

Vinnsla og vörupróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Einangrun, hreinsun og rannsóknir á blóðþrýstings- lækkandi peptíðum úr fiskpróteinum

Margrét Geirsdóttir
Guðmundur Óli Hreggviðsson
Lárus Freyr Þórhallsson
Rósa Jónsdóttir
Patricia Hamaguchi

Líftækni

Skýrsla Matís 48-07
Desember 2007

ISSN 1670-7192

<i>Titill / Title</i>	Einangrun, hreinsun og rannsóknir á blóðþrýstingslækkandi peptíðum úr fiskpróteinum		
<i>Höfundar / Authors</i>	<i>Margrét Geirsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Lárus Freyr Þórhallsson, Rósa Jónsdóttir, Patricia Hamaguchi</i>		
<i>Skýrsla / Report no.</i>	48 - 07	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	Desember 2007
<i>Verknr. / project no.</i>	1787		
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>	AVS		
<i>Ágrip á íslensku:</i>	<p>Í rannsóknum á peptíðum unnum úr ýmsum matvælaþróteinum hafa fundist peptíð með blóðþrýstingslækkandi eiginleika. Íslensk fiskprótein gætu hugsanlega orðið mikilvæg uppspretta slíkra peptíða sem nýta mætti til þróunar verðmætra fiskafurða og heilsufæðis. Markmið verkefnisins er að rannsaka þessa virkni í fiskpeptíðum og einangra, hreinsa og skilgreina peptíð með blóðþrýstingslækkandi áhrif.</p> <p>Í skýrslunni er greint frá fyrstu niðurstöðum á einangrun fiskpróteinpeptíða og mælinga á blóðþrýstingslækkandi áhrifum þeirra.</p>		
<i>Lykilorð á íslensku:</i>	<i>Lífvirkni, peptíð, súluhreinsun, ACE, CE</i>		
<i>Summary in English:</i>	<p>Various processed food proteins have been reported to include peptides with possible antihypertensive effect. Fish proteins are a potential source for such blood pressure-lowering peptides that might be used to develop valuable fish products and nutraceuticals. The aim of this project is to study the activity of fish proteins and isolate, clarify and define peptides with antihypertensive properties.</p> <p>The report presents the first results regarding the isolation of fish protein peptides and their bioactive properties as ACE inhibitors.</p>		
<i>English keywords:</i>	<i>Bioactive properties, peptides, columns, ACE, CE</i>		

Efnisyfirlit

1. Inngangur.....	1
2. Framkvæmd	5
2.1. Efni.....	5
2.2. Tæki	6
2.3. Aðferðir.....	8
2.3.1. Vatnsrof.....	8
2.3.2. Mæling á ACE hindrun.....	10
2.3.3. Örsíun á þorsk hýdrólýsötum.....	11
2.3.4. Pökkun á súlu og keyrsla staðla.....	16
2.3.5. Gelsíun á hýdrólýsati	19
2.3.6. Gel rafdráttur.....	21
2.3.7. Fairbanks litun	22
2.3.8. Frostþurrkun.....	23
2.3.9. Undirbúningur lausna fyrir ACE og CE mælingar.....	24
2.3.10. Próteinmæling.....	24
2.3.11. Capillary Electrophoresis.....	24
3. Niðurstöður	26
3.1.1. ACE hindrunarmæling.....	26
3.1.2. Gel rafdráttur.....	26
3.2. Örsíun á þorsk hýdrólýsati	27
3.2.1. Örsíun með 3 kDa hylki.....	27
3.2.2. Örsíun með 1 kDa hylki.....	27
3.3. Gelsíun	27
3.3.1. Stöðlun á súlum.....	27
3.3.2. Þáttun á hýdrólýsati.....	29
3.3.3. Frostþurrkaðir þættir	30
3.4. ACE hindrunarmælingar á hýdrólýsötum og þáttum	31
3.4.1. Ákvörðun IC_{50} gildis fyrir hýdrólýsat eftir 0,45 μ m síupappír.....	31
3.4.2. Ákvörðun IC_{50} gildis fyrir hýdrólýsat eftir örsíun með 3 kDa hylki	32
3.4.3. Ákvörðun IC_{50} gildis fyrir hýdrólýsat eftir örsíun með 1 kDa hylki	33
3.4.4. Virknimæling á þáttum	34
3.5. Capillary electrophoresis	35
4. Ályktanir.....	44
Heimildaskrá.....	45

1. Inngangur

Hjarta- og æðasjúkdómar eru algengir á Íslandi og ein algengasta dánarorsökin og er hækkaður blóðþrýstingur þar einn helsti áhættuþátturinn.

Nýlegar rannsóknir benda til að áhrif próteina á heilsu séu meiri en að afla nauðsynlegrar orku og næringar. Við niðurbrot á próteinum við meltingu eða annað niðurbrot myndast smærri efni, oligopeptíð, en þá verða aminosýruraðir, sem voru óvirkar innan próteinkeðjunnar, virkar þegar peptíðin eru “leyst úr læðingi.” Þessi peptíð gegna margþættum hlutverkum sem lífeðlisfræðilegir áhrifavaldar og hafa til dæmis áhrif á blóðþrýsting, meltingu, oxunarferla og fleira í líkamanum og eru kölluð lífvirk efni (Bryndís Eva Birgisdóttir 2002; Tanaka o.fl., 2006). Það er því mögulegt að nota peptíð í heilsufæði og jafnvel lyf.

Í Japan, Finnlandi og á Íslandi hafa verið settar á markað sýrðar mjólkurafurðir sem innihalda lífvirk peptíð sem rannsóknir hafa sýnt að geti við reglubundna notkun lækkað blóðþrýsting (MS 2007; Mäyrä-Mäkinen, 2003). Á þann hátt getur regluleg neysla þessara afurða minnkað hættuna á hjarta- og æðasjúkdómum.

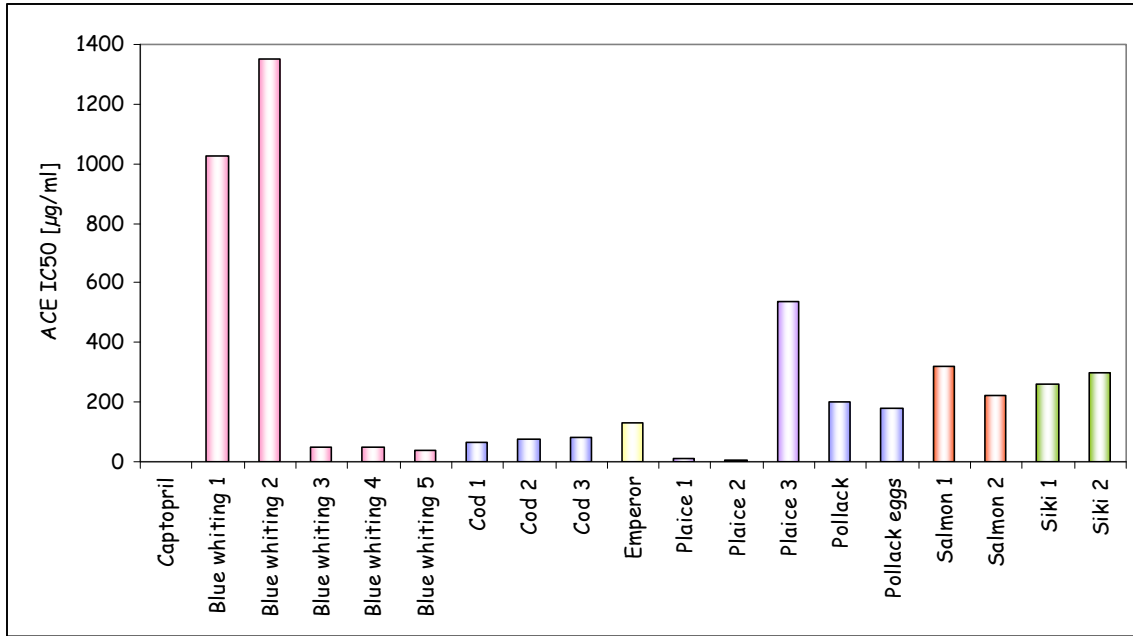
Þessar afurðir flokkast sem markfæði (e. functional foods), en það eru matvæli sem eiga það sameiginlegt að þeim hefur verið breytt í þeim tilgangi að þau hafi jákvæðari heilsusamleg áhrif á neytandann en matvælin óbreytt (UST, 2006). Skil milli þess hvað eru matvæli og hvað eru lyf geta verið á reiki þegar lesið er yfir þær fullyrðingar sem settar eru fram við markaðssetningu þessara vara enda stundum vísað til þess að þau séu á mörkum matvæla og lyfja (Swinbanks og O’Brien, 1993). Hægt er að setja spurningamerki við hvort markfæði í öllum tilfellum stendur undir því að hafa öll þau áhrif sem framleiðendur lofa umfram það að borða fjölbreyttan og hollan mat. Hjá því verður hins vegar ekki litið að markaður fyrir þessar afurðir er stór og stækkar með hverju árinu sem líður.

Faraldursfræðilegar rannsóknir benda til þess að regluleg neysla á sjávarfangi minnki hættu á hjarta- og æðasjúkdómum (He o.fl., 2004). Hingað til hafa þessi áhrif aðallega

verið þökkuð ómega-3 fitusýrum sem finnast í fiski (Vanschoonbeek o.fl., 2003). Nú er talið að aðrir þættir í sjávarfangi en fitusýrusamsetningin hafi einnig jákvæð áhrif og er það sérstaklega rakið til fiskpróteina (Tanaka o.fl., 2006).

Það markfæði sem sett hefur verið á markað og er talið hafa blóðþrýstingslækkandi áhrif er aðallega unnið úr mjólkurpróteinum. Rannsóknir benda hins vegar til þess að peptíð sem unnin eru úr fiskpróteinum hafi á sama hátt blóðþrýstingslækkandi áhrif. Til dæmis var framkvæmd rannsókn þar sem rottur með háan blóðþrýsting fengu fæði sem innihélt annars vegar 20% einangruð fiskprótein og hins vegar 20% kasein mjólkurprótein. Fæði var að öðru leyti eins og innihélt meðal annars 5% isio olíu. Blóðþrýstingur lækkaði marktækt hjá þeim rottum sem fengu fiskprótein miðað við þær sem fengu kasein (Ait-Yahia o.fl., 2003). Einnig hafa blóðþrýstingslækkandi áhrif verið mæld í sjávarafurðum eins og sardínnum, bonito (Chiletúnfiskur), þörungum og ostrum (Li o.fl., 2004; Tanaka o.fl., 2006).

Til að meta blóðþrýstingslækkandi áhrif er hægt að mæla hvort prófefni virki sem hindri á Angiotensin-I-umbreytingar ensími (Angiotensin-I-converting enzyme; ACE) (Jeon o.fl., 1999). Blóðþrýstingslækkandi áhrif hafa verið mæld *in vitro* í íslensku hýdrólýsati úr kolmunna í SeafoodPlus verkefninu ProPepHealth (mynd 1). Fimm mismunandi gerðir kolmunnahýdrólýsats voru mældar (Blue whiting 1-5 á mynd 1). Eins og sjá má komu hýdrólýsötu 3 til 5 vel út miðað við önnur sýni mæld, þ.e.a.s. lítið magn þarf af þeim til að hindra 50% virkni ACE. Nánar má lesa um lífvirkni og blóðþrýstingslækkandi áhrif peptíða í mastersritgerð Lárusar Freys Þórhallssonar (2007), skýrslu Helgu Gunnlaugsdóttur og félaga (2005) og Guðjóns Þorkelssonar og Helgu Gunnlaugsdóttur (2005).



Mynd 1. Magn. hýdrólýsats sem þarf til að hindra 50% af virkni ACE (IC₅₀) (Picot, o.fl., 2005).

Það er áhugavert að greina hýdrólýsat niður í smærri þætti og eru einkum tvær ástæður fyrir því. Í fyrsta lagi virðist sem ACE hindravirkni sé mismikil í mismunandi þáttum. Í tilraun þar sem ACE hindrunarvirkni var mæld í mismunandi þáttum úr ensímhýdrólýsu á þorskafskurði kom í ljós að smæstu einingarnar, minnstu peptíðin, höfðu mesta hindrunarvirkni (Jeon o.fl., 1999). Þar sem einungis smæstu einingarnar eru teknar upp í meltingunni er mestur áhugi fyrir því að greina virkni í smæstu einingunum. Einnig er áhugavert að greina hvaða peptíð hafa virknina sem leitað er að. Til að einangra peptíð í próteinhýdrólýsati er hægt að nota filtrun og/eða súlur (van der Ven, 2002).

Markmið verkefnisins er að rannsaka, hreinsa og einangra virk fiskpeptíð. Á fyrstu stigum þess hefur aðaláherslan verið lögð á að setja upp nýjan tækjabúnað sem nauðsynlegur er fyrir verkefnið. Framkvæmd var vinna sem fellur undir verkþætti 1 til 7 í verkáætlun. Lokið hefur verið við að skipuleggja fyrstu tilraunir (verkþáttur 1), ákveða hvaða verklýsingar notaðar eru (verkþáttur 2), vatnsrjúfa þorskflök (verkþáttur 3) í lausnir til að nota við mælingar á blóðþrýstingslækkandi áhrifum og til aðgreiningar (verkþættir 4, 5 og 6). Greiningar á þáttum var framkvæmd með efnamælingum, Capillary electrophoresis (CE) og rafdrætti (verkþáttur 7). Helsti ávinningur er

uppsetning á síubúnaði og sulum til aðgreiningar. Stór hluti verkefnisins var unninn sem hluti af mastersverkefni Lárusar Freyrs Þórhallssonar í lyfjafræði við Háskóla Íslands og er þessi skýrsla að hluta fengin úr lokaskýrslu hans.

2. Framkvæmd

2.1. Efni

Vatnsrof á þorski

Protamex®	Novozyme
Þorskflök	Fiskisaga, Höfðabakka 1

Mæling á ACE hindrunarvirkni og þróun mæliaðferðar

N-[3-(2-Fúrýl)acrýloyl]-Phe-Gly-Gly	FAPGG	Sigma
Kaptópríl		Sigma-Aldrich
Enalapríl maleate salt		Sigma
ACE úr kanínu lunga 1UN		Sigma

Gel rafdráttur

PhastGel™ Gradient 10-15	GE Healthcare Biosciences AB
Coomassie blue brilliant R-250	ICN Biomedicals
Brómóphenól Blue	sigma
PhastGel™ SDS buffer strips	GE Healthcare Biosciences AB
2-própanól	Sigma-Aldrich
EDTA	ICN Biomedicals
Glyceról	Sigma-Aldrich
Merkaptóethanól	Sigma
SDS	Sigma
Protein marker broad range (2-212 kDa)	New England Biolabs

Pökkun og keyrsla á gelsíunarsúlu

Bio-Gel® P Polyacrylamide gel, P-2 Fine 45-90 µm (wet)	Bio-Rad
Maurasýra	Fluka
Ediksýra	Riedel de-Haen

Önnur efni

Natríum hýdroxíð perlur	Merck
Natríum klóríð	Riedel de-Haen
Kalíum fosfat (dibasic puriss)	Riedel-de Haen
Kalíumdíhydrogen fosfat	Merck
Trizma hýdróklóríð (reagent grade minimum 99%)	Sigma
Tris(hýdroxýmethyl)aminómetan 99,9% ultrapure	Sigma
Ferrítín HMW gel filtration kit	Pharmacia Biotech
Cýsnókóbólámín 1 mg/mL	Sygehus apotekerne

2.2. Tæki

Vatnsrof á þorski

Hitabað 20 B	Julabo
IKA [®] RW 20 digital	IKA [®]
718 STAT Titron	Metrohn
Blandari	Waring
Ultra-Turrax [®] homogenizer	IKA [®]

Mæling á ACE hindrunarvirgni

Sveip blandari (Stuart Vortex Mixer)	Bibby Sterlin Ltd.
Ljósmælir (Ultrospec 300 Pro)	Amersham Pharmacia Biotech
Hitabað EC 5M	Julabo
Plast kúvettur (10x4x45mm)	Sarstedt

Gelrafráttur

Phastsystem [™] Gel chamber	Pharmacia Biotech
ALPS - 300 (automated lab plate sealer)	AB-Gene
PTC-225 (peltier thermo cycler)	MJ Research
Örplötublandari (Titramax 1000)	Heidolph

Gelsíunarsúlur, pökkun og keyrsla

ÄKTA purifier (vökvaskilja)	Amersham Pharmacia Biotech
Fraction collector Frac-950	Amersham Pharmacia Biotech
Econo-column [®] Flow Adaptor	Bio-Rad
Econo-Column [®] súlur, 2,5 x 100 cm	Bio-Rad

Örsíun á fiskhýdrólýsati

Prep/Scale [™] -TFF Cartridge 1 kDa og 3 kDa	Millipore
Prep/Scale [™] -TFF Cartridge haldari	Millipore
Hitaskápur	Binder

Önnur tæki

Skilvinda (T3-25 Centrifuge)	Beckman Coulter
Skilvinda 2 (Avanti [™] J-20 x p1 centrifuge)	Beckman Coulter
Vog 1 (PB3002-s Deltarange R)	Mettler Toledo
Vog 2 (AG204 Deltarange R)	Mettler Toledo
Plasttilraunaglös með rauðum tappa	Sarstedt
Síur (0,22 µm og 0,45 µm)	Millipore
Sprautusíur (0,45 µm)	Schleicher & Schuell
96 brunna míkroplötur	NUNC
Segulhræra/hitaplata (RCT basic IKAMAG [®])	IKA [®]
pH mælir	Radiometer Copenhagen
Frostþurrkari (Lyolab 3000)	Heto

2.3. Aðferðir

2.3.1. Vatnsrof

Þorsklök voru keypt að morgni tilraunadags hjá Fiskisögu að Höfðabakka 1 í Reykjavík. Fiskurinn var hakkaður í blandara og þynntur með vatni svo próteininnihald væri um 3%. Lausnin var gerð einsleit í jafnara (homogenizer) í eina mínútu og síðan sett í hitabað við 30°C. Þegar því hitastigi hafði verið náð var sýrustig stillt á pH 7.5 með 2 M NaOH.



