske metabolne aktivnosti

Za določanje celične energijske metabolne aktivnosti smo uporabili komplet "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay" (Promega), ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca ter alikvote hrаниli v zmrzovalni skrinji na -80 °C. Komplet omogoča določanje števila živih celic v kulturi in temelji na kvantitativnem določanju prisotnih ATP molekul, ki so indikator metabolno aktivnih celic. Celotno število prisotnih ATP molekul je premo sorazmerno neposredno s številom živih celic v kulturi in intenziteti oddane luminiscence (Promega, 2007).

Pred uporabo smo alikvote komercialnega kompleta "BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay" najprej segreli na sobno temperaturo. V jamico bele 96-mestne mikrotitrskie ploščice smo nato v 4-ih ponovitvah nanesli po 100 µl tretirane celične suspenzije, dodali 100 µl reagenta in premešali. Po 5-ih minutah smo na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan) s pomočjo računalniškega programa Magellan izmerili luminiscenco. Rezultate smo predstavili kot relativne vrednosti luminiscence/OD₆₅₀ glede na pripadajoče slepe vzorce (tretirana kultura z ustreznim slepim vzorcem).

3.3.5 Ekstrakcija mitohondrijskih proteinov

Dvo-urnemu tretiranju celic kvasovk je sledilo pobiranje vzorcev za ekstrakcijo mitohondrijskih proteinov. Centrifugirali smo 2x 20 ml celične suspenzije, in sicer 3 minute pri 4000 obr./min. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, celice pa sprali z 10 ml PBS pufra, ki smo ga predhodno ogreli na 28 °C. Nato smo celično suspenzijo ponovno centrifugirali 3 minute pri 4000 obr./min in po centrifugiranju supernatant odlili. Celice smo po končanem postopku zamrznili v tekočem dušiku pri -196 °C in jih do uporabe rabe hrаниli v zmrzovalni skrinji na -80 °C.

Mitohondrijske proteine smo ekstrahirali z uporabo kompleta »Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit« (CalBiochem). Vzorce, ki smo jih zamrznjene hrаниli na temperaturi -80 °C, smo najprej postopoma odtalili na ledu. V vmesnem času smo pripravili 1x citosolni ekstrakcijski pufer (CP), ki smo ga pripravili z redčenjem 5x citosolnega ekstrakcijskega pufera z bidestilirano vodo. Ko so se vzorci odtalili, smo posameznemu peletu dodali 1250 µl CP, ki je vseboval še 1,25 µl raztopine DTT in 2,5 µl raztopine inhibitorja proteaze. Pelet z dodanim CP smo najprej dobro resuspendirali, nato pa smo ga prenesli v 12,5-ml centrifugirko z ovalnim dnem ter mu dodali 5 žličk cirkonij-kremenčevih kroglic. Vzorce smo nato homogenizirali z mešanjem na vrtičniku 5x po 1 minuto z vmesnimi eno-minutnimi inkubacijskimi intervali na ledu. Sledilo je centrifugiranje 20 minut pri temperaturi 4 °C in 800 g. Supernatant smo prenesli v svežo centrifugirko in ga centrifugirali še 30 minut (4 °C, 10000 g). V tem koraku je prišlo do ločitve med citosolno in mitohondrijsko frakcijo, zato smo pelet obdržali, saj je ta predstavljal mitohondrijsko frakcijo, supernatant pa prenesli v svežo centrifugirko ter ga centrifugirali še dodatnih 20

minut (4 °C, 20000 g) – citosolna frakcija. Pelet, ki je predstavljal mitohondrijsko frakcijo, smo nato s povlekom pipete resuspendirali v 1 ml CP brez dodanega inhibitorja proteaze in DTT ter ga nato centrifugirali 10 min pri 10000 g in 4 °C. Postopek spiranja smo ponovili še enkrat. Po zadnjem spiranju smo mitohondrijski pelet raztopili v 50 µl mitohondrijskega ekstrakcijskega pufra (MP), ki smo mu predhodno dodali 0,1 µl inhibitorja proteaze in 0,05 µl raztopine DTT. Najprej smo raztopili en pelet (iz 20 ml suspenzije) ter nato raztopino prenesli k drugemu peletu. Temu je sledilo merjenje koncentracije proteinov. Tako pridobljene mitohondrijske frakcije smo do nadaljnje uporabe hranili v zamrzovalni omari na temperaturi -80 °C.

3.3.6 Merjenje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov v ekstraktih oz. frakcijah smo določili kolorimetrično po Bradford metodi na podlagi umeritvene krivulje govejega serumskega albumina (BSA). Metoda temelji na vezavi barvila Coomassie Brilliant Blue G-250 preko elektrostatskih in v manjši meri hidrofobnih interakcij na molekule proteina, pri čemer se rdeče obarvan kompleks spremeni v modro obarvan, hkrati pa se s tem spremeni tudi absorpcijski maksimum barvila iz 465 nm na 595 nm (Bradford, 1976).

V jamice prozorne mikrotiterske ploščice smo prenesli 4 µl ustreznih redčenih frakcij in dodali 196 µl Bradfordovega reagenta, ki smo ga pripravili tako, da smo originalni koncentrat (Biorad Protein Assay) 5x razredčili z bidestilirano vodo, in dobro premešali. Po 5-ih minutah inkubacije na sobni temperaturi smo nato na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan) s pomočjo programske opreme Magellan izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Koncentracijo proteinov smo izračunali s pomočjo enačbe umeritvene krivulje (Priloga 1).

3.3.7 Dvo-dimenzionalna poliakrilamidna gelska elektroforeza (2-D PAGE)

2-D PAGE je ena od osnovnih tehnik proteomike namenjena ločevanju proteinov, ki sta jo kot prva neodvisno razvila O'Farrell (1975) in Klose (1975), v naslednjih desetletjih pa so temu sledile različne modifikacije in izpopolnjevanja.

Kot že samo ime pove, ločevanje proteinov poteka v dveh dimenzijah. Prvo dimenzijo predstavlja izoelektrično fokusiranje, kjer se proteini med sabo ločijo glede na svojo izoelektrično točko. Drugo dimenzijo predstavlja poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS PAGE), kjer se proteini ločijo še glede na njihovo molekulsko maso.

3.3.7.1 Izoelektrično fokusiranje – 1. dimenzija

Proteine najprej z izoelektričnim fokusiranjem ločimo glede na njihovo izoelektrično točko (pI). Protein v električnem polju potuje toliko časa, dokler ne dospe v področje gela, kjer je pH natančno enak vrednosti njegove izoelektrične točke (pI).

Proteini so namreč zaradi aminokislin lahko neto pozitivno ali negativno nabiti ali nevtralni, kar se spreminja v odvisnosti od pH njihovega okolja. Med fokusiranjem se premikajo pod vplivom električnega polja v traku z imobiliziranim pH gradientom (IPG). Gre za trak, prepojen z zaporedjem amfolitov. V tem času postajajo proteini s sprejemanjem oziroma oddajanjem protonov vedno manj nabiti, dokler se ne ustavijo v točki, kjer je njihov neto naboj 0 (število pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov je izenačeno s številom negativno nabitih) (Kočevar in Komel, 2008). Ta točka predstavlja njihovo izoelektrično točko.

3.3.7.1.1 Priprava vzorcev za nanos na IPG trakove

Pri pripravi vzorcev smo glede na koncentracije proteinov najprej določili volumne posameznih vzorcev, v katerih je bila masa proteinov 100 µg. Dobljenim volumnom smo nato dodali toliko rehidracijskega pufra (Preglednica 8), da je končni volumen vzorca in RP (rehidracijskega pufra) znašal 250 µL.

Rehidracijski pufer sestavljajo urea, tiourea, neionski detergent CHAPS, DTT, IPG pufer, bromfenol modro. Urea denaturira proteine in izboljša njihovo topnost. Topnost proteinov, predvsem hidrofobnih, poveča tudi tiourea. CHAPS je neionski detergent, ki prav tako poveča topnost proteinov ter preprečuje njihovo agregacijo. Ker nima naboja, ne vpliva na potovanje proteinov med izoelektričnim fokusiranjem. IPG pufer omogoča boljšo separacijo proteinov, zlasti pri večjih nanosih, poveča topnost proteinov, omogoča enakomerno prevodnost vzdolž pH gradiента, ne da bi s tem vplival na izoelektrično fokusiranje ali obliko gradienta (GE Healthcare, 2004).

3.3.7.1.2 Rehidracija IPG trakov

Pri delu smo uporabili trakove z imobiliziranim pH gradientom (pH=4-7) dolžine 13 cm, ki smo jih hranili na T = - 20 °C. Za rehidracijo smo uporabili podstavek z režami in pokrovom. Podstavek smo najprej uravnali v ravnotežno pozicijo in nato v sredino reže odpipetirali 250 µl raztopine za rehidracijo trakov z raztopljenimi proteini. Nato smo s traku z anodnega konca (+) odstranili plastično folijo, ki je prekrivala gel in ga previdno brez tvorbe mehurčkov položili z gelom navzdol v režo ter prekrili s 3 ml mineralnega olja, s čimer smo preprečili kristalizacijo uree in evaporacijo vode iz rehidracijskega pufra. Ploščo za rehidracijo IPG trakov smo nato pokrili s pokrovom ter pustili, da je rehidracija tekla čez noč.

3.3.7.1.3 Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Po končani rehidraciji smo trakove najprej pomočili v bidestilirano vodo (v valju), na hitro sprali z bidestilirano vodo in jih osušili na papirnatih brisačkih, obrnjene z gelom navzgor. S tem smo odstranili kristale uree in proteine, ki so večji od 120 kDa in med rehidracijo v gel niso vstopili.

Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C med potekom IEF, smo vertikalno nanesli 4x po 1 ml mineralnega olja, čezenj postavili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, tako da je anodni priključek bil nameščen na vrhu plošče, ter vanj nalili 10 ml mineralnega olja. V podstavek smo nato dali plastično ploščo z vdolbinami. V vdolbine plastične plošče smo nato položili osušene trakove z gelom navzgor in pozitivnim (+) koncem na zgornjem delu plošče. Nato smo odrezali dva enako dolga elektrodnega trakova, ju namočili v bidestilirani vodi, na hitro osušili na papirnatih brisačkih ter ju položili pravokotno na oba konca trakov. Čeznju smo nato namestili elektrodi in trakove prelili s približno 150 ml mineralnega olja ter pokrili s pokrovom. Ploščo za izoelektrično fokusiranje smo nato priključili na usmernik, na katerem smo nastavili 4-fazni potek izoelektričnega fokusiranja (Preglednica 19). Izoelektrično fokusiranje je s pomočjo termostatskega cirkulatorja potekalo pri temperaturi 20 °C.

Preglednica 19: Prikaz 4. faznega poteka izoelektričnega fokusiranja.

Faza delovanja na usmerilniku	Napetost [V]	Tok [mA]	Čas
1. faza	0-300	≤ 2	1 min
2. faza	300	≤ 2	1 h
3. faza	300-35000	≤ 2	1 h 30 min
4. faza	3500	≤ 2	5 h

Po končanem IEF smo trakove prenesli v plastično mapo in jih shranili v zamrzovalno omaro na temperaturo - 80 °C do izvedbe 2. dimenzije.

3.3.7.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS PAGE) – 2. dimenzija

V 2. dimenziji smo proteine ločevali glede na njihovo molekulsko maso, pri čemer smo uporabili poliakrilamidne gele in anionski detergent natrijev dodecil sulfat (SDS).

S pomočjo analitske metode SDS-PAGE elektroforeze določamo molekulsko maso proteinom in polipeptidom. Metoda temelji na uporabi anionskoga detergenta SDS, ki denaturira proteinske molekule, jih razvije in obda s svojimi molekulami. Ker imajo molekule SDS negativen naboj, imajo tudi vsi denaturirani proteini negativen naboj, velikost naboja pa je odvisna od velikosti proteinske molekule. V električnem toku vse molekule potujejo proti anodi, ki je pozitivno nabita, dolžina njihovega potovanja pa je prenosorazmerna z njihovo velikostjo. Večje molekule potujejo počasneje od manjših, ker jim poliakrilamidni gel nudi večji upor. Tako po določenem času manjše molekule

prepotujejo daljšo razdaljo od katode proti anodi kot večje molekule (Anderluh in sod., 2009).

