

Ekstracelularne proteinaze bakterijskih sojeva iz *Lactobacillus* i *Lactococcus* rodova s kazeinolitičkim djelovanjem

Rak, Helena

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:838917>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Helena Rak

7541/BT

**Ekstracelularne proteinaze bakterijskih sojeva iz *Lactobacillus* i
Lactococcus rodova s kazeinolitičkim djelovanjem**

Završni rad

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Zagreb, 2021.

Temeljna dokumentacijska kartica

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Ekstracelularne proteinaze bakterijskih sojeva iz *Lactobacillus* i *Lactococcus* rodova s kazeinolitičkim djelovanjem

Helena Rak, 0058212535

Sažetak: Proteinaze probiotičkih bakterija mliječne kiseline (BMK), osim što osiguravaju bakterijskim stanicama izvore dušika i aminokiselina esencijalnih za stanični rast, kataliziraju i razgradnju kazeina iz fermentiranih mliječnih proizvoda do peptida koji mogu imati bioaktivne učinke. Za detekciju potencijalnih producenta proteinaza, u ovom radu su korišteni sojevi iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus* kod kojih je ustanovljen Fmc⁺ fenotip, koji se povezuje s prisutnošću proteinaza. Analizom fenotipa hidrolize kazeina analiziranih BMK prilikom inkubacije supernatanta kulture ili koncentrirane biomase stanica u diferencijalnoj hranjivoj podlozi, sojevi *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus plantarum* D13 nakon uzgoja u optimalnoj hranjivoj podlozi za rast, a sojevi *Lactococcus lactis* ZG5-32 i *Lactobacillus brevis* SF9B nakon uzgoja u obranom mlijeku iskazali su značajnije kazeinolitičko djelovanje koje može rezultirati sintezom biopeptida. Optimiran je protokol za ekstrakciju proteinaza iz odabranih sojeva BMK te su proteinski uzorci analizirani SDS-PAGE metodom. Proteinski ekstrakti djelomično purificirane proteinaze sojeva *Lc. lactis* ZG5-32 i ZG7-10 su i u vrlo niskim koncentracijama zadržali proteolitičku aktivnost. SDS-PAGE metodom detektirani su proteini u ekstraktu sojeva *Lb. brevis* D6 i SF9B, *Lb. fermentum* D12 i *Lb. plantarum* D13 čiju je daljnju karakterizaciju potrebno provesti.

Ključne riječi: biopeptidi, Fmc⁺ fenotip, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, proteinaze, proteolitički sustav

Rad sadrži: 29 stranica, 8 slika, 5 tablica, 17 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi: Martina Banić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 17. lipnja 2021.

Basic documentation card

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Extracellular proteases of bacterial strains from *Lactobacillus* and *Lactococcus* genera with caseinolytic activities

Helena Rak, 0058212535

Abstract: In addition to providing bacterial cells with nitrogen sources and amino acids essential for cell growth, certain probiotic lactic acid bacterial proteinases also catalyze the breakdown of casein from fermented dairy products to peptides with potential bioactive effects. *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains showing the Fmc⁺ phenotype were analysed for the presence of proteases. Analysis of casein hydrolysis phenotype of LAB, during incubation of culture supernatant or concentrated cell biomass, in differential nutrient medium showed that *Lactobacillus brevis* D6 and *Lactobacillus plantarum* D13 strains after growth in the optimal growth medium, showed a significant caseinolytic effect, whereas the same was observed for *Lactococcus lactis* ZG5-32 and *Lactobacillus brevis* SF9B strains after growth in skim milk. The proteinases extraction was optimized and protein samples were analyzed by SDS-PAGE method. Protein extracts of partially purified proteinase of strains *Lc. lactis* ZG5-32 and ZG7-10, retained proteolytic activity even at very low concentrations. Proteins in the extract of strains: *Lb. brevis* D6 and SF9B, *Lb. fermentum* D12 and *Lb. plantarum* D13 were detected by the SDS-PAGE method and their identification must be performed.

Keywords: biopeptides, Fmc⁺ phenotype, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, proteinase, proteolytic system

Thesis contains: 29 pages, 8 figures, 5 tables, 17 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Jasna Novak, Full professor

Technical support and assistance: Martina Banić mag. ing. biotechn.

Defence date: June 17, 2021.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak, a u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika (PRO-BIO 2.0)“ (IP-2019-04-2237) voditeljice prof. dr. sc. Blaženke Kos.

Sadržaj

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. PROTEOLITIČKI SUSTAV BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1. PROTEOLIZA KAZEINA POMOĆU BMK	4
2.1.2. STRUKTURA EKSTRACELULARNIH PROTEINAZA BMK	5
2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI NASTALI PROTEINAZNOM AKTIVNOŠĆU BMK	6
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. RADNI MIKROORGANIZMI	9
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE	10
3.1.3. KEMIKALIJE	10
3.1.4. PRIBOR I APARATURA	10
3.2. METODE RADA	11
3.2.1. ODRŽAVANJE I ČUVANJE MIKROORGANIZAMA	11
3.2.2. ODREĐIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI BMK	11
3.2.3. ODREĐIVANJE PH I POSTOTKA SINTETIZIRANE MLIJEČNE KISELINE U SUPERNATANTU KULTURE	12
3.2.4. EKSTRAKCIJA PROTEINAZA BMK	12
3.2.5. SDS-PAGE ANALIZA POTENCIJALNIH PROTEINAZA	13
3.2.6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA	14
4.REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. SELEKCIJA SOJEVA BMK S PROTEINAZNOM AKTIVNOŠĆU	15
4.2. EKSTRAKCIJA PROTEINAZA <i>LACTOCOCCUS</i> I <i>LACTOBACILLUS</i> SOJEVA	24
5.ZAKLJUČCI	27
6.POPIS LITERATURE	28

1. Uvod

Biotehnoška primjena bakterija mliječne kiseline (BMK) u raznim granama prehrambene industrije sve je zastupljenija. Skupini BMK pripadaju bakterijski sojevi poput *Lactobacillus rhamnosus* koji su među najistraživanijim mikroorganizmima s aspekta funkcionalnosti probiotika. Značajno fiziološko svojstvo BMK je posjedovanje sustava proteina proteolize. Proteolitički sustav BMK omogućuje hidrolizu kazeina kako bi se stanice opskrbile esencijalnim aminokiselinama tijekom rasta u mlijeku (Villegas i sur., 2015). Također, proteolitički sustav BMK doprinosi specifičnim organoleptičkim svojstvima fermentiranih mliječnih proizvoda (Blaya i sur., 2018; Beganović i sur., 2013; Leboš Pavunc i sur., 2012). Proteolitički enzimi BMK omogućuju opskrbu bakterijskih stanica dušikovim spojevima koji su neophodni za njihov rast. BMK zahtijevaju razne slobodne aminokiseline za svoj rast, čija je dostupnost u mikrokolišu niska (Brown i sur., 2017). Stoga je primarna funkcija enzima proteolitičkog sustava razgradnja proteina iz mikrokoliša do peptida, odnosno aminokiselina koje stanica može apsorbirati i iskoristiti kao izvore hranjivih tvari (Kieliszek i sur., 2021).

Osim što omogućuju BMK dostupnost nutrijenata potrebnih za rast, ustanovljeno je da se uslijed proteinazne aktivnosti pojedinih sojeva BMK u mliječnim proizvodima mogu sintetizirati peptidi s bioaktivnim djelovanjem koji se nazivaju i bioaktivni peptidi ili biopeptidi. Biopeptidi mogu nastati hidrolizom proteina hrane djelovanjem probavnih enzima u gastrointestinalnom traktu (GIT), *in vitro* enzimskom hidrolizom ili mikrobnom fermentacijom, a pokazuju razne biološke aktivnosti koje imaju povoljne učinke na ljudsko zdravlje (Marccone i sur., 2017).

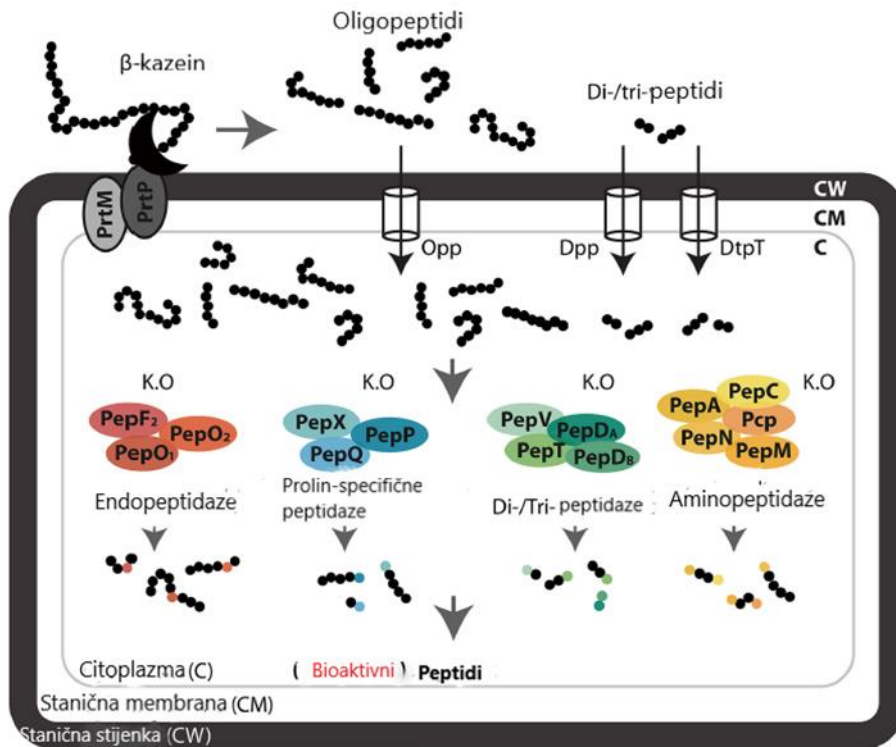
Cilj ovog rada bio je ispitati proteolitičku aktivnost pojedinih BMK iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus* s Fmc⁺ fenotipom te ustanoviti prisutnost proteinaza s kazeinolitičkim djelovanjem, čija aktivnost može rezultirati sintezom biopeptida. Za selekciju sojeva s proteinaznom aktivnošću primijenjena je učinkovita metoda inkubacije koncentrirane biomase stanica, odnosno supernatanta kulture soja producenta, za pretpostavljanje stanične lokalizacije proteinaze tj. razlikovanje da li je kazeinolitička proteinaza vezana na staničnu stijenu ili se izlučuje ekstracelularno, u diferencijalni medij, odnosno obrano mlijeko s agarom za detekciju hidrolize kazeina. Odabirom hranjive podloge za kultivaciju također je ispitana i mogućnost induciranja proteinazne aktivnosti sojeva producenata. Nakon *in vitro* selekcije sojeva potencijalnih producenata proteinaza optimiran je i protokol za ekstrakciju proteinaza, koje su potom analizirane SDS-PAGE metodom.