Mynd 2. Tæki notuð við hýdrólýseringu.

Ensímrof er framkvæmt með aðstoð pH stat tækis (718 STAT Titrion, Mynd 2). Hlutfall ensíms (E) og hvarfefnis (S) E/S var 1/33. Rétt magn ensíms var vigtað ásamt 25 g af vatni og bætt út í hvarflausnina og pH stat tæki sett af stað, en pH stat tæki sér um að bæta við basa til að viðhalda réttu sýrustigi á meðan á hvarfi stendur. Þegar stig vatnsrofs (%DH – sjá næstu síðu) var 10% var hvarf stöðvað með hitun í 85°C heitu hitabaði með hristingu í 20 mínútur. Sýnið var látið kólna yfir nótt í kæli og sett í skilvindu í 30 mínútur við 10.000 x g. Lausn síuð í gegnum Whatman pappír nr. 4 og að því loknu í gegnum 0,45 µm síupappír. Lausn sett í kæli þangað til frekari þáttun var framkvæmd.

Stig vatnsrofs (Degree of hydrolysis, %DH) var reiknað frá magni og styrk basa sem var notað til að viðhalda stöðugu sýrustigi á meðan á ensímiðurbroti stóð. DH er skilgreint sem fjöldi peptíðtengja (h) sem hafa verið klofin sem hlutfall af heildarfjölda peptíðtengja (Adler-Nissen 1986).

$$\%DH = \frac{h \times 100}{h_{tot}} = \frac{BN_B}{\alpha h_{tot} \times MP} \times 100$$

Þar sem

B = magn basa [ml].

NB = styrkur basa [M].

α = vatnsrofsstuðull (“average degree of dissociation”) α -NH hópa (sjá neðar).

MP = magn próteins [g].

h_{tot} = heildarfjöldi peptíðtengja. h_{tot} gildi fyrir þorsk sem er 7,501 mequiv/g.

α vatnsrofsstuðull, var reiknaður skv.

$$\alpha = 10^{pH-pK} / (1 + 10^{pH-pK})$$

Þar sem

pH = sýrustig við ensímvatnsrof.

pK = meðaltal jafnvægisfasta fyrir NH hópa aminosýranna.

pK gildi sem fall af hitastigi (T í Kelvin) var reiknað skv:

$$pK = 7.8 + \frac{298 - T}{298T} \times 2400$$

2.3.2. Mæling á ACE hindrun

Kanínulungna ACE 1 UN frá Sigma var leyst upp í 5 mL af afjónuðu vatni og skipt í nokkra skammta sem hafa þá styrkleikann 0,2 U/mL (Vermeirssen og félagar 2005). Uppleyst ensímið var síðan geymt í frysti þar til það var notað í virknipróf. Útbúin var 0,5 mM FAPGG hvarfefnislausn í 50 mM Tris HCl pH 7,5, 300 mM NaCl. Upphaflega var sett 100 µL af vatni (blankur) eða hindra í tilraunaglas og bætt við það 25 µL (5mU) af ACE lausn. Þessi blanda var hituð við 37°C í 2 mínútur í hitabaði. Síðan var bætt við 900 µL af FAPGG lausn og blandað með sveip (vortex) blandara, tilraunaglassið var sett aftur í hitabaðið og látið standa þar í 2 mínútur. Síðan var hvarflausnin flutt með pípettu yfir í tóma kúvettu sem búið var að koma fyrir í ljósmælinum. Gleypnin var mæld með afjónað vatn sem viðmið í hituðum kúvettuhaldara (37°C) á 5 mínútna kafla. Settur var 30 sekúndna lag-tími á keyrsluna. Gleypniminnkunin sem á sér stað samsvarar ensím virkninni. Gerðar voru fjórar keyrslur fyrir hvert sýni. Hallatalan sem fæst út frá gleypniminnkuninni samsvarar gleypniminnkun á mínútu. Meðaltal hallatalnanna fjögurra var sett inn í eftirfarandi jöfnu til þess að reikna ACE hindrunina:

$$\% \text{ ACE hindrun} = \left(1 - \left(\frac{\Delta A_{\text{hindri}}}{\Delta A_{\text{blankur}}} \right) \right) \times 100 \%$$

Mynd 3 sýnir hvernig uppsetning var við mælingu á ACE hindrun: Ljósmælir, hitabað og sveipblandari. Nánari lýsing á aðferðafræði má sjá í skýrslu Lárusar og félaga (2007).



Mynd 3. Ljósmaerir, hitabað og sveipblandari.

2.3.3. Örsiun á þorsk hýdrólýsötum

Notast var við Prep/Scale™-TFF hylki sem var einskonar súla vafin að innan með ákveðinni síu. Hylkin voru af tveim síugerðum, 1 kDa og 3 kDa (mynd 4).



Mynd 4. Prep/Scale™-TFF hylki.

Þegar hylki (cartridge) er notað í fyrsta skiptið þarf að skola í gegnum það með vatni, hreinsa með NaOH og skola aftur í gegnum það með vatni. Þessi vatnsskolun og hreinsun fer fram samkvæmt ákveðnu kerfi sem gefið er upp af framleiðanda og hentar þessum súlustærðum ($0,6 \text{ m}^2$). Eftir að hýdrólýsat hafði verið síað þurfti að endurtaka skolun og hreinsun og skola síðan aftur. Þegar notkun og hreinsun var lokið var hylkið fyllt með 0,1 M NaOH og geymt í kæli.

Skolun

1. Þegar hylkið er nýtt er það geymt í 0,1 % alkýl-benzýl-dímetýl ammóníum klóríð lausn, fyrir notkun voru tapparnir fjarlægðir úr götum hylkisins og vökvinn hristur úr því yfir vaski (mynd 5). Ef búið var að nota hylkið áður þarf einnig að hrista úr því þann geymsluvökva (0,1 M NaOH) sem hafði verið hlaðinn á.



Mynd 5. Sturtað úr hylki

2. Hrat (retentate) og gegndræpi (permeatae) slöngunum er komið fyrir í sitt hvorri mælikönnunni og dæluslangan sett í skolvökvann.

3. Skolvökvinn er eimað vatn sem er búið að hita við 50°C í a.m.k einn sólarhring áður en skolun fer fram. Á meðan skolun stendur er skolvökvinn geymdur á hitaplötu sem stillt er á 50°C til að viðhalda því hitastigi (mynd 6).
4. Upphaflega eru 2 lítrar látnir fara í gegnum hratlínuna. Þegar dæling hefst skal hafa hraðann eins lítinn og unnt er en auka hann svo í rúmlega 1 L/mín.
5. Síðan eru 6 lítrar látnir fara í gegnum gegndræpslönguna með því að skrúfa fyrir hrat lokuna. Fylgjast skal vel með þrýstingnum á kerfinu og stýra flæðihraða dællunnar þannig að einhver vökvi komi út úr gegndræpslöngunni. Meiri þrýsting þarf á 1 kDa hylkið en 3 kDa hylkið.
6. Að lokum er 1 lítri látinn fara í gegnum hratslönguna með dæluhraðann 1 L/mín.

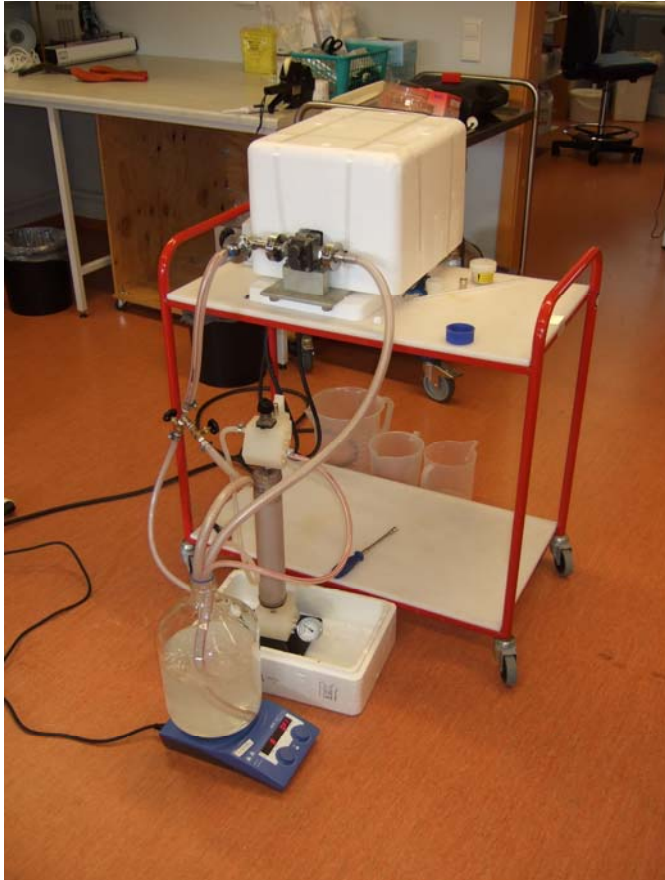


Mynd 6. Uppsetning við skolun.

Hreinsun

1. Hreinsivökvinn er 4 - 5 L af 0,1 M NaOH sem búið er að hita við 50°C í að minnsta kosti sólarhring áður en hreinsun fer fram. Á meðan á hreinsun stendur er hreinsivökvinn geymdur á hitaplötu sem stillt er á 50°C til að viðhalda hitastiginu

2. Gegndræpi- og hratslöngunum ásamt dæluslöngunni er komið fyrir í hreinsivökvanum.
3. Dælan sett í gang á lágum hraða sem síðan er hækkaður upp í 4 L/mín og þrýstingur stilltur á 1,4 bör. Þetta er síðan látið hringsóla í klukkutíma (mynd 7).



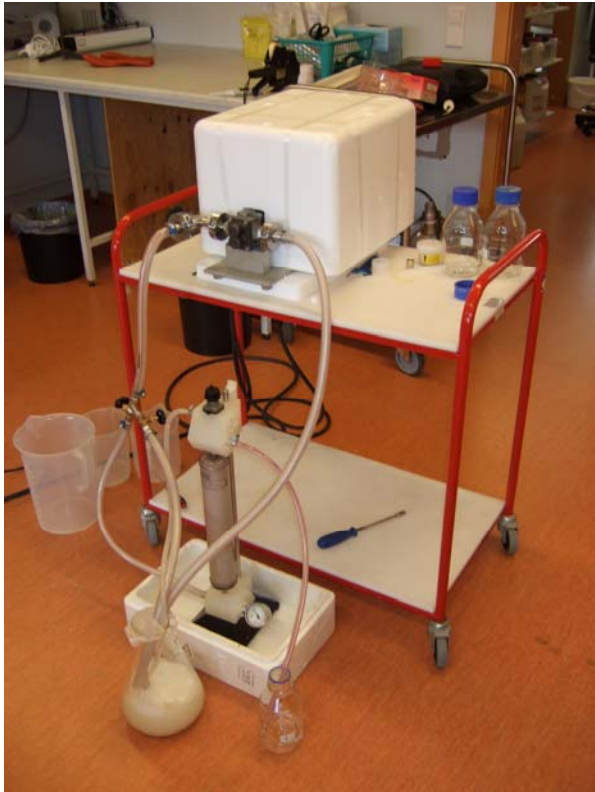
Mynd 7. Uppsetning við hreinsun.

4. Hratlokuna þarf að opna og loka að hluta tvisvar á þessum tíma til að ná að skola allt yfirborð hennar vel.
5. Hrat- og gegndræpislöngunum er komið fyrir í tómu íláti þegar klukkutíminn er liðinn og hreinsivökvinn er kláraður.
6. Allur vökvi sem situr eftir í hylkinu er fjarlægður með því að losa hylkið úr haldaranum og hrista það yfir vaski.
7. Skolað með vatni samkvæmt skolleiðbeiningum.

Síun á fiskihýdrólýsati

1. Hýdrólýsatinu er komið fyrir í bikarglasi sem rúmar það magn sem skal sía.

2. Hrat- og gegndræpslöngum er komið fyrir í sitt hvort safnlátíð og dæluslangan sett í hýdrólýsatið.
3. Dæla er sett í gang og þrýstingur og hraði stilltur þannig að vökvi komi í gegnum gegndræpslönguna. Hýdrólýsatið freyðir mjög mikið þegar dælan er sett í gang (mynd 8). Þegar búið er að fá viðunandi magn úr gegndræpilínunni er slökkt á dælunni.



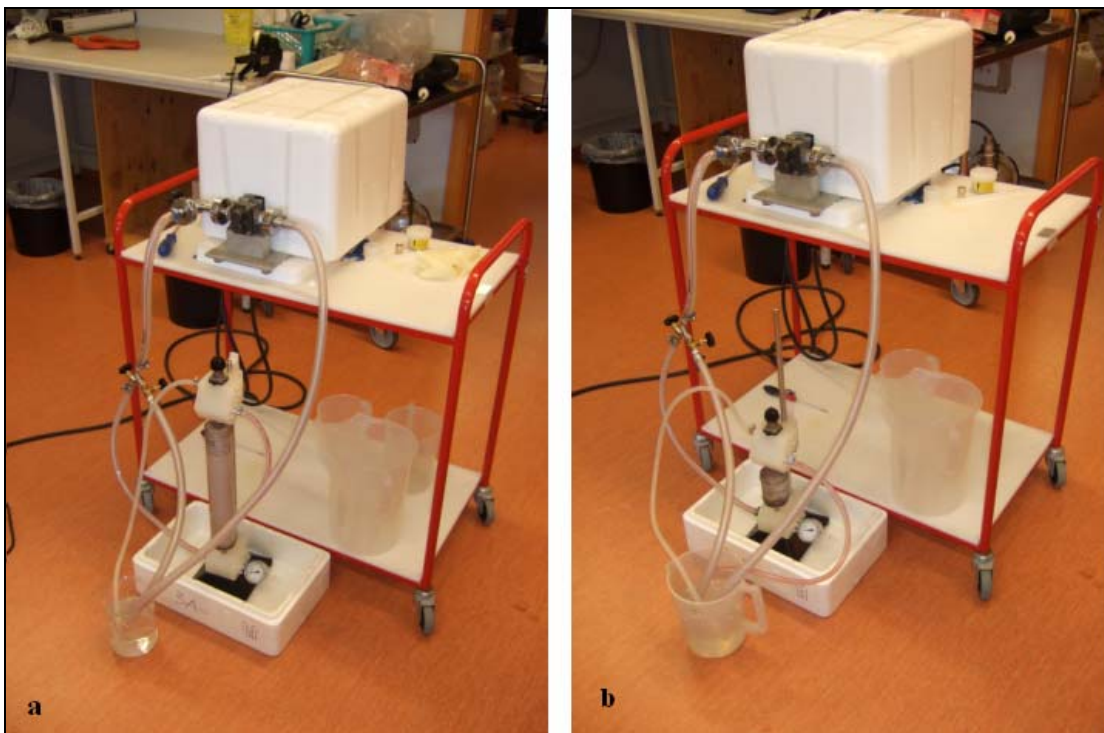
Mynd 8. Uppsetning við síun.

