

Identifikacija i karakterizacija bioaktivnih peptida proizvedenih s odabranim sojevima bakterija mliječne kiseline

Brajković, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:268124>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2020.

Katarina Brajković

1340/MB

**IDENTIFIKACIJA I
KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNIH
PEPTIDA PROIZVEDENIH S
ODABRANIM SOJEVIMA BAKTERIJA
MLIJEČNE KISELINE**

Rad je izrađen u Centralnom laboratoriju Inkubacijskog centra za bio-znanosti i komercijalizaciju tehnologije – BICRO BIOCentar d.o.o. pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Adriane Lepur, znan. sur. i u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos.

Prije svega, veliko hvala prof. dr. sc. Blaženki Kos na poticajnom mentorstvu, motivacijskim riječima i pristupačnosti u svakom trenutku tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura.

Neizmjereno sam zahvalna dr. sc. Adriani Lepur, znan. sur. na stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada. Također, zahvaljujem na ogromnoj količini strpljenja, intenzivnoj motivaciji, poticaju i nesebičnom prenošenju znanja. Posebnu zahvalu upućujem i Matei Skoblar, mag. ing. na uloženom trudu i vremenu te pomoći kod provođenja eksperimenata. Od srca zahvaljujem dr. sc. Ani Butorac, viša znan. sur., Marini Merkaš, mag. chem. i svim ostalim djelatnicima Biocentra na toploj atmosferi, razumijevanju i dijeljenju savjeta.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i ljubavi koje su mi pružili tijekom studiranja. Najviše bih se zahvalila svojoj majci bez koje ništa od ovog ne bi bilo ostvarivo.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika,
enzima, probiotika i starter kultura

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA BIOAKTIVNIH PEPTIDA PROIZVEDENIH S ODABRANIM SOJEVIMA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Katarina Brajković, 1340/MB

Sažetak: Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke najbrojnija su skupina bioaktivnih tvari prisutnih u mliječnim proizvodima. To su proteinski fragmenti koji nastaju tijekom probave u humanom organizmu ili tijekom procesa prerade mlijeka metabolizamskom aktivnošću prisutnih bakterija mliječne kiseline. Cilj ovog rada bio je izolacija, pročišćavanje i razdjeljivanje bioaktivnih peptida iz uzoraka svježih sušenih sireva i sirutki kromatografijom ionske izmjene, tekućinskom kromatografijom isključivanja po veličini i spektrometrijom masa na MALDI-TOF/TOF uređaju. Ispitano je antimikrobno i antioksidativno djelovanje izoliranih bioaktivnih peptida. Također, provedena je neciljana analiza i identifikacija proteina iz uzoraka sira i sirutke u svrhu karakterizacije peptida s bioaktivnim djelovanjem. Rezultati provedenih metoda ne pokazuju antimikrobno i antioksidativno djelovanje izoliranih bioaktivnih peptida. Međutim, neciljanom analizom proteina identificirani su bioaktivni peptidi čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je ranije utvrđeno i u literaturi opisano: ACE-inhibitorno, imunomodulatorno, antitrombotično, antioksidativno i antimikrobno djelovanje.

Ključne riječi: kazein, proteini sirutke, bakterije mliječne kiseline, bioaktivni peptidi, biološko djelovanje

Rad sadrži: 69 stranica, 21 slika, 26 tablica, 72 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Neposredni voditelj: *dr. sc. Adriana Lepur, znan. sur.*

Mentor: *prof.dr.sc. Blaženka Kos*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Ana Butorac, viša znan. sur., Marina Merkaš, mag. chem., Matea Skoblar, mag. ing., Katarina Butorac, mag. ing., asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Jagoda Šušković*
2. Prof. dr. sc. *Blaženka Kos*
3. Dr. sc. *Adriana Lepur, znan. sur.*
4. Prof. dr. sc. *Anita Slavica (zamjena)*

Datum obrane: 23. listopada, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic
And Starter Culture Technologies

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE PEPTIDES PRODUCED BY SELECTED STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA

Katarina Brajković, 1340/MB

Abstract: Bioactive peptides originated from casein and whey proteins are the most numerous group of bioactive substances present in dairy products. They are protein fragments that are synthesized in the food digestion process in human body or during milk processing by the metabolic activity of the lactic acid bacteria. The aim of this study was to isolate, purify, and separate bioactive peptides from samples of fresh dried cheeses and whey by ion-exchange chromatography, size-exclusion chromatography, and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. The antimicrobial and antioxidant activities of isolated bioactive peptides were tested. Also, non-targeted analysis and identification of proteins from cheese and whey were performed to characterize peptides with bioactive activity. The results of the implemented methods do not show the antimicrobial and antioxidant activity of isolated bioactive peptides. However, non-targeted protein analysis identified bioactive peptides whose amino acid sequences correspond to bioactive peptides from the database. As previously identified, their activities were described in the literature as ACE-inhibitory, immunomodulatory, antithrombotic, antioxidant, and antimicrobial activity.

Keywords: casein, whey proteins, lactic acid bacteria, bioactive peptides, biological activity

Thesis contains: 69 pages, 21 figures, 26 tables, 72 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Principal investigator: *PhD. Adriana Lepur, Research Associate*

Mentor: *Blaženka Kos, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Ana Butorac, Senior Research Associate, Marina Merkaš, mag. chem., Matea Skoblar, mag. ing., Katarina Butorac, mag. ing., Scientific Assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Jagoda Šušković*, Full professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
3. PhD. *Adriana Lepur*, Research Associate
4. PhD. *Anita Slavica*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 23 October 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI	2
2.1.1. Bioaktivni sastojci mlijeka.....	2
2.1.1.1. <i>Kazein</i>	4
2.1.1.2. <i>Proteini sirutke</i>	5
2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI PODRIJETLOM IZ MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA	7
2.2.1. Mikrobna fermentacija s bakterijama mliječne kiseline.....	8
2.2.1.1. <i>Uloga bakterija mliječne kiseline u tvorbi bioaktivnih peptida</i>	9
2.2.3. Vrste bioaktivnih peptida.....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI.....	13
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	13
3.1.2. Hranjive podloge.....	14
3.1.3. Uzorci za analizu.....	16
3.1.4. Laboratorijski uređaji	16
3.1.5. Laboratorijski pribor.....	17
3.1.6. Kemikalije.....	18
3.1.7. Otopine	19
3.1.8. Programi i baze podataka.....	20
3.2. METODE RADA	21
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	21
3.2.2. Određivanje optičke gustoće bakterijske suspenzije	21
3.2.2.1. <i>Izrada krivulje rasta bakterijskih kultura</i>	21
3.2.3. Izolacija bioaktivnih peptida iz sira i sirutke	22
3.2.4. Određivanje ukupne koncentracije proteina <i>QubitTM Protein setom s DeNoviX</i> fluorimetrom.....	22
3.2.5. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja bioaktivnih peptida izoliranih iz sira i sirutke	24
3.2.6. Pročišćavanje i razdjeljivanje bioaktivnih peptida kromatografijom ionske izmjene (eng. <i>Ion Exchange Chromatography</i>).....	25