2. Teorijski dio

2.1. Proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline

BMK su heterogena skupina gram-pozitivnih, katalaza-negativnih bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji produkt fermentacije ugljikohidrata, te su prisutne kao dio autohtone mikrobne populacije u različitim ekološkim nišama bogatim hranjivim tvarima (Šušković i sur., 2010). Prilagodba okolišu koji sadrži izvore svih potrebnih hranjivih tvari utjecala je na adaptaciju bakterijskih sojeva i time na promjene u genomu, te specifičnim zahtjevima za rast, uključujući i povećanje potražnje za aminokiselinama. U specifičnom mikrokolišu, BMK se natječu s ostalim prisutnim mikroorganizmima za izvore supstrata, koji im omogućuju visoke specifične brzine rasta i sintezu povećanih koncentracija mliječne kiseline nastale prilikom fermentacije dostupnih ugljikohidrata. Potrebe za esencijalnim aminokiselinama rezultiraju iscrpljivanjem niskomolekularnih peptida ili slobodnih aminokiselina u mikrokolišu, te se naknadne potrebe bakterijskih stanica za aminokiselinama nadoknađuju hidrolizom proteina (Marcone i sur. 2017; Villegas i sur., 2015).

Fenotip razgradnje kazeina, koji se povezuje s prisutnosti proteolitičkog sustava, iskazuju mnogi sojevi BMK. Također, kompetitivna strategija stanica BMK da su u simbiotskim odnosima s drugim sojevima BMK koji sintetiziraju proteinaze, vrlo je rasprostranjena među autohtonom mikrobnom populacijom fermentiranih mliječnih proizvoda (Hansen i Marcatili, 2020; Bayala i sur., 2018; Leboš Pavunc i sur., 2012). Komparativnom analizom genoma BMK ustanovljeno je da sojevi *Lactobacillus* vrste poput *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Lb. helveticus* više ne sadrže nakupine gena za biosintezu aminokiselina (Villegas i sur., 2015). Za rast BMK *Lc. lactis*, u mliječnom mediju, presudan je protein kazein kao izvor dušika, budući da je ova bakterija auksotrofna za nekoliko aminokiselina, te da mlijeko ne sadrži značajne koncentracije slobodnih aminokiselina. Bakterijske stanice *Lc. lactis*, ali i drugih bakterija iz *Lactobacillus* rodova, hidroliziraju kazein kroz tri temeljne faze (slika 1). Proteinaza PrtP, vezana za staničnu ovojnica, razgrađuje kazein iz okolnog medija na oligopeptide. Nastali oligopeptidi se transportiraju unutar bakterijske stanice putem oligopeptidnog transportnog sustava Opp. U posljednjem koraku, specifične peptidaze hidroliziraju oligopeptide u manje peptide koji se u konačnici provode u aminokiseline, te su dostupne za sintezu proteina *de novo* i za ostale metaboličke aktivnosti stanice (Huang i Kok, 2020).



Slika 1. Proteolitički sustav razgradnje kazeina bakterije *Lc. lactis* MG1363. Hidroliza β -kazeina je inicirana enzimom PrtP posredovanjem enzima PrtM. Nastali oligopeptidi se transportiraju u stanicu pomoću Opp transportnog sustava, a dipeptidi ili tripeptidi se transportiraju unutar stanice pomoću Dpp ili DtpT transportnih sustava. Peptidi se razgrađuju združenim djelovanjem 15 peptidaza, koje su klasificirane prema specifičnosti cijepanja (usklađeno s 8 različitih boja na slici). Delecijom gena za specifične peptidaze, mutantni soj ne može razgraditi specifične peptide te se pretpostavlja da se, umjesto slobodnih aminokiselina, (bio)peptidi nakupljaju intracelularno (preuzeto od Huang i Kok, 2020)

Proteolitički sustav BMK sadrži proteinaze, peptidaze i specifične membranske transportne proteine. Proteinaze cijepaju kazein u peptide, zatim unutarstanične peptidaze razgrađuju peptide do aminokiselina. Transportni sustavi omogućuju prijenos aminokiselina i peptida preko citoplazmatske membrane (Kieliszek i sur., 2021).

2.1.1. Proteoliza kazeina pomoću BMK

Za BMK je karakterističan brz stanični metabolizam te su im za rast potrebne različite aminokiseline. Primjerice bakterije iz roda *Lactococcus* za rast trebaju glutaminsku kiselinu, glicin, leucin, izoleucin, histidin, metionin i valin. Količina slobodnih aminokiselina i izvora dušika u mlijeku nije dovoljna da zadovolji sve potrebe bakterijskih stanica. Stoga bakterijske stanice izvore aminokiselina nadoknađuju razgradnjom proteina iz mlijeka, prvenstveno kazeina (Villegas i sur., 2015). Osim uloge u rastu bakterijskih stanica, proteolitički sustav doprinosi i oblikovanju arome fermentiranog proizvoda što može rezultirati stvaranjem bioaktivnih peptida s učincima koji doprinose zdravstvenom stanju domaćina (Brown i sur., 2017; Marcone i sur., 2017; Leboš Pavunc i sur., 2012). Proteinaze BMK razlikuju se obzirom na molekularnu masu. Unatoč sličnostima u strukturi, proteinaze BMK se razlikuju i prema specifičnosti za supstrat, no pokazuju i afinitet prema hidrofobnim dijelovima kazeina. Kazein je najzastupljeniji protein mlijeka, koji čini 80 % svih proteina mlijeka, a u strukturi sadrži četiri frakcije: α 1-, α 2-, β - i κ -kazein, od kojih svaka sadrži vrlo velik broj prolinskih ostataka (Kieliszek i sur., 2021). Bakterija *Lc. lactis* eksprimira dva ekstracelularna proteolitička enzima: laktocepin I (PI-) i laktocepin III (PIII-); koji su klasificirani prema specifičnosti razgradnje pojedinačnih frakcija α 1-, β - i κ -kazeina (Blaya i sur., 2018). Laktocepin I (PI-) uglavnom hidrolizira β -kazein koji je većinom hidrofobnih svojstava te sadrži visoki udio prolina u strukturi i to uglavnom u C-terminalnom fragmentu polipeptidnog lanca. β -kazein se može razgraditi na više od 100 različitih oligopeptida koji sadrže od 4 do 30 aminokiselinskih ostataka. Peptidi nastali uslijed razgradnje kazeina, djelovanjem proteinaza vezanih za staničnu stjenku BMK, transportiraju se unutar stanice pomoću Opp, Dpp i DtpT transportnog sustava. Daljnju razgradnju peptida provode endopeptidaze (oligopeptidaze) i aminopeptidaze. Endopeptidaze cijepaju unutarnje veze u peptidima, dok aminopeptidaze uklanjaju aminokiseline s N- i C-terminalnog kraja peptida. Proizvodi nastali djelovanjem oligopeptidaza i amidopeptidaza supstrat su za di- i tripeptidaze, čija se enzimska aktivnost razlikuje kod pojedinih bakterijskih sojeva. Završni produkti hidrolize su slobodne aminokiseline, koje su bogat izvor dušika za bakterijsku stanicu (Kieliszek i sur., 2021).

2.1.2. Struktura ekstracelularnih proteinaza BMK

Već je između pojedinih sojeva *Lb. helveticus* značajna bioraznolikost gena za proteinaze u genomu, a mogu sintetizirati od jedne do četiri proteinaze vezane za staničnu stijenu (Beganović i sur., 2013). Ekstracelularni proteini nalaze se s vanjske strane površine bakterijske stanice i vezani su za komponente stanične stijene kovalentnim vezama. Ekstracelularni proteini u strukturi sadrže nekoliko domena s različitim funkcijama. Proteinaze vezane za staničnu stijenu BMK sadrže funkcionalne regije koje su odgovorne za aktivaciju enzimskih prekursora. Većina ekstracelularnih proteinaza sadrži: domenu koja se nalazi na N-terminalnom kraju, sastoji se od signalnog peptida, veličine 40 aminokiseline, te pred-sekvence koja sadrži 150 aminokiselina. Signalna sekvenca se uklanja djelovanjem ekstracelularnog proteina PrtM. U strukturi proteina nakon signalne sekvence od 40 aminokiselinskih ostataka, slijedi katalitička domena koja sadrži 500 aminokiselinskih ostataka. Katalitička domena sadrži aktivno mjesto enzima koje se sastoji od asparaginske kiseline, histidina i serina. Nadalje, slijedi domena I od 150 ostataka koja određuje specifičnosti proteinaze za supstrat. Domena A nalazi se iza domene B i sastoji se od 500 aminokiselinskih ostataka te je vjerojatno uključena u stabiliziranje aktivnosti proteinaza. Sljedeća domena je H domena, strukture α -uzvojnice od 200 aminokiselinskih ostataka, koja je, jednim krajem pričvršćena za staničnu stijenu, a drugim krajem povezana s domenom B, koja se nalazi izvan stanične membrane. Ekstracelularne proteinaze sadrže i hidrofilnu W domenu, koja se sastoji od 100 aminokiselinskih ostataka s visokim udjelom Pro-Gly i Ser-Thr sekvenci (Kieliszek i sur., 2021).