4. Tekin voru sýni af bæði hratvökva og gegndræpivökva og þau fryst.
5. Gegndræpilausnin var síðan merkt og henni komið fyrir í kæli.
6. Búnaður skolaður, hreinsaður og skolaður.

Hleðsla á geymsluvökva og hreinsun haldara

1. Þegar hreinsun og skolun er lokið er gegndræpi- og hratslöngunum komið fyrir í u.þ.b. 1 lítra af 0,1 M NaOH.

2. Kveikt á dælu og hraðinn hækkaður í 4 L/mín, hratloku og hraða stillt þannig að þrýstingurinn sé 1,4 bör.
3. Vökvinn er látinn hringsóla í 2 mínútur (mynd 9 a).
4. Slökkt á dælu og hylki losað úr.
5. Hylki sem er fullbleytt er komið fyrir í lokuðum plastpoka og geymt í kæli.
6. Haldarinn er skolaður með eimuðu vatni með því að setja tómt hreinsunarhylki í haldarann og keyra í 2 mínútur (mynd 9 b).
7. Þurrkað er af haldaranum með vatni og etanóli.



Mynd 9. Áfylling á hylki með NaOH (a) og skolon á haldara með tómu hylki (b).

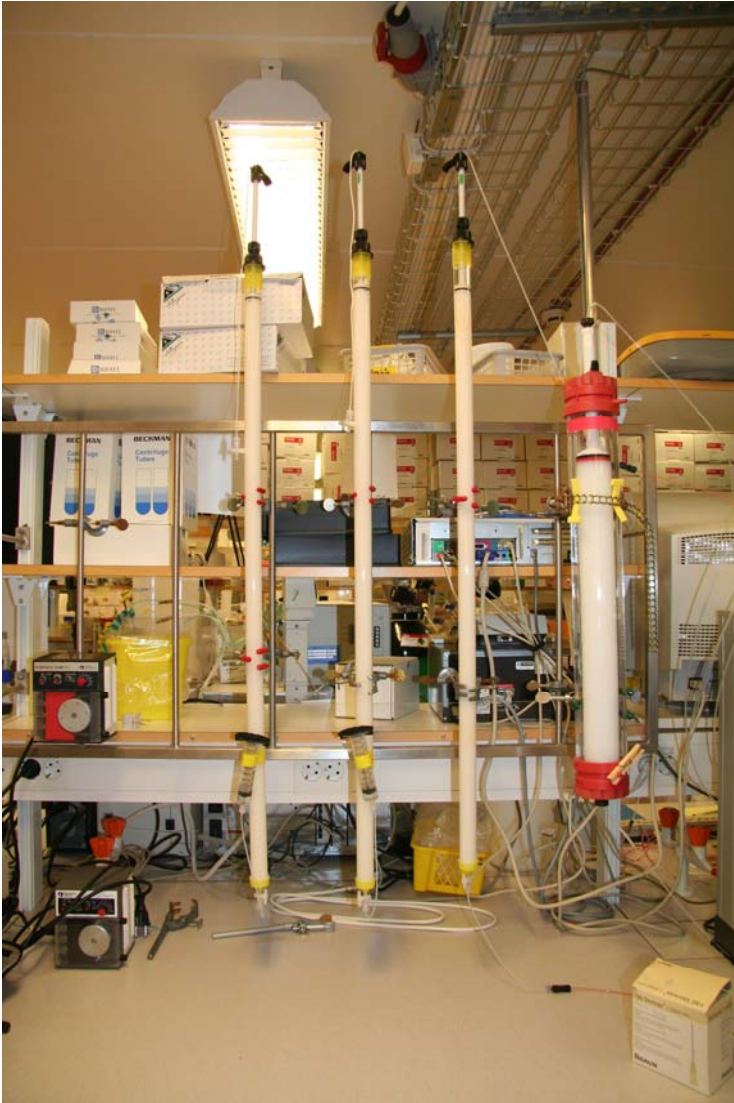
2.3.4. Pökkun á súlu og keyrsla staðla

Gelduftið var bleytt upp í 20 mM Tris buffer, pH 7,4 með 100 mM NaCl og látið þenjast út í þrjár klukkustundir. Súlnni stillt upp og hún rétt af með hallamáli. Súlan fyllt af geli með því að láta það renna á glerstaf ofan í forðahólfíð (mynd 10).



Mynd 10. Forðahólf fyllt með geli.

Þegar forðahólfíð var orðið fullt var lokinu komið fyrir ofan á það. Stuðpúðinn sem notaður var til að bleyta upp gelið var látinn dropa í gegnum forðalokið með þeim hraða að hann sé jafn þeim hraða sem stuðpúðinn fór út af súlunni. Ef hraðinn út af súlunni breyttist eitthvað var hraðanum inn á súluna breytt í samræmi við það. Þegar það gel sem var á súlunni var búið að setjast niður var forðahólfíð tæmt með pípettu og það fyllt aftur með gellausn. Þetta var síðan endurtekið þar til súlan var fullpökkuð. Mynd 11 sýnir allar þrjár súlurnar pakkaðar.



Mynd 11. Súlurnar tilbúnar.

Þegar súlan hafði verið pökkuð að því marki sem sett var, var gelinu þrýst niður með aðfallsmillistykkinu (flow adaptor). Þegar súla var tilbúin var keyrður í gegnum hana staðall með einkennandi lit til að kanna hvernig efnið dreifðist á súlunni og hvort að það fengist ekki skarpur toppur. Á súlu 1 var keyrður 20 mg/ml ferrítín staðall (mynd 12) en þar sem efnið skildi eftir sig gulbrúnan lit efst í súlunni var talið að það væri ónýtt. Því voru súlur 2 og 3 keyrðar með 0,5 ml af 1mg/ml cyanokóbólamín staðli.



Mynd 12. Ferritín staðall keyrður á súlu 1.

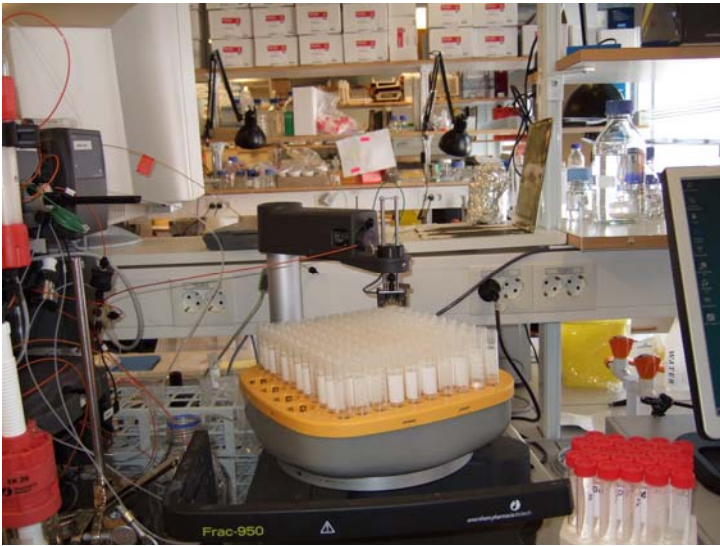
2.3.5. Gelsíun á hydrólýsati

Súlurnar voru tengdar saman og forkeyrðar með 5 % maurasýru. Frostþurrkað sýnið var leyst upp í 5 % maurasýru, í eins litlu magni og unnt var. Lausnin var sett í skilvindu við 5.400 x g í 30 mínútur og síðan síuð í gegnum 0,45 μ m sprautusíu. Að þessu loknu var sýnið tilbúið til þess að fara inn á súlurnar. Aðfallsmillistykkið var tekið af súlunni og mest allur vökvinn sem lá ofan á gelinu fjarlægður með pípettu. Þegar búið var að fjarlægja vökvann var sýnið flutt á gelið með pípettu. Lausninni var síðan þrýst niður í gelið með því að setja lok á súluna og þrýsta inn lofti með sprautu. Þegar sýnið var komið niður í gelið var aðfallsmillistykkið sett aftur á og þrýst á gelið. Við keyrslu í gegnum súluna var notast við Akta purifier vökvaskilju (mynd 13) sem tengd var við þáttasafnara (mynd 14). Kerfið var sett í gang með flæðihraðann 0,5 mL á mínútu.

Þegar fyrstu topparnir fóru að skila sér út af súlunum var þáttasafnarinn settur í gang. Í hvert glas var safnað 5 ml og þar sem þáttasafnarinn tekur 120 glös þurfti að skipta um áður en 20 klst. voru liðnar. Þegar efni var hætt að koma út af súlunni voru glös sameinuð í bikarglas eftir því hvaða toppi þau tilheyrðu. Þegar búið var að sameina alla toppana var plastfilma sett á bikarglösin og þeim komið fyrir í frysti til að gera efnið klárt til frostþurrkunar.



Mynd 13. Akta purifier vökvaskiljan.



Mynd 14. Þáttasafnarinn.

2.3.6. Gel rafdráttur

Hleðslustuðpúði var útbúinn með eftirfarandi efnum:

- 4 mL af 1 M Tris/HCl pH 6,8.
- 800 µl af 0,5 M EDTA.
- 0,77 g af SDS 5 %.
- 8 mL af glyceról 50 %.
- Brómóphenól blue í litlu magni var tekið á spatúlu og bætt út í.
- 50 mÍkrólÍtrar af merkaptóethanóli sett í 950 mÍkrólÍtra af þessari lausn rétt fyrir notkun.

Í sitt hvorn brunninn á 96 brunna mÍkróplötu voru sett 10 µl af próteinvísi og 10 µl af sýni. Í brunnana var síðan bætt við 3 µl af hleðslustuðpúða og pípettað upp og niður. MÍkróplötunni var lokað með því að setja hana í plöstinarvél og hún síðan sett í hitunartækið (peltier thermal cycler) til að sjóða sýnin í 5 mínútur. Kveikt var á rafdráttartækinu (mynd 15) og því leyft að hita sig upp í smá tíma.

Parafínfilmur var þrýst á sýnabrunnsstimpilinn til þess að fá á filmuna lítil hólfr með jöfnu bili, sem hægt var að setja sýnin á. Sýni og vísi var komið fyrir í brunnunum á parafínfilmunni, það magn efnis sem sett var í brunnana var a.m.k tvöfalt það magn sem kemst í sýnahólfið á greiðunni.

Áður en gelið var lagt í tækið var settur vatnsdropi á gelsvæðið sem á að nota, gelinu var síðan komið fyrir á svæðinu með því að leggja það á dropann og nudda því fram og tilbaka þannig að ekkert loft sé á milli gelsins og grunnsins heldur aðeins vatn. Muna þarf að taka plastfilmuna af þeirri hlið gelsins sem á að snúa upp. Þegar búið var að koma gelinu fyrir í tækinu voru stuðpúðastrimlar lagðir í sitt hvort hólfið, við anóðu og katóðu.



Mynd 15. Phastsystem™ Gel chamber.

Sýnagreiðan (sample applicator) var lögð í sýnin sem búið var að koma fyrir í holunum á plastfilmunni og sýni safnað í hólfin. Gæta þurfti þess að ekki væru neinar loftbólur í sýnunum áður en greiðan var lögð á, því annars kemst loft upp í hana. Þegar nægilegt magn sýnis var komið í greiðuna var greiðan lögð á gelið og sýnið fluttist yfir. Tækið var sett af stað og rafdráttur hófst. Þegar honum var lokið var gelið litað með Fairbanks litun svo unnt væri að sjá böndin.

2.3.7. Fairbanks litun

Útbúnir voru fjórar eftirtaldar lausnir :

- A: 0,05 % kúmassí (coomassie) blár, 25 % ísóprópanól, 10 % ediksýra.
- B: 0,005 % kúmassí (coomassie) blár 10 % ísóprópanól, 10 % ediksýra.
- C: 0,002 % kúmassí (coomassie) blár, 10 % ísóprópanól, 10 % ediksýra.
- D: 10 % ediksýra.

Gelið var lagt í lausn A og hitað í örbylgjuofni í eina mínútu. Vökvanum hellt af og lausn B hellt yfir gelið og hitað í eina mínútu. Vökvanum var hellt af og lausn C hellt yfir gelið

og hitað í örbylgjuofni í eina mínútu. Vökva var hellt af og lausn D var hellt yfir gelið og hitað í eina mínútu. Þetta var síðan kælt við stofuhita á rólegri hristingu. Þegar liturinn var farinn af gelinu og blettirnir orðnir mjög greinilegir var það tilbúið. Vökvanum var hellt af gelinu, það sett í plastvasa og skannað inn í tölvu.

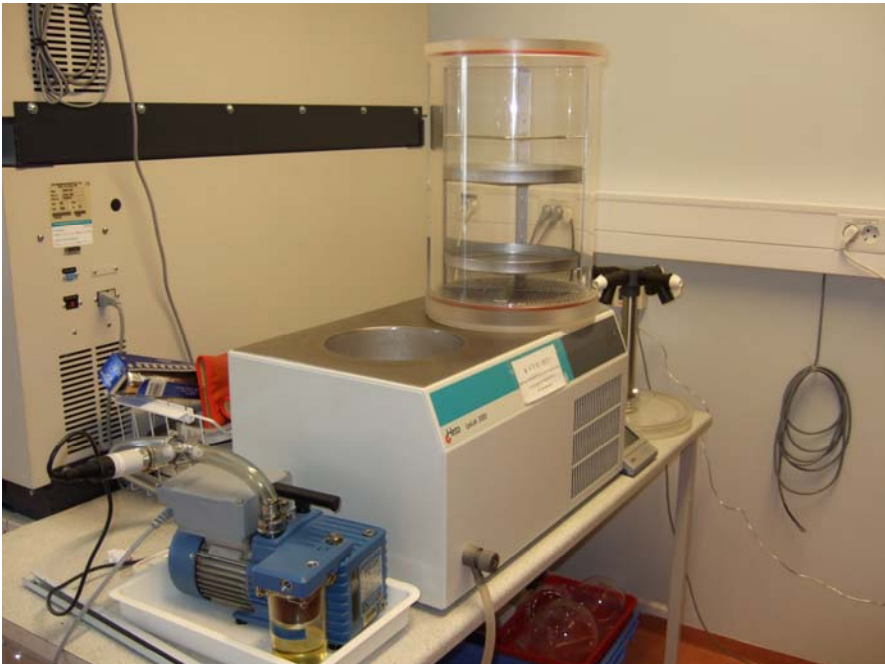
2.3.8. Frostþurrkun

2.3.8.1. Frostþurrkun hýdrólýsata

Hýdrólýsatinu var skipt í nokkra skammta í plastskálar og þær settar í frysti. Þegar hýdrólýsatið var fullfryst var plastfilma sett yfir skálarnar og á hana stungin nokkur göt. Skálunum var síðan komið fyrir í frostþurrkaranum (mynd 16). Tveimur sólarhringum síðar var hýdrólýsatið fjarlægð úr frostþurrkaranum. Frostþurrkað duftið var hvítt og mjög fingert. Duftinu var komið fyrir í plastíláti og vegið.

2.3.8.2. Frostþurrkun þátta

Bikarglösin voru tekin út úr frysti og göt stungin á plastfilmurnar og þeim komið fyrir í frostþurrkaranum. Sex sólarhringum síðar voru glösin fjarlægð úr honum.



Mynd 16. Frostþurrkarinn.

2.3.9. Undirbúningur lausna fyrir ACE og CE mælingar

Fyrir mælingu á ACE og CE voru leysanleg prótein/peptíð einangruð úr frostþurrkuðu dufti með aðferð Morr og féлага (1985) með smá breytingum. Um 0,5 g af dufti vegið nákvæmlega í 150 ml bikarglas ásamt um 40 ml af 0,1M NaCl lausn. Segli komið fyrir í glasi, sett á segulhræru og hrært í 1 klst án þess að “vortex” myndaðist. Að þeim tíma loknum var lausn færð í 50 ml mæliflösku og fyllt að marki með 0,1M NaCl lausninni. Skilvindað í 30 mínútur við 20.000 x g. Floti safnað og notað í CE mælingar og ACE mælingar.