3.2.7. Ispitivanje antioksidativnog učinka bioaktivnih peptida DPPH metodom.....	26
3.2.8. Određivanje intaktne mase peptida tekućinskom kromatografijom isključivanja po veličini (eng. <i>Size-Exclusion Chromatography</i>).....	28
3.2.8.1. Priprema standarda.....	28
3.2.8.2. Priprema uzoraka.....	28
3.2.9. Neciljana analiza peptida iz uzoraka sira i sirutke	29
3.2.9.1. Priprema uzoraka.....	29
3.2.9.2. Korištene otopine	29
3.2.9.3. Pročišćavanje i separacija peptida te sakupljanje frakcija.....	29
3.2.9.4. Analiza peptida spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF.....	31
3.2.9.3. Identifikacija proteina	32
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. UZGOJ I KONSTRUIRANJE KRIVULJA RASTA PATOGENIH MIKROORGANIZAMA.....	34
4.2. FLUORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNE KONCENTRACIJE PROTEINA QUBIT™ PROTEIN SETOM	37
4.3. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA BIOAKTIVNIH PEPTIDA IZOLIRANIH IZ SIRA I SIRUTKE.....	38
4.4. PROČIŠĆAVANJE I RAZDJELJIVANJE BIOAKTIVNIH PEPTIDA U FRAKCIJE KROMATOGRAFIJOM IONSKE IZMJENE	41
4.5. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG UČINKA BIOAKTIVNIH PEPTIDA IZ SIRA I SIRUTKE DPPH METODOM.....	44
4.6. ODREĐIVANJE INTAKTNE MASE PROTEINA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM ISKLJUČIVANJA (eng. <i>Size-Exclusion Chromatography</i>).....	48
4.7. NECILJANA ANALIZA PEPTIDA IZ UZORAKA SIRA I SIRUTKE.....	53
4.7.1. ACE-inhibitorski peptidi podrijetlom iz sira i sirutke	53
4.7.2. Imunomodulatorski peptidi podrijetlom iz sira i sirutke.....	56
4.7.3. Antitrombotični peptidi podrijetlom iz sira i sirutke.....	57
4.7.4. Antioksidativni peptidi podrijetlom iz sira i sirutke.....	59
4.7.5. Antimikrobni peptidi podrijetlom iz sira i sirutke.....	59
4.8. PROTEOMSKA ANALIZA UZORKA S POTENCIJALNOM ANTIOKSIDATIVNOM AKTIVNOŠĆU.....	62
5. ZAKLJUČCI.....	64
6. LITERATURA	65

1. UVOD

Hipokrat je 400. godine prije nove ere zapisao: "Mlijeko je najsavršenija ljudska hrana", a razvojem znanosti i istraživanjem sastava mlijeka, pokazala se istinitost njegove tvrdnje. Mlijeko i mliječni proizvodi dio su svakodnevne prehrane čovjeka, a veliku važnost imaju zbog nutritivnih i zdravstvenih karakteristika. Prerada mlijeka u sir, uz izdvajanje sirutke, jedan je od najstarijih postupaka koji su ljudi uveli u konzerviranje lako pokvarljive hrane kao što je mlijeko, koje se spontano kiseli i gruša. Mliječni proteini sastoje se od kazeina (proteina koji se ugrađuje u sir) i sirutkinih proteina (proteina koji se ugrađuju u sirutku). Od ukupne količine mlijeka dobiva se oko 10 % sira, a ostalih 90 % je sirutka. Mliječni proteini posjeduju dodatnu fiziološku funkciju uslijed velikog broja bioaktivnih peptida koji su uklopljeni u same proteine (Korhonen i Pihlanto, 2006).

Bioaktivni peptidi podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke najbrojnija su skupina bioaktivnih tvari prisutnih u mliječnim proizvodima. To su proteinski fragmenti sastavljeni od 3 do 20 aminokiselina koji nastaju tijekom probave u humanom organizmu ili tijekom procesa prerade mlijeka metabolizamskom aktivnošću prisutnih bakterija mliječne kiseline. Mnogi peptidi izolirani iz kazeina ili proteina sirutke mogu imati više bioloških funkcija odjednom, a često je teško utvrditi koja funkcija se smatra najvažnijom. Budući da je u kravljem mlijeku prisutna raznolikost bioaktivnih peptida, ono se smatra najvažnijim izvorom prirodnih bioaktivnih komponenti. Brojna znanstvena istraživanja ukazuju na potencijalni ili stvarni učinak bioaktivnih peptida iz mlijeka i mliječnih proizvoda u humanom organizmu kroz pozitivan utjecaj na kardiovaskularni, živčani, prehrambeni i imunološki sustav. U posljednja dva desetljeća učinjen je veliki iskorak u znanosti, tehnologiji i komercijalnim primjenama bioaktivnih sastojaka koji se prirodno nalaze u kravljem mlijeku, kolostrumu i fermentiranim mliječnim proizvodima. Bakterije mliječne kiseline sa specifičnom proteolitičkom aktivnošću sudjeluju u tvorbi bioaktivnih peptida tijekom fermentacije mlijeka te dobivaju posebnu važnost kao proteolitičke starter kulture u mliječnoj industriji (Griffiths i Tellez, 2013).