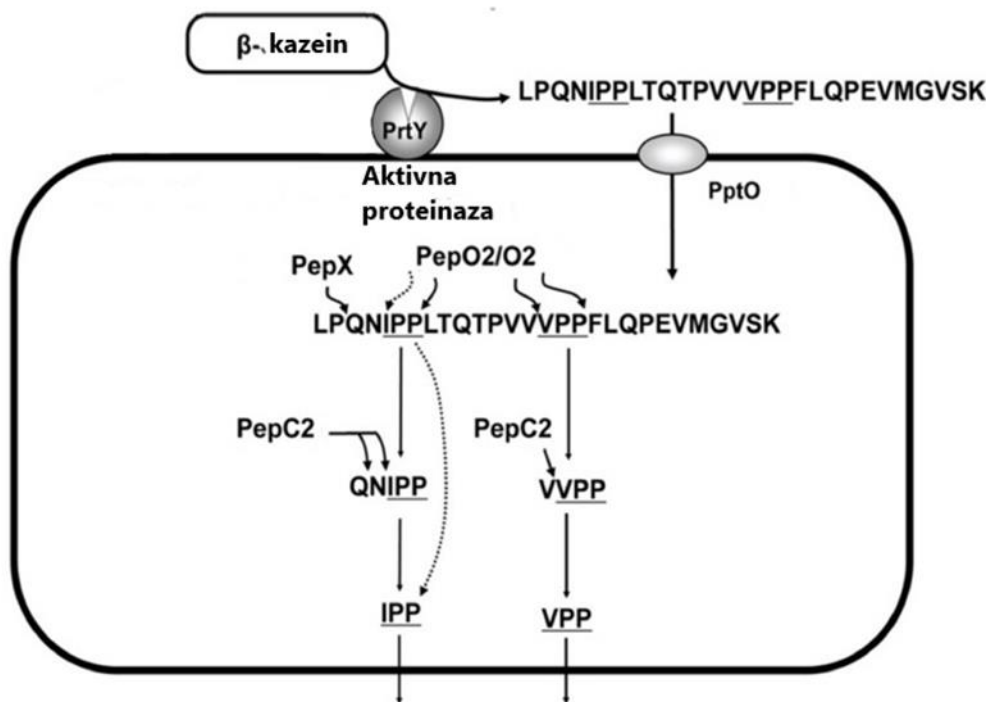
Peptidi nastali uslijed razgradnje kazeina se transportiraju unutar stanice pomoću Opp, DtpT i Dpp. Opp transporteri su ABC transporteri koji omogućuju energiju za transport peptida nastalih proteolitičkom razgradnjom kazeina kroz staničnu membranu. Radi se o aktivnom transportu molekula, koji zahtjeva utrošak energije. Sustav transporta oligopeptida uključuje ATP, koji omogućuje transport peptida veličine 4 do najmanje 8 aminokiselina. Oligopeptidni transportni sustav *Lc. lactis* sudjeluje u transportu oligopeptida koji sadrže 5 do 20 ili više aminokiselina, a karakteristike ovih peptida značajno određuju kinetiku transporta. Dakle, rast bakterija u mlijeku ovisi o prisutnosti transportera oligopeptida koji su dio proteolitičkog sustava BMK, a koji omogućuje transport peptida u stanicu gdje se dalje hidroliziraju djelovanjem oligopeptidaze do slobodnih aminokiselina koje su koristan izvor dušika, ali i energije za bakterijsku stanicu (Kieliszek i sur., 2021; Villegas i sur., 2015).

2.2. Bioaktivni peptidi nastali proteinaznom aktivnošću BMK

Kako su sojevi iz roda *Lactobacillus* auksotrofni za određene aminokiseline, hidrolizom proteina dostupnih u mikrokolišu nadoknađuju potrebe stanice za pojedine aminokiseline. Proteolitička aktivnost laktobacila omogućava stanicama dostupnost aminokiselina, no može rezultirati i nakupljanjem raznovrsnih peptida u fermentiranim mliječnim proizvodima od kojih prema literaturi pojedini imaju potencijal bioaktivnih molekula povezanih s korisnim učincima na zdravlje čovjeka (Marcone i sur., 2017). Potencijal bioaktivnih peptida značajan je i unutar perspektive zdravog načina prehrane i hipoteze o korisnim učincima na zdravlje (Huang i Kok, 2021). Primjena BMK, osobito laktobacila, s proteoličkim djelovanjem u fermentiranim mliječnim proizvodima, učinkovita je strategija za karakterizaciju peptida s bioaktivnim funkcijama (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Bioaktivni peptidi čije su sekvence sadržane u strukturi izvornog proteina, primjerice kazeina, ne pokazuju biološke funkcije, inaktivni su, te se očituju tek nakon razgradnje proteina djelovanjem probavnih enzima unutar GIT trakta, *in vitro* enzimskom hidrolizom ili uslijed mikrobne fermentacije. Biološke funkcije bioaktivnih peptida prema literaturi su raznovrsne, te uključuju apsorpciju minerala, snižavanje krvnog tlaka i razine kolesterola u krvi, antidijabetička, imunomodulirajuća, antioksidativna, opioidno djelovanje i antimikrobna svojstva (Raveschot i sur., 2018; Marcone i sur., 2017). *Lb. helveticus* pokazuje brz rast u mlijeku zbog izražene aktivnosti proteolitičkog sustava i adaptacije na niske pH vrijednosti (Bayal i sur., 2018; Beganović i sur., 2013). Enzimi proteolitičkog sustava imaju ključne uloge unutar tehnološkog aspekta primjene jer doprinose skraćanju vremena sazrijevanja, koagulaciji, formiranju okusa i u smanjenju gorčine konačnog mliječnog proizvoda. Proteinaza stanične ovojnice *Lb. helveticus* razgradnjom kazeina utječe na povećane koncentracije Ile-Pro-Pro (IPP) i Val-Pro-Pro (VPP) tripeptida, koji se povezuju s potencijalnim antihipertenzivnim učincima. Pretpostavljeni specifični mehanizam djelovanja bioaktivnih peptida, utemeljen je na inhibiciji angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. angiotensin-converting enzyme, ACE), koji sudjeluje u sustavu renin-angiotenzin. Mogućnost *Lb. helveticus* da proizvodi peptide s ovakvim učincima u mediju baziranom na mlijeku, nije prisutna kod svih sojeva ove vrste, te je ustanovljena u tek nekoliko sojeva koji tijekom fermentacije mlijeka proizvode ACE-inhibitorne peptide. Prema rezultatima istraživanja kod pojedinaca koji su kontinuirano unosili fermentirane proizvode u kojima je primijenjen *L. helveticus* te koji sadrže povećane koncentracije IPP i VPP tripeptida, uočeno je smanjenje arterioskleroze (Cremonesi i sur., 2013).

Pretpostavlja se da *Lb. helveticus* ima mogućnost stvaranja peptida Val-Pro-Pro i Ile-Pro-Pro u fermentiranim mliječnim proizvodima (slika 2). Proteinaza stanične ovojnice (PrtY) razgrađuje β -kazein do peptida iz kazeina veličine 28 aminokiselina, koji sadrže VPP i IPP sekvence. Peptidi se transportiraju u bakterijsku stanicu pomoću oligopeptidnog transportera PptO, zatim se unutar stanice djelovanjem endopeptidaze na C- i N-terminalnom kraju sekvence, oslobađaju VPP i IPP. Ključni enzim homologan endopeptidazi PepO2, nedavno je identificiran kod soja *Lb. helveticus* CM4 te može katalizirati razgradnju C-terminalnog kraja aminokiselinske sekvence VPPFL i IPPLT do VPP. Procesiranje na N-terminalnom kraju i otpuštanja VPP i IPP mogu katalizirati specifične aminopeptidaze poput pepC2 i X-prolil dipeptidil aminopeptidaze PepX. Budući da PepX može otpustiti dipeptid sa sekvencom X-Pro s N-kraja, aminopeptidaze mogu zaustaviti hidrolizu na X-Pro-Pro sekvenci (Cremonessi i sur., 2013).



Slika 2. Pretpostavljeni proteolitički sustav bakterije *Lb. helveticus* (Cremonessi i sur., 2013)

Funkcionalna hrana, uključujući inovativne funkcionalne mliječne proizvode, za promicanje zdravlja ili smanjenje rizika od bolesti, privukla je interes prehrambene industrije širom svijeta. Fermentirani mliječni proizvodi su upravo značajni s aspekta primjene bioaktivnih peptida koji imaju široki spektar bioloških funkcija (Huang i Kok, 2020; Leboš Pavunc i sur., 2012). Izazovi u industrijskoj proizvodnji i komercijalizaciji novih bioaktivnih peptida uključuju: identifikaciju strukture i izolaciju bioaktivnih peptida, razjašnjavanje molekularnih mehanizama djelovanja koji su temelj bioaktivnih učinaka i razvoj učinkovitih bioprocena za proizvodnju biopeptida u koncentriranom obliku (Raveschot i sur., 2018).