2.3.10. Próteinmæling

Próteinmagn í lausnum fyrir ACE og CE mælingu var mælt með aðferð Dumas hjá Nýsköpunarmiðstöð Íslands í macro analyzer vario MAX CN tæki frá Elementar. Í stuttu máli þá er sýnið brennt við 900°C með háhreinu súrefni í háhreinum Helium burðarfasa. Bruninn er síðan fullkomnaður með sérstökum súlum og öll önnur gös en N₂ og CO₂ hreinsuð burt og allur raki fjarlægður. Mælinemi var TCD (Thermal conductivity detector). Aðferð Dumas byggir á því að mæla köfnunarefni (N) sem er til staðar í sýninu sem er síðan umreiknað yfir í prótein.

2.3.11. Capillary Electrophoresis

Aðferð til greiningar á peptíðum með capillary electrophoresis var byggð á aðferð Engvang og Nielsen (2000) og frá Henrik H. Nielsen (2004). Fosfatbuffer (100 mM, pH 2.75, filteraður gegnum 45µm filter og afgasaður) var notaður sem aðgreiningarbuffer (separation buffer). Fyrir fyrstu notkun hárpípusúlunnar eða langa geymslu var súlan skoluð með 1M NaOH (60 mín), 0.1 M NaOH (15 mín), H₂O (5 mín), 100mM fosfórsýru (10 mín) og aðgreiningarbuffer (15 mín). Hitastig súlunnar var 25°C. Sýni var sprautað inn við þrýstinginn 15 kNsm⁻² og aðskilið við fastan straum (constant voltage of 15kV) í 20 mínútur. UV-gleypni var mæld við 195 nm, 214 nm og 280 nm með DAD skynjara. Milli keyrslna var súlan hreinsuð (preconditioned) með 100 mM fosfórsýru í 5 mínútur og með greiningarbuffer í 8 mínútur. Aðgreiningarbuffer var endurnýjaður fyrir hverja keyrslu. Af sýni voru teknir 0.3 ml og fluttir í Ependorfph glas ásamt 0.3 ml af

100 mM fosfat buffer sýrustig 2.7. Lausn færð í sprautu með 0,45µm síu og síað í CE –
glas og mælt að því loknu.

3. Niðurstöður

3.1.1. ACE hindrunarmæling

Gerð var ACE hindrunarmæling á báðum lausnum áður en farið var í frekari þáttun til að kanna hvort virkni væri til staðar í hýdrólýsati eða ekki (tafla 1).

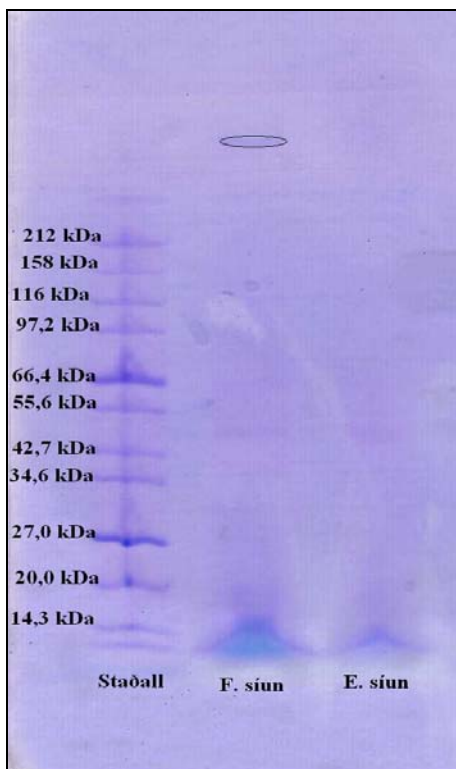
Tafla 1. ACE hindrunarmæling á hýdrólýsati fyrir og eftir 45 μ m síun

Sýni	Meðaltal	Staðalfrávik	Hindrun [%]
Blankur	0,00855	\pm 0,00044	-
Hýdrólýsat f. síun	0,00065	\pm 0,00021	92,40%
Hýdrólýsat e. síun	0,000625	\pm 0,00004	92,69%

Mælingarnar staðfestu að hindrun væri til staðar, því var óhætt að setja af stað þáttun á síuðu hýdrólýsati með örsíun.

3.1.2. Gel rafdráttur

Gerður var gelrafdráttur á báðum lausnum (mynd 17).



Mynd 17. Gelrafdráttur á hýdrólýsati.

Eins og sjá má á myndinni var eitt prótein sem var stærra en 212 kDa í ósíaða sýninu. Einnig var fullt af efnum sem voru með mólþunga um 14 kDa og undir. Þegar litið er á sýnið sem búið var að sía sést að próteinbandið sem var á sýninu fyrir síun er horfið og þær agnir sem voru eftir eru allar undir 14 kDa.

3.2. Örsíun á þorskhýdrólýsati

3.2.1. Örsíun með 3 kDa hylki

Hýdrólýsati, u.þ.b. 3 lítrar (1586 g), var komið fyrir í örsíunarkerfinu og safnað var þar til u.þ.b.1 lítri var kominn í safnflöskuna. Fyrir síun var vökvinn gullitaður, en eftir síun hafði hann tapað nokkru af lit sínum en var samt gulur og tær eins og áður.

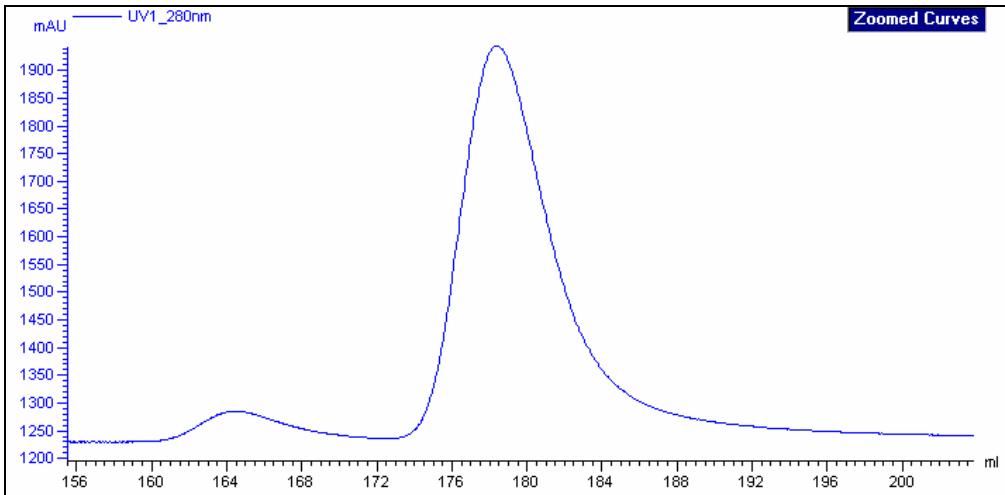
3.2.2. Örsíun með 1 kDa hylki

Öllum vökva sem safnað var eftir 3 kDa síun er komið fyrir í örsíunarkerfinu og safnað er þar til u.þ.b. 0,5 L er kominn í safnflöskuna. Síaði vökvinn er nánast laus við allan lit. Allur vökvi sem safnað var í þessu skrefi var frostþurrkaður. Frostþurrkað hýdrólýsatið gaf af sér 3,783 g af hvítu fingerðu dufti.

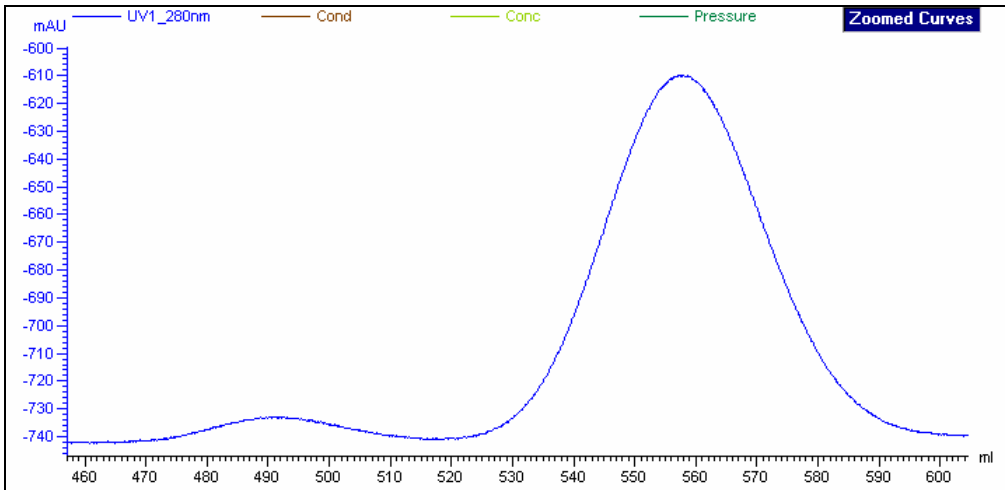
3.3. Gelsíun

3.3.1. Stöðlun á súlum

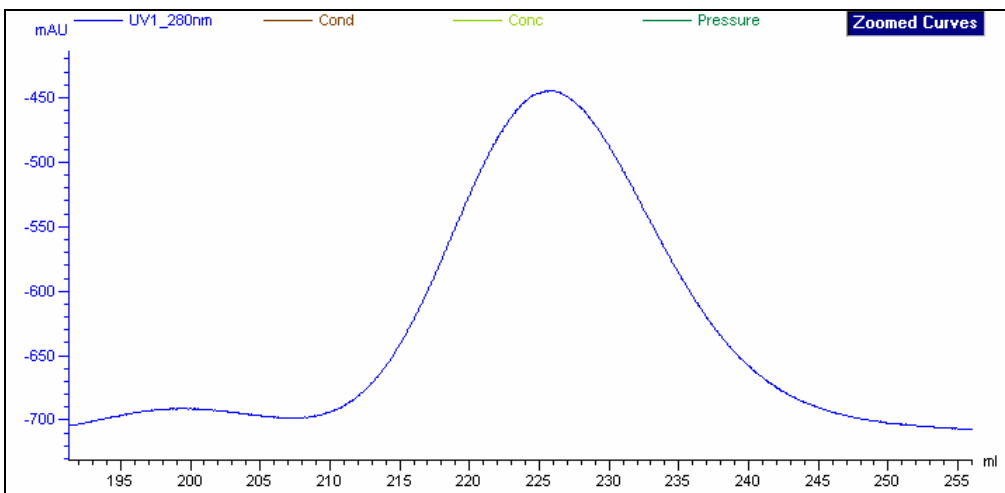
Súla 1 var stöðluð með ferritíni en súlur 2 og 3 voru staðlaðar með cýanókóbólamíni. Mynd 18 sýnir staðaltoppinn á súlu 1, mynd 19 sýnir staðaltoppinn á súlu 2 og mynd 20 staðaltoppinn á súlu 3. Topparnir koma mjög vel út og var því óhætt að raðtengja súlurnar og keyra hýdrólýsatið í gegnum þær. Toppurinn á súlu 1 var frábrugðinn toppunum á súlum 2 og 3 vegna þess að í því tilviki var notaður annar staðall.



Mynd 18. Toppur fyrir stöðlun á súlu 1.



Mynd 19. Toppur fyrir stöðlun á súlu 2.



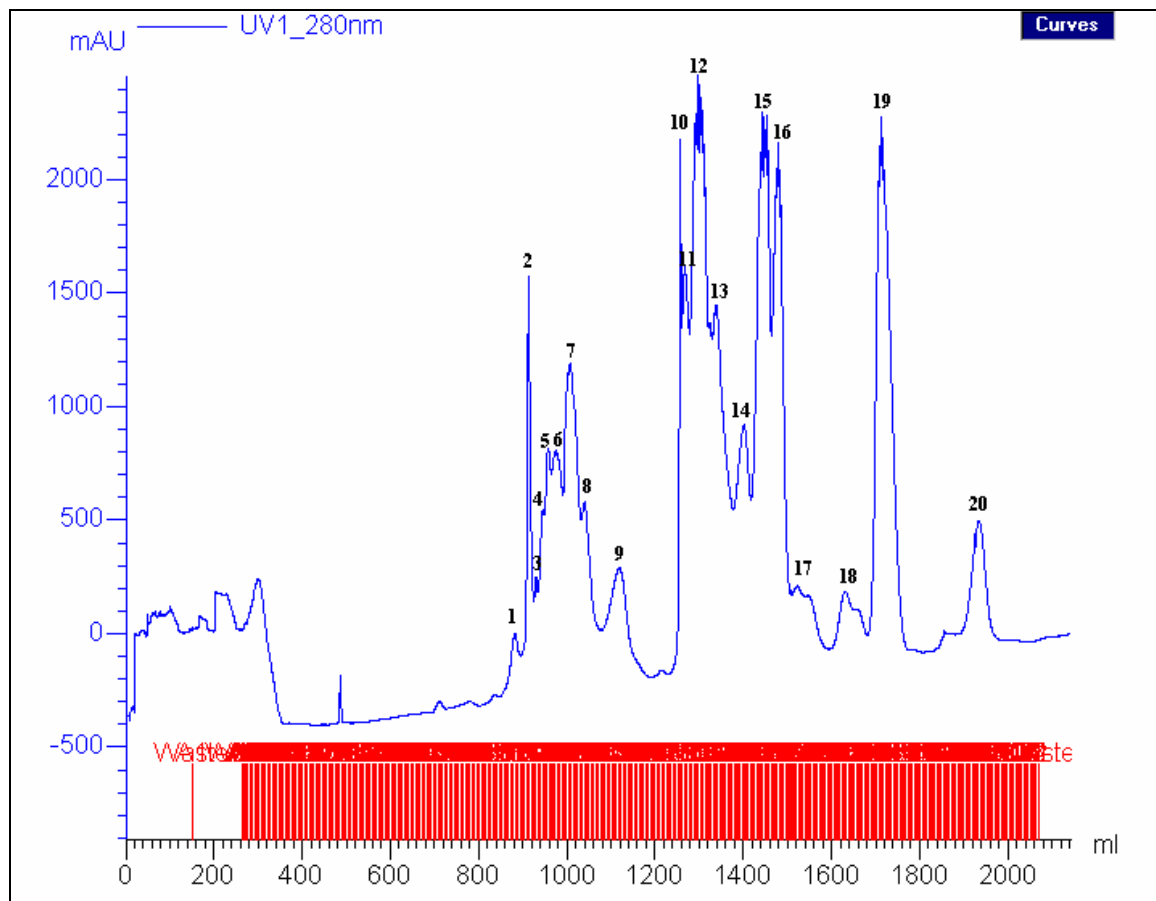
Mynd 20. Toppur fyrir stöðlun á súlu 3.

3.3.2. Þáttun á hýdrólýsati

Þegar búið var að undirbúa frostþurrkað hýdrólýsatið (3,783 g) með því að leysa það upp og síá, var sýnið keyrt á súluna. Keyrslan stóð í um það bil þrjá sólarhringa og var þáttasafnarinn ræstur fjórum sinnum á því ferli. Ákveðið var að sameina viðeigandi þætti sem tilheyra 20 mismunandi toppum í jafnmörg bikarglös. Mynd 21 sýnir hvaða toppi hvert glas tilheyrði og tafla 2 sýnir hvað hvert glas inniheldur mikið rúmmál.

Tafla 2. Rúmmál þátta.

Toppur nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
mL	30	20	10	15	15	30	35	30	45	10	15	50	30	40	45	50	75	20	75	10



Mynd 21. Niðurstöður gelsíunar á 1 kDa hýdrólýsati.

3.3.3. Frostþurrkaðir þættir

Næst voru allir þættir frostþurrkaðir. Frostþurrkunin tók fimm daga. Í töflu 3 er að finna lýsingar á hverjum þætti fyrir sig.

Tafla 3 Lýsing á frostþurrkuðum þáttum.