Cilj ovog rada bio je izolacija, pročišćavanje i razdjeljivanje bioaktivnih peptida iz uzoraka svježih sušenih sireva i sirutke proizvedenih kombinacijom autohtonih izolata bakterija mliječne kiseline kromatografijom ionske izmjene, tekućinskom kromatografijom isključivanja po veličini i spektrometrijom masa na MALDI-TOF/TOF uređaju. Ispitano je antimikrobno i antioksidativno djelovanje izoliranih bioaktivnih peptida. Također, provedena je neciljana analiza i identifikacija proteina iz uzoraka sira i sirutke, primjenom programa ProteinScape, verzija 3.0., u svrhu karakterizacije peptida s bioaktivnim djelovanjem.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI

Mlijeko je najkompletnija biološka tekućina, vrlo složena sastava, bijele do žućkasto-bijele boje te karakteristična mirisa i okusa. Budući da je kravljeg mlijeka količinski najviše, ono se i najviše koristi kao osnovna sirovina u proizvodnji svih mliječnih proizvoda (Tratnik, 1998).

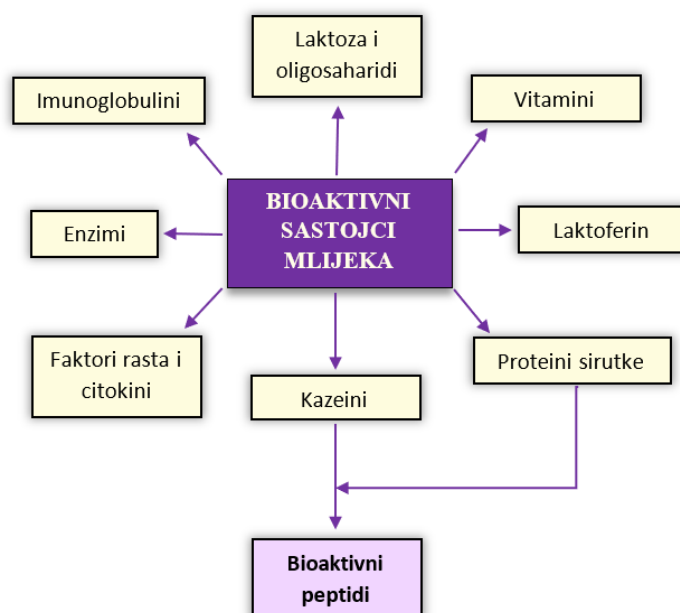
Sir je mliječni proizvod dobiven grušanjem mlijeka uz izdvajanje sirutke. Postupak proizvodnje sira vjerojatno potječe još od 7000. do 6000. godina prije nove ere kada su nomadska plemena istočnih Mediteranskih zemalja za transport mlijeka domaćih životinja koristili torbe od životinjske kože, želudaca i mjehura. U transportu je došlo do spontane koagulacije toplog mlijeka te razdvajanja na sirutku i grušu (Lukač Havranek, 1995). Danas se proizvodnja sira provodi u 5 koraka: obrada mlijeka, koagulacija, odvajanje sirutke, soljenje i dozrijevanje. U prvome koraku se mlijeko toplinski obrađuje pri 73 °C tijekom 15 sekundi kako bi se uništili patogeni mikroorganizmi. Zatim se dodaju prethodno odabrane starter kulture i slijedi proces koagulacije. Kako bi došlo do procesa grušanja mlijeka treba se narušiti struktura κ -kazeina koji stabilizira micelu kazeina (poglavlje 2.1.1.1). U siru se pomoću enzima renina koji se sastoji od dvije proteaze, kimozina i pepsina, potiče agregacija micela (Andrén, 2002). Završni korak je rezanje gruša i uklanjanje sirutke (Hallen, 2008). Sir se soli kako bi se pojačao okus i produljio vijek trajanja, a faza dozrijevanja je ključna za razvijanje arome i okusa čemu pridonose razni enzimi iz bakterija mliječne kiseline (Kongo, 2013).

Sirutka je jednako stara kao i sirevi, ali ova dragocjena zeleno-žuta tekućina se najprije bacala, a potom koristila isključivo kao krmivo. Njezina primjena u ljudskoj prehrani započela je nakon spoznaje da je sirutka izvanredan izvor visokovrijednih proteina. Sastav i svojstva sirutke ovise o tehnologiji proizvodnje sira te o kakvoći upotrijebljenog mlijeka (Tratnik, 2003).

2.1.1. Bioaktivni sastojci mlijeka

Mlijeku se već stoljećima pripisuju brojna preventivna i terapijska djelovanja te je ono u svojem izvornom obliku funkcionalna hrana budući da je bogato tvarima različitih bioloških učinaka. Sastav mlijeka određuje njegovu hranidbenu vrijednost, mogućnost prerade u mliječne proizvode te mnoge fizikalno-kemijske i organoleptičke osobine proizvoda (Alichanidis i Polychroniadou, 1995).

Kako bi se održale i podmirile sve metaboličke potrebe, vrlo je bitno organizmu hranom osigurati dovoljnu količinu energije, a kravlje mlijeko u odnosu na ostale namirnice ima znatno veći udio energije. Kako bi uopće došlo do sinteze 1 litre mlijeka, kroz krvožilni sustav treba proteći od 400 do 500 litara krvi. Mlijeko se stvara iz specifičnih sastojaka koji iz krvi odlaze u mliječnu žlijezdu gdje započinju složeni biokemijski procesi. U složenim procesima biosinteze nastaju mliječna mast, mliječni šećer (laktoza) i tipični proteini mlijeka (kazein, proteini sirutke). Ostali sastojci, mineralne tvari, vitamini, enzimi, albumini krvnog seruma, imunoglobulini i brojni drugi glikoproteini izravno prelaze iz krvi u mliječnu žlijezdu i tako postaju sastojci mlijeka (Slika 1) (Tratnik i Božanić, 2012).