Stoga su nastojanja za razvoj postupaka za ekstrakciju i purifikaciju biološki aktivnih peptida iz fermentacijske komine prisutna s ciljem primjene krajnjeg produkta kao funkcionalnog ili nutraceutičkog pripravka (Raveschot i sur., 2018). Selektivno taloženje je brza i jeftina metoda za izdvajanje peptida od prisutnih zaostalih proteina koja se može uspješno provesti u većem mjerilu. Za taloženje se primjenjuju trikloroocetna kiselina, etanol i amonijev sulfat. Međutim, pristupi utemeljeni na taloženju primjenom navedenih kemikalija su limitirajući jer zahtijevaju dodatni korak pročišćavanja, primjerice primjenu kromatografskih metoda za uklanjanje taložnog sredstva (Agyei i sur., 2016). Jedna od mogućnosti prevladavanja ovog izazova je eksploatacija samog metabolizma BMK. Kako bakterije proizvode mliječnu kiselinu tijekom fermentacije, što zakiseljava prevrelu kominu uslijed snižavanja pH vrijednosti i time može doprinijeti taloženju proteina. Nakon fermentacije, topljivi ekstrakt koji sadrži peptide izdvaja se centrifugiranjem. Membranske tehnike ultra- i nanofiltracije također se mogu koristiti za ekstrakciju i purifikaciju peptida. Prednost metode je što nije potrebna primjena kemikalija te je olakšan prijenos u veće mjerilo i mogućnost združivanja s ostalim metodama. Membranski reaktori omogućuju kontinuirani proces pri kojem se hidroliza proteina i separacija peptida odvijaju simultano. Kromatografske metode poput gel filtracije i ionsko izmjenjivačke kromatografije također se mogu primijeniti u postupcima purifikacije peptida. Karakterizira ih visoka specifičnost što omogućuje visoku razinu separacije. Nedostatak ovih metoda je ekonomski aspekt primjene u biotehnološkim procesima (Raveschot i sur., 2018; Agyei i sur., 2016).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom je radu provedena detekcija kazeinolitičkih proteinaza koje sintetiziraju BMK iz *Lactobacillus* i *Lactococcus* rodova. U tablici 1 prikazani su sojevi BMK, izolirani iz različitih mikrookoliša, koji su korišteni u eksperimentima za detekciju aktivnosti proteinaza. Sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 1. Sojevi bakterija mliječne kiseline, iz *Lactobacillus* i *Lactococcus* rodova, čija je aktivnost proteinaze ispitana u ovom radu:

Naziv i oznaka soja	Ekostanište
<i>Lactobacillus helveticus</i> M92	Silaža
<i>Lactobacillus brevis</i> D6	Dimljeni sir
<i>Lactobacillus brevis</i> ZG1-K7	Svježi sir
<i>Lactobacillus brevis</i> SF9B	Kiseli kupus
<i>Lactobacillus brevis</i> SF15B	Kiseli kupus
<i>Lactobacillus plantarum</i> SF9C	Kiseli kupus
<i>Lactobacillus plantarum</i> SF15C	Kiseli kupus
<i>Lactobacillus plantarum</i> D13	Dimljeni sir
<i>Lactobacillus fermentum</i> D12	Dimljeni sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 1-51	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 2-4	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 2-11	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 4-1	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 4-2	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 5-32	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 5-51	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 6-51	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 7-6	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 7-10	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 9-2	Svježi sir
<i>Lactococcus lactis</i> ZG 9-11	Svježi sir

3.1.2. Hranjive podloge

U ovom radu su za uzgoj BMK korištene slijedeće hranjive podloge:

- MRS tekuća hranjiva podloga za rast *Lactobacillus* sojeva, „Biolife“, Italija
- M17 tekuća hranjiva podloga za rast *Lactococcus* sojeva, „Biolife“, Italija
- diferencijalni medij za detekciju proteinazne aktivnosti: 10 % (w/v) obrano mlijeko („Sigma-Aldrich“, Švicarska) s dodatkom 2 % (w/v) agara („Biolife“, Italija)

3.1.3. Kemikalije

- Obrano mlijeko u prahu „Sigma-Aldrich“, Švicarska
- Agar „Biolife“, Italija
- Fenolftalein „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev hidroksid „Kemika“, Hrvatska
- Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer „Invitrogen“ SAD
- Akrilamid „Sigma“, SAD
- TEMED „Sigma“, SAD
- Amonijev persulfat „Acros Organics“, Belgija
- Natrijev klorid „Kemika“, Hrvatska
- Kalcijev klorid „Gram mol“, Hrvatska
- Reducirajući reagens
- Metilensko modri R-250 „Sigma“, SAD
- Octena kiselina „Kemika“, Hrvatska
- Standar proteina poznatih molekulskih masa „ProSieve QuadColor“, SAD

3.1.4. Pribor i aparatura

- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- Automatske pipete „Eppendorf“, SAD
- Vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- Vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- Hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- Elektroforetske kadice, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija

- Komora za elektroforezu, „Sigma“, SAD
- Kivete „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice „Golias“, Slovenija
- Magnetska miješalica „IKA WERKE“, Njemačka
- Centrifuga „Eppendorf Centrifuge 5804R“, SAD
- Centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- Hladnjak (-80°C) „Eppendorf CryoCube F101h“, SAD
- Biospec Nano spektrofotometar „Shimadzu“, Japan
- Vortex V1 plus „Biosan“, Latvija
- Epruvete „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlemeyerove tikvice „Technische Glaswerke Ilmenau“, Njemačka
- Laboratorijski stalci „neoLab“, Njemačka

3.2. Metode rada

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi BMK čuvani su pri -80 °C u tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % v/v glicerola. Sojevi su 24 sata prije provođenja eksperimenta inokulirani u optimalni hranjivi medij (MRS ili M17), odnosno obrano mlijeko i inkubirani pri 37 °C u anaerobnim uvjetima.

3.2.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti BMK

Proteolitička aktivnost određena je metodom difuzije u podlogu koja sadrži obrano mlijeko uz dodatak agara. Dan prije izvođenja eksperimenta, sojevi iz roda *Lactobacillus* inokulirani su u MRS tekuću hranjivu podlogu i inkubirani preko noći pri 37 °C u anaerobnim uvjetima, a sojevi iz roda *Lactococcus* naciepljeni su u M17 tekuću hranjivu podlogu i inkubirani preko noći pri 37 °C u anaerobnim uvjetima. Isti sojevi iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus* su, za procjenjivanje mogućnost rasta u mliječnim proizvodima, naciepljeni u sterilno obrano mlijeko i inkubirani preko noći pri 37 °C u anaerobnim uvjetima.

U obranom mlijeku s agarom ravnomjerno su bušačem diskova izbušene jažice promjera 7 mm te su zatim pipetmanom dodani 50 µL biomase stanica nakon centrifugiranja, ili 50 µL

supernatanta kulture, obzirom da proteinaze mogu biti vezane na staničnu stijenku ili prisutne u izvanstaničnom mediju. Tako priređene Petrijeve zdjelice su inkubirane na sobnoj temperaturi, a promjeri prozirnih zona hidrolize (razgradnje) kazeina, koji mogu upućivati na proteinaznu aktivnost, određuju se nakon 24 sata. Istom metodom provedena je detekcija proteinazne aktivnosti sojeva nakon kultivacije u obranom mlijeku, kako bi se ustanovila mogućnost induciranja proteolitičke aktivnosti. Odabrani sojevi, koji su pokazivali hidrolitičku aktivnost, nacijepljeni su metodom okomite crte na agar s obranim mlijekom te su prozirne zone očitane nakon 24 sata inkubacije.

3.2.3. Određivanje pH i postotka sintetizirane mliječne kiseline u supernatantu kulture

U supernatantu kulture, dobivenom centrifugiranjem prekonoćnih kultura BMK, pomoću pH metra određena je pH vrijednost. Za određivanje postotka sintetizirane mliječne kiseline 1 ml supernatanta kulture je razrijeđen s 19 ml destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 ml. Razrijeđeni uzorak je titriran s 0,1 M NaOH uz dodatak fenolftaleina kao indikatora, do pojave blijedo ružičaste boje. Broj mililitara 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju, pomnožen s dva predstavlja kiselost u stupnjevima Soxhlet-Henkela ($^{\circ}\text{SH}$).

Postotak proizvedene mliječne kiseline izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 20 \times f_{\text{NaOH}} \times 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}\text{SH} \times 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

$$f_{\text{NaOH}} = 1$$

$$(1^{\circ}\text{SH} \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%))$$

3.2.4. Ekstrakcija proteinaza BMK

Odabrani su sojevi BMK koji su pokazali potencijalnu aktivnost proteinaza su inokulirani u optimalni medij i nakon inkubacije pri optimalnim uvjetima rasta provedena je ekstrakcija proteinaza prema Villegas i sur. (2015). Nakon rasta u optimalnom mediju bakterijske stanice su centrifugirane pri 8000 x *g* tijekom 10 minuta pri 4 °C. Biomasa stanica je zatim isprana s

0,85 % (w/v) fiziološkom otopinom uz dodatak 10 mM CaCl₂ te su stanice zatim ponovno centrifugirane na 8000 x *g* tijekom 10 minuta i isprane. Nakon drugog ispiranja stanice su resuspendirane u 20 mM Tris-HCl puferu (pH 7,5) uz dodatak 5 mM CaCl₂. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta i zatim su centrifugirani na 8000 x *g* tijekom 15 minuta. Supernatant je pohranjen pri 4 °C, a koncentrirana biomasa stanica (pelet) je isprana i resuspendirana u 20 mM Tris-HCl puferu i pohranjena pri 4 °C. U ekstraktu proteina je zatim određena koncentracija proteina pomoću Biospec nano spektrofotometra (tablica 2) te su priređeni ekstrakt proteina iz supernatanta kulture ili peleta su analizirani pomoću SDS-PAGE metode.

Tablica 2. Koncentracije proteina u supernatantu ekstrakta nakon ekstrakcije odabranih sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*.

Naziv soja	Koncentracija proteina u supernatantu ekstrakta (µg/mL)
<i>Lb. brevis</i> D6	116,96
<i>Lb. brevis</i> ZG 1-K7	68,44
<i>Lb. brevis</i> SF15B	29,02
<i>Lb. plantarum</i> D13	80,36
<i>Lb. fermentum</i> D12	412,04
<i>Lc. lactis</i> ZG 5-32	22,15
<i>Lc. lactis</i> ZG 7-10	34,05

3.2.5. SDS-PAGE analiza potencijalnih proteinaza

SDS-PAGE elektroforeza provedena je u 8 % poliakrilamidnom gelu. Priređeni su gel za razdvajanje (8 % akrilamida) i gel za sabijanje (4 % akrilamida), a uzorcima je dodan reducirajući reagens te su denaturirani kuhanjem 2-3 minute. Ukupni volumen uzorka je nanešen na 8 %-tni poliakrilamidni gel. SDS-PAGE je provedena pri konstantnom naponu od 50 V tijekom 3 sata u kadici za elektroforezu. Nakon završene elektroforeze, gel je obojen u 0,1 % metilenskom modrilu R-250 s 50 % metanola i 7 % octene kiseline tijekom 3 sata. Nakon bojanja, gel je inkubiran u 7 % otopine octene kiseline kako bi se uklonio višak boje.