Þáttur	Lýsing á þætti
1.	Gulleitt efni
2.	Gulleitt duft
3.	Gul klessa föst við botninn í glasinu, mjög sterk ammoníaklykt
4.	Gul klessa föst við botninn, skrítin lykt
5.	Hvítt efni fast við botninn í glasinu
6.	Hvít og gul klessa, mjög sterk lykt
7.	Gulleitt duft
8.	Hvítt duft með smá gulum og brúnum lit, vond lykt
9.	Gul olúklessa, sterk lykt
10.	Brún rák á botni og nokkrar litlar klessur, mjög sterk lykt
11.	Gulbrúnar klessur, lykt svipuð og í þætti 10
12.	Svört klessa, mjög sterk og vond lykt
13.	Ljósbleikt með dökkum flygsum, dauf lykt
14.	Grátt og brúnt efni, dauf lykt
15.	Fjólublá klessa, engin lykt
16.	Lítill svört klessa, mjög vond lykt
17.	Ekkert að sjá nema pínu óhreinindi í botni, gulur litur í köntum, sterk og vond lykt
18.	Lítill gul klessa í miðju glasinu, dauf lykt
19.	Lítill óhreinindi, dauf lykt
20.	Lítill gul óhreinindi á botninum, dauf lykt

Settir voru 3 mL af vatni í hvert glas til þess að leysa upp efnin, 5 mL af vatni voru settir út í glas 15 til að leysa það efni upp að fullu. Eftir upplausn voru flestar lausnirnar gulleitar, nema lausnir 12 og 16 sem voru svartar og lausn 15 sem varð litlaus. Tekið var 750 µl sýni úr hverju glasi til þess að nota í ACE prófanir, afgangurinn var frystur þar til frekari vinnsla með efnið var ákveðin.

3.4. ACE hindrunarmælingar á hýdólýsötum og þáttum

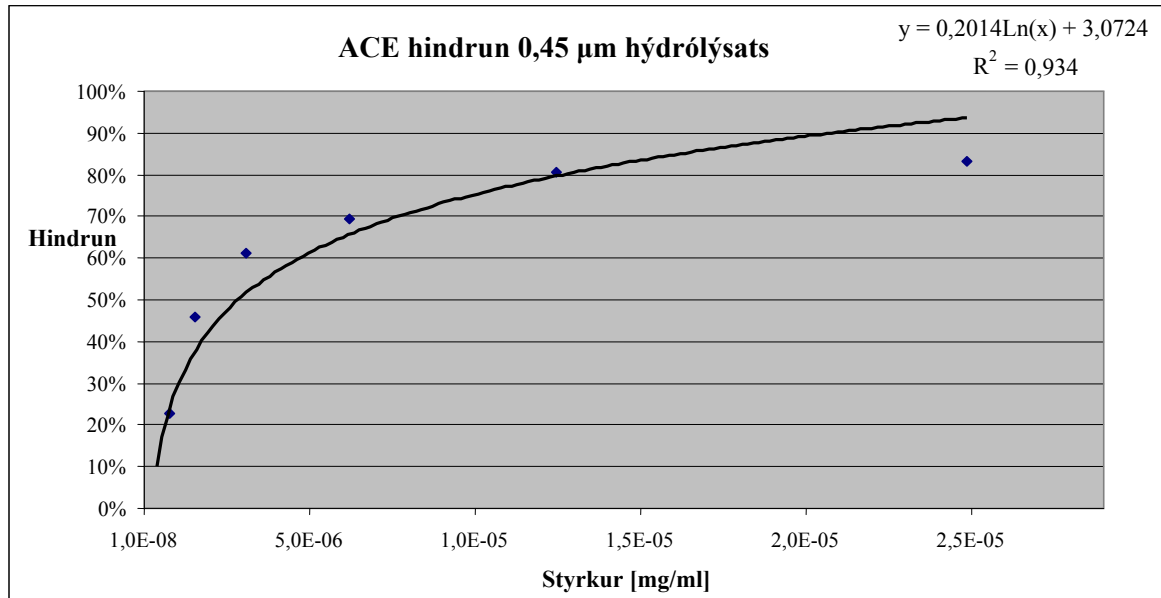
Upphaflega var próteinstyrkur mældur með Bradford aðferð. Á síðari stigum kom í ljós að ekki er unnt að nota aðferð Bradfords við mælingar á peptíðum. Öll gildi á IC_{50} skal því taka varlega. Próteinstyrkur í þáttuðum sýnum var hins vegar mældur með Dumas aðferð sem er áreiðanlegri þegar kemur að peptíðum. Þau IC_{50} gildi eru því áreiðanlegri.

3.4.1. Ákvörðun IC_{50} gildis fyrir hýdrólýsat eftir 0,45 µm síupappír

Tafla 4 og mynd 22 sýna niðurstöður ACE hindrunarmælingarinnar fyrir síað hýdrólýsat.

Tafla 4. Niðurstöður fyrir ACE hindrunarmælingu á 0,45 µl hýdrólýsati.

Sýni	Meðaltal	Staðalfrávik	p-gildi	Hindrun [%]
Blankur	0,0048	± 0,00030		
2,49 * 10 ⁻⁵ mg/ml	0,0008	± 0,00017	0,0025	83,33%
1,24 * 10 ⁻⁵ mg/ml	0,0009	± 0,00006	0,0014	80,56%
6,22 * 10 ⁻⁶ mg/ml	0,0015	± 0,00025	0,0001	69,44%
3,11 * 10 ⁻⁶ mg/ml	0,0019	± 0,00015	0,0055	61,11%
1,55 * 10 ⁻⁶ mg/ml	0,0026	± 0,00000	0,0061	45,83%
7,77 * 10 ⁻⁷ mg/ml	0,0037	± 0,00017	0,0533	22,92%
3,89 * 10 ⁻⁷ mg/ml	0,0048	± 0,00012	0,8075	-0,69%



Mynd 22. ACE hindrunarmæling á 0,45 μm síuðu hýdólýsati.

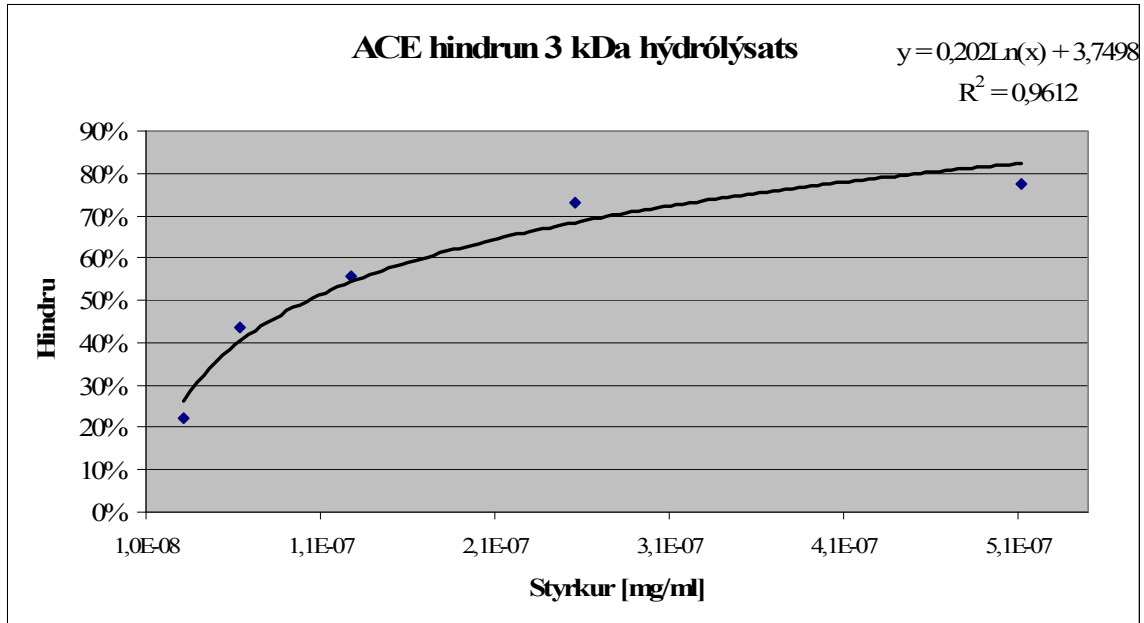
Á mynd 22 er einnig að finna jöfnu ferilsins og út frá henni má reikna IC_{50} gildið. IC_{50} fyrir hýdrólýsatið er $2,84 \cdot 10^{-6}$ mg/mL eða 2,84 μg/mL. Niðurstöðurnar í keyrslum fyrir styrkleikana $3,89 \cdot 10^{-7}$ mg/ml og $7,77 \cdot 10^{-7}$ mg/ml eru ekki tölfræðilega marktækt frábrugðnar blank keyrslum samkvæmt p-gildum ($p < 0,05$).

3.4.2. Ákvörðun IC_{50} gildis fyrir hýdrólýsat eftir örsíun með 3 kDa hylki

Tafla 5 og mynd 23 sýna niðurstöður ACE hindrunarmælingarinnar fyrir síað hýdrólýsat.

Tafla 5. Niðurstöður fyrir ACE hindrunarmælingu á 3 kDa örsíuðu hýdrólýsati.

Sýni	Meðaltal	Staðalfrávik	p-gildi	Hindrun [%]
Blankur	0,0068	± 0,00015		
$5,12 \cdot 10^{-7}$ mg/ml	0,0014	± 0,00006	0,0019	77,37%
$2,56 \cdot 10^{-7}$ mg/ml	0,0017	± 0,00020	0,0024	73,16%
$1,28 \cdot 10^{-7}$ mg/ml	0,0028	± 0,00020	0,0008	55,79%
$6,4 \cdot 10^{-8}$ mg/ml	0,0036	± 0,00031	0,0712	43,68%
$3,2 \cdot 10^{-8}$ mg/ml	0,0052	± 0,00038	0,2697	22,11%



Mynd 23. ACE hindrunarmæling á 3 kDa örsíuðu hýdólýsati.

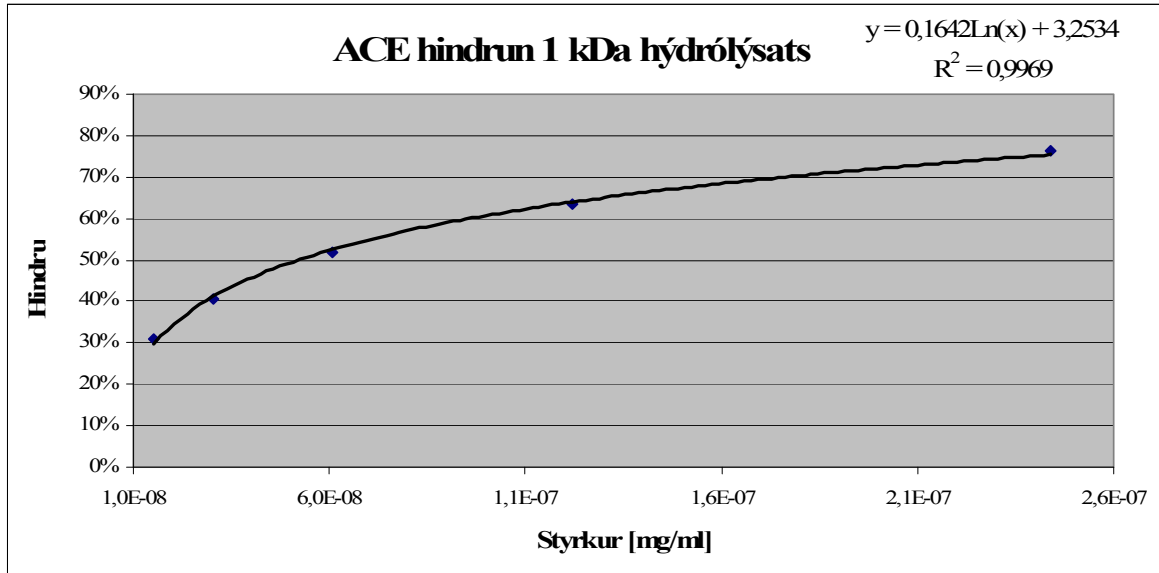
Á mynd 23 er einnig að finna jöfnu ferilsins og útfrá henni má mæla IC_{50} gildið. IC_{50} fyrir hýdrólýsatið er $1,03 \cdot 10^{-7}$ mg/mL eða 0,103 µg/mL. Niðurstöðurnar í keyrslum fyrir styrkleikana $6,4 \cdot 10^{-8}$ mg/ml og $3,2 \cdot 10^{-8}$ mg/ml eru ekki tölfræðilega marktækt frábrugðnar niðurstöðum fyrir blank keyrslur samkvæmt p-gildum ($p < 0,05$).

3.4.3. Ákvörðun IC_{50} gildis fyrir hýdrólýsat eftir örsíun með 1 kDa hylki

Tafla 6 og mynd 24 sýna niðurstöðurnar fyrir ACE hindrunarmælingu á 1 kDa örsíað hýdrólýsat.

Tafla 6. Niðurstöður fyrir ACE hindrunarmælingu á 1 kDa örsíuðu hýdrólýsati.

Sýni	Meðaltal	Staðalfrávik	p-gildi	Hindrun [%]
Blankur	0,0068	± 0,00015		
$2,44 \cdot 10^{-7}$ mg/ml	0,0016	± 0,00017	0,0008	76,35%
$1,22 \cdot 10^{-7}$ mg/ml	0,0025	± 0,00015	0,0016	63,55%
$6,10 \cdot 10^{-8}$ mg/ml	0,0033	± 0,00006	0,0008	51,72%
$3,05 \cdot 10^{-8}$ mg/ml	0,0040	± 0,00015	0,0001	40,39%
$1,52 \cdot 10^{-8}$ mg/ml	0,0047	± 0,00032	0,0023	31,03%



Mynd 24. ACE hindrunarmæling á 1 kDa örsíuðu hýdólýsati.

Á mynd 24 er einnig að finna jöfnu fyrir hindrunarferilinn, út frá henni má reikna IC_{50} gildi hýdrólýsatsins. IC_{50} fyrir hýdrólýsatið er $5,2 \cdot 10^{-8}$ mg/mL eða 0,052 μ g/mL. 1 kDa hýdrólýsatið sýnir mesta virkni af hýdrólýsötunum, þess vegna var það valið til þáttunar á gelsíun fremur en 3 kDa hýdrólýsatið. Keyrslur allra styrkleika eru tölfræðilega marktækt frábrugðnar blankkeyrslum samkvæmt p-gildum ($p < 0,05$).

3.4.4. Virknimæling á þáttum

Niðurstöður á prótein- og ACE mælingu á þáttunum 20 má sjá í töflu 7. Ekki reyndist vera neitt samhengi á milli staðsetningu þáttar og IC_{50} gildis. Hins vegar var virkni mjög misjöfn í toppunum. Einangrun og þáttun á súlu var framkvæmd við um 280 nm, sem er bylgjulengd sem arómatískar aminosýrur gleypa við. Þar sem sýnin höfðu verið vatnsrofin og að því loknu síuð nokkrum sinnum gæti verið betra að safna við aðra bylgjulengd. Næstu skref eru að greina þættina enn frekar niður. Einnig að endurtaka tilraunina og safna af súlum við aðra bylgjulengd.

Tafla 7. Magn köfnunarefnis (N), próteins og ACE hindrun þátta.