Slika 1. Shematski prikaz glavnih bioaktivnih sastojaka iz mlijeka (Park, 2009)

Proteini su u prehranbenom smislu najvažniji sastojak mlijeka. U mlijeku je identificirano više od 200 različitih proteina, od kojih je većina samo u tragovima. U okviru dušičnih tvari, mlijeko sadrži 95 % proteina (PN), a preostalih 5 % su neproteinske dušične tvari (NPN). U PN se ubrajaju dva glavna tipa potpuno različitih proteina: kazein i proteini sirutke (u omjeru oko 80:20 %). U NPN se ubrajaju uglavnom peptidi, slobodne aminokiseline, aminošećeri, urea, kreatin i mnogi drugi (Bosnić, 2003). Osim nutritivne vrijednosti mlijeka, biološki aktivni sastojci mlijeka kao što su mliječni protein kazein i proteini sirutke, koji se ugrađuju i u mliječne proizvode, dobivaju sve veću važnost zbog bioloških i biokemijskih uloga koje imaju ključni utjecaj na ljudski metabolizam i zdravlje.

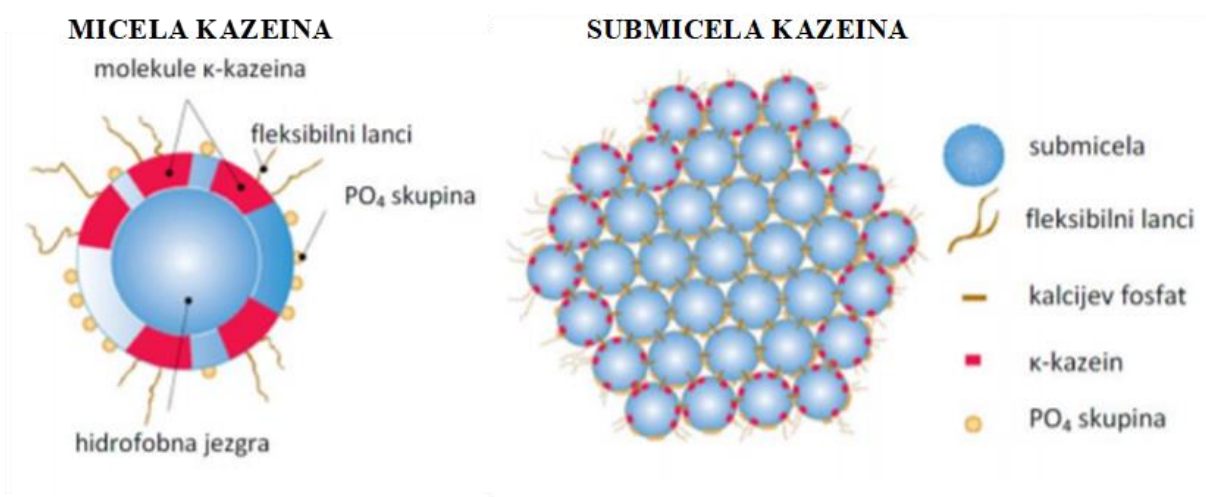
2.1.1.1. Kazein

Naziv kazein potječe od latinske riječi *caseus* što znači sir, jer kazein svojim zgrušnjavanjem omogućuje proizvodnju sira i predstavlja osnovni protein u siru. Kazein je i najzastupljeniji protein mlijeka, heterogenog sastava te vrlo složene strukture kojom se posljednjih 50 godina intenzivno bave mnogi znanstvenici (Tratnik i Božanić, 2012). Kravlje, kozje i ovčje mlijeko spadaju u kazeinska mlijeka, gdje je udio kazeina u ukupnom udjelu proteina iznad 75 %. Kazein se u sve tri vrste mlijeka smatra dobrim izvorom bioaktivnih peptida, pa najčešće izolirane peptide iz kazeina kao glavnog prekursora čine antihipertenzivni, antitrombotični, opioidni, antimikrobni, imunomodulatorni, antioksidativni peptidi i peptidi koji vežu mineralne tvari (Akuzawa i sur., 2009).

U sirovom mlijeku, kazein se nalazi u obliku malih koloidnih čestica koje zadržavaju dosta vode, a nazivaju se micela kazeina. Micela kazeina prvenstveno se sastoji od kazeinskih frakcija: α_{S1} -kazeina, α_{S2} -kazeina, β -kazeina i κ -kazeina što su produkti specifičnih gena, a sintetiziraju se u mliječnoj žlijezdi. Prisutne frakcije γ -kazeina uglavnom su rezultat proteolize β -kazeina (Tratnik i Božanić, 2012). Micela kazeina zapravo je nakupina određenog broja manjih podjedinica submicela koje nastaju povezivanjem različitih kazeinskih frakcija (Tratnik, 1998).

Micela kazeina prilično su otvorene strukture, zbog visokog udjela aminokiseline prolina u kazeinskim frakcijama koji svojom strukturom ograničava širinu oblikovanja sekundarne strukture proteina kazeina. Stoga su kazeinske molekule zapravo prirodno denaturirane, a micela su posljedično vrlo podložne proteolizi (Tratnik i Božanić, 2012). Povezivanje submicela zbiva se preko koloidnog Ca-fosfata koji gradi mostove između fosfoserinskih ostataka (PO_4 skupine) α_{S1} , α_{S2} i β -kazeina. Nastala veza je elektrostatske prirode jer je koloidni Ca-fosfat elektropozitivan (+), a submicela je elektronegativna (-). Završetak oblikovanja micela nastaje u trenutku kada se frakcija κ -kazeina pojavi na površini micela. Hidrofobni dio molekule κ -kazeina vezan je za unutrašnjost micela koja je isto hidrofobna, a hidrofilni dio je izložen prema vodenoj fazi mlijeka i odgovoran je za stabilizaciju nastale kazeinske micela (Slika 2) (Rollema, 1992).

Konsumiranjem tradicionalno proizvedenih sireva mogu se zadovoljiti zahtjevi organizma za svim esencijalnim aminokiselinama, osim metionina i cisteina koji se nalaze u sastavu proteina sirutke (Tratnik, 1998).