2. dimenzijo smo izvedli v več zaporednih korakih:

- vlivanje poliakrilamidnih gelov,
- uravnoteženje IPG trakov,
- prenos IPG traku na ločilni gel,
- SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE).

3.3.7.2.1 Vlivanje gelov

Za vlivanje ločilnih gelov je bilo treba najprej sestaviti kalup. Med stekleni plošči velikosti 16x18 cm smo na obeh straneh vstavili distančnika debeline 1 mm ter vse skupaj s stički vpeli v nosilec. Med stekleni plošči smo nato enakomerno vlili 19 ml 12 % poliakrilamidnega ločilnega gela (Preglednica 14). Nato smo v kalup na zgornjo površino gela previdno dolili še tanko plast bidestilirane vode (približno do 1 cm pod zgornjim robom). S tem smo gelu preprečili stik s kisikom in mu omogočili enakomerno polimerizacijo. S tem smo hkrati dosegli tudi ravno zgornjo stranico gela, ki bi se v nasprotnem primeru nagubala. Po končani polimerizaciji smo bidestilirano vodo odlili, površino gela pa dobro osušili s fenom.

3.3.7.2.2 Uravnoteženje IPG trakov

Trakove smo vzeli iz zamrzovalne omare in najprej namočili v 4 epruvete z 1xSDS elektroforeznim pufrom (Preglednica 10), ter se s tem znebili ostankov mineralnega olja. Nato smo trakove prenesli v epruvete z 10 ml pufra za uravnoteženje I in jih položili na stresalno ploščo za 15 minut. Iz pufra za uravnoteženje I smo jih nato prenesli v epruvete z 10 ml pufra za uravnoteženje II in jih ponovno za 15 minut položili na stresalno ploščo. Po uravnoteženju smo trakove prenesli na brezprašne krpice (z gelom navzgor) in počakali, da so se osušili.

3.3.7.2.3 Prenos IPG traku na ločilni gel

Na površino ločilnega gela smo nalili agarozno raztopino (Preglednica 15), ki smo jo predhodno segreli na 100 °C. Nato smo trak spustili v režo med steklenima ploščama in ga s pomočjo igle potisnili do ločilnega gela. Strnjena agariza je tako fiksirala gel.

3.3.7.2.4 SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE).

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo kalup s stički namestili v zgornjo posodo za SDS-PAGE ter odstranili podstavek. Nato smo kalup z zgornjo posodo prenesli v spodnjo

posodo za SDS PAGE ter obe posodi napolnili z 1x SDS elektroforeznim pufom. Spodnjo posodo smo nato pokrili s pokrovom ter obe posodi povezali z usmernikom. Elektroforetski sistem smo priključili tudi na hladilni sistem ter tako zagotovili konstantno temperaturo 20 °C. Potovanje vzorcev v smeri anode je potekalo najprej 15 minut pri konstantnem toku 20 mA/ in nato pri konstantnem toku 40 mA/gel, dokler barvilo bromfenol modro ni doseglo spodnjega roba gela (približno 1 ura in 35 minut). Nato smo SDS-PAGE ustavili, previdno razstavili kalup in gel označili z zarezami (vsak gel je imel svojo specifično zarezo), zato da kasneje pri barvanju gelov ne bi prišlo do morebitnih zamenjav med geli.

3.3.7.3 Barvanje gelov

Za barvanje gelov smo uporabili barvilo SYPRO® Ruby.

V kolikor smo barvali samo en gel, smo za barvanje uporabili 200 ml raztopine, če smo barvali v isti plastični posodi dva gela hkrati, pa smo uporabili 300 ml raztopine. Prvi korak barvanja gelov je fiksacija na stresalni plošči s pomočjo fiksacijske raztopine (Preglednica 16). S fiksacijo onemogočimo difuzijo proteinov ter odstranimo odvečne ione in SDS. Po fiksaciji smo vso fiksacijsko raztopino v posodi odlili. Temu je sledilo prekonočno barvanje z barvilm SYPRO® Ruby, ki je občutljivo na svetlobo, zato smo ob vsaki uporabi barvila delali v temi, posode za barvanje gelov pa ovili v alu folijo in tako gele skupaj z barvilm še dodatno zaščitili pred vdorom svetlobe. Po končanem koraku barvanja smo gele prenesli v sveže posode in dodali 200 ml ali 300 ml raztopine za razbarvanje (Preglednica 17). Postopek razbarvanja smo izvedli dvakrat po 30 minut na stresalni plošči. Postopku razbarvanja je sledilo izpiranje z bidestilirano vodo. Izpirali smo prav tako v zaprtih posodah na stresalnih plošči, 3x po 5 minut.

Preglednica 20: Postopek barvanja gelov.

Korak	Raztopina	Čas
fiksacija	fiksacijska raztopina (Preglednica 16)	2x 30 min
barvanje	barvilo SYPRO® Ruby	preko noči
razbarvanje	raztopina za razbarvanje (Preglednica 17)	2x 30 min
izpiranje	ddH ₂ O	3x 5 min

3.3.7.3.1 Fotografiranje gelov

Gele smo fotografirali s sistemom za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI HR-Gbox kamero (Syngene).

3.3.7.3.2 Analiza slik gelov

Slike gelov smo analizirali s komercialnim računalniškim programom 2-D Dymension (Syngene). Program omogoča primerjavo več gelov hkrati, hkrati pa omogoča tudi popravke ozadja na slikah in vsebuje filtre za zmanjševanje šuma, med drugim tudi SYPRO® Ruby filter, ki lahko zazna in samodejno odstrani lise, ki so jih povzročili kristali SYPRO® Ruby barvila z adsorbcijo na gel. Pred primerjavo slik posameznih gelov med seboj smo na vseh fotografijah določili območje primerjave oziroma detekcije elektroforetskih lis. V okviru analize smo za primerjavo kot referenčni gel uporabili gel s proteiniskim profilom kvasovke, ki ni bila tretirana s proteinimi hidrolizati, ampak z ustreznimi slepimi vzorci: voda ali prebavni sok. Za posamezen vzorec smo primerjali dva gela, ki sta predstavljala dve biološki ponovitvi. Program 2-D Dymension je nato samodejno zaznal točne pozicije posameznih elektroforetskih lis, jih označil in povezal ujemajoče se 2-D lise, ki jih je nato medsebojno primerjal. Temu je sledilo ročno pregledovanje in preverjanje označenih 2-D lis. Preverili smo, ali so označene 2-D lise ustreznobokrožene in kakšno je ujemanje med posameznimi 2-D lisami na gelih. Za lažji in bolj natančen pregled smo uporabili tudi programsko funkcijo tridimenzionalnega pregleda 2-D lis. Končne rezultate analize gelov program izpiše v obliki preglednice, v kateri so podane vse primerjane 2-D lise in izračunano razmerje normaliziranih volumnov glede na referenčni gel (relativne vrednosti R). Normaliziran volumen predstavlja razmerje med volumnom ene 2-D lise proti celokupnemu volumnu vseh 2-D lis na gelu. Kot diferencialno izražene proteine smo upoštevali tiste proteine, pri katerih je bilo razmerje med normaliziranimi volumni glede na referenčni gel večje od 1,5 in statistično značilno ($p \leq 0,05$).

3.3.7.3.3 Izrezovanje proteininskih lis

Po določitvi diferencialno izraženih proteinov smo nadaljevali izrezovanjem le-teh iz gela. Izbrani gel smo položili na ploščo z UV lučjo in nato z uporabo avtomatske pipete in ustreznou rezanimi nastavki izrezali izbrano 2-D liso.

3.3.7.3.4 Identifikacija proteinov

Identifikacija proteinov je bila opravljena z uporabo masne spektrometrije na Danskem (Technical University of Denmark).

3.3.7.3.5 Zbiranje podatkov s pomočjo podatkovnih baz

Po identifikaciji proteinov je sledilo zbiranje podatkov o identificiranem proteinih s pomočjo spletnih podatkovnih zbirk NCBI in UniProt.

3.3.7.3.6 Statistična analiza rezultatov

Rezultati merjenja znotrajcelične oksidacije in celične energijske metabolne aktivnosti so bili pridobljeni iz dveh bioloških meritev in so statistično obdelani s testom Duncan.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

V okviru diplomske naloge smo preverili vpliv neprebavljenih in *in vitro* prebavljenih proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca na znotrajcelično oksidacijo, celično energijsko metabolno aktivnost in mitohondrijski proteom kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ki smo jo uporabili kot modelni organizem. Celice kvasovk smo za 2 uri izpostavili neprebavljenim in prebavljenim vzorcem proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca v koncentraciji 1,0 mg/ml (v celični suspenziji). Celice smo tretirali tudi z ustreznimi slepimi vzorci. Splei vzorec pred prebavo je predstavljala voda, po prebavi pa prebavni sok.

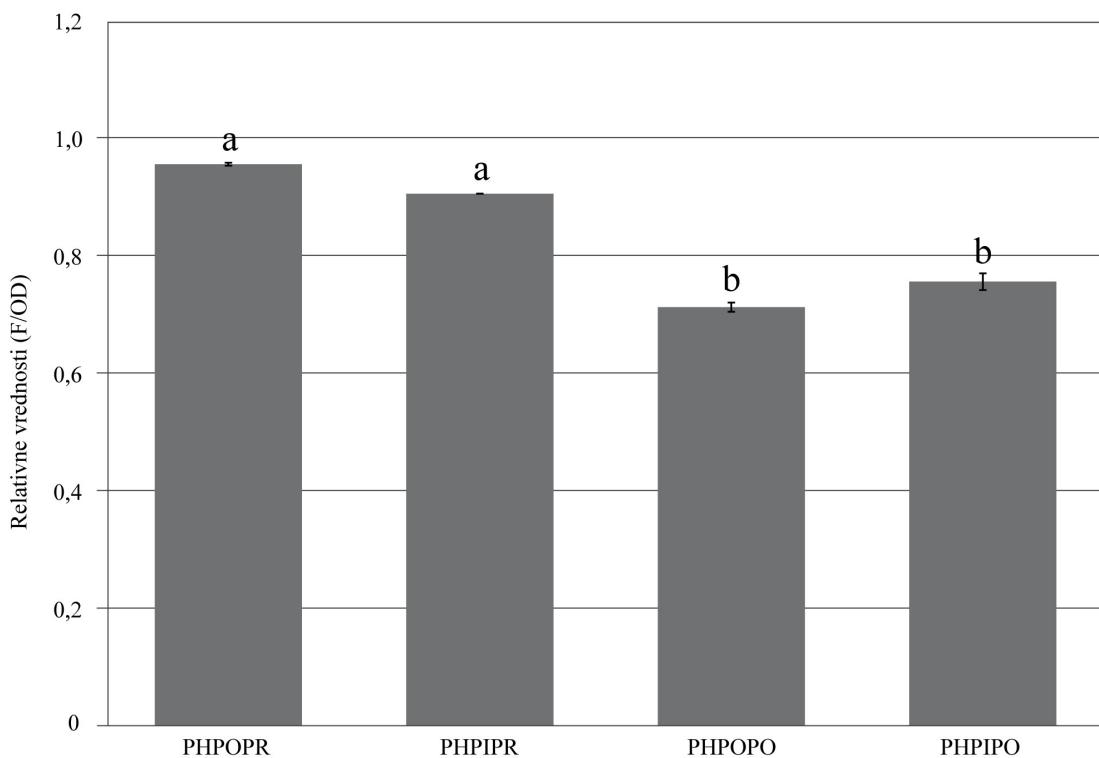
4.1 ANTIOKSIDATIVNO DELOVANJE PROTEINSKIH HIDROLIZATOV IN CELIČNA ENERGIJSKA METABOLNA AKTIVNOST

V številnih predhodnih študijah ribjih proteinskih hidrolizatov je bilo potrjeno njihovo antioksidativno delovanje. Naravno prisotne antioksidativne, kakor tudi encimsko hidrolizirane bioaktivne peptide, so identificirali v različnih vrstah rib (tuna, sardina, modri repak (*Macruronus novaezealandiae*), morski list (*Solea solea*), pacifiški oslič (*Merluccius productus*) in polenovka (*Gadus morhua*), medtem ko je o piščančjih bioaktivnih peptidih z antioksidativnim delovanjem objavljenih bistveno manj študij in razpoložljivih podatkov. Glede na naše zbrane podatke do sedaj še ni bila objavljena nobena študija, ki bi združila primerjavo med proteinskimi hidrolizati ribjih kot tudi perutninskih mišičnih proteinov.