3.2.6. Statistička analiza podataka

Svi eksperimenti, uključujući određivanje pH vrijednosti, postotka proizvedene mliječne kiseline i određivanje zona uslijed razgradnje kazeina, ponovljeni su tri puta te su određene srednje vrijednosti i standardna devijacija. Rezultati su statistički obrađeni pomoću *online* programa „VassarStats“ metodom „Tukey HSD Test“. Podaci dobiveni mjerenjem pH uspoređivani su s najmanjom pH vrijednosti supernatanta kulture porasle u optimalnom mediju odnosno u obranom mlijeku te su istaknute vrijednosti koje se statistički značajno razlikuju od referentne vrijednosti. Vrijednosti postotka proizvedene mliječne kiseline uspoređivane su s najvećom vrijednosti postotka proizvedene mliječne kiseline u supernatantu kulture porasle u optimalnom mediju, odnosno u obranom mlijeku te su istaknute vrijednosti koje se statistički značajno razlikuju od referentne vrijednosti. Promjeri zona inhibicije uspoređivani su s najvećim, posebno za supernatant i biomasu, te također za kulture porasle u optimalnom mediju, odnosno u obranom mlijeku.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Selekcija sojeva BMK s proteinaznom aktivnošću

Proteolitički sustav BMK ima značajnu ulogu za rast bakterijskih stanica, doprinosi razvoju okusa fermentiranih mliječnih proizvoda te može proizvoditi bioaktivne peptide s pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje (Brown i sur., 2017). Sinteza biopeptida tijekom fermentacije omogućuje postizanje dodatnog funkcionalnog učinka u fermentiranim mliječnim proizvodima. Stoga je atraktivna s investicijskog aspekta industrije jer predstavlja bioproces bez dodatnih postupaka koji bi utjecali na ekonomičnost čitavog procesa industrijske proizvodnje. Huang i Kok (2020) su u svom istraživanju istražili mogućnost za povećanje sinteze i raznovrsnosti nastalih biopeptida genetičkim modifikacijama proteolitičkog sustava soja *Lc. lactis* kojim se postižu povećani prinosi u proizvodnji peptida sa spektrom bioaktivnih učinaka. Ovaj soj BMK se smatra potencijalnom „staničnom tvornicom“ sinteze bioaktivnih peptida. Hansen i Marcatili (2020) kreirali su model predviđanja strukture kovalentno vezane proteinaze stanične ovojnice (engl. cell envelope proteinase) BMK soja *Lc. lactis*. Model pretpostavlja i mehanizme interakcije bakterijskih stanica *Lc. lactis* s micelama kazeina kao supstrata tijekom rasta u mlijeku te ukazuje na kinetiku enzimske reakcije proteolitičkog sustava. Prema modelu, katalitička reakcija je, sudjelovanjem trijade bakterijskih stanica, proteinaze i supstrata kazeina, inducirana promjenama u strukturi proteina prilikom interakcije sa supstratom.

Za preliminarnu procjenu primjene specifičnog soja BMK kao starter kulture u proizvodnji sira značajno je odrediti mogućnost 1 % prekonoćnog inokuluma soja da koagulira mlijeko tijekom 16 sati inkubacije pri 42 °C, što se određuje detekcijom specifičnog Fmc⁺ fenotipa (engl. fast milk coagulating). Fmc⁺ fenotip se povezuje s prisutnošću proteinaza u bakterijskim stanicama. Kvalitativnim određivanjem koagulacije obranog mlijeka, odnosno prisutnost fenotipa koagulacije (Fmc⁺ fenotip) nakon prekonoćnog uzgoja pojedinih sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus* ustanovljeno je da većina *Lactobacillus* sojeva, odnosno svi sojevi koji pripadaju *Lc. lactis* vrsti značajno koaguliraju obrano mlijeko (tablica 3). Poželjno svojstvo starter kultura je da tijekom fermentacije sintetiziraju i visoke koncentracije mliječne kiseline tijekom rasta u mlijeku (Villegas i sur., 2015). Kako bi mogle rasti i sintetizirati mliječnu kiselinu koja rezultira acidifikacijom u fermentiranim mliječnim proizvodima, BMK moraju metabolizirati laktozu i posjedovati proteolitički sustav koji omogućuje učinkovitu razgradnju kazeina. Ustanovljeno je da su kod pojedinih sojeva *Lactococcus* vrste spontane mutacije tj. promjene Fmc⁺ fenotipa u Fmc⁻ fenotip, čime soj više ne posjeduje fenotip koagulacije mlijeka, povezane s gubitkom

aktivnosti proteinaze PrtP vezane za staničnu ovojnica i/ili enzima potrebnih za metaboliziranje laktoze, te se pretpostavlja da je uzrok gubitak plazmida koji sadrži gene koji kodiraju za ove enzime. Fmc⁻ fenotip *Lc. lactis* također može biti posljedica gubitka plazmida koji sadrži gene koji kodiraju za oligopeptidni permeazni sustav. Uz to, zabilježeno je da je aminopeptidaza, kodirana *pepA*, potrebna za optimalan rast *Lc. lactis* u mlijeku (Herbert i sur., 2001). Stoga je kvalitativno određena i prisutnost fenotipa koagulacije nakon inkubacije sojeva u obranom mlijeku pri optimalnim uvjetima rasta. Ustanovljeno je da fiziološka aktivnosti BMK doprinosi koagulaciji i zgrušavanju proteina u mlijeku, te je kvalitativno određen stupanj koagulacije (tablica 3). *Lb. helveticus* M92, te svi sojevi *Lactococcus* vrste doprinose procesu koagulacije mlijeka (tablica 3).

Tablica 3. Kvalitativno određivanje koagulacije obranog mlijeka, odnosno prisutnost Fmc⁺ fenotipa nakon prekonoćnog uzgoja pojedinih sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*.

Soj	1. Eksperiment	2. Eksperiment	3. Eksperiment
<i>Lb. helveticus</i> M92	+++	+++	+++
<i>Lb. brevis</i> D6	+	+++	+++
<i>Lb. brevis</i> ZG1 K7	++	++	+++
<i>Lb. brevis</i> SF9B	+/-	++	++
<i>Lb. plantarum</i> SF15B	+	+	+
<i>Lb. plantarum</i> SF9C	-	++	+
<i>Lb. plantarum</i> SF15C	+/-	+	++
<i>Lb. plantarum</i> D13	+	++	+++
<i>Lb. fermentum</i> D12	-	++	+/-
<i>Lc. lactis</i> ZG1-51	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG2-4	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG2-11	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG4-1	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG4-2	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG5-32	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG5-51	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG6-51	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG7-6	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG7-10	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG9-2	+++	+++	+++
<i>Lc. lactis</i> ZG9-11	+++	+++	+++

* Nije prisutna koagulacija –

Neznatna koagulacija +/-

Umjerena koagulacija +

Izražena koagulacija ++

Značajna koagulacija +++

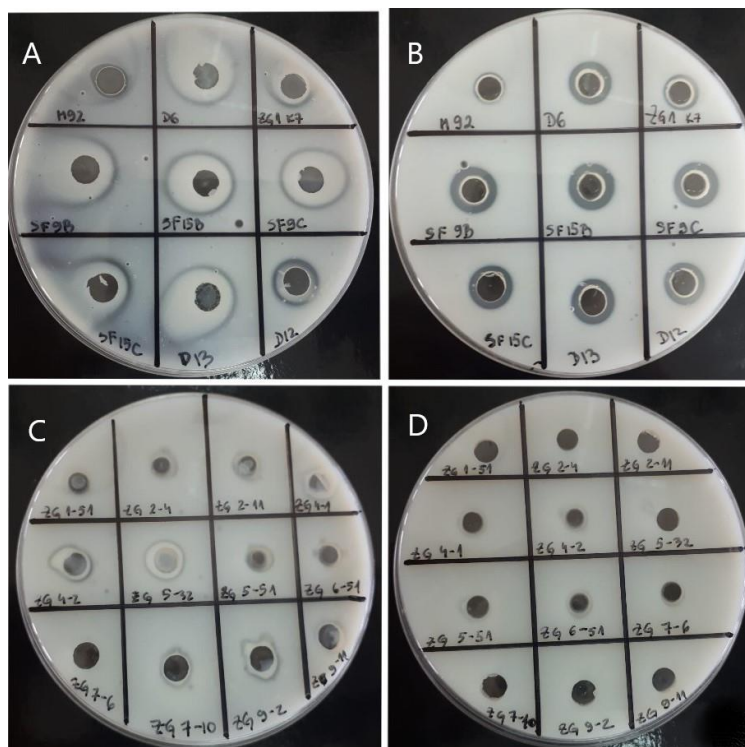
Nadalje, u ovom radu je ispitan potencijal 21 soja BMK koji pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Lactococcus*, a koji su izolirani iz fermentacijskih ekosustava, prvenstveno fermentiranih mliječnih proizvoda, za razgradnju kazeina iz obranog mlijeka s ciljem odabira sojeva producenata proteinaza (slika 3).