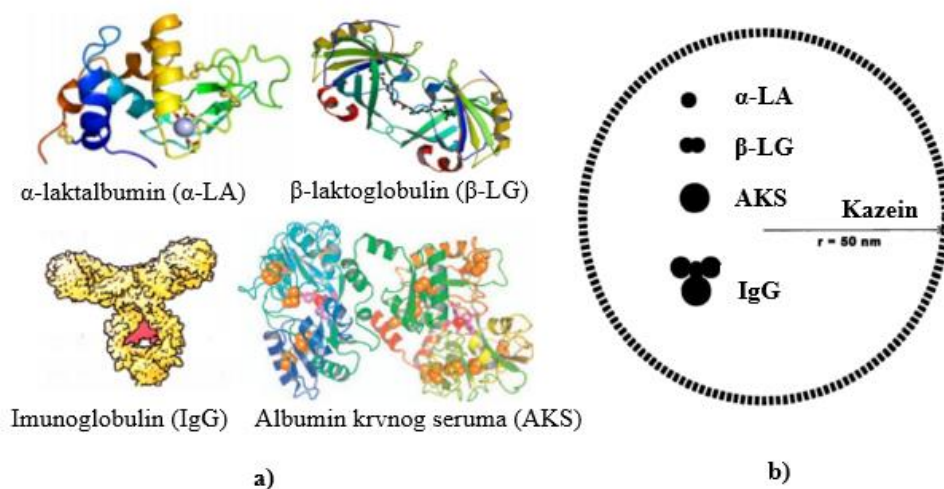
Slika 2. Izgled submicele te izgradnja i stabilizacija micela kazeina (Rollema, 1992)

2.1.1.2. Proteini sirutke

Prema strukturi, proteini sirutke su kompaktne globularne molekule s relativno podjednakom raspodjelom kiselih/baznih te hidrofobnih/hidrofilnih ostataka aminokiselina. Intramolekularno vrlo nabrana struktura (formacija α -uzvojnice) tih proteina rezultat je malog udjela aminokiseline prolina (Madureira i sur., 2010).

Od ukupnih proteina sirutke u serumu mlijeka najviše je β -laktoglobulina (~50 %) i α -laktalbumina (~22 %), što su genetski proizvodi mliječne žlijezde. Slijede manji polimeri, proteoze-peptoni (~10 %) koji djelomice potječu od hidrolize kazeina (osobito β -kazeina), a djelomice od hidrolize proteina membrane masti. Mala količina proteina potječe iz krvi, a to su imunoglobulini (~5 %) i albumin krvnog seruma (~12 %) (Slika 3). Postoje još i mnogi drugi manji proteini i enzimi koji se nalaze u tragovima (neki potječu iz krvi, a neki iz mliječne žlijezde) (Tratnik i Božanić, 2012).

Iako proteini sirutke čine samo 20 – 30 % proteina u ukupnom udjelu proteina kravljeg, ovčjeg i kozjeg mlijeka smatraju se dobrim izvorom bioaktivnih peptida pa mogu poslužiti kao izvor svih ranije navedenih peptida koji su podrijetlom iz kazeina, s izuzetkom antitombotičnih peptida. Zahvaljujući svojim terapijskim i dokumentiranim kliničkim svojstvima, proteini sirutke kravljeg mlijeka dobivaju sve veći komercijalni značaj (Mann i sur, 2019).



Slika 3. a) Modeli trodimenzionalne strukture proteina sirutke; b) usporedba njihove veličine s prosječnim promjerom micela kazeina (De Wit, 1998)

Kompleksi proteina sirutke i nekoliko pojedinačnih proteina uključeni su u velik broj fiziološki blagotvornih učinaka, kao što su poboljšanje fizičkog stanja, oporavak nakon vježbanja i sprječavanje mišićne atrofije, održavanje tjelesne težine, kardiovaskularno zdravlje, antikancerogeni učinak, zacjeljivanje rana te upravljanje mikrobnim infekcijama i upalama sluznice (Park 2009).

U usporedbi s kazeinom, proteini sirutke znatno su hidrofilniji pa su zato i stabilniji na djelovanje kiseline ili enzima te zaostaju u otopini nakon koagulacije kazeina i odvajanja sirnoga gruš. Međutim, proteini sirutke vrlo su termolabilni u odnosu na termostabilni kazein. Budući da se proteini sirutke u mlijeku različito ponašaju pri određenim temperaturama koje izazivaju njihovu denaturaciju, te zbog međumolekularnih interakcija ili interakcija s kazeinom vrlo je teško odrediti stupanj promjene pojedinog proteina (Božanić i sur., 2010).

Proteini sirutke, a prije svega fragmenti proteina, pokazuju raznovrsno bioaktivno djelovanje poput antimikrobnog, antikancerogenog, antihipertenzivnog, imunomodulatornog djelovanja kao i druga pozitivna djelovanja na organizam. Peptidi dobiveni enzimskom hidrolizom proteina sirutke imaju mnogo raznovrsniju i izraženiju biološku aktivnost od nativnih proteina iz kojih su dobiveni. Upravo zato, proteini sirutke, a posebno njihovi hidrolizati i peptidne frakcije postaju zanimljivi za nova istraživanja (Park, 2009).

2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI PODRIJETLOM IZ MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA

Bioaktivni peptidi se definiraju kao proteinski fragmenti koji imaju pozitivan utjecaj na tjelesne funkcije te dokazano mogu poboljšati zdravlje. Aktivnost bioaktivnih peptida se zasniva na njihovom aminokiselinskom sastavu i slijedu. Mnogi peptidi izolirani iz mlijeka i mliječnih proizvoda pokazuju višefunkcionalna svojstva, a najbolje istraženi su antihipertenzivni, antimikrobni, antioksidativni, antitrombotični, imunomodulatorni i opioidni peptidi (Korhonen i Pihlanto - Leppälä 2004).

Dosadašnja *in vivo* i *in vitro* istraživanja stavljaju naglasak na tvorbu bioaktivnih peptida iz kazeina i proteina sirutke kravljeg mlijeka kao glavnih prekursora, dok se značajno manji dio istraživanja usmjerio na tvorbu bioaktivnih peptida iz kazeina i proteina sirutke kozjeg i ovčjeg mlijeka (Recio i sur., 2009).

Unatoč tome što mlijeko predstavlja dobar izvor proteina, većina bioaktivnih peptida prisutnih u mlijeku nalazi se u neaktivnom obliku unutar native proteinske sekvence te svoju aktivnost mogu iskazati tek nakon hidrolize proteina iz kojeg potječu. Bioaktivni peptidi se iz proteinskog prekursora mogu osloboditi na nekoliko načina:

- ✚ mikrobnom fermentacijom s proteolitičkim starter kulturama,
- ✚ enzimskom hidrolizom djelovanjem probavnih enzima - *in vivo* ili *in vitro*,
- ✚ enzimskom hidrolizom enzimima izvedenim iz mikroorganizama i biljaka.