V večini omenjenih študij je bila učinkovitost antioksidativnih peptidov dokazana *in vitro* z lovljenjem DPPH radikala, z reducirajočo močjo antioksidanta, z vezavo kovinskih ionov ali s preučevanjem inhibicije ali zakasnitve lipidne peroskidacije v emulzijskih sistemih in zmletem mesu mišičnih tkiv. Poznavanje slednjih mehanizmov delovanja je namreč zlasti dragoceno na področju živilske industrije, saj v ospredje prihajajo vedno bolj naravne alternative stabilizatorjev v živilih, pri čemer kažejo izredno velik potencial tudi bioaktivni peptidi.

Kljudno *in vitro* dokazom antioksidativne učinkovitosti ni nujno, da so antioksidanti učinkoviti tudi v celicah (Petelinc in sod., 2013; Slatnar in sod., 2012).

Zato smo v okviru diplomskega dela preučili antioksidativno učinkovitost proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca pred in po prebavi v *in vitro* modelu GI z meritvijo znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.



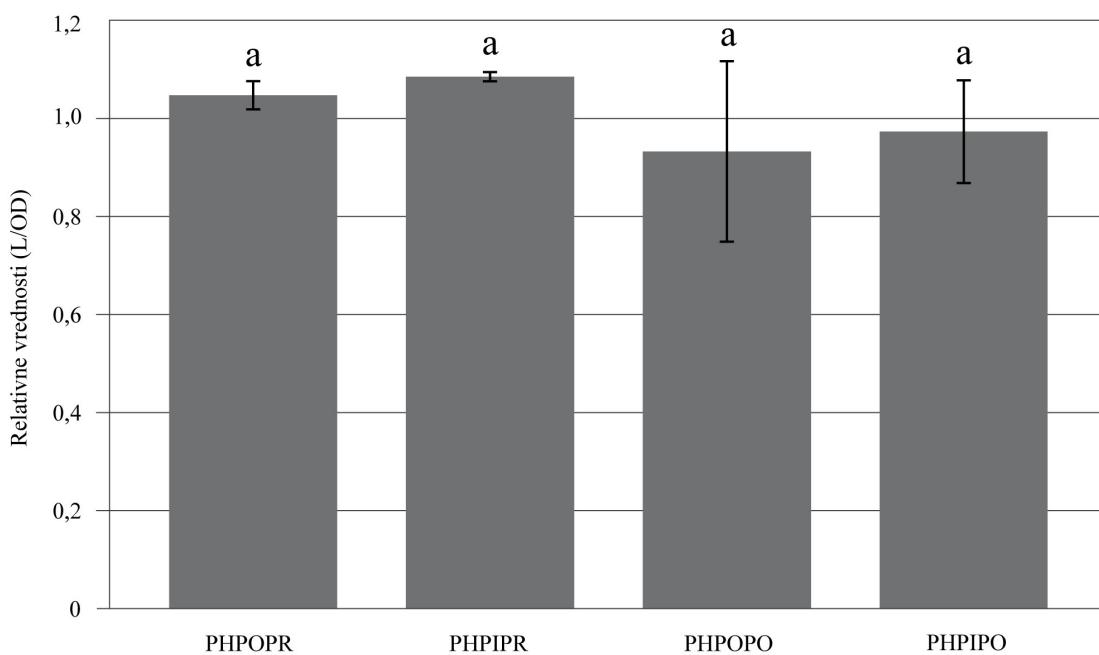
Slika 2: Znotrajcelična oksidacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca. Rezultati so predstavljeni kot povprečne relativne vrednosti (F/OD) \pm sd dveh bioloških ponovitev glede na pripadajoče slepe vzorce. Povprečne relativne vrednosti (F/OD), ki so označene z različnimi črkovnimi indeksi (a, b), so glede na Duncan test statistično značilne ($p \leq 0,05$). PHPOPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPOPO: prebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPO: prebavljeni proteinski hidrolizati piščanca.

Pri celicah, tretiranih z neprebavljenimi proteinskimi hidrolizati, smo v primerjavi s slepim vzorcem (kvasovke izpostavljene vodi) zasledili zmanjšanje znotrajcelične oksidacije zgolj v primeru piščančjega hidrolizata (10-% zmanjšanje) (Slika 2). Rezultati meritve znotrajcelične oksidacije celic, ki so bile izpostavljene prebavljenim proteinskim hidrolizatom, pa so vendarle pokazali večjo stopnjo antioksidativne učinkovitosti tako pri eni kot tudi drugi vrsti hidrolizatov. Pri celicah, tretiranih s prebavljenimi proteinskimi hidrolizati, smo v primerjavi s slepim vzorcem (kvasovke izpostavljene prebavnim sokovom) zasledili zmanjšanje znotrajcelične oksidacije pri obeh vrstah hidrolizatov. Po tretiranju s prebavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke smo zasledili 30-% zmanjšanje znotrajcelične oksidacije, medtem ko je bila ta vrednost pri prebavljenih piščančjih hidrolizatih 25-odstotna, brez ostalih bistvenih razlik med njimi (Slika 2). Če primerjamo vpliv neprebavljenih in prebavljenih proteinskih hidrolizatov z njihovimi pripadajočimi slepimi vzorci, smo glede na meritve znotrajcelične oksidacije, zasledili večjo antioksidativno učinkovitost pri prebavljenih hidrolizatih, kar pomeni, da fiziološko

dogajanje v gastrointestinalnem traktu (modifikacije, hidroliza) prispeva k večji antioksidativni učinkovitosti tako peptidov polenovke kot tudi piščančijih peptidov.

Podobno študijo so izvedli tudi You in sod. (2010), ki so s simulacijo GI določevali spremembe v antioksidativni učinkovitosti ribnih peptidov, pridobljenih iz azijske činklje (*Misgurnus anguillicaudatus*) z encimsko razgradnjo. Rezultati so pokazali, da prehod vzorcev čez gastrointestinalni trakt poveča njihovo aktivnost lovljenja prostih radikalov 2,2-azino-bis (3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) diamonijeve soli (ABTS), reducirajočo moč in kelacijo Cu²⁺ v primerjavi s kontrolo.

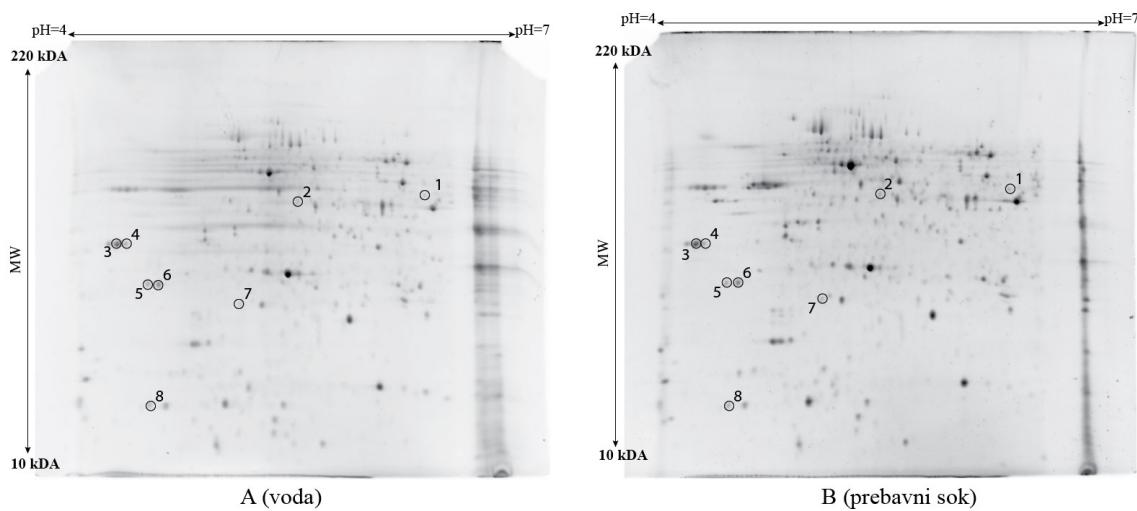
V okviru diplomske naloge smo določevali tudi celično energijsko metabolno aktivnost po izpostavitvi prebavljenim in neprebavljenim proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca. Pri tem nismo zaznali bistvenih razlik niti med vzorci polenovke in piščanca niti med neprebavljenimi in prebavljenimi vzorci (Slika 3), kar tudi dokazuje, da proteinski hidrolizati na kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae* niso delovali citotoksično.



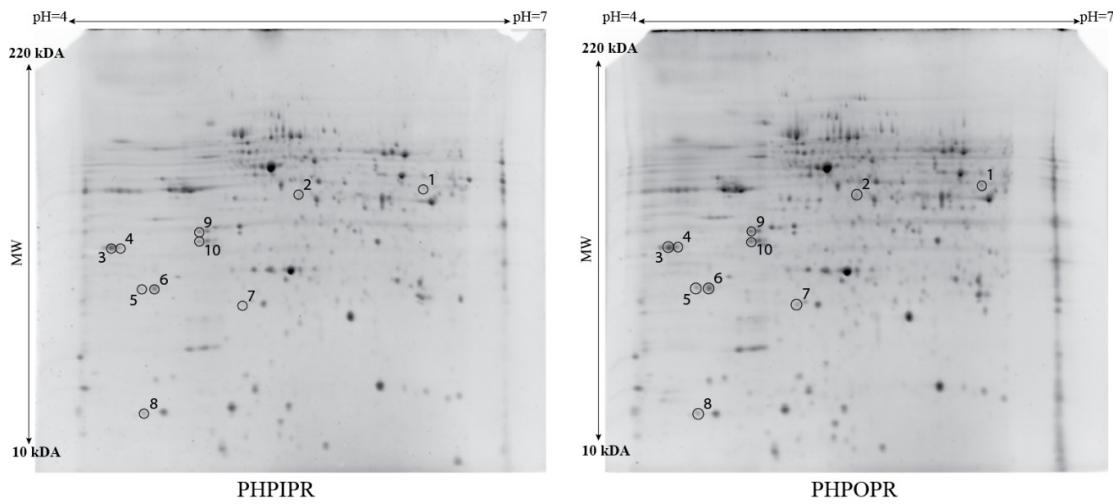
Slika 3: Celična energijska metabolna aktivnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urnem tretiranju z neprebavljenimi in prebavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke in piščanca. Rezultati so izraženi kot povprečne relativne vrednosti (L/OD) ± sd dveh bioloških ponovitev glede na pripadajoče slepe vzorce. Povprečne relativne vrednosti, ki so označene s črkovnim indeksom a, glede na Duncan test niso statistično značilne ($p \leq 0,05$). PHPOPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPR: neprebavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPOPO: prebavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPPIO: prebavljeni proteinski hidrolizati piščanca.