Þáttur	Heildar N [%]	Prótein (N x 6,25) [%]	ACE hindrun [%]	IC ₅₀ [mg/ml]
1	0,546	3,413	85,7	0,68
2	0,609	3,809	74,6	2,50
3	0,329	2,057	83,3	0,07
4	0,381	2,384	84,1	1,89
5	0,454	2,840	83,6	0,29
6	0,683	4,271	86,6	0,53
7	0,804	5,027	83,6	1,54
8	0,425	2,658	84,3	1,47
9	0,355	2,222	85,9	0,79
10	0,036	0,226	90,1	0,25
11	0,067	0,418	91,5	0,34
12	0,345	2,157	90,0	0,31
13	0,127	0,796	83,1	0,70
14	0,054	0,336	88,7	0,18
15	0,063	0,395	83,6	0,23
16	0,059	0,366	88,3	0,43
17	0,043	0,268	83,6	0,41
18	0,022	0,136	80,8	0,13
19	0,036	0,222	65,6	0,77
20*	0,045/0,009	0,282/0,057	18,3	

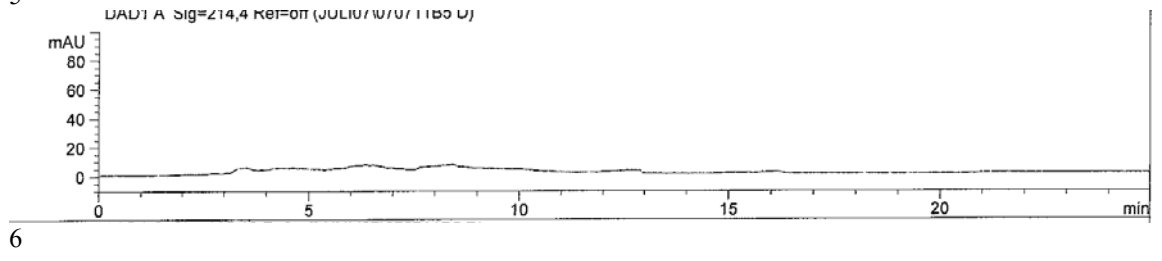
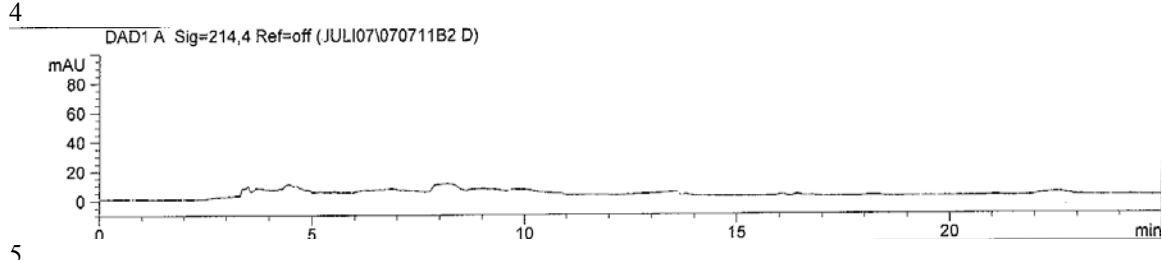
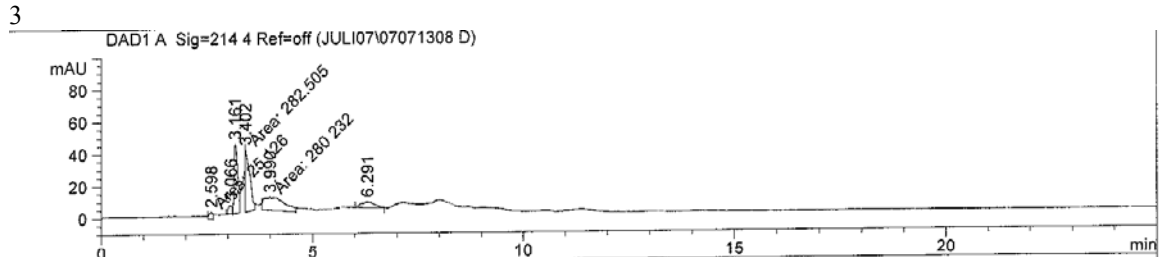
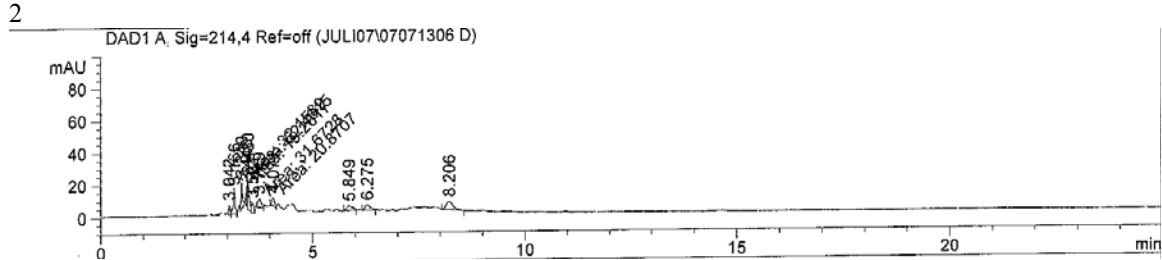
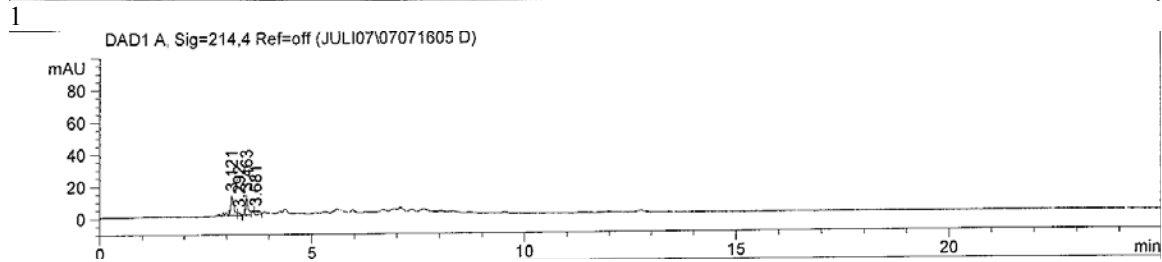
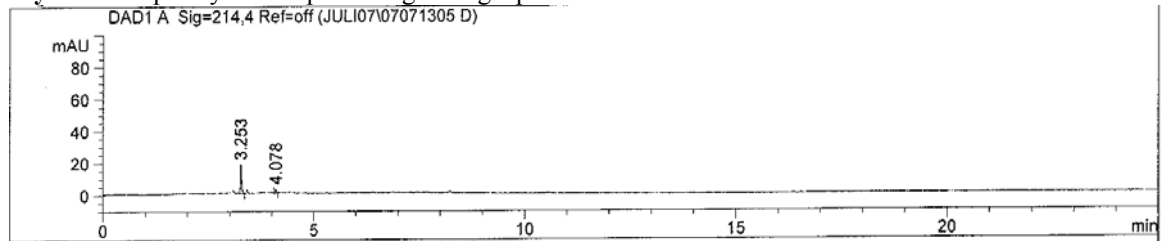
* Ósamræmi í próteinmælingu. Þar sem ACE hindrun var <50% var próteinmæling ekki endurtekin.

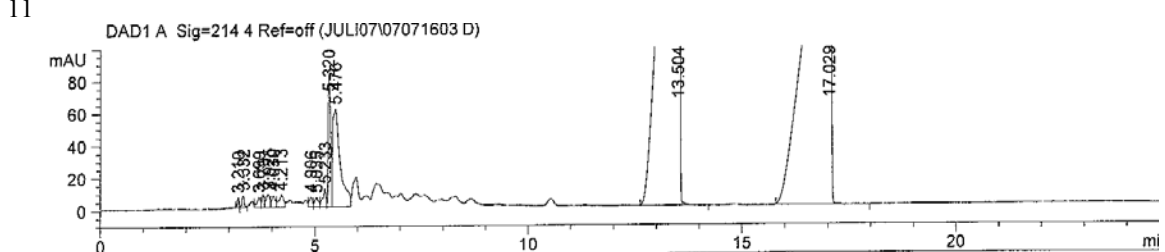
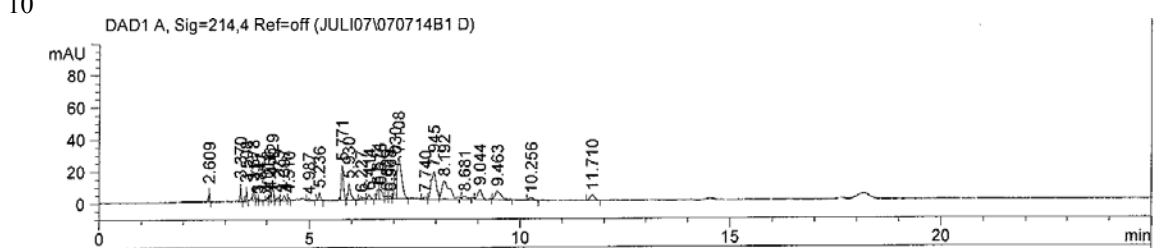
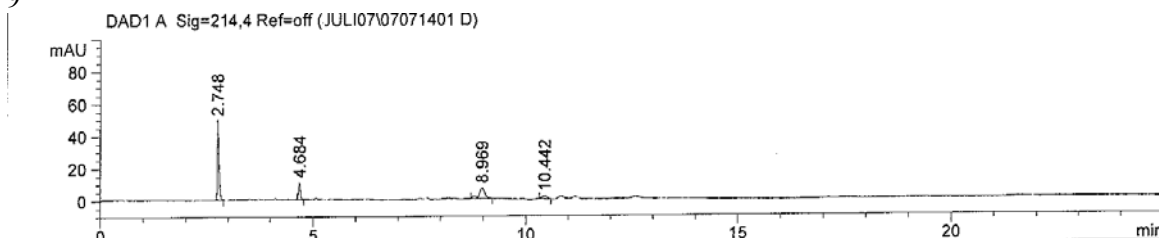
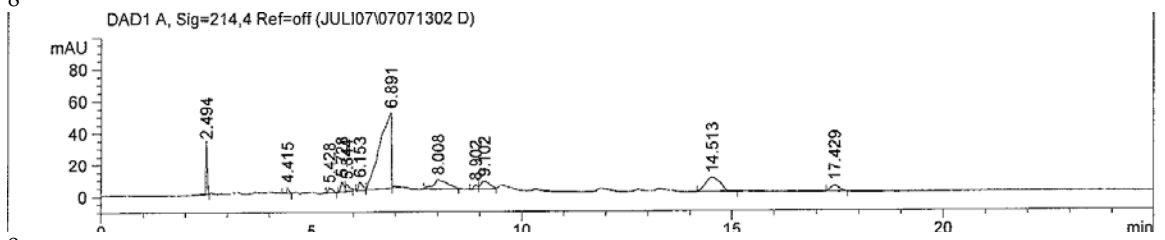
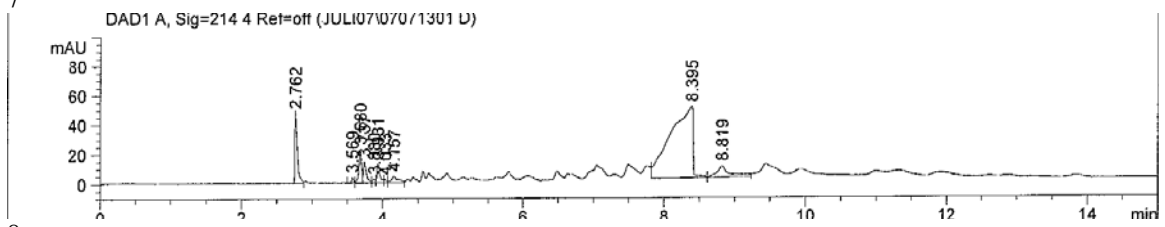
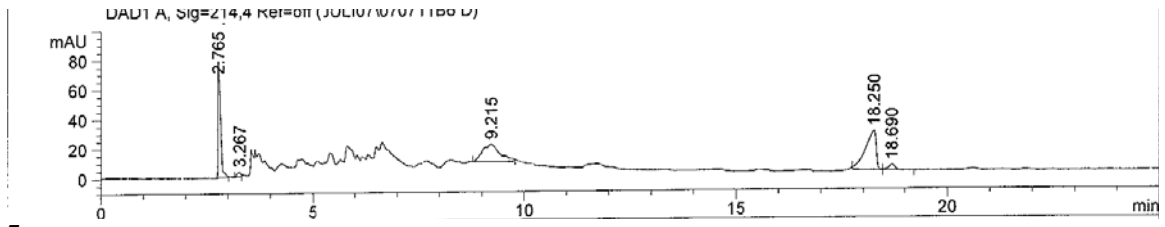
3.5. Capillary electrophoresis

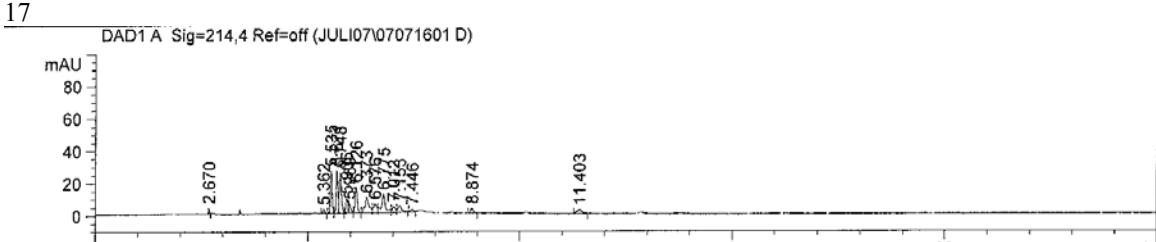
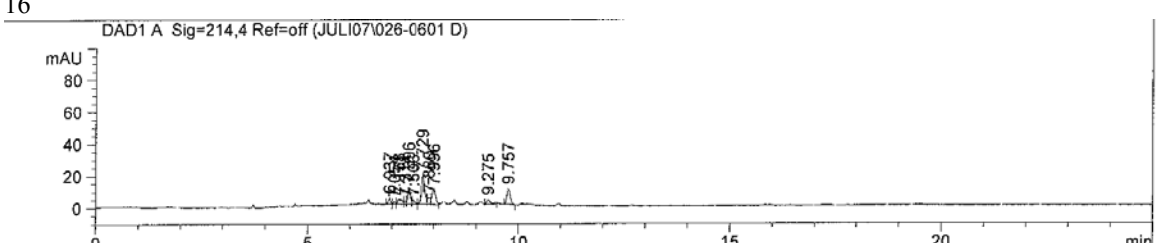
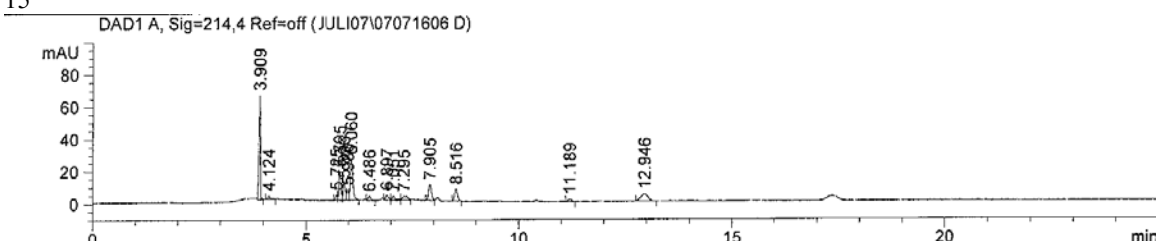
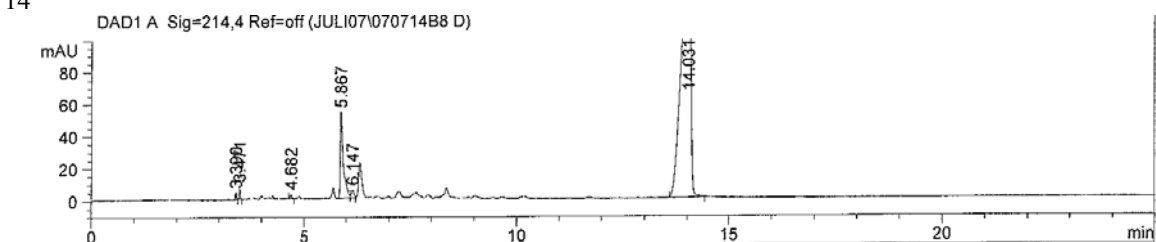
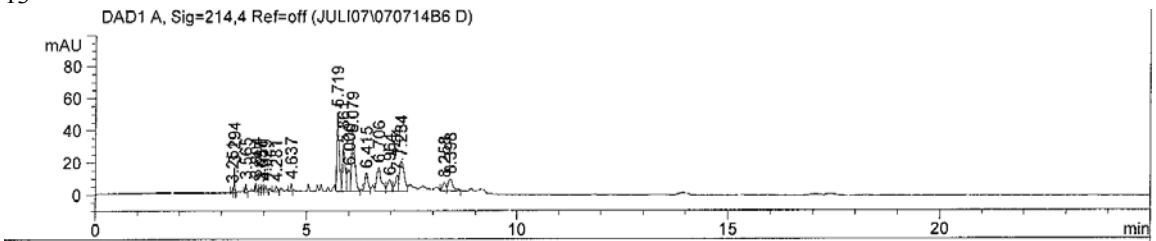
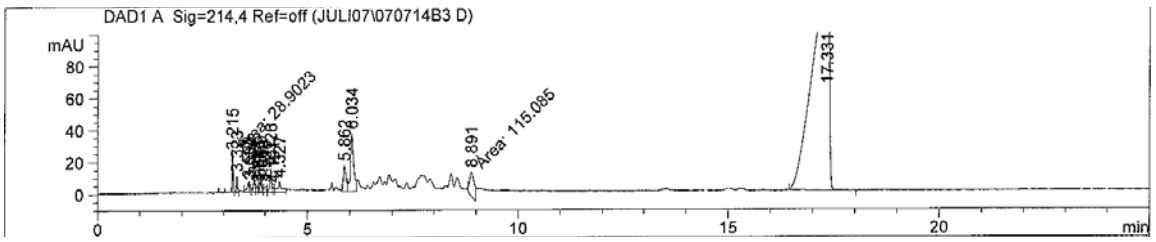
Þættirnir 20 voru greindir á CE tæki við 214 nm (mynd 25), 195 nm (mynd 26) og 280 nm (mynd 27). Ekki er greinanleg bein tenging á milli ACE virkni og fjölda toppa á CE gröfum. Áhugavert er að bera saman CE mælingu við 280 nm og niðurstöður gelsíunar (mynd 21). Einungis greindust toppar við CE við 280 nm þar sem styrkur var hæstur á mynd 21. Í næstu tilraunum er því ráðlagt að einangra sýni við aðra bylgjulengd en hér var notuð.