Svakim od spomenutih načina mogu nastati bioaktivni peptidi s potencijalnim ili stvarnim učinkom na humani organizam. Enzimska hidroliza proteina mlijeka, bilo da je riječ o kazeinu ili proteinima sirutke, najčešće se događa tijekom proizvodnje fermentiranih mlijeka i sireva. Stoga, unutar skupine mliječnih proizvoda, fermentirana mlijeka i sirevi predstavljaju glavne izvore bioaktivnih peptida (Korhonen i Pihlanto, 2006).

Proteolitičke starter kulture imaju posebnu važnost u tvorbi bioaktivnih peptida u mliječnoj industriji (Griffiths i Tellez, 2013). Mnoge industrijske starter kulture bakterija mliječne kiseline imaju visoku proteolitičku aktivnost i djelovanjem mikrobne proteolize oslobađaju različite bioaktivne peptide iz mliječnih proteina. Također, starter kulture u proizvodnji sira i komercijalne probiotičke bakterije proizvode različite bioaktivne peptide tijekom fermentacije mlijeka (Gobbetti i sur., 2004).

2.2.1. Mikrobna fermentacija s bakterijama mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili u anaerobnim uvjetima te proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. To su gram-pozitivne, nesporulirajuće, katalaza-negativne bakterije koje nemaju citokrom. Rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama, a dio su i autohtone mikroflore gastrointestinalnog trakta sisavaca (Kos, 2001).

U nekoliko vrsta BMK roda *Lactobacillus* pronađeni su S-proteini, tj. površinski sloj proteina sastavljen od identičnih glikoproteinskih podjedinica koje su kovalentnim vezama povezane s površinom stanica (Sleytr i sur., 2001). Budući da su S-proteini u direktnom kontaktu s okolišem, imaju ulogu u adheziji bakterija na različite supstrate i površine te djeluju kao mehanička barijera u nepovoljnim uvjetima (Sára i Sleytr, 2000). S-proteini su nađeni u: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus hilgardii* (Beganović i sur., 2013; Johnson i sur., 1980).

BMK sintetiziraju mnoge antimikrobne komponente, a osobito značajnima se smatra proizvodnja mliječne i octene kiseline. Zbog toga, BMK se danas intenzivno istražuju zbog mogućnosti njihove primjene u prehrambenoj industriji kao prirodnih konzervansa. Bakteriocini su ribosomski sintetizirani proteini ili peptidi koji posjeduju antimikrobnu aktivnost uskog spektra djelovanja prema srodnim bakterijskim vrstama (Šušković i sur., 2010). Mogu djelovati bakteriostatski (inhibirati rast i razvoj bakterija) ili baktericidno (ubijati bakterije) (Parada i sur., 2007). Upotreba bakteriocina, kao prirodno proizvedenih proizvoda, vrlo je važna u prehrambenoj industriji kao zamjena za kemijske konzervanse koji dovode do promjene organoleptičkih svojstava hrane (Bali i sur., 2016). Bakteriocini koje proizvode bakterije roda *Lactobacillus* od posebnog su značaja jer te bakterije imaju GRAS (eng. *Generally Recognized As Safe*) status i obično se koriste za proizvodnju fermentirane hrane (Ahmed i sur., 2010).

Opisano je otprilike 30 vrsta bakterija roda *Lactobacillus* koji imaju sposobnost proizvodnje egzopolisaharida, a među njima su najpoznatiji: *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. helveticus* itd. (Beganović i sur. 2013; Sutherland, 2002). Egzopolisaharidi su dugolančani polimeri koji se sastoje od ponavljajućih, razgranatih jedinica šećera i/ili njihovih derivata. Bakterijski egzopolisaharidi imaju široku upotrebu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji gdje su poseban značaj pokazali u proizvodnji sireva i ostalih mliječnih proizvoda (De Vuyst i Degeest, 1999).

Egzopolisaharidi bakterijama pružaju mogućnost lakše adhezije na različite površine ili supstrate, služe kao signalne molekule te mogu formirati biofilm koji ima ulogu zaštite stanica od mehaničkih oštećenja, dehidracije i bakteriofaga, a istovremeno olakšava komunikaciju između stanica (Coghlan, 1996; Cerning i sur., 1994).

Bakterije mliječne kiseline se u industriji najviše primjenjuju kao starter kulture te kao biokonzervansi zahvaljujući sposobnosti redukcije pH i fermentacije šećera u organske kiseline. Budući da kao krajnji proizvodi njihova metabolizma nastaju različiti spojevi, BMK doprinose i različitim aromama određenih proizvoda poput sira, kefira, jogurta, maslaca itd (Šušković i sur., 2010).

2.2.1.1. Uloga bakterija mliječne kiseline u tvorbi bioaktivnih peptida

Nastanak bioaktivnih peptida mikrobnom fermentacijom s proteolitičkim starter kulturama podrazumijeva korištenje mljekarskih mikrobnih kultura, najčešće bakterija mliječne kiseline (BMK) i njihovih enzima gdje se u procesu fermentacije iz mliječnih proteina oslobađaju bioaktivni peptidi. BMK koriste mliječne proteine kao primarni izvor esencijalnih aminokiselina (Choi i sur., 2012).

BMK su razvile vlastiti metabolizam razgradnje mliječnih proteina kojeg čine stanično vezane proteinaze i nekoliko različitih unutarstaničnih peptidaza (aminopeptidaze, dipeptidaze, tripeptidaze i endopeptidaze). Stanično vezane proteinaze započinju razgradnju mliječnih proteina do oligopeptida koji se potom unose u stanicu oligopeptidnim transportnim sustavom. Moguća je i razgradnja mliječnih proteina stanično vezanim proteinazama do peptida malih molekularnih masa i slobodnih aminokiselina koji se potom unose u stanicu tripeptidnim, dipeptidnim i aminokiselinskim transportnim sustavom. Uneseni peptidi različitih molekularnih masa se djelovanjem različitih unutarstaničnih peptidaza razgrađuju do aminokiselina koje bakterije koriste za vlastiti rast (Samaržija, 2015). Tijekom procesa tvorbe aminokiselina esencijalnih za rast i razmnožavanje bakterijskih stanica, djelovanjem stanično vezanih proteinaza i unutarstaničnih peptidaza, dolazi do tvorbe bioaktivnih peptida. Tvorba bioaktivnih peptida ovisi o proteolitičkoj aktivnosti korištene mljekarske kulture, a u mljekarskoj industriji najznačajniji sojevi pripadaju bakterijama *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* i *Streptococcus thermophilus* (Beganović i sur., 2013; Kohronen i Pihlanto, 2006).