4.2 SPREMENBE PROTEOMA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PO IZPOSTAVITVI PROTEINSKIM HIDROLIZATOM POLENOVKE IN PIŠČANCA

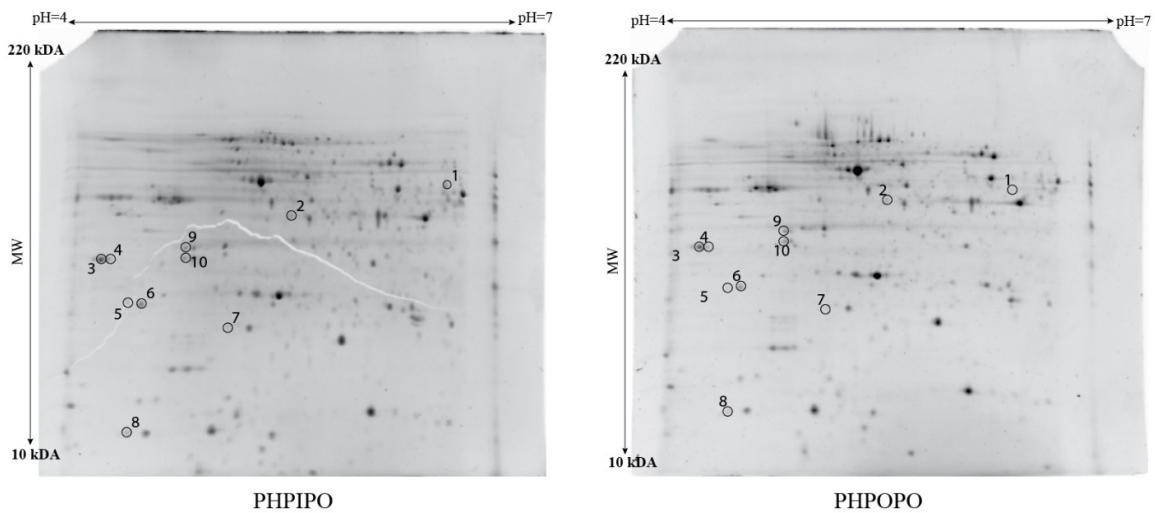
Predhodne študije, med drugim tudi študije, ki so bile opravljene na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, so pokazale, da *S. cerevisiae* je primeren modelni organizem pri preučevanju bioaktivnih komponent na ravni proteoma (Cigut in sod., 2011; Petelinc in sod., 2013; Zakrajšek in sod., 2011). Vpliv neprebaavljenih in prebaavljenih proteinskih hidrolizatov na sintezo proteinov v kvasovki *S. cerevisiae* smo analizirali z uporabo 2-D elektroforeze, čemur je sledila identifikacija diferencialno izraženih proteinov s pomočjo masne spektrometrije. Pri večini identificiranih proteinov smo zaznali znižanje (-) ravni proteina glede na pripadajoče slepe vzorce. Ti proteini so peptidil-prolil *cis/trans* izomeraza (Ppi), elongacijski faktor 1-beta (Efb1), elongacijski faktor 2 (Eft2), homogen translacijsko kontroliran tumorski protein (Tma19), peroksiredoksin (Tsa1) in podenota 6 citokrom c oksidaze. Omenjena proteina Efb1 in Tma19 smo identificirali kar v dveh različnih 2-D lisah, iz česar lahko sklepamo, da gre bodisi za različne izomere teh dveh proteinov, bodisi za posttranslacijske modifikacije ali alternativne oblike odsekov mRNA (Rossignol in sod., 2006), kar bi lahko bilo povezano z njihovo regulacijo. Poleg tega smo opazili, da smo s tretiranjem celic z neprebaavljenimi in prebaavljenimi proteinskimi hidrolizati obe vrst sprožili *de novo* sintezo dveh proteinov Bhm1 in Bhm2, ki v celicah, ki niso bile tretirane, nista bila prisotna.



Slika 4: Proteinski profil mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitvi slepim vzorcem; A: voda, B: prebavni sok



Slika 5: Proteinski profili mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi neprebavljenim proteinskim hidrolizatom piščanca (PHPIPR) in polenovke (PHPOPR).



Slika 6: Proteinski profili mitohondrijske frakcije celičnega ekstrakta kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* po 2-urni izpostavitevi prebavljenim proteinskim hidrolizatom piščanca (PHPPIO) in polenovke (PHPOPO).

Preglednica 21: Razmerji vrednosti normaliziranih volumnov glede na pripadajoče slepe vzorce po izpostavitev proteinskim hidrolizatom in identificirani proteini. PHPPIPR: neprejavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPOPR: neprejavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPPIPO: prejavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPOPO: prejavljeni proteinski hidrolizati polenovke.

Št. 2-D lisce	Razmerje vrednosti normaliziranih volumnov glede na slepi vzorec (voda) pred prebavo		Razmerje vrednosti normaliziranih volumnov glede na slepi vzorec (prebavni sok) po prebavi		Skupni števvek (število ujemajočih se peptidov)	Ime proteina	Pristopna številka v NCBI podatkovni zbirki
	PHPPIPR	PHPOPR	PHPPIPO	PHPOPO			
1	-1,81	-1,10	-1,76	-1,78	158 (6)	Ppi	151941057
2	-1,49	-1,63	-1,19	-1,88	217 (7)	Eft2	6320593
3	-1,49	-1,49	-1,86	-1,75	173 (10)	Efb1	6319315
4	-1,97	-1,43	-2,09	-1,59	157 (4)	Efb1	6319315
5	-2,69	-2,54	-1,51	-3,09	143 (7)	Tma19	6322794
6	-1,43	-1,48	-1,30	-1,77	208 (9)	Tma19	6322794
7	-2,36	-1,53	-2,25	-1,92	238 (4)	Tsa1	6323613
8	-1,46	-2,09	-1,94	-1,86	118 (4)	Cox6	6321842
9	De novo	De novo	De novo	De novo	181 (7)	Bmh2	683696
10	De novo	De novo	De novo	De novo	219 (5)	Bmh1	671634

4.3 IDENTIFIKACIJA PROTEINOV

Da bi bolje razumeli zvišanje (+) oziroma znižanje (-) ravni proteina glede na pripadajoče slepe vzorce, smo s pomočjo pristopne številke NCBI v podatkovni zbirki, preverili funkcije identificiranih proteinov, za kar smo uporabili spletno podatkovno zbirko UniProt oziroma integrirano podatkovno zbirko genske ontologije (ang. Gene Ontology, GO). GO so namreč podatkovne zbirke podatkov, ki na podlagi zbranih podatkov o genskih produktih, omogočajo boljšo anotacijo genov ravno zaradi standardizirane in nadzorovane rabe biološkega besedišča (termini genske ontologije), kar je njihova glavna prednost.

Na do sedaj zbranih spoznanjih smo identificirane proteine opisali z njihovimi molekularnimi funkcijami, posttranslacijskimi modifikacijami, biološko vlogo in celičnimi komponentami (lokacija na nivoju subcelularnih struktur in makromolekul kompleksov).

Preglednica 22: Pregled zbranih podatkov o identificiranih proteinih s pomočjo bioinformacijske podatkovne zbirke UniProt (The Gene Ontology Consortium, 2015).

Ime proteina	Biološka funkcija	Genska ontologija	Molekularna funkcija
PPI Peptidil-prolil <i>cis/trans</i> izomeraze	Pospešijo zvijanje proteinov. Katalizirajo spremembo iz cis v trans konformacijo prolina za nastanek oligopeptida.	<ul style="list-style-type: none"> – Zvijanje proteinov – Peptidil-prolil izomeracija na proteinih 	Peptidil-prolil <i>cis/trans</i> izomeracija
Eft2 Elongacijski faktor 2	V odvisnosti od GTP katalizira translokacijo v ribosomu tekom koraka elongacije pri translaciji	<ul style="list-style-type: none"> – GTP katabolični procesi – Pozitivna regulacija translacijske elongacije 	<ul style="list-style-type: none"> – vezava GTP – GTPazna aktivnost – Vezava rRNA Elongacijski faktor
Efb1 Elongacijski faktor 1	Katalitična podenota gvanin nukleotid izmenjujočega dejavnika (GEF), eEF1B je podenota evkariontskega elongacijskega faktorja 1.	<ul style="list-style-type: none"> – regulacija translacijske terminacije – elongacija translacije 	<ul style="list-style-type: none"> – aktivnost gvanin nukleotid izmenjujočega dejavnika – elongacijski faktor
Tma19 Homologen translacijsko kontroliran tumorski protein	Sodeluje pri sintezi proteinov. Sodeluje pri stabilizaciji mikrotubolov.	<ul style="list-style-type: none"> – Celični odziv na oksidativni stres – Citoplazemska translacija 	/
Tsa1 peroksidoksin	Fiziološko pomemben antioksidant, ki predstavlja encimsko zaščito pred radikali, ki vsebujejo žveplo. Ščiti pred oksidacijskim sistemom, ki vsebuje tiol (vendar ne ščiti pred oksidacijskimi sistemi, ki tiola ne vsebujejo).	<ul style="list-style-type: none"> – Kontrolna točka poškodb DNA – Zaščita DNA – Celična redoks homeostaza – celični odziv na oksidativni stres – Zvijanje proteinov – Replikativno staranje celic – Odziv na hidroperskid 	<ul style="list-style-type: none"> – Vezava na ribosome – Tioredoksin peroksidazna aktivnost – Vezava razvithih proteinov
Cox6 mitohondrijska citokrom c oksidaza, podenota 6	Citokrom c oksidaza, terminalna oksidaza v transportu elektronov v mitohondriju.	<ul style="list-style-type: none"> – Transmembranski transport vodika – Mitohondrijski transport elektronov 	<ul style="list-style-type: none"> – Citokrom c-oksidazna aktivnost – Vezava kovinskih ionov

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 22: Pregled zbranih podatkov o identificiranih proteinih s pomočjo bioinformacijske podatkovne zbirke UniProt (The Gene Ontology Consortium, 2015).

Ime proteina	Biološka funkcija	Genska ontologija	Molekularna funkcija
Bmh2 Protein BMH2		<ul style="list-style-type: none"> – Kontrolna točka poškodb DNA – Iniciacija podvojevanja DNA – Signalna transdukcija Ras proteina – Nastanek akrospor – Biosinteza hitina pri glivičnih tipih celičnih sten – Glikogen metabolni procesi – Negativna regulacija apoptoznih procesov – Negativna regulacija delovanja ubikvitin ligaz v mitozi – Rast pseudohif – Signalna transdukcija pri filamentozni rasti 	<ul style="list-style-type: none"> – Izvorno vezavno mesto DNA – replikacije – Vezava – fososerina
Bmh1 Protein BMH1		<ul style="list-style-type: none"> – Kontrolna točka poškodb DNA – Signalna transdukcija Ras proteina – Nastanek akrospor – Biosinteza hitina pri glivičnih tipih celičnih sten – Glikogen metabolni procesi – Negativa regulacija apoptoznih procesov – Negativna regulacija transkripcije RNA II promotorja – Negativna regulacija delovanja ubikvitin ligaz v mitozi – Rast pseudohif – Signalna transdukcija pri filamentozni rasti 	<ul style="list-style-type: none"> – Izvorno vezavno mesto DNA – replikacije – Vezava – fososerina

4.4 FUNKCIJE IDENTIFICIRANIH PROTEINOV

4.4.1 Elongacijski faktor 1beta (Efb1) in elongacijski faktor 2 (Eft2)

Pri obeh proteinih, elongacijski faktor 1-beta (Efb1) in elongacijski faktor 2 (Eft2), ki sodeljujeta pri sintezi proteinov, je bila zmanjšana njuna raven po izpostavitvi neprebavljenim in prebavljenim proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca.

Sinteza proteinov je kompleksen proces, ki vključuje interakcije med velikim številom faktorjev, ki katalizirajo sestavljanje ribosomov, mRNA in aminoacil-tRNA (Chan in sod., 2004). Uravnavanje teh informacijskih poti je mogoče doseči na več nivojih, vključno z modulacijo translacijskih faktorjev ali njihovo aktivnostjo (Raught in sod., 2000), ribosomalno biogenezo (Ruggero in Pandolfi, 2003) in z interakcijami z malimi RNA molekulami (Nahvi in sod., 2002). Visoko ohranjen protein elongacijski faktor 1-beta je podenota EF-1 kompleksa, ki v odvisnosti od GTP katalizira korak elongacije pri sintezi proteinov. Efb1 igra poglavito vlogo v regulaciji elongacije, saj regenerira GTP, ki je vezan na EF-1 alfa in potreben za vsak nov elongacijski cikel. Nadzor nad delovanjem EF-1 lahko modulira običajno sintezo proteinov. Moldave (1985) je mnenja, da več signalnih transduksijskih poti uporablja EF-1 kot ciljno molekulo za nadzor nad sintezo proteinov. Študije so pokazale tudi, da se EF 1-beta lahko pretvori v fosforilirano obliko, ki pa je kritična za njegovo optimalno delovanje (Nalinanom in sod., 2001).