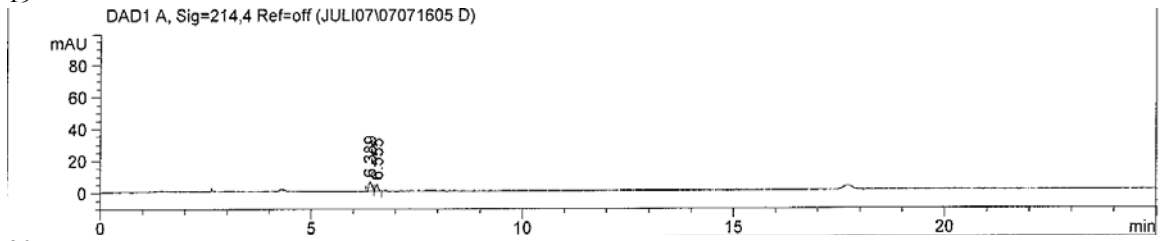
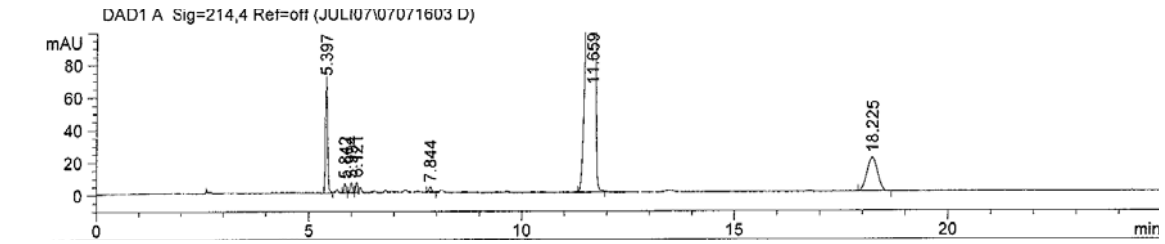
Frekari greining á sýnum, t.d. með því að safna af CE tæki og að ACE greina toppa, er áætluð sem næstu skref.

Mynd 24. Capillary Electrophoresis greining á þáttum 1 til 20 við 214 nm.

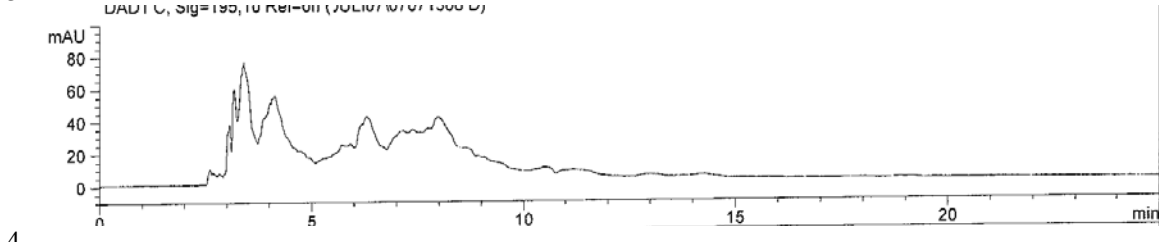
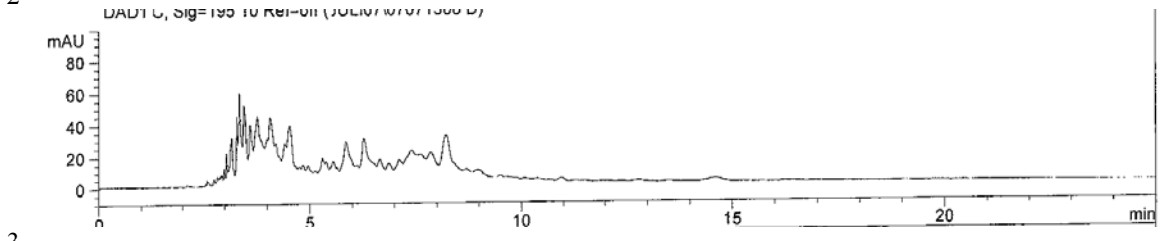
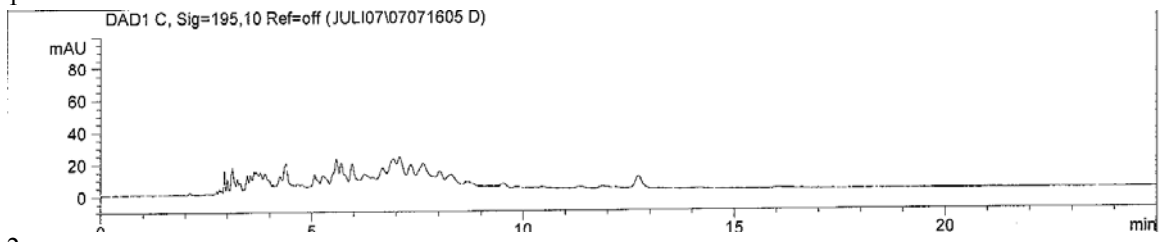
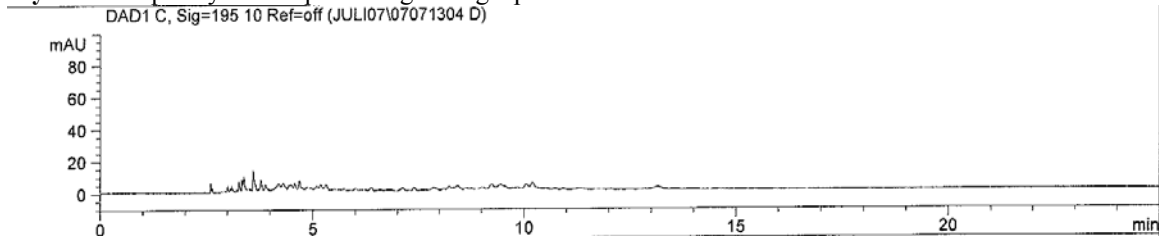


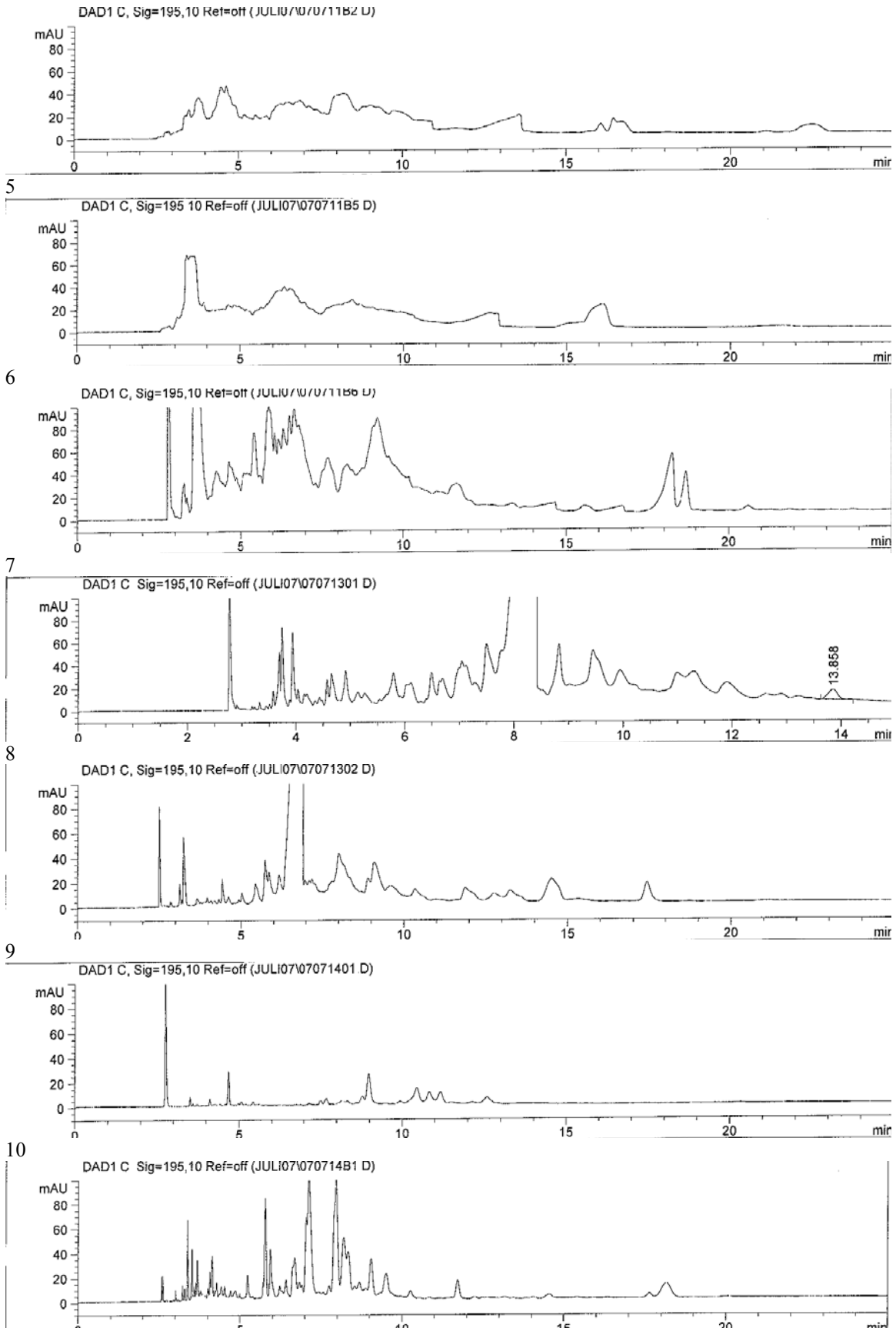




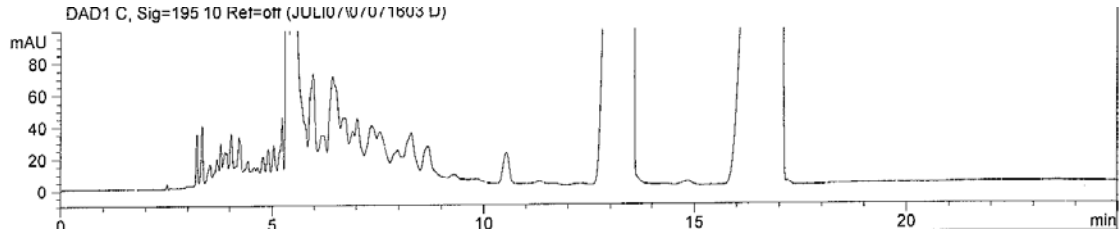


Mynd 25. Capillary Electrophoresis greining á þáttum 1 til 20 við 195 nm.