Slika 3. Selekcija sojeva BMK iz rodova *Lactobacillus* u *Lactococcus* s mogućom proteolitičkom aktivnošću. Kazeinolitička aktivnost ispitana je u uzorcima supernatanta prenoćne kulture i koncentrirane biomase pomoću metode mjerenja zona hidrolize u obranog mlijeku s 2 % agara: **A)** Sojevi porasli u optimalnom mediju **B)** Sojevi porasli u obranog mlijeku *Sojevi koji se statistički značajno razlikuju od sojeva s najvećim promjerom zone hidrolize, $P < 0,01$

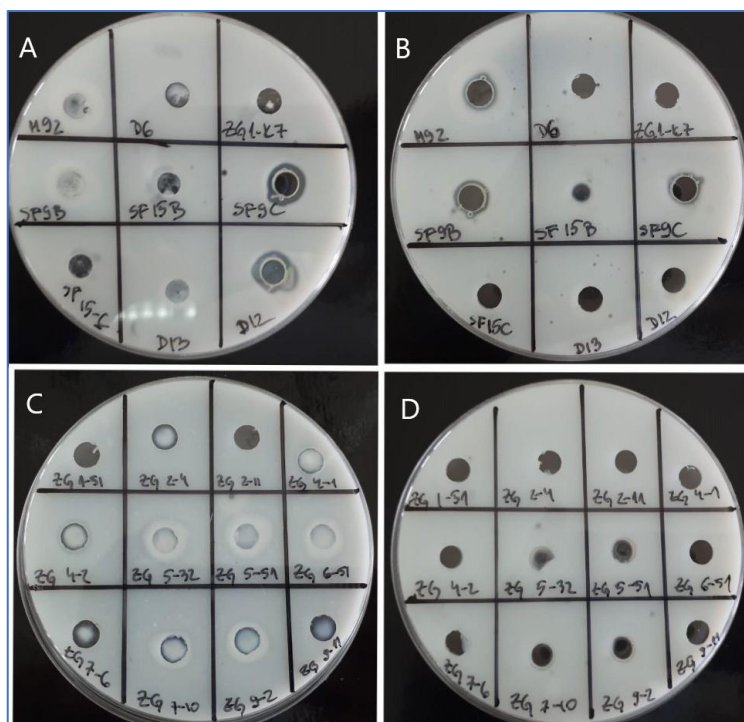
Odabrani sojevi pokazuju tipičan Fmc⁺ fenotip koji se može povezati s eksprimiranjem proteinaza (Villegas i sur., 2015). Probir bakterijskih sojeva s potencijalnom proteolitičkom aktivnošću utemeljen je na detekciji hidrolize proteina iz obranog mlijeka, u prisutnosti koncentrirane biomase stanica kako bi se detektirala aktivnost proteinaze vezane na staničnu stjenku, odnosno supernatanta bakterijskih kultura u slučaju da se radi o ekstracelularnoj proteinazi (slika 3).

Proteolitički sustav BMK uključuje združenu aktivnost nekoliko enzima, a analizom supernatanta kulture, odnosno koncentrirane biomase stanica omogućena je dostupnost kazeina svim komponentama enzimskog sustava prema tome i proteinazama, transportnim proteinima i peptidazama u usporedbi s eksperimentalnim pristupom u kojem bi se ispitala aktivnost purificirane proteinaze. Svi testirani sojevi pokazuju određenu razinu kazeinolitičke aktivnosti. Kada se uspoređuju rezultati između sojeva *Lactobacillus*, *Lb. brevis* D6 i *Lb. plantarum* D13, ali i *Lb. fermentum* D12 su učinkovitiji u razgradnji kazeina u usporedbi s preostalim analiziranim sojevima (slika 3), što je potvrđeno i određivanjem proteinazne aktivnosti spektrofotometrijski pomoću Ansonove metode i analizom dobivenih proteinskih fragmenata razgradnje kazeina pomoću SDS-PAGE metode (Butorac i sur., u pripremi). Zanimljivo je da je proteolitička aktivnost soja *Lb. plantarum* SF15B, nakon rasta u obranom mlijeku, značajno prisutna u uzorku koncentrirane biomase, dok je prilikom analize prisutnosti proteolitičke aktivnosti u supernatantu ustanovljeno da nema proteinazne aktivnosti. Ovakav rezultat upućuje na mogućnost soja *Lb. plantarum* SF15B sintetizira proteinazu vezanu na staničnu ovojnica. Slično je ustanovljeno i za sojeve *Lc. lactis* ZG5-51 i ZG9-2. Prema rezultatima sojevi iz roda *Lactobacillus*, nakon rasta u optimalnom mediju, fenotipski pokazuju izraženiju mogućnost hidrolize kazeina u usporedbi sa sojevima iz roda *Lactococcus* (slika 3). No ustanovljeno je, primjerice, da soj *Lc. lactis* ZG5-32 pokazuje značajnu proteolitičku aktivnost nakon prethodnog prekonoćnog uzgoja u obranom mlijeku, pa se može pretpostaviti da kod ovog soja, koji je izvorno izoliran iz sira, postoji mogućnost induciranja komponenata proteolitičkog sustava i preusmjeravanja prema iskorištenju proteina kazeina odabirom odgovarajućeg medija, koji ne sadrži druge izvore aminokiselina, osim primjerice, kazeina te u manjoj mjeri proteine sirutke.



Slika 4. Zone hidrolize za detekciju proteinazne aktivnosti sojeva BMK poraslih u optimalnom mediju: **A)** biomasa stanica sojeva iz roda *Lactobacillus* **B)** supernatant kulture sojeva iz roda *Lactobacillus* **C)** biomasa stanica sojeva iz roda *Lactococcus* **D)** supernatant kulture sojeva iz roda *Lactococcus*.

Sojevi *Lactobacillus* i *Lactococcus* rodova su inokulirani u obrano mlijeko kako bi se ispitala mogućnost induciranja aktivnosti proteinaze nakon rasta u limitirajućoj hranjivoj podlozi u kojoj su jedini izvori dušika proteini obranog mlijeka, prvenstveno kazein. Prema rezultatima ustanovljeno je da se proteolitička aktivnost nije značajno promijenila kada su sojevi prethodno uzgojeni u obranom mlijeku umjesto u optimalnom hranjivom mediju (slika 4).



Slika 5. Prozirne zone uslijed hidrolize za detekciju proteinazne aktivnosti sojeva BMK poraslih u obranom mlijeku: **A)** koncentrirana biomasa stanica sojeva iz roda *Lactobacillus* **B)** supernatant kulture sojeva iz roda *Lactobacillus* **C)** biomasa stanica sojeva iz roda *Lactococcus* **D)** supernatant kulture sojeva iz roda *Lactococcus*.

U konačnici može se zaključiti da iako je ovaj eksperimentalni pristup prikladan za odabir sojeva BMK s potencijalom za ekspresiju proteinaze između velikog broja BMK, lokalizaciju proteinaze potrebno je ustanoviti drugim metodama, primjerice na temelju poznavanja potpuno sekvencioniranih genoma ciljanih sojeva može se pretpostaviti *in silico* stanična lokalizacija. Također će se istražiti prisutnost gena koji kodiraju za enzime proteolitičkog sustava prema Leboš Pavunc i sur. (2012) primjenom specifičnih početnica za proteinaze za amplifikaciju ciljane sekvence pomoću PCR.

Tijekom fermentacije, učinkovit rast BMK očituje se aktivnim metabolizmom tijekom kojeg se izvori ugljika poput laktoze provode do mliječne kiseline, što rezultira snižavanjem pH vrijednosti okolnog medija. Stoga su određene vrijednosti pH i postotak sintetizirane mliječne kiseline u supernatantu kulture (tablice 4 i 5).

Tablica 4. pH vrijednosti određene u supernatantima kultura BMK nakon prekonoćnog uzgoja u optimalnom mediju i nakon prekonoćne inkubacije u obranom mlijeku.

Soj bakterije mliječne kiseline	pH vrijednost (optimalni medij)	pH vrijednost (obrano mlijeko)
<i>Lb. helveticus</i> M92	4,77 ± 0,46	4,30 ± 0,51
<i>Lb. brevis</i> D6	3,85 ± 0,03	5,06 ± 0,18
<i>Lb. brevis</i> ZG1 K7	4,25 ± 0,36	5,11 ± 0,11
<i>Lb. brevis</i> SF9B	4,20 ± 0,71	5,00 ± 0,47
<i>Lb. plantarum</i> SF15B*	3,99 ± 0,44	5,49 ± 0,08
<i>Lb. plantarum</i> SF9C*	3,78 ± 0,08	5,67 ± 0,15
<i>Lb. plantarum</i> SF15C*	3,86 ± 0,08	5,43 ± 0,15
<i>Lb. plantarum</i> D13*	3,75 ± 0,05	5,19 ± 0,28
<i>Lb. fermentum</i> D12*	4,07 ± 0,24	6,02 ± 0,11
<i>Lc. lactis</i> ZG1-51*	5,47 ± 0,04	4,83 ± 0,04
<i>Lc. lactis</i> ZG2-4*	5,39 ± 0,14	4,60 ± 0,06
<i>Lc. lactis</i> ZG2-11*	5,34 ± 0,21	4,81 ± 0,04
<i>Lc. lactis</i> ZG4-1*	5,39 ± 0,29	4,61 ± 0,07
<i>Lc. lactis</i> ZG4-2*	5,44 ± 0,25	4,53 ± 0,04
<i>Lc. lactis</i> ZG5-32*	5,62 ± 0,14	4,71 ± 0,13
<i>Lc. lactis</i> ZG5-51*	5,24 ± 0,43	4,68 ± 0,03
<i>Lc. lactis</i> ZG6-51*	5,50 ± 0,09	4,65 ± 0,04
<i>Lc. lactis</i> ZG7-6*	5,34 ± 0,34	4,61 ± 0,04
<i>Lc. lactis</i> ZG7-10*	5,35 ± 0,30	4,58 ± 0,04
<i>Lc. lactis</i> ZG9-2*	5,33 ± 0,28	4,58 ± 0,07
<i>Lc. lactis</i> ZG9-11*	5,44 ± 0,42	4,76 ± 0,11

* Sojevi koji se statistički značajno razlikuju od soja *Lb. plantarum* D13 (najmanja pH vrijednost u supernatantu kulture) nakon prekonoćnog uzgoja u optimalnom mediju, $p < 0,1$

*Sojevi koji se statistički značajno razlikuju od soja *Lb. helveticus* M92 (najmanja pH vrijednost u supernatantu kulture) nakon prekonoćnog uzgoja u obranom mlijeku, $p < 0,5$ za SF15B i D13; $p < 0,1$ za SF9C, SF15C i D12