Evkariontski elongacijski faktor 2 (eEF2) v odvisnosti od GTP povzroči translokacijo nastajajočega proteina z A mesto na P mesto v ribosому. Večinoma delovanje eEF2 uravnavajo specifične eEF2 kinaze s fosforilacijo ali defosforilacijo, za njihovo spremenjeno raven pa so odgovorni različni mehanizmi v evkariontski celici. Poleg tega v celicah obstajajo tudi drugi stimulanti, ki nadzorujejo elongacijo peptidne verige, bodisi z inhibiranjem, bodisi z aktivacijo eEF2. Faza elongacije pri sintezi proteinov običajno v celici porabi veliko energije in aminokislin (Kaul in sod., 2001). Celice kvasovk v stacionarni fazni rasti so neprestano izpostavljene endogeno proizvedenim ROS, ki znotraj celice ves čas napadajo njihove molekule (Sigler in sod., 1999). Znano je, da se celice kvasovk lahko prilagodijo na oksidativni stres s spremembami v izražanju genov, vključno s transkripcijo in translacijo genov, ki kodirajo zapise za antioksidativne obrambne sisteme in druge obrambne mehanizme v celici (Morano in sod., 2012). Med njimi so tudi številni visoko zastopani proteini, ki so del stresnega odgovora, da zagotovijo zaščito pred ROS in s tem preživetje celic (Davidson in sod., 2011).

V celicah, ki so bile izpostavljene proteinским hidrolizatom, smo zaznali zmanjšanje znotrajcelične oksidacije, kar pomeni, da so verjetno ravno peptidi prevzeli vlogo pri vzdrževanju redoks homeostaze. Tako so celice lahko upočasnile sintezo proteinov oksidativnega stresnega odgovora z zniževanjem izražanja elongacijskih faktorjev in tako varčevale z energijo, ki je imajo v stacionarni fazni že tako malo (Zakrajšek in sod., 2011).

Nekatere študije so že pokazale, da elongacijski faktorji predstavljajo ciljno mesto za inhibicijo biosinteze s snovmi, izoliranimi iz različnih naravnih virov. Glikozid in kafeinska kislina, izolirana iz listov melise (*Melissa officinalis*), inhibirata biosintezo proteinov z neposrednim delovanjem na eEF2. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da podenota EF-1 alfa predstavlja ciljno mesto za delovanje kvercetina (Galasinski in sod., 1996). Do podobnih doganj so prišli tudi Llano-Sotelo in sod. (2009), ki so poročali o

nizkomolekularnih peptidih kot inhibitorjih translacije v bakterijskih kot tudi evkariontskih celicah.

Zaviranje sinteze proteinov predstavlja tudi prijemališče nekaterih novih protiglivnih učinkovin. Pri EF2 kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* so ugotovili, da le-ta lahko predstavlja ciljno mesto visoko specifičnih protiglivnih naravnih spojin, kot je npr. sordarin (Domínguez in sod., 1998; Kinsman in sod., 1998). Sordarini, tetraciklične diterpenske učinkovine, stabilizirajo kompleks ribosom/EF2 in tako ustavijo podaljševanje novonastajajoče peptidne verige. Čeprav je glivni EF2 visoko homogen z EF2 drugih evkariontov, se sordarini vežejo le na glivni EF2 (Justice in sod., 1998). V našem primeru ne moremo zaključiti, da proteini hidrolizati polenovke in piščanca izražajo protiglivno delovanje, saj znižanje znotrajcelične oksidacije v našem primeru nakazuje zaščito celic pred celično apoptozo. Za podrobnejše interpretacije in bolj natančne zaključke o vplivu bioaktivnih peptidov na elongacijske procese v celici so potrebne dodatne študije. Poleg tega obstajajo poročila, ki kažejo, da lahko procesi za sintezo proteinov služijo kot ciljna mesta za antikancerogena zdravila, saj se aberacije v sintezi proteinov (npr. povečano število izraženih elongacijskih faktorjev) pogosto povezujejo s pojavom rakavih bolezni (Arora in sod., 2003). Posledično bi bile zanimanja vredne tudi dodatne študije proteininskih hidrolizatov in njihovih vplivov na elongacijske faktorje, predvsem zmanjšanje ravni elongacijskih faktorjev v različnih rakavih celičnih linijah.

4.4.2 Protein Tma19

Neprebavljeni in prebavljeni proteini hidrolizati tako polenovke kot tudi piščanca so povzročili zmanjšano raven Tma19 proteina. Tma19 je kvasni ortolog sesalskemu s translacijo kontroliranemu tumorskemu proteinu TCTP (ang. translationally controlled tumor protein). TCTP je evolucijsko zelo ohranjen protein (Thayanithy in Venugopal, 2005). Primerjalne študije so pokazale, da je 50 % aminokislin homolognih njegovim najbolj oddaljenim ortologom v višjih organizmih (Rinnerthaler in sod., 2006). Prvotno so ga odkrili v človeških tumorskih celicah, od koder izvira tudi njegovo poimenovanje (Gachet in sod., 1999). Kvasne ortologe TCTP – Tma19 so preučevali Rinnerthaler in sod. (2006) in predlagali njegovo preimenovanje v Mm1 (mikrotubulni in mitohondrijski interakcijski protein). Njihove študije so namreč pokazale, da so Mm1 po blagem nastopu oksidativnega stresa ali zaradi delovanja drugih stresnih dejavnikov, translocirani iz svoje običajne pozicije v citoplazmi na zunanjo površino mitohondrijev. Obstaja več dokazov, da TCTP/Mm1 zaznava stresne dejavnike in hkrati regulira stresne odgovore nanje. O povečani ravni TCTP kot posledica delovanja stresnih dejavnikov so poročali v mnogih organizmih, pri čemer so preučili vpliv najrazličnejših stresnih dejavnikov, med drugim oksidativni stres (Rupec in sod., 1998; Ryan in sod., 2011), topotropni šok (Gnanasekar in sod., 2002), izpostavljenost Ca^{2+} ionom (Gnanasekar in sod., 2002) ali težkim kovinam (Schmidt in sod., 2007).

Na podlagi podatkov, ki so jih pridobili Rinnerthaler in sod. (2006), bi lahko zmanjšana raven Tma19 v našem primeru pomenila prenos proteina z mitohondrijske površine nazaj na njegovo lokacijo v citosolu, saj se je po izpostavitvi celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* proteinskim hidrolizatom zmanjšala znotrajcelična oksidacija, zlasti pri prebavljenih vzorcih. Podobno so pokazale tudi študije celičnih linij MCF-7 (tumorske celične linije dojk), kjer je bila zaznana znižana raven tarčnega TCTP po izpostavitvi celičnih linij resveratrolu (Díaz-Chávez in sod., 2013).

4.4.3 Proteini Tsa1, Ppi in Cox6

Znižanje znotrajcelične oksidacije v kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae* po izpostavitvi proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca se izraža tudi v zmanjšani ravni proteina Tsa1, ki sodeluje pri odzivih organizma na oksidativni stres in vzpostavljanju redoks homeostaze v organizmu (The Gene Ontology Consortium, 2015; Morano in sod., 2012).

Podobno se je zmanjšala tudi raven proteina peptidil-propil *cis/trans* izomeraze (Ppi), ki sodeluje pri zvijanju proteinov s katalizo izomeracije prolina (The Gene Ontology Consortium, 2015); kar je posredno povezano z oksidativnim stresom.

Znižano raven smo zasledili tudi pri podenoti 6 citokrom c oksidaze (Cox6). Citokrom c oksidaza, podenota 6, je podenota citokrom c oksidaze oziroma kompleksa IV, ki se nahaja v fosfolipidnem dvosloju notranje membrane mitohondrijev in igra ključno vlogo pri nastanku energije v aerobnih celicah. Encim Cox predstavlja zadnji protein v dihalni verigi, saj katalizira prenos elektronov iz citokrom c molekul na molekule kisika. Citokrom c oksidaza pri evkariontih je sestavljena iz 11-13 podenot (pri kvasovki *S. cerevisiae* 11 podenot, pri človeku 13 podenot). Podenote 1, 2, 3 so visokomolekularni in zelo hidrofobni transmembranski proteini, katerih zapis je v mitohondrijskem genomu. Skupaj tvorijo katalitično jedro encima. Preostale, manjše podenote, ki obkrožajo jedro encima, so kodirane v jedrnem genomu (Fontanesi in sod., 2006). Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko sklepamo tudi, da so bioaktivni peptidi lahko dodaten dejavnik, ki sodeluje pri uravnavanju dihalne verige. Obstojče študije namreč kažejo, da antioksidanti, kot so na primer flavonoidi, lahko modulirajo dele dihalne verige in zavirajo nastanek ROS (Lagoa in sod., 2011).

Čeprav se je v celicah kvasovk *S. cerevisiae* po izpostavitvi proteinskim hidrolizatom znižala znotrajcelična oksidacija, nismo zasledili nobenih znakov, ki bi zaradi zmanjšane ravni Cox6 zavirali celično dihanje. Poleg tega proteinski hidrolizati niso imeli vpliva na celično energijsko metabolno aktivnost kvasovk.

4.4.4 Proteina Bhm1 in Bhm2

Prisotnost proteinov Bhm1 in Bhm2 smo zasledili zgolj v celicah kvasovke *S. cerevisiae*, ki so bile izpostavljene neprebaavljenim in prebaavljenim proteinim hidrolizatom tako polenovke kot tudi piščanca, medtem ko v celicah, ki so bile izpostavljene slepim vzorcem, niso bili prisotni. Proteina Bhm1 in Bhm2 uvrščamo v družino 14-3-3 proteinov. 14-3-3 proteini so visoko ohranjeni proteini, ki so bili najdeni v vseh preučevanih evkariontih. V celici so vključeni v različne celične procese in interakcije z več sto drugimi proteini (van Heusden in Steensma, 2006) V kvasovkah najdemo dva proteina iz družine 14-3-3 proteinov. To sta Bhm1 in Bhm2 proteina (Gelperin in sod., 1995; van Heusden in sod., 1995), ki smo ju identificirali tudi v sklopu našega raziskovalnega dela. Bhm1 in Bhm2 sta identična v 93 % njunih aminokislin (van Heusden in sod., 1995). Njuna primarna funkcija je predvsem vezava na fosforilirane proteine (Muslin in sod., 1996). Glede na to, da imata Bhm proteina več ciljnih mest za vezavo, sodelujeta v številnih procesih v celici. Zato samo na podlagi teh rezultatov težko pojasnimo njun pojav v celicah, ki so bile izpostavljene proteinim hidrolizatom.

Z opravljeno raziskavo smo uspešno potrdili naše začetne hipoteze. Izpostavitev celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* proteinim hidrolizatom polenovke in piščanca je znižala znotrajcelično oksidacijo ter povzročila spremembe v izražanju mitohondrijskih proteinov. Učinki proteinim hidrolizatov po izpostavitvi *in vitro* modelu prebavnega trakta so bili večji kot pred izpostavitvijo tako pri vzorcu polenovke kot tudi piščanca.

5 SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo prišli do naslednjih sklepov:

- Izpostavitev celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* proteinskim hidrolizatom polenovke in piščanca zniža znotrajcelično oksidacijo, pri čemer med posameznima vrstama proteinskih hidrolizatov ni bistvenih razlik.
- Prebavljeni proteinski hidrolizati imajo ne glede na vrsto večjo antioksidativno učinkovitost v primerjavi z neprebavljenimi proteinskimi hidrolizati, kar potrjuje vlogo gastrointestinalnega trakta pri povečanju antioksidativne učinkovitosti.
- Neprebavljeni in prebavljeni proteinski hidrolizati nimajo vpliva na celično energijsko metabolno aktivnost.
- Proteinski hidrolizati polenovke in piščanca povzročijo spremembe v sintezi proteinov, ki sodelujejo pri različnih procesih v celici (oksidativni stresni odgovor, zvijanje proteinov, sinteza proteinov), in sicer se v večji meri njihova raven po izpostavitvi hidrolizatom zmanjša.
- Večje spremembe na ravni proteoma povzročajo prebavljeni hidrolizati polenovke.