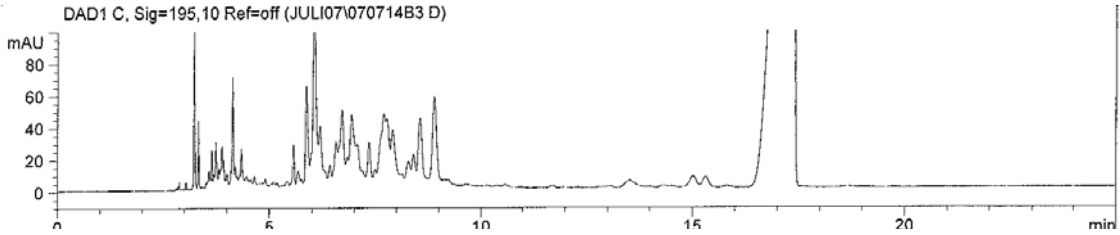




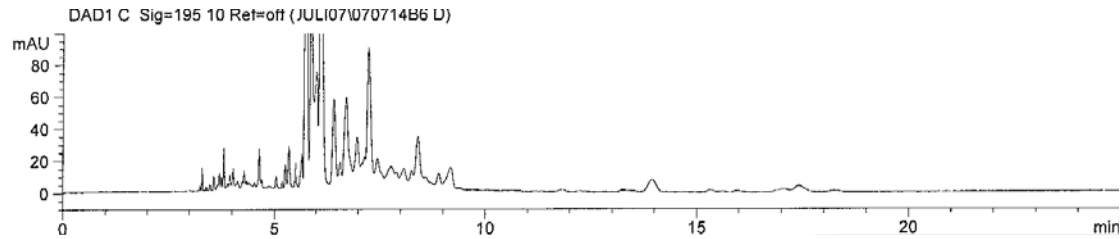
11



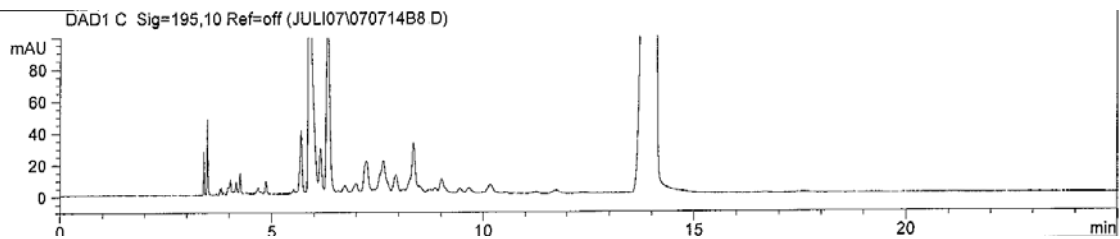
12



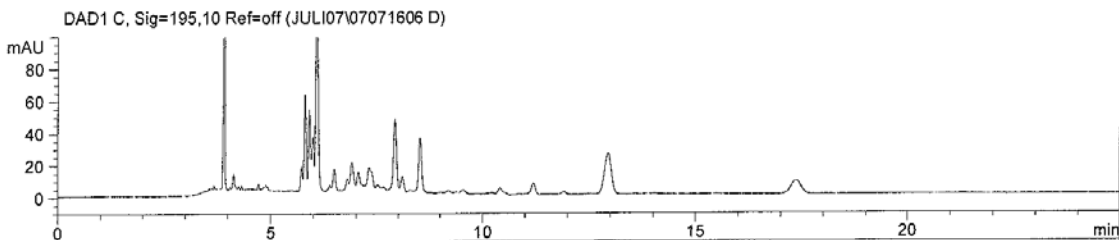
13



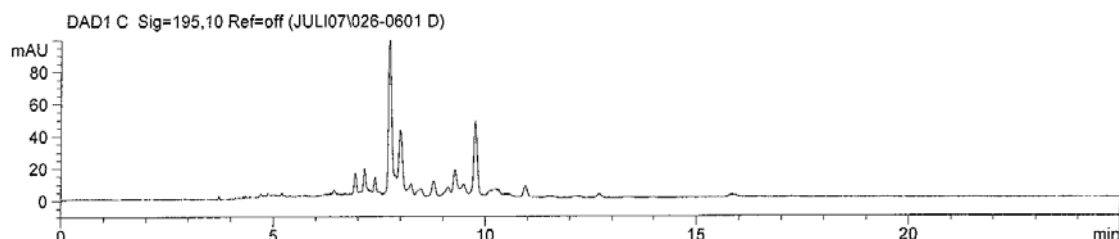
14



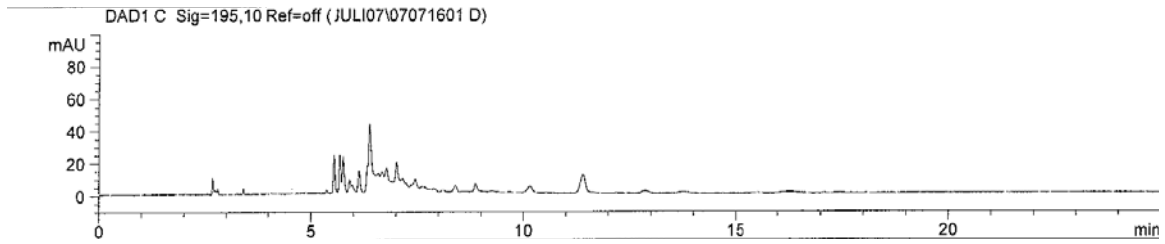
15



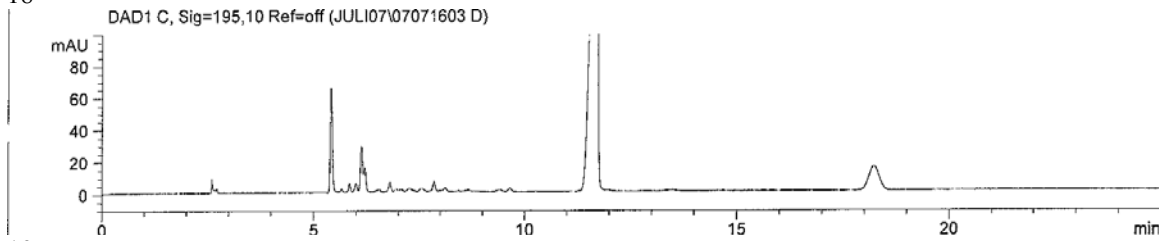
16



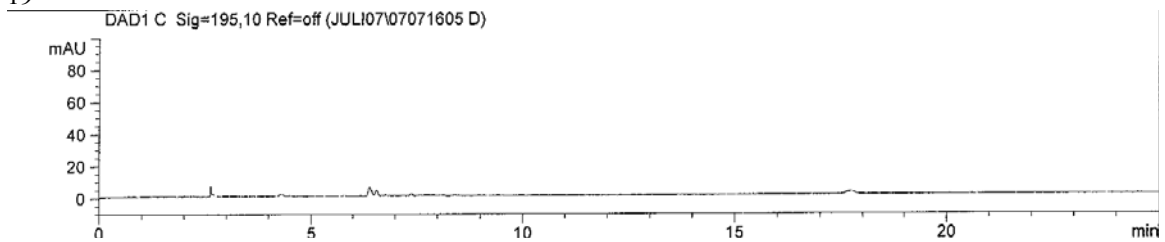
17



18

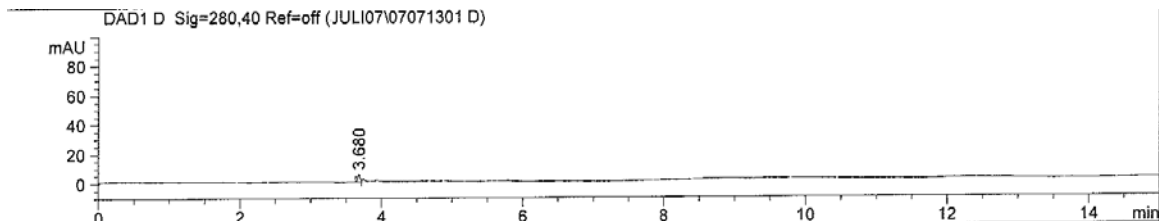


19

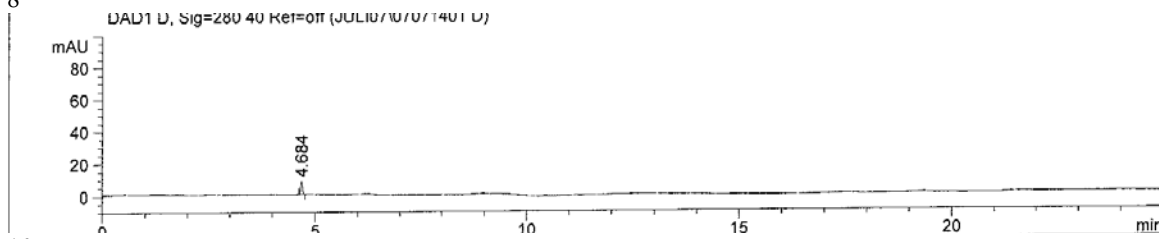


20

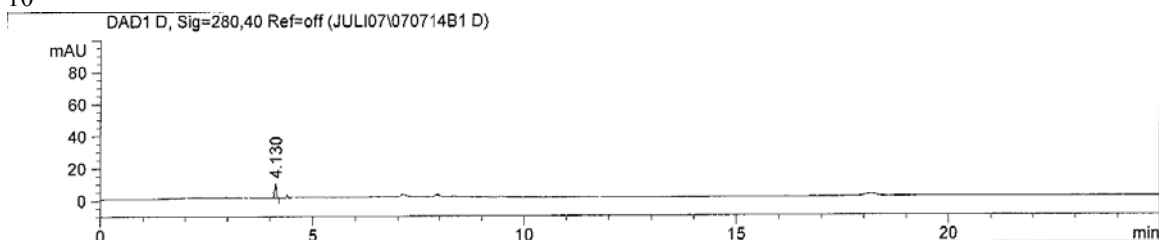
Mynd 26. Capillary Electrophoresis greining á þáttum 1 til 20 við 280 nm. Ekki greindist toppur í þeim þáttum sem vantar.



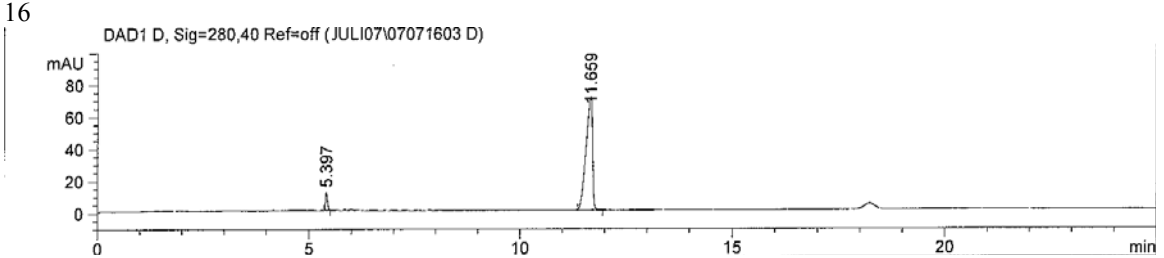
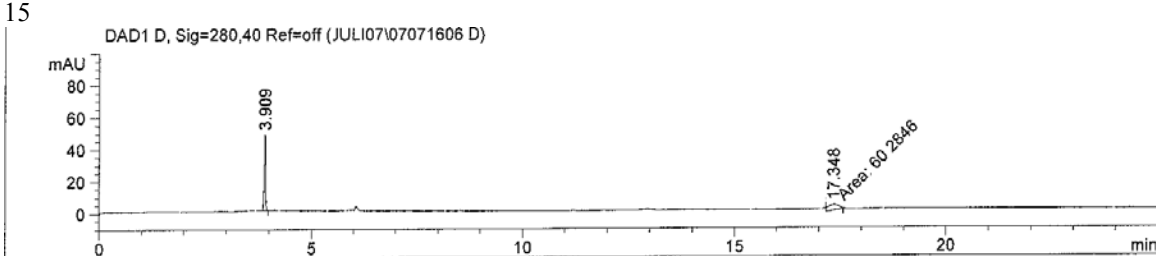
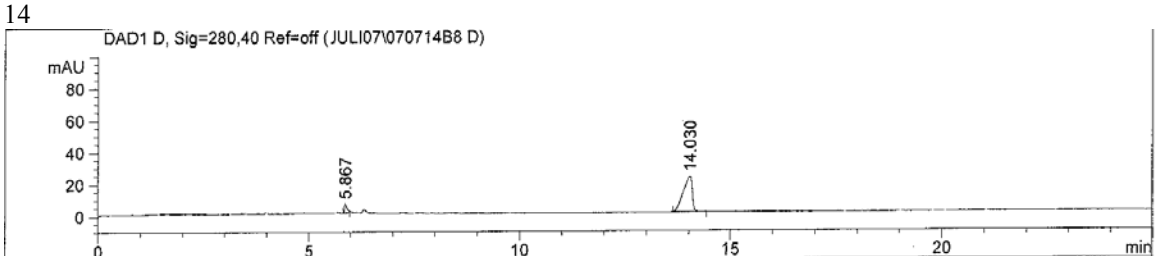
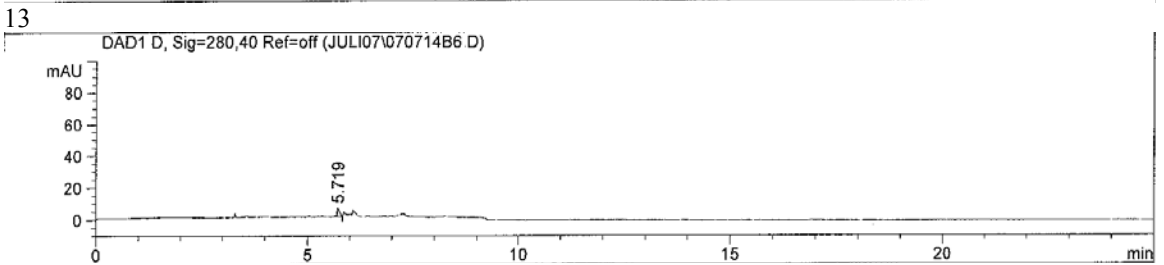
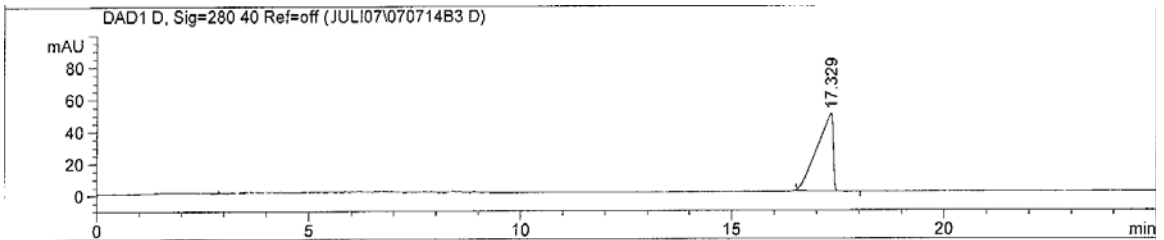
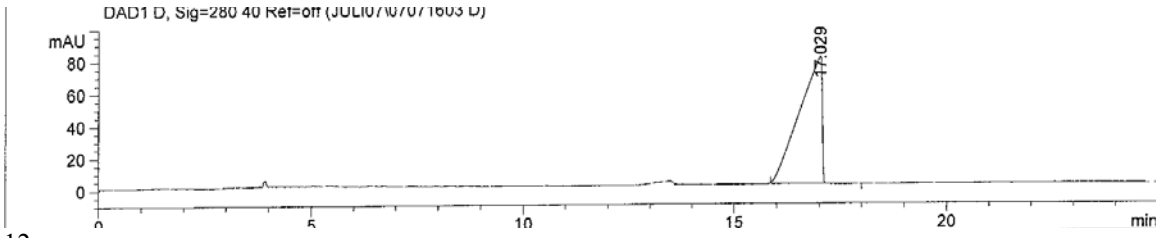
8



10



11



19

4. Ályktanir

Vel gekk að setja upp tækjabúnað og aðferðir. Síur og súlur voru settar upp til að einangra hýdrólýsöt niður í þætti. ACE virkni í þáttum var greind ásamt mælingum á próteinmagni og greining með Capillary Electrophoresis (CE).

Ekki reyndist vera samhengi á milli staðsetningu af súlu og ACE virkni. Hins vegar var virkni mjög misjöfn í toppunum. Þættirnir voru greindir á CE tæki. Ekki er greinanleg bein tenging á milli ACE virkni og fjölda toppa á CE gröfum.

Næstu skref eru að greina þættina enn frekar niður ásamt því að endurtaka tilraunina og safna af súlum við aðra bylgjulengd en notuð var í þessari tilraun.

Heimildaskrá

- Adler-Nissen J. 1986. Enzymatic hydrolysis of Food Proteins; Elsevier Applied Science Publishers. Barking, UK.
- Ait-Yahia D., Madani S., Savelli J.L., Prost J., Bouchenak M., Belleville J. 2003. Dietary Fish protein lowers blood pressure and alters tissue polyunsaturated fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*. **19**: 342-346.
- Bryndís Eva Birgisdóttir. 2002. Líffræðilega virk peptíð. Hin nýja næringarfræði. Fræðslufundur Matvæla- og næringafræðafélags Íslands 15. nóvember 2002.
- Engvang, K. and Nielsen, H.H. 2000. In situ activity of chymotrypsin in sugar-salted herring during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **80**:1277-1283.
- Guðjón Þorkelsson og Helga Gunnlaugsdóttir. 2005. Lífvirk efni í Íslensku sjávarfangi: yfirlitsskýrsla. Verkefnaskýrsla 6-05. Reykjavík, Rannsóknarstofnun fiskiðnaðarins.
- He K., Song Y., Daviglius M.L., Liu K., Van Horn L., Dyer A.R., Goldbourt U., Greenland P. 2004. Fish Consumption and Incidence of Stroke: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Stroke*. **35**: 1538-1542.
- Helga Gunnlaugsdóttir, Margrét Geirsdóttir, Aðalheiður Eypórsdóttir, Hjörleifur Einarsson og Guðjón Þorkelsson. 2005. Lífvirk efni í íslensku sjávarfangi: samantekt. Verkefnaskýrsla 5-05. Reykjavík, Rannsóknarstofnun fiskiðnaðarins.
- Jeon Y.J., Byun H.G., Kim S.K. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*. **35**: 471-478.
- Lárus Freyr Þórhallsson, Margrét Geirsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Sigurður Vilhelmsson, Guðjón Þorkelsson. 2007. Blóðþrýstingslækkandi áhrif (Ace-hindravirkni) í íslensku sjávarfangi – uppsetning mæliaðferða. Verkefnaskýrsla 10-07. Mátis.
- Lárus Freyr Þórhallsson. 2007. Uppsetning á ACE hindrunar mæliaðferð *in vitro* og einangrun blóðþrýstingslækkandi peptíða úr sjávarfangi. Leiðbeinendur: Sesselja S. Ómarsdóttir, lektor og Guðmundur Óli Hreggviðsson lektor.
- Li G.H., Le G.W., Shi Y.H., Shrestha S. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*. **24**: 469-486.
- Mäyrä-Mäkinen A. 2003. Evolus fermented milk. Fyrirlestur á New functional ingredients and foods, Bella Center, Kaupmannahöfn, 9-11. apríl 2003.

Morr C.V., German B., Kinsella J.E. og Regenstein J.M. 1985. A Collaborative Study to Develop a Standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science* **50**: 1715-1718.

MS. 2007. Heimasíða Mjólkursamsölnunnar.
<http://www.ms.is/article.aspx?catID=129&ArtId=155>. Sótt þann 20.4.2007.

Nielsen, H.H. 2004. Persónulegar upplýsingar. Danish Institute for Fisheries Research. Dept. of Seafood Research. Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

Swinbanks D., O'Brien J. 1993. Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature*. **364**: 180.

Tanaka K., Nishizono S., Kugino K., Tamari M., Kurumiya M., Abe N., Ikeda I., 2006. Effect of dietary oyster extract on lipid metabolism, blood pressure, and blood glucose in SD rats, hypertensive rats, and diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 462-470.

UST. 2006. Heimasíða Umhverfisstofnunar. www.ust.is

van der Ven C., Gruppen H., de Bont D.B.A., Voragen A.G.J. 2002. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *International Dairy Journal*. **12**: 813-820.

Vanschoonbeek K., de Maat M.P.M., Heemskerk J.W.M. 2003. Fish oil consumption and reduction of arterial disease. *The Journal of Nutrition*. **133**:, 657-660.

Vermeirssen, V., Van Camp, J. og Verstraete, W. 2005. Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein in vitro gastrointestinal digests. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **85**: 399-405.