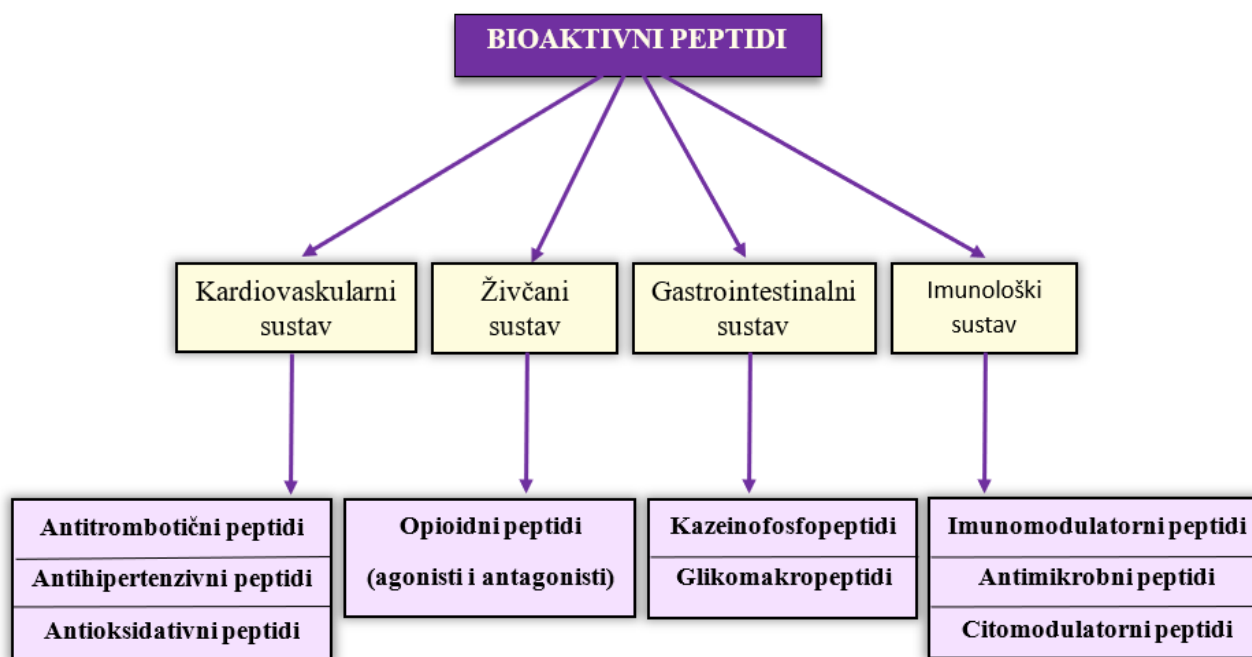
2.2.3. Vrste bioaktivnih peptida

Primarna funkcija proteina iz hrane je opskrba tijela aminokiselinama i organskim dušikom na odgovarajući način. Do sada se vrlo malo pažnje posvećivalo mliječnim proteinima, posebice kazeinima, koji se trenutno smatraju glavnim izvorom biološki aktivnih peptida. Uz kazeine, poznato je da biljni proteini sadrže potencijalno bioaktivne sekvence. Dokazano je da se bioaktivni peptidi izvedeni iz kazeina, poput β -kazomorfina i fosfopeptida, mogu osloboditi tijekom prolaska gastrointestinalnim traktom. Peptidi podrijetlom iz proteina hrane mogu biti potencijalni modulatori različitih regulatornih procesa u tijelu. Mogući regulatorni učinci odnose se na unos hranjivih sastojaka (fosfopeptidi, kazomorfini), imunološku obranu (imunopeptidi, kazokinini, kazomorfini) i neuroendokrini prijenos informacija (kazokinini) (Schlimme i Meisel, 1995).

Vrlo je bitno istaknuti imunoaktivni sustav proteina koji čine specifična antitijela imunoglobulini i nespecifični laktoferin, transferin, enzimi laktoperoksidaza i lizozim te proteini koji vežu minerale i vitamine. Ti sastojci mlijeka utječu na otpornost ljudskog organizma i zaštićuju ga od štetnih bakterija, virusa, toksina, uzročnika zaraznih bolesti, alergijskih reakcija pa i nekih stranih proteina (tumora) (Tratnik i Božanić, 2012).

Znanstvenicima koji se bave istraživanjima na polju bioaktivnih peptida često se postavlja pitanje o tome koje su vrste bioaktivnih peptida korisne i poželjne kao sastojci hrane ili lijekovi. Kod odgovora na takva pitanja treba biti vrlo pažljiv jer mogućnosti za dizajn funkcionalne hrane i prirodnih lijekova izgledaju obećavajuće, ali trebaju se provesti brojna istraživanja prije implementiranja istih. Međutim, neki peptidi izvedeni iz kazeina već su pronašli zanimljivu primjenu, od prehrambenih dodataka (fosfopeptidi) do farmaceutskih pripravaka (fosfopeptidi, β -kazomorfini) (Schlimme i Meisel, 1995).

Mlijeko je bogato tvarima različitih bioloških učinaka, koji mlijeku daju epitet funkcionalne hrane. Mliječni bioaktivni peptidi pokazuju velik broj *in vivo* fizioloških učinaka na gastrointestinalni, kardiovaskularni, endokrini, imuni, živčani i druge tjelesne sustave (Slika 4). Većina peptida koji reguliraju imunološke, gastrointestinalne, hormonske i neurološke reakcije igraju ključnu ulogu u prevenciji raka, osteoporoze, hipertenzije i drugih bolesti (Mohanty i sur, 2015).