6 POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo preučevali učinke proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca na znotrajcelično oksidacijo, celično energijsko metabolno aktivnost in mitohondrijski proteom modelnega organizma kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155). Z namenom raziskovanja vplivov encimske razgradnje in drugih modulacij na peptide so bili uporabljeni vzorci proteinskih hidrolizatov predhodno izpostavljeni *in vitro* modelu gastrointestinalnega trakta. Učinke prebavljenih proteinskih hidrolizatov smo primerjali z neprebavljenimi proteinskimi hidrolizati, tako na celični kot tudi na proteomske ravni.

Kulturo kvasovk smo najprej razmnoževali v tekočem YEPD gojišču do njihove stacionarne faze rasti. Celice smo po končani kultivaciji inkubirali v PBS pufru nadaljnjih 96 ur pri 28 °C in 220 obr./min. Po inkubaciji celic kvasovke v PBS pufru, smo suspenziji kvasovk dodali vzorce neprebavljenih in prebavljenih proteinskih hidrolizatov polenovke in piščanca v koncentraciji 1,0 mg/ml. Celice kvasovk smo izpostavili tudi pripadajočim slepim vzorcem (voda in prebavni sok).

Po dvo-urni izpostavitvi celic kvasovk proteinskim hidrolizatom smo določili znotrajcelično oksidacijo, celično energijsko metabolno aktivnost in preučili vpliv proteinskih hidrolizatov na mitohondrijski proteom kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

Pri določanju znotrajcelične oksidacije smo zasledili večjo antioksidativno delovanje prebavljenih proteinskih hidrolizatov v primerjavi z neprebavljenimi, pri čemer se niso izrazile bistvene razlike med eno in drugo vrsto proteinskih hidrolizatov, iz česar lahko sklepamo, da je ravno fiziološko dogajanje v gastrointestinalnem traktu (modifikacije, hidroliza) pripomoglo k večji antioksidativni učinkovitosti. Rezultati so pokazali tudi, da neprebavljeni kot tudi prebavljeni proteinski hidrolizati polenovke in piščanca ne vplivajo na celično energijsko metabolno aktivnost.

Na ravni mitohondrijskega proteoma smo opazili bolj izrazite spremembe ob dodatku prebavljenih proteinskih hidrolizatov, pri čemer so večje spremembe v ravni mitohondrijskih proteinov kvasovke povzročili proteinski hidrolizati polenovke. Na proteomske ravni so proteinski hidrolizati polenovke in piščanca povzročili spremembe v ravni proteinov, ki sodelujejo pri različnih celičnih procesih (oksidativni stresni odgovor, zvijanje proteinov, sinteza proteinov). Pri večini se je njihova raven po izpostavitvi proteinskim hidrolizatom zmanjšala.

Poznavanje delovanja proteinskih hidrolizatov znotraj živih celic, tudi na ravni proteoma, je pomembno za razvoj novih izdelkov z vsebnostjo ribnih in piščančjih proteinskih hidrolizatov v vlogi funkcionalnih sestavin.

7 VIRI

- Alavarado C. Z., Owens C. M. 2006. Poultry: chemistry and biochemistry. V: Handbook of food science, technology and engineering. 1st ed. Hui Y.H. (ed.). Boca Raton, CRC Press : 31-1 – 31-14
- Anderluh G., Maček P., Sepčič K., Turk T. 2009. Eksperimentalne metode v biokemiji. Ljubljana, Študentska založba: 137 str.
- Arora S., Yang J.-M., Kinzy T. G., Utsumi R., Okamoto T., Kitayama T., Kitayama T., Ortiz P. A., Hait W. N. 2003. Identification and characterization of an inhibitor of eukaryotic elongation factor 2 kinase against human cancer cell lines. *Cancer Research*, 63: 6894–6899
- Aruoma O. I. 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 32: 671-83
- Atlas R. M., Lawrence P. 1993. Handbook of microbiological media. Boca Raton, CRC Press: 1006-1007
- Azuma B., Machida K., Saeki Y., Kanamoto R., Iwami K. 2000. Preventive effect of soybean resistant proteins against experimental tumorigenesis in rat colon. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 16: 349-354
- Bagchi K., Puri S. 1998. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterranean Health Journal*, 4: 350-60
- Balti R., Nedjar-Arroume N., Adje E. Y., Guillochon D., Nasri M. 2010. Analysis of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3840-3846
- Boveris A., Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134: 707 – 716
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254
- Brantl V., Teschemacher H., Henschel A., Lottspeich F. 1979. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*, 360: 1211-1216
- Cao G., Sofic E., Prior R. L. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3426–3431
- Chakrabarti S., Jahandideh F., Wu J. 2014. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 2014, ID 608979, doi: 518 10.1155/2014/608979: 11 str.
- Chan J., Khan S. N., Harvey I., Merrick W., Pelletier J. 2004. Eukaryotic protein synthesis inhibitors identified by comparison of cytotoxicity profiles. *RNA*, 10: 528–543

- Cigut T., Polak T., Gašperlin L., Raspot P., Jamnik P. 2011. Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 11449–11455
- Daffre S., Bulet P., Spisni A., Sabatier L. E., Rodrigues E. G., Travassos L. R. 2008. Bioactive natural peptides. *Studies in Natural Products Chemistry*, 35: 597-691
- Danquah M., Agyei D. 2012. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotechnology*, 1: 1-7
- Davidson G. S., Joe R. M., Roy S., Meirelles O., Allen C. P., Wilson M. R., Tapia P. H., Manzanilla E. E., Dodson A. E., Chakraborty S., Carter M., Young S., Edwards B., Sklar L., Werner-Washburne M. 2011. The proteomics of quiescent and nonquiescent cell differentiation in yeast stationary-phase cultures. *Molecular Biology of the Cell*, 22: 988–998
- de Zamaroczy M., Bernardi G. 1985. Sequence organization of the mitochondrial genome of yeast—a review. *Gene*, 37: 1-17
- Díaz-Chávez J., Fonseca-Sánchez M.A., Arechaga-Ocampo E., Flores-Pérez A., Palacios-Rodríguez Y., Domínguez-Gómez G., Marchat L. A., Fuentes-Mera L., Mendoza-Hernández G., López-Camarillo C. 2013. Proteomic profiling reveals that resveratrol inhibits HSP27 expression and sensitizes breast cancer cells to doxorubicin therapy. *PloS One*, 8: e64378, doi: 10.1371/journal.pone.0064378: 12 str.
- Domínguez J. M., Kelly V. A., Kinsman O. S., Marriott M. S., Gómez de las Heras F. 1998. Sordarins: a new class of antifungals with selective inhibition of the protein synthesis elongation cycle in yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 2274–2278
- Erdmann K., Belinda W. Y., Cheung H. S. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19: 643-654
- EFSA. 2009. Review of the potential health impact of beta-casomorphins and related peptides. *EFSA Journal*, 7, 2, doi: 10.2903/j.efsa.2009.231r: 107 str.
- Farber E. 1994. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Modern Pathology*, 7: 605-609
- Farvin K. H. S., Andersen L. L., Nielsen H. H., Jacobsen C., Jakobsen G., Johansson I., Jessen F. 2013. Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: *in vitro* assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, 149: 326-334
- Fontanesi F., Soto I. C., Barrientos A. 2006. Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 60: 557-568
- Fountoulakis M., Lahm H. 1998. Hydrolysis and amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826: 109-34

- Foury F. 1997. Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene*, 195: 1-10
- Friedman M. 1996. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 6-29
- Fuge E. K., Braun E. L., Werner-Washburne M. 1994. Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 176: 5802-5813
- Fujita H., Yokoyama K., Yoshikawa M. 2000. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 65: 564-569
- Gachet Y., Tournier S., Lee M., Lazaris-Karatzas A., Poulton T., Bommer U. A. 1999. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *Journal of Cell Science*, 112: 1257-1271
- Galasinski W., Chlabcz J., Paszkiewicz-Gadek A., Marcinkiewicz C., Gindzienski A. 1996. The substances of plant origin that inhibit protein biosynthesis. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 53: 311-318
- Galvez A. F., Chen N., Macasieb J., de Lumen B. O. 2001. Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Research*, 61: 7473-7478
- Garrett R. H., Grisham C. M. 2005. Proteins: their primary structure and biological functions. V: Biochemistry. 4th ed. Garrett R.H., Grisham C.M. (eds.). Boston, Brooks/Cole, Cengage Learning: 93-126
- Gelperin D., Weigle J., Nelson K., Roseboom P., Irie K., Matsumoto K., Lemmon S. 1995. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 11539-11543
- Gnanasekar M., Rao K. V. N., Chen L., Narayanan R. B., Geetha M., Scott A. L., Ramaswamy K., Kaliraj P. 2002. Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121: 107-118
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274: 563-567
- Gray J., Petsko G., Johnston G., Ringe D., Singer R., Werner-Washburne M. 2004. »Sleeping beauty«: quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 187-206
- Guerard F., Dufosse L., De La Broise D., Binet B. 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of*

- Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11: 1051-1059, doi: 10.1016/S1381-1177(00)00031-X: 9 str.
- Guthrie C., Fink G. 1991. Guide to yeast genetics and molecular biology. V: Methods in enzymology, 1st ed. Guthrie C., Fink G. R. (eds.). San Diego, Academic Press: 1-932
- Halliwell B., Cross C. E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. Environmental Health Perspectives, 102: 5-12
- Harnedy P. A., FitzGerald R. J. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review. Journal of Functional Foods, 4: 6-24
- Hatake H., Numata Y., Kochi M. 1990. Synergistic effect of sardine myofibril protein hydrolysates with antioxidants. Nippon Suisan Gakkaishi, 56: 1011-1011
- GE Healthcare. 2004. 2-D electrophoresis. Principles and methods. Little Chalfont, Amersham Biosciences UK Ltd: 162 str.
- Herman P. K. 2002. Stationary phase in yeast. Current Opinion in Microbiology, 5: 602-607
- Herpandi H. N., Rosma A., Wan Nadiah W. A. 2011. The tuna fishing industry: a new outlook on fish protein hydrolysates. Comprehensive reviews in food science and food safety, 10: 195-207
- Höllt V. 1983. Multiple endogenous opioid peptides. Trends in Neurosciences, 6: 24-26
- Holownia T. 2008. Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. Biochemical Engineering Journal, 39: 221-229
- Hsu K. C., Li-Chan E. C. Y., Jao C. L. 2011. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. Journal of Functional Foods, 4: 718-726
- Hsu K. C., Lu G. H., Jao C. L. 2009. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). Food Research International, 42: 647-652
- Huang S.-L., Jao C.-L., Ho K.-P., Hsu K.-C. 2012. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides. Peptides, 35: 114-121
- Hultin H. O. 1994. Oxidation of lipids in fish muscle. V: Seafoods chemistry, processing, technology and quality. 1st ed. Shahidi F., Botta R. J. (eds.). London, Blackie Academic Press: 49-74
- Izadpanah A., Gallo R. L. 2005. Antimicrobial peptides. Journal of the American Academy of Dermatology, 52: 381-390
- Jakubowski W., Bilinski B., Bartosz G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Free Radical Biology and Medicine, 28: 659-664
- Jeon Y., Byun H., Kim S. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. Process Biochemistry, 35: 471-478