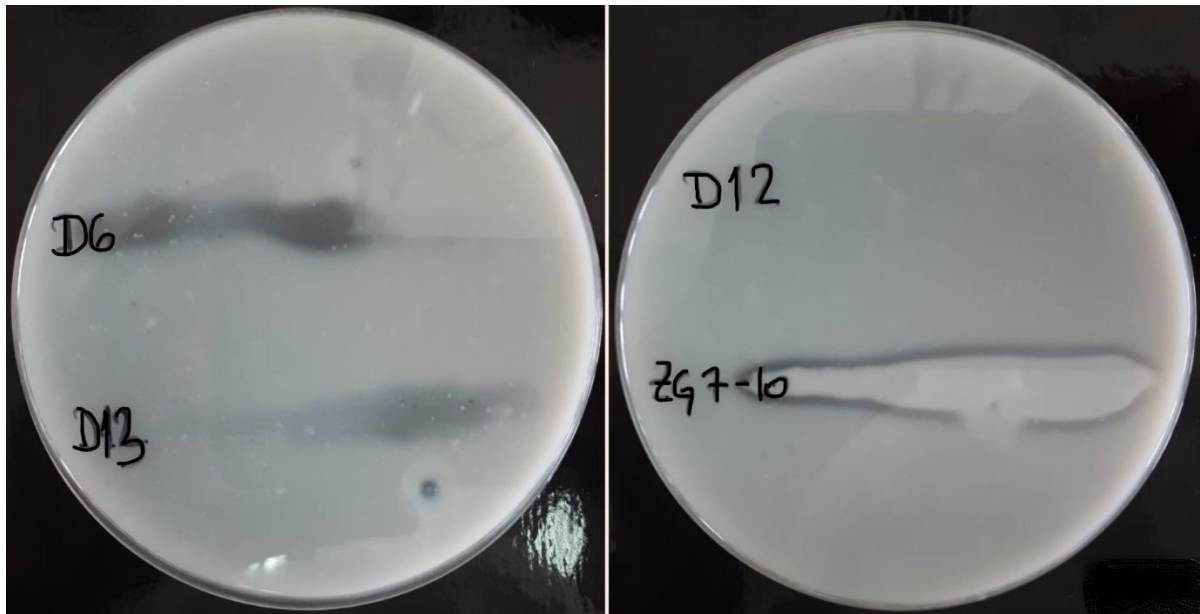
Tablica 5. Postotak mliječne kiseline određen u supernatantima kultura BMK nakon prekonoćnog uzgoja u optimalnom mediju, odnosno inkubacije u obranom mlijeku

Soj bakterije mliječne kiseline	% mliječne kiseline (optimalni medij)	% mliječne kiseline (obrano mlijeko)
<i>Lb. helveticus</i> M92	1,05 ± 0,49	0,63 ± 0,39
<i>Lb. brevis</i> D6	1,83 ± 0,14	0,36 ± 0,09
<i>Lb. brevis</i> ZG1 K7	1,38 ± 0,46	0,33 ± 0,05
<i>Lb. brevis</i> SF9B	1,50 ± 0,53	0,39 ± 0,05
<i>Lb. plantarum</i> SF15B	1,71 ± 0,47	0,27 ± 0
<i>Lb. plantarum</i> SF9C	1,98 ± 0,31	0,27 ± 0
<i>Lb. plantarum</i> SF15C	1,71 ± 0,24	0,33 ± 0,05
<i>Lb. plantarum</i> D13	1,74 ± 0,45	0,29 ± 0,03
<i>Lb. fermentum</i> D12	1,38 ± 0,05	0,26 ± 0,03
<i>Lc. lactis</i> ZG1-51*	0,57 ± 0,26	0,41 ± 0,05
<i>Lc. lactis</i> ZG2-4*	0,57 ± 0,34	0,38 ± 0,07
<i>Lc. lactis</i> ZG2-11*	0,51 ± 0,36	0,39 ± 0,05
<i>Lc. lactis</i> ZG4-1*	0,51 ± 0,29	0,42 ± 0,05
<i>Lc. lactis</i> ZG4-2*	0,51 ± 0,29	0,36 ± 0,09
<i>Lc. lactis</i> ZG5-32*	0,56 ± 0,25	0,42 ± 0,05
<i>Lc. lactis</i> ZG5-51*	0,53 ± 0,38	0,39 ± 0,05
<i>Lc. lactis</i> ZG6-51*	0,48 ± 0,34	0,42 ± 0,10
<i>Lc. lactis</i> ZG7-6*	0,54 ± 0,31	0,36 ± 0,09
<i>Lc. lactis</i> ZG7-10*	0,53 ± 0,33	0,39 ± 0,10
<i>Lc. lactis</i> ZG9-2*	0,54 ± 0,31	0,45 ± 0
<i>Lc. lactis</i> ZG9-11*	0,63 ± 0	0,39 ± 0,10

*Sojevi koji se statistički značajno razlikuju od soja SF9C koji sintetizira najveći postotak proizvedene mliječne kiseline nakon prekonoćnog uzgoja u optimalnom mediju, $p < 0,1$

Najveći postotak proizvedene mliječne kiseline nakon prekonoćnog uzgoja u obranom mlijeku određen je u supernatantu kulture soja *Lb. helveticus* M92.

Kako bi se potvrdila prisutnost fenotipa hidrolize kazeina, sojevi za koje je ustanovljena potencijalna prisutnost proteinaze, dodatno su inokulirani na kruti medij obranog mlijeka uz dodatak agara metodom okomite crte te je potvrđeno da sojevi *Lb. brevis* D6, *Lb. plantarum* D13 i *Lc. lactis* subsp. *lactis* ZG7-10 pokazuju kazeinolitičku aktivnost uslijed pojave prozirne zone u blizini inokulirane bakterijske kulture (slika 6).



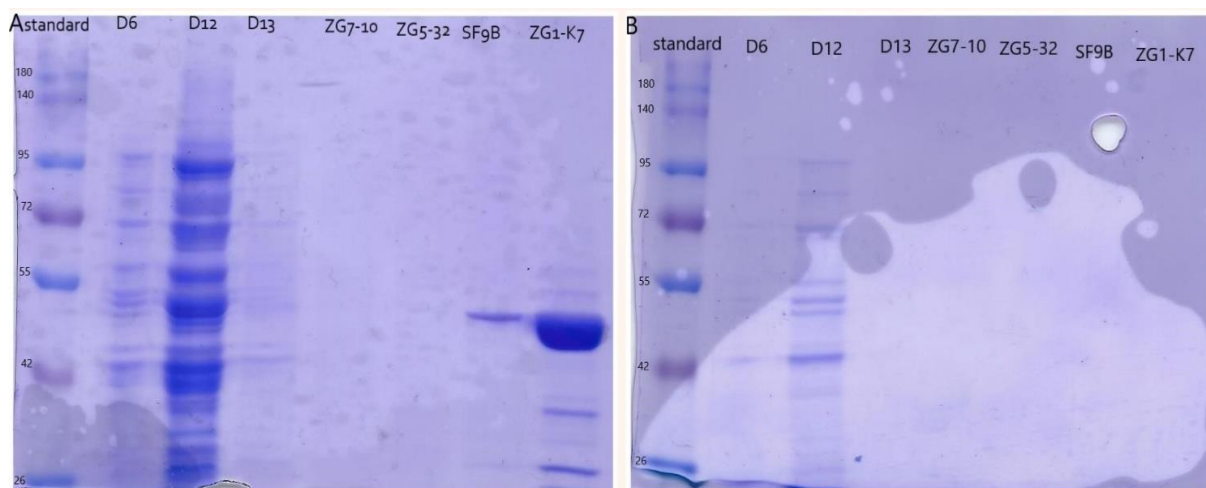
Slika 6. Prozirne zone uslijed hidrolize kazeina oko poraslih kultura *Lb. brevis* D6, *Lb. plantarum* D13, *Lb. fermentum* D12 i *Lc. lactis* subsp. *lactis* ZG7-10 kao rezultat potencijalne aktivnosti proteinaze koja razgrađuje kazein u krutom mediju obranog mlijeka s dodatkom agara. Inokulirani sojevi inkubirani su tijekom 48 sati na sobnoj temperaturi

4.2. Ekstrakcija proteinaza *Lactococcus* i *Lactobacillus* sojeva

U istraživanjima proteolitičkog sustava BMK značajnije su okarakterizirane proteinaze sojeva iz roda *Lactococcus* u usporedbi s istraživanjima proteinaza *Lactobacillus* sojeva. S obzirom da se *Lactococcus* sojevi većinom primjenjuju kao starter kulture, a *Lactobacillus* sojevi su često okarakterizirani kao probiotičke bakterije, mogućnost sinteze bioaktivnih peptida, a time i karakterizacija proteolitičkog sustava ovih bakterija doprinijela bi funkcionalnosti ovih bakterija zbog toga što imaju potencijal za zdravstvene učinke *in vivo*. Stoga je u ovom radu, s aspekta primjene funkcionalnih starter kultura iz *Lactococcus* roda i probiotičkih sojeva iz *Lactobacillus* roda, provedena daljnja karakterizacija proteolitičkog sustava optimiranjem protokola za ekstrakciju proteinaza s površine bakterijskih stanica potencijalnih producenta. Proteinaze stanične stijenke BMK značajne su i tijekom procesa fermentacije mlijeka jer omogućuje soju producentu, a radi se najčešće o autohtonim sojevima BMK, rast u mlijeku i samim time doprinos uspješnosti fermentacije. Također, proteinaze stanične stijenke, koje sintetiziraju pojedine BMK, mogu doprinijeti karakterizaciji fermentiranih mliječnih proizvoda kao funkcionalne hrane, jer iskorištavanjem kazeina iz mlijeka može doći do nakupljanja peptida od kojih su pojedini definirani kao bioaktivni zbog potencijalnih zdravstvenih učinaka u domaćinu (Villegas i sur., 2015). Villegas i sur. (2015) uspješno su proveli ekstrakciju proteinaze stanične stijenke, koja nije kovalentno povezana sa staničnom ovojnicom, te je ovaj protokol neinvazivan, čime se ne modificira niti ne narušava integritet bakterijske stanice te je omogućena efikasna ekstrakcija proteinaze s iskorištenjem od 90 %, a sam postupak nije utjecao na degradaciju te je očuvana struktura proteinaze stanične stijenke (Villegas i sur., 2015). Kako bi se provela daljnja karakterizacija proteinaza odabranih sojeva BMK, provedena je djelomična purifikacija, te je priređeni ekstrakt proteina iz biomase stanica odnosno supernatanta bakterijske kulture analiziran SDS-PAGE metodom. Određene su i koncentracije proteina u proteinskim ekstraktima. Uzorci ekstrakta proteina s intenzivnim proteinskim vrpčama pripadaju ekstraktu proteina sojeva u kojima su izmjerene više koncentracije proteina (slika 8). Koncentracija proteina u koncentriranoj biomasi stanica veća je nego u supernatantu ekstrakta.