Slika 4. Fiziološki učinci bioaktivnih peptida iz mliječnih proteina kazeina i proteina sirutke (Korhonen i Pihlanto, 2007; Silva i Malcata, 2005)

Na kardiovaskularni sustav djeluju antitrombotični, antihipertenzivni i antioksidativni peptidi. Antitrombotični peptidi inhibiraju vezanje fibrinogena i trombocita čime onemogućavaju stvaranje tromba. Antihipertenzivni peptidi snižuju sistolički i dijastolički krvni tlak u osoba s povišenim krvnim tlakom, dok antioksidativni peptidi djeluju tako da onemogućavaju stvaranje ili aktivnost slobodnih radikala što je važno za opstanak stanica (Mohanty i sur., 2015).

Opioidni peptidi djeluju na živčani sustav i proučavani su u mnogim istraživanjima. Za iskazivanje opioidnog učinka u humanom organizmu važnu ulogu igra aminokiselinski slijed opioidnog peptida. Oni peptidi koji pokazuju aminokiselinsku sekvencu Tyr-Gly-Gly-Phe na N-terminalnom kraju nazivaju se "tipični" opioidni peptidi i potječu od molekula prekursora: proenkefalina, prodinorfina i proopiomelanokortina. "Atipični" opioidni peptidi imaju različite N-terminalne sekvence i svi su izvedeni iz različitih proteina prekursora kao npr. α - i β -kazeina, α -laktalbumina i β -laktoglobulina. Opioidni peptidi se preko spomenutog slijeda aminokiselina vežu na specifični receptor, a sposobnost vezanja uvjetuje njihov učinak u organizmu (Pihlanto, 2011).

Opioidni agonisti imaju sposobnost regulacije rasta i funkcije stanica uključenih u središnji živčani sustav, a najpoznatiji su fragmenti β -kazeina, takozvani β -kazomorfini zbog izazivanja učinka nalik morfiju (izazivanje sna, ublažavanje boli). Opioidni antagonisti suzbijaju agonističku aktivnost enkefalina, endogenog receptora koji konkurira opioidnom peptidu za mjesto vezanja na opioidni receptor (Akuzawa i sur., 2009).

Glikomakropeptidi (GMP) i kazeinomakropeptidi (CMP) nastaju cijepanjem kazeina kimozinom i djeluju na gastrointestinalni sustav. GMP modulira crijevnu mikrofloru, dok CMP mogu imati inhibicijsko djelovanje protiv *Streptococcus mutans* i *Escherichia coli* (Mohanty i sur., 2015). Također, dokazano je da kazeinofosfopeptidi inhibiraju karijesne lezije rekalcificiranjem zubne cakline te se mogu koristiti u liječenju dentalnih bolesti. Nadalje, u pogledu moguće aplikacijske forme fosfopeptida, predloženo je korištenje farmaceutskih pripravaka poput tableta, paste za zube, materijala za punjenje zuba, ali i u obliku prehrambenih proizvoda poput kruha, kolača i žvakaćih guma. Treba naglasiti da sir sadrži fosfopeptide kao prirodne sastojke i, zaista, neke vrste sira mogu zaštititi od propadanja zubne cakline (Pause i Lembke, 1993).

Na imunološki sustav djeluju imunomodulatorni, antimikrobni i citomodulacijski peptidi. Glikopeptidi, hormoni i peptidni fragmenti imunoglobulina se smatraju imunomodulatornim peptidima koji reguliraju imunološke funkcije. Nadalje, peptidi izolirani iz β -kazeina vrše fagocitozu u ljudi i inhibiraju infekciju *Klebsiella pneumoniae* kod miševa. Citomodulatorni peptidi iz kazeina mogu inhibirati rast stanica raka stimulacijom imunološkog sustava, dok se peptidi dobiveni iz κ -kazeina i α -laktalbumina koriste u imunološkim terapijama ljudi zaraženih HIV virusom (Mohanty i sur., 2015). Antimikrobni peptidi potpomažu prirodnu obranu organizma od napada patogena. Gledajući bioaktivne peptide iz mlijeka i mliječnih proizvoda, očekuje se da ukupni antibakterijski učinak peptida bude veći od zbroja pojedinih učinaka imunoglobulinskih i neimunoglobulinskih obrambenih proteina i peptida (laktoferin, laktoperoksidaza i lizozim) (Park i sur., 2007). Takav učinak se može pripisati sinergističkom djelovanju prirodno prisutnih proteina i peptida (Gobbeti i sur., 2004). Osim u mlijeku i mliječnim proizvodima, antimikrobni peptidi se u sisavaca nalaze i na epitelnoj površini i unutar fagocitnih stanica, a vrlo su bitne komponente urođenog imunog sustava zbog mogućnosti moduliranja upalnog odgovora (Park, 2009).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom poglavlju prikazani su materijali potrebni za identifikaciju i karakterizaciju bioaktivnih peptida izoliranih iz sira i sirutke. U podpoglavljima od 3.1.1. do 3.1.8. opisani su korišteni radni mikroorganizmi, uvjeti čuvanja mikroorganizama, uzorci za analizu te su navedene sve korištene kemikalije, laboratorijski uređaji, laboratorijski pribor i otopine.

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu u *in vitro* eksperimentima korištena su dva patogena bakterijska soja iz porodice *Enterobacteriaceae* i probiotički sojevi iz roda *Lactobacillus* i *Lactococcus*.

Patogeni bakterijski sojevi, *Escherichia coli* DSM 300893 i *Klebsiella pneumoniae* soj interne oznake 4, dio su Banke stanica Mikrobiološkog laboratorija Inkubacijskog centra za bio-znanosti i komercijalizaciju tehnologije - BIOCentra u Zagrebu.

Probiotički sojevi dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu – ZBMK (Tablica 1).

Tablica 1. Svojstva i uvjeti čuvanja probiotičkih sojeva korištenih u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Uvjeti čuvanja	Svojstvo
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37°C, anaerobno	Eksprimira S-proteine na površini svojih stanica
<i>Lactobacillus plantarum</i>	M92C	MRS, 37°C, anaerobno	Producent bakteriocina
<i>Lactobacillus brevis</i>	ZG1	MRS, 37°C, anaerobno	Eksprimira S-proteine na površini svojih stanica
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ZG1C	MRS, 37°C, anaerobno	Producent bakteriocina