- Jeong H. J., Lam Y., de Lumen B. O. 2002. Barley lunasin suppresses ras-induced colony formation and inhibits core histone acetylation in mammalian cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5903-5908
- Jun S. Y., Park P. J., Jung W. K., Kim S. K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219: 20-26
- Justice M. C., Hsu M. J., Tse B., Ku T., Balkovec J. 1998. Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 3148–3151
- Kanamoto R., Azuma N., Miyamoto T., Saeki T., Tsuchihashi Y., Iwami K. 2001. Soybean resistant proteins interrupt an enterohepatic circulation of bile acids and suppress liver tumorigenesis induced by azoxymethane and dietary deoxycholate in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 4: 999-1002
- Kaul G., Pattan G., Rafeequi T. 2001. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochemistry and Function*, 29: 227-234
- Kelleher K. 2005. Discards in the world's marine fisheries: an update. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 131 str.
- Kim J. Y., Woo H. J., Ahn C. W., Nam H. S., Shin Z. I., Lee H. J. 1999. Cytotoxic effects of peptides fractionated from bromelain hydrolyzates of soybean protein. *Food Science and Biotechnology*, 8: 333-337
- Kim S. H., Kim J. Y., Park S. W., Lee K. W., Kim K. H., Lee H. J. 2003. Isolation and purification of anticancer peptides from Korean ginseng. *Food Science and Biotechnology*, 12: 79-82
- Kim S. K., Kim Y. T., Byun H. G., Nam K. S., Joo D. S., Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1984-1989
- Kim S. K., Mendis E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts - a review. *Food Research International*, 39, 4: 383-393
- Kim S. K., Wijesekara I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2, 1: 1-9
- Kinsman O. S., Chalk P. A., Jackson H. C., Middleton R. F., Shuttleworth A., Rudd B. A., Jones C. A., Noble H. M., Wildman H. G., Dawson M. J., Stylli C., Sidebottom P. J., Lamont B., Lynn S., Hayes M. V. 1998. Isolation and characterisation of an antifungal antibiotic (GR135402) with protein synthesis inhibition. *Journal of Antibiotics*, 51: 41–49
- Kitts D. D., Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309-1323
- Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues: a novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26: 231-243

- Kočevar N., Komel R. 2008. Preiskava bolezenskih proteomov z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo in masno spektrometrijo. Medicinski Razgledi, 43: 193-203
- Kohen R., Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic Pathology, 30: 620-50
- Ko J. Y., Lee J. H., Samarakoon K., Kim J. S., Jeon Y. J. 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. Food and Chemical Toxicology, 52: 113–120
- Korhonen H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. Journal of Functional Foods, 1: 177-187
- Korhonen H., Pihlanto A. 2003. Food-derived bioactive peptides – opportunities for designing future foods. Current Pharmaceutical Design, 9: 1297-1308
- Korhonen H., Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality: a review. International Dairy Journal, 16: 945-960
- Kristinsson H. G., Rasco B. A. 2002. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40: 43-81
- Lacroix I. M. E., Li-Chan E. C. Y. 2012. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein. International Dairy Journal, 25: 97-102
- Lagoa R., Graziani I., Lopez-Sanchez C., Garcia-Martinez V., Gutierrez-Merino C. 2011. Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1807: 1562–1572
- Lazarev V. N., Govorun V. M. 2010. Antimicrobial peptides and their use in medicine. Applied Biochemistry and Microbiology, 46: 803-814
- Leung E. H. W., Ng T. B. 2007. A relatively stable antifungal peptide from buckwheat seeds with antiproliferative activity toward cancer cells. Journal of Peptide Science, 13: 762-767
- Li Y. 2007. Current progress and advances of study on bioactive peptides. Food and Fermentation Industries, 33: 1-9
- Llano-Sotelo B., Klepacki D., Mankin A. S. 2009. Selection of small peptides inhibitors of translation. Journal of Molecular Biology, 391: 813–819
- Lönnerdal B. 2002. Bioactive proteins: clinical applications for gastrointestinal health. Bulletin - International Dairy Federation, 375: 22-24
- Meisel H. 2004. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. Biofactors, 21: 55-61
- Meisel H., FitzGerald R. J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Current Pharmaceutical Design, 9: 1289–1295
- Mendis E., Rajapakse N., Kim S. K. 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 581–587

- Mendis E., Rajapakse N., Byun H. G., Kim S. K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects. *Life Science*, 53: 2166-2178
- Meng S., Xu H., Wang F. 2010. Research advances of antimicrobial peptides and applications in food industry and agriculture. *Current Protein and Peptide Science*, 11: 264-273
- Mine Y., Shahidi F. 2005. Nutraceutical proteins and peptides in health and disease: an overview. V: Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. 1st ed. Mine Y., Shahidi F. (eds.). Boca Raton, CRC Press/Taylor and Francis: 3-10
- Moldave K. 1985. Eukaryotic protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 54: 1109–1149
- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19: 651-658
- Morano K. A., Grant C. M., Moye-Rowley W. S. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 1157–1195
- Moure A., Dominguez H., Parajo J.C. 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration. *Process Biochemistry*, 41: 447-456
- Mullally M. M., O'Callaghan D. M., FitzGerald R.J., Donnelly W. J., Dalton J. P. 1994. Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatin protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2973-2981
- Muslin A. J., Tanner J. W., Allen P. M., Shaw A. S. 1996. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 84: 889–897
- Nagodawithana T. W., Nelles L., Trivedi N. B. 2010. Protein hydrolysates as hypoallergenic, flavors and palatants for companion animals. V: Protein hydrolysates in biotechnology. Pasupuleti V. K., Demain A. L. (eds.). New York, Springer: 191-207
- Nahvi A., Sudarsan N., Ebert M. S., Zou X., Brown K. L., Breaker R. R. 2002. Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry and Biology*, 9: 1043–1049
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H. 2001. Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *European Food Research and Technology*, 231: 259–269
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H., Shahidi F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124: 1354–1362
- Nazeer R. A., Kumar N. S. S., Jai Ganesh R. 2012. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*, 35: 261–268
- O'Farrell P. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 25: 4007–4021

- Ono S., Hosokawa M., Miyashita K., Takahashi K. 2003. Isolation of peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory effect derived from hydrolysate of upstream chum salmon muscle. *Journal of Food Science*, 68: 1611–1614
- Ono S., Hosokawa M., Miyashita K., Takahashi K. 2006. Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 383–386
- Onuh J. O., Girgih A. T., Aluko R. E., Aliani M. 2013. *In vitro* antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chemistry*, 150: 366-373
- Papagianni M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, 21: 465-499
- Papas A. M. 1999. Diet and antioxidant status. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 999–1007
- Parsons A. B., Geyer R., Hughes T. R., Boone C. 2003. Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. *Progress in Cell Cycle Research*, 5: 159-166
- Pasupuleti V. K., Braun S. 2010. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. V: Protein hydrolysates in biotechnology. Pasupuleti V. K., Demain A. L. (eds.). New York, Springer: 11-32
- Pasupuleti V.K., Holmes C., Demain A.L. 2010. Applications of protein hydrolysates in biotechnology. V: Protein hydrolysates in biotechnology. Pasupuleti V.K., Demain A.L. (eds.). New York, Springer: 1-9
- Pečar S., Mravljak J. 2015. Šumi živiljenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 319 str.
- Petelin T., Polak T., Demšar L., Jamnik P. 2013. Fractionation of phenolic compounds extracted from propolis and their activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One*, 8: e56104, doi:10.1371/journal.pone.0056104: 8 str.
- Petrillo E. W. J., Ondetti M. A. 1982. Angiotensin converting enzyme inhibitors: medicinal chemistry and biological actions. *Medicinal Research Reviews*, 2: 1-41
- Phelan M., Aherne A., FitzGerald R. J., O'Brien N. M. 2009. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19: 643-654
- Picot L., Bordenave S., Didelot S., Fruitier-Arnaudin I., Sannier F., Thorkelsson G., Bergé J.P., Guérard F., Chabeaud A., Piot J.M. 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, 41: 1217-1222
- Poljšak B., Šuput D., Milisav I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 1-11

- Prokisch H., Scharfe C., Camp D. G., Wenzhong X., Lior D., Andreoli C., Ron H. 2004. Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. PLoS Biology, 2: e160, doi: 10.1371/journal.pbio.0020160: 7 str.
- Promega 2007. BacTiter-Glo™ Microbial cell viability assay: technical bulletin. Madison, Promega Corporation: 16 str.
- Raught B., Gingras A.-C., Sonenberg N. 2000. Regulation of Ribosomal Recruitment in Eukaryotes. Translational Control of Gene Expression, 39: 245–293
- Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. International Journal of Antimicrobial Agents, 24: 536-547
- Rinnerthaler M., Jarolim S., Heeren G., Palle E., Perju S., Klinger H., Bogengruber E., Madeo F., Braun R. J., Breitenbach-Koller L., Breitenbach M., Laun P. 2006. MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1757: 631–638
- Rosen G. M., Pou S., Ramo C. L., Cohen M. S., Britigan B. E. 1995. Free radicals and phagocytic cells. FASEB Journal, 9: 200-209
- Rossignol M., Peltier J. B., Mock H. P., Matros A., Maldonado A. M., Jorrín J.V. 2006. Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. Proteomics, 6: 5529–5548
- Ruggero D., Pandolfi P. P. 2003. Does the ribosome translate cancer?. Nature Reviews. Cancer, 3: 179–192
- Rupec R. A., Poujol D., Kaltschmidt C., Messer G. 1998. Isolation of a hypoxia-induced cDNA with homology to the mammalian growth-related protein p23. Oncology Research, 10: 69-74
- Ryan J. T., Ross R. P., Bolton D., Fitzgerald G. F., Stanton C. 2011. Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. Nutrients, 3: 765–791
- Saiga A., Okumura T., Makihara, S., Katsuta T., Shimizu R., Yamada T., Nishimura T. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 1741-1745
- Saiga A., Iwai K., Hayakawa T., Takahata Y., Kitamura S., Nishimura T., Morimatsu F. 2008. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 9586–9591
- Sannaveerappa T., Carlsson N. G., Sandberg A. S., Undeland I. 2007. Antioxidative properties of press juice from herring (*Clupea harengus*) against hemoglobin (Hb) mediated oxidation of washed cod mince. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 9581–9591
- Sato K., Yoshinaka R., Sato M. 1989. Hydroxyproline content in the acid-soluble collagen from muscle of several fishes. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 55: 1467
- Schmidt I., Fähling M., Nafz B., Skalweit A., Thiele B.-J. 2007. Induction of translationally controlled tumor protein (TCTP) by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. The FEBS Journal, 274: 5416–24

- Schrezenmeir J., Korhonen H., Williams C., Gill H. S., Shah N. 2000. Foreword. British Journal of Nutrition, 84: 1-1
- Shahidi F., Zhong Y. 2008. Bioactive peptides. Association of Official Analytical Chemists, 91: 914–931
- Sherman F. 1991. Getting started with yeast. V: Methods in enzymology. 1st ed. Guthrie C., Fink G. R. (eds.). San Diego, Academic Press: 3-21
- Shi X. D., Chen X. L. 2000. Outline and perspective of research and development of bioactive peptides from marine protein enzymatic hydrolysate. Amino Acids & Biotic Resources, 22: 13-16
- Sies H. 1998. Oxidative stress: introductory Remarks. London, Academic Press: 1-8
- Sies H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biology, 4: 180-183
- Sigler K., Chaloupka J., Brozmanová J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms I. Microbial vs. higher cells - damage and defenses in relation to cell aging and death. Folia Microbiologica, 44: 587–624
- Simpson D. J. W., Kompala D. S., Meiss J. D. 2009. Discontinuity induced bifurcations in a model of *Saccharomyces cerevisiae*. Mathematical Biosciences, 218: 40-49
- Slatnar A., Jakopic J., Stampar F., Veberic R., Jamnik P. 2012. The effect of bioactive compounds on *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity of different berry juices. PloS One, 7: e47880, doi:10.1371/journal.pone.0047880: 8 str.
- Srdić-Rajić T., Konić-Ristić A. 2016. Antioxidants: role on health and prevention. V: Encyclopedia of food and health. 1st ed. Caballero B., Finglas P. M., Toldrá F. (eds.). Kidlington, Elsevier: 718-726
- Suetsuna K., Osajima K. 1986. The inhibitory activities against angiotensin I-converting enzyme of basic peptides originating from sardine and hair tail meat. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 52: 1981–1984
- Sun Y., Pan D., Guo Y., Li J. 2012. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. Food and Chemical Toxicology, 50: 3397-3404
- Teschmacher H. 1994. Opioid receptor ligands derived from food proteins. Current Pharmaceutical Design, 9: 1331-1344
- Thayianthy V., Venugopal T. 2005. Evolution and expression of translationally controlled tumour protein (TCTP) of fish. Biochemistry & Molecular Biology, 142: 8–17
- The Gene Ontology Consortium. 2015. Gene Ontology Consortium: going forward. Nucleic Acids Research, 43: D1049–D1056
- Theodore A. E., Raghavan S., Kristinsson H. G. 2008. Antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein hydrolysates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 7459–7466
- Thomas D., Loffler F. 1994. Improved protein functionalities by enzymatic treatment. Food Marketing & Technology, 2: 4-6