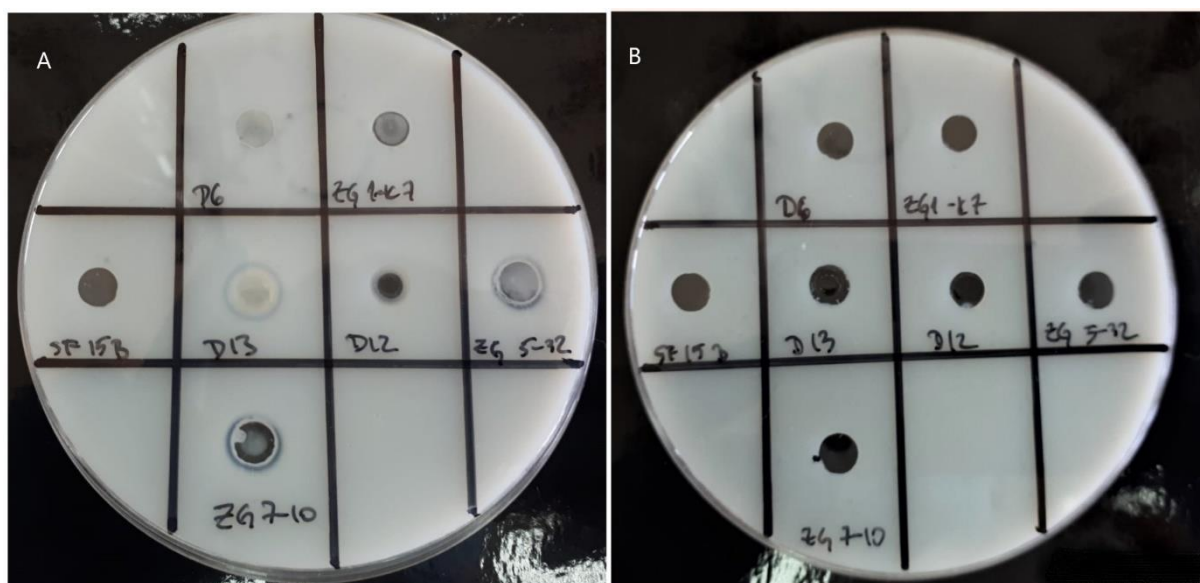
Za daljnje optimiranje postupaka purifikacije proteinaza, potrebno je nakon tretmana s 1 M NaCl provesti ultrafiltraciju kroz membranu s graničnom vrijednošću od 100 kDa, a pri tome omogućiti maksimalan prinos enzima. Cilj je postići razdvajanje proteinaze od kontaminirajućih proteina i unaprijediti protokol purifikacije proteinaze (Villegas i sur., 2015). Potrebno je istaknuti da je ekstrakcija provedena nakon inokulacije pojedinih sojeva BMK u optimalnoj

podlozi za rast, a prema Brown i sur. (2017) na ekspresiju proteinaza se može utjecati dostupnim peptidima u hranjivoj podlozi za rast. Kod soja *Lc. lactis*, transkripcijski regulator CodY posreduje u represiji nekoliko gena proteolitičkog sustva prtP/prtM, opp-pepO1, pepD, pepN, pepC, i pepX što proizlazi iz adaptacije stanica na dostupne aminokiseline razgranatih lanaca (Lamarque i sur., 2011). Brown i sur. (2017) u kontekstu učinka dostupnih peptida u mediju za rast na sintezu proteinaze, usporedili su ekspresiju gena za enzime proteolitičkog sustava nakon uzgoja *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 u kemijski definiranom mediju i nakon rasta u istom mediju uz dodatak enzimatskog hidrozilata kazeina. *prtL*, *oppA1*, *optS*, *optA* geni i *oppDFBC* i *optBCDF* operoni su značajno eksprimirani u bakterijskim stanicama nakon rasta u kemijski definiranom mediju u usporedbi s ekspresijom u stanicama *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 u mediju s dodanim peptidima. Transkriptomaska analiza potvrđena je analizom proteoma prema kojoj je značajno povećana sinteza enzima proteolitičkog sustava PrtL, PepG, OppD i OptF nakon kultivacije stanica u hranjivom mediju bez peptida (Brown i sur., 2017). SDS-PAGE analizom bakterijskih stanica iz kemijski definiranog medija, ustanovljena je pojedinačna linija proteina na poziciji koja odgovara molekuloj masi od 190 kDa što je pretpostavljena molekulska masa proteinaze ovog soja. Pri tome je značajno istaknuti da nakon analize stanica poraslih u MRS hranjivoj podlozi, ili kemijski definiranom mediju s peptidima nije uočena ista proteinska vrpca (Brown i sur., 2017). Stoga je osim postupka ekstrakcije proteinaze potrebno definirati i hranjivu podlogu za rast soja producenta proteinaze kako bi se postigli visoki prinosi prilikom ekstrakcije. Na SDS-PAGE gelu prisutne su vrpce proteinaza različite molekulske mase kod sojeva: *Lb. brevis* D6, *Lb. fermentum* D12, *Lb. plantarum* D13, *Lb. brevis* SF9B, *Lb. brevis* ZG1-K7. Ustanovljena je prisutnost proteina različitih molekulske mase u uzorcima ekstrakata proteina sojeva i to iz proteinskih ekstrakata izoliranih iz uzoraka biomase stanica sojeva *Lb. brevis* D6, *Lb. fermentum* D12, *Lb. plantarum* D13, te iz supernatanta kulture sojeva D6 i D12 (slika 7 A i B).



Slika 7. SDS-PAGE analiza proteina nakon djelomične purifikacije proteinaze iz uzoraka **A)** koncentrirane biomase stanica (pelet) **B)** supernatanta – ekstrakta proteinaza iz odabranih sojeva *Lb. brevis* D6, *Lb. fermentum* D12, *Lb. plantarum* D13, *Lc. lactis* ZG7-10, *Lc. lactis* 5-32, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. brevis* ZG1-K7.

Nakon djelomične purifikacije proteinaza sojeva *Lc. lactis* ZG5-32 i ZG7-10, proteinski ekstrakt je zadržao proteolitičku aktivnost (slika 8).



Slika 8. Zone hidrolize koje upućuju na razgradnju kazeina iz obranog mlijeka djelovanjem djelomično purificiranih proteinaza odabranih sojeva *Lc. lactis* ZG7-10 i ZG5-32 u uzorcima proteinskih ekstrakata iz **A)** koncentrirane biomase stanica (peleta) **B)** supernatanta bakterijske kulture

Protokoli ekstrakcije proteinaze se će se optimizirati s ciljem purifikacije proteinaze, te će se provesti analiza proteina primjenom spektrometrije masa.

5. Zaključci

Sojevi *Lactobacillus* i *Lactococcus* vrsta s Fmc⁺ fenotipom iskazuju kazeinolitičko djelovanje za koje se pretpostavlja da proizlazi iz katalitičkog djelovanja sustava proteinaza.

Nakon djelomične ekstrakcije proteinaza sojeva *L. lactis* ZG5-32 i ZG7-10, proteinski ekstrakt, i u vrlo niskoj koncentraciji, je zadržao proteolitičku aktivnost.

SDS-PAGE metodom detektirani su proteini u ekstraktu proteinaza sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *L. brevis* SF9B, čija će se daljnja purifikacija optimirati, te će se identifikacija provesti spektrometrijom masa.

6. Popis literature

Agyei D., Ongkudon C. M., Wei C.Y., Chan A.S., Danquah M.K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing* **98**:244–256.

Beganović J., Kos B., Leboš Pavunc A., Uroić K., Džidara P., Šušković J. (2013.) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe* **20**:1075-9964.

Blaya J., Barzideh Z., LaPointe G. (2018.) Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science* **101(4)**:3611-3629.

Brown L., Villegas J.M., Elean M., Fadda S., Mozzi F., Saavedra L., Hebert E.M. (2017.) YebC, a putative transcriptional factor involved in the regulation of the proteolytic system of *Lactobacillus*. *Scientific Reports* **7(1)**:8579.

Butorac K., Novak J., Leboš Pavunc A., Banić M., Butorac A., Lovrić M., Oršolić N., Šušković J., Kos B. Design of a consortium of lactic acid bacteria for the production of biocheese with the increased content of biopeptides encrypted in casein (u pripremi).

Cremonesi P., Chessa S., Castiglioni B. (2013.) Genome sequence and analysis of *Lactobacillus helveticus*. *Frontiers in Microbiology* **3**:435.

Hansen E.B., Marcatili P. (2020.) Modeled Structure of the Cell Envelope Proteinase of *Lactococcus lactis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**:613986.

Hebert E.M., De Giori G.S., Raya R.R. (2001.) Isolation and Characterization of a Slowly Milk-Coagulating Variant of *Lactobacillus helveticus* Deficient in Purine Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **67(4)**: 1846–1850.

Huang C., Kok J. (2020.) Editing of the Proteolytic System of *Lactococcus lactis* Increases Its Bioactive Potential. *Applied and Environmental Microbiology* **86**:e01319-20.

Kieliszek M., Pobiega K., Piwowarek K., Kot A.M. (2021.) Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules* **26**:1858.

Lamarque M., Aubel D., Piard J.C., Gilbert C., Juillard V., Atlan D. (2011.) The peptide transport system Opt is involved in both nutrition and environmental sensing during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Microbiology (Reading)* **157(6)**:1612-1619.

Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos B., Uroić K., Blažić M., Šušković J. (2012). Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technology and Biotechnology*, **50**:141–151.

Marcone S., Belton O., Fitzgerald D.J. (2017.) Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *British Journal of Clinical Pharmacology* **83(1)**:152-162.

Raveschot C., Cudennec B., Coutte F., Flahaut C., Fremont M., Drider D., Dhulster P. (2018.) Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus* Species: From Gene to Application. *Frontiers in Microbiology* **9**:2354.

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S. (2010.) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology* **48 (3)**:296–307.

VassarStats: Website for Statistical Computation, < <http://vassarstats.net/> > Pristupljeno 26.travnja.2021.

Villegas J.M., Brown L., Savoy de Giori G., Hebert E.M. (2015.) Characterization of the mature cell surface proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**:4277–4286.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ime i prezime studenta