- Thomä-Worringer C., Sorensen J., Lopez-Findino R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. International Dairy Journal, 16: 1324-1333
- Tibäck E. A., Svelander C. A., Colle I. J., Altskär A. I., Alminger M. A., Hendrickx M. E., Langton M. I. 2009. Mechanical and thermal pretreatments of crushed tomatoes: effects on consistency and *in vitro* accessibility of lycopene. Journal of Food Science, 74: E386–E395
- Tilman D., Clark M. 2014. Nature. Global diets link environmental sustainability and human health, 515: 518–522
- Udenigwe C. C., Aluko R. E. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. Journal of Food Science, 77: R11–R24
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J., Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry, 266: 37–56
- van Heusden G. P. H., Griffiths D. J. F., Ford J. C., Chin-Woeng A. T. F. C., Schrader P. A. T., Carr A. M., Steensma H. Y. 1995. The 14-3-3 proteins encoded by the BHM1 and BHM2 genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. European Journal of Biochemistry, 229: 45–53
- van Heusden G. P. H., Steensma H. Y. 2006. Yeast 14-3-3 proteins. Yeast, 23: 159-171
- Vermeirssen V., Van Camp J., Verstraete W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. British Journal of Nutrition, 92: 357-366
- Whitcomb D. C., Lowe M. E. 2007. Human pancreatic digestive enzymes. Digestive Diseases and Sciences, 52: 1-17
- Willet W. 2006. The Mediterranean diet: science and practice. Public Health Nutrition, 9: 105-110
- Wu J., Ding X. 2002. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. Food Research International, 35: 873-880
- Yi H. J., Kim J. Y., Kim K. H., Lee H. J. 2003. Anticancer activity of peptide fractions from egg white hydrolysate against mouse lymphoma cells. Food Science and Biotechnology, 12: 224-227
- You L., Zhao M., Regenstein J. M., Ren J. 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry, 120: 810–816
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M. 2002. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. Food Chemistry, 78: 457–461
- Zakrajšek T., Raspor P., Jamnik P. 2011. *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase as a model organism-characterization at cellular and proteome level. Journal of Proteomics, 74: 837–2845

ZAHVALA

Ob zaključku pomembnih življenjskih obdobij, kot je tudi študij, se radi ozremo »nazaj«, se spominjam prvih začetkov, vzponov kot tudi padcev na strmi poti do cilja. Zagotovo ni večjega zadovoljstva, da pot do cilja ni bila samotna in prazna, temveč polna drobnih in velikih trenutkov, ki so vsi, kot koščki sestavljanke gradili končno podobo. Hvala življenje, da si me obdarilo s kopico ljudi, ki so verjeli vame do konca, me spodbujali in pomagali pri iskanju poslednjega koščka.

Največjo mero hvaležnosti posvečam mentorici izr. prof. dr. Poloni Jamnik. Hvala Vam za mentorstvo, ki mi je dalo več, kot sem si lahko sploh predstavljal. Hvala Vam za ves trud in čas, ki ste mi ga namenili, za pomoč, spodbude in podporo, ko sem jo najbolj potrebovala. Hvala Vam, da ste verjeli vame že od vsega začetka, tudi v trenutkih, ko niti sama nisem več upala verjeti. Zagotovo lahko trdim, da mi brez Vas vsekakor ne bi uspelo. S svojo prezenco ste zapolnili posebno mesto v mojem življenju in me ponesli do cilja, ki sem si ga nekoč lahko samo predstavljal. Hvala Vam!

Recenzentu izr. prof. dr. Blažu Cigiću se zahvaljujem za strokoven in temeljit pregled diplomskega dela ter konstruktivne pripombe, ki so diplomsko deloše izboljšale.

Najlepše se zahvaljujem tudi prof. dr. Lei Demšar za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov.

Hvala tudi dr. Katji Istenič za vso pomoč pri laboratorijskem delu kot tudi za vse nasvete, ki jih je bila vselej pripravljena deliti z mano. Začetniška trema v laboratoriju bi brez Katje bila bistveno večja, delovni torki pa bistveno daljši.

Zahvaljujem se tudi ge. Barbari Slemenik za temeljit pregled oblike diplomskega dela ter navajanja virov.

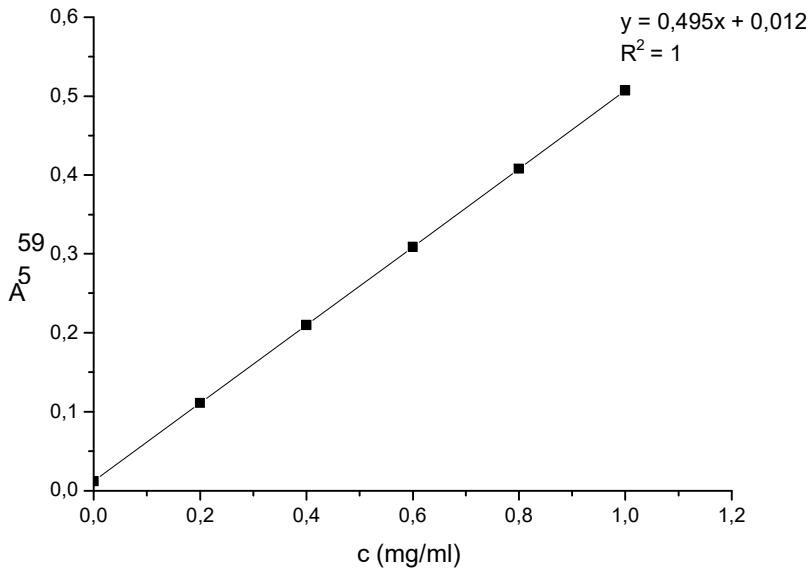
Prav zagotovo gre posebna zahvala tudi sošolkam in sošolcem, ki so mi tekom študija tako ali drugače priskočili na pomoč. Maja, hvala ti, da si dihala z mano do konca ter mi s svojimi besedami popestrila še tako naporen dan.

Predvsem pa bi se rada zahvalila tudi vsem mojim domačim, ki ste mi omogočili študij, me tekom študija podpirali in me spodbujali. Mami, hvala ti. Besede same ne opišejo dovolj moje hvaležnosti in ponosa, da sva zmogli tudi to.

Hvala tudi vsem prijateljem, ki ste mi tekom študija tako ali drugače priskočili na pomoč in mi stali ob strani. Hvala vam za iskreno prijateljstvo in nepozabna študentska leta.

PRILOGE

Priloga A: Umeritvena krivulja BSA za merjenje koncentracije proteinov po Bradford metodi.



Priloga B: Relativne vrednosti (F/OD) glede na pripadajoče slepe vzorce za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) po 2-urnem tretiranju z neprejavljenimi in prejavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke in piščanca dveh bioloških ponovitev. PHPOPR: neprejavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPOPO: prejavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPR: neprejavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPIPO: prejavljeni proteinski hidrolizati piščanca.

Čas merjenja (min)	Relativne vrednosti (F/OD)			
	PHPOPR	PHPOPO	PHPIPR	PHPIPO
2	1,001	0,874	1,033	1,000
	0,995	0,715	0,985	0,927
4	1,010	0,870	1,028	0,990
	0,976	0,724	0,986	0,934
6	0,975	0,835	1,010	0,962
	0,995	0,726	0,979	0,911
8	1,000	0,839	1,006	0,962
	0,973	0,733	0,975	0,893
10	0,982	0,817	1,004	0,946
	0,971	0,716	0,953	0,882
12	0,983	0,812	0,988	0,924
	0,973	0,704	0,956	0,879
14	0,968	0,790	0,976	0,901
	0,970	0,715	0,962	0,870
16	0,985	0,779	0,970	0,894
	0,953	0,726	0,949	0,855
18	0,970	0,770	0,950	0,868
	0,953	0,717	0,941	0,844
20	0,973	0,748	0,936	0,840
	0,953	0,716	0,950	0,829
22	0,966	0,755	0,945	0,840
	0,953	0,709	0,939	0,816
24	0,965	0,741	0,933	0,823
	0,950	0,723	0,942	0,814
26	0,956	0,722	0,920	0,805
	0,958	0,713	0,934	0,786
28	0,952	0,719	0,912	0,795
	0,966	0,712	0,918	0,785
30	0,961	0,715	0,915	0,785
	0,951	0,708	0,931	0,795
32	0,957	0,708	0,912	0,776
	0,968	0,712	0,911	0,766
34	0,943	0,705	0,901	0,764
	0,960	0,712	0,912	0,748
36	0,957	0,700	0,896	0,755
	0,950	0,703	0,923	0,758

se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge B: Relativne vrednosti (F/OD) glede na pripadajoče slepe vzorce za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) po 2-urnem tretiranju z neprejavljenimi in prejavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke in piščanca dveh bioloških ponovitev.

Čas merjenja (min)	Relativne vrednosti (F/OD)			
	PHPOPR	PHPOPO	PHPIPR	PHPIPO
38	0,950	0,686	0,887	0,745
	0,952	0,710	0,907	0,739
40	0,946	0,685	0,886	0,732
	0,955	0,712	0,891	0,737
42	0,932	0,681	0,877	0,723
	0,951	0,720	0,893	0,718
44	0,936	0,672	0,874	0,720
	0,948	0,714	0,889	0,730
46	0,933	0,678	0,870	0,713
	0,946	0,700	0,889	0,710
48	0,928	0,663	0,871	0,702
	0,952	0,715	0,894	0,699
50	0,935	0,661	0,868	0,698
	0,942	0,723	0,887	0,701
52	0,934	0,666	0,872	0,703
	0,937	0,721	0,874	0,681
54	0,936	0,656	0,864	0,692
	0,948	0,719	0,885	0,688
56	0,932	0,657	0,858	0,682
	0,936	0,715	0,862	0,678
58	0,938	0,649	0,861	0,678
	0,951	0,724	0,859	0,663
60	0,930	0,646	0,852	0,676
	0,955	0,727	0,863	0,662
62	0,936	0,646	0,851	0,668
	0,947	0,716	0,867	0,659
64	0,939	0,650	0,862	0,666
	0,953	0,712	0,868	0,659
66	0,942	0,642	0,852	0,659
	0,948	0,716	0,865	0,648
68	0,943	0,635	0,855	0,654
	0,951	0,721	0,858	0,640
70	0,943	0,635	0,849	0,655
	0,963	0,727	0,857	0,631
72	0,939	0,629	0,849	0,650
	0,952	0,721	0,846	0,622
74	0,934	0,631	0,846	0,643
	0,955	0,720	0,848	0,621
76	0,926	0,622	0,845	0,638
	0,945	0,720	0,850	0,616

se nadaljuje

Nadaljevanje Priloge B: Relativne vrednosti (F/OD) glede na pripadajoče slepe vzorce za določanje znotrajcelične oksidacije kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) po 2-urnem tretiranju z neprejavljenimi in prejavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke in piščanca dveh bioloških ponovitev.

Čas merjenja (min)	Relativne vrednosti (F/OD)			
	PHPOPR	PHPOPO	PHPIPR	PHPIPO
78	0,936	0,628	0,848	0,637
	0,951	0,724	0,844	0,611
80	0,950	0,635	0,859	0,644
	0,959	0,733	0,844	0,595

Priloga C: Relativne vrednosti (L/OD) glede na pripadajoče slepe vzorce za določanje energijske metabolne aktivnosti kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 2155) po 2-urnem tretiranju z neprejavljenimi in prejavljenimi proteinskimi hidrolizati polenovke in piščanca dveh bioloških ponovitev. PHPOPR: neprejavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPOPO: prejavljeni proteinski hidrolizati polenovke, PHPIPR: neprejavljeni proteinski hidrolizati piščanca, PHPIPO: prejavljeni proteinski hidrolizati piščanca.

Relativne vrednosti (L/OD)			
PHPOPR	PHPOPO	PHPIPR	PHPIPO
1,067	1,116	1,078	1,077
1,027	0,748	1,091	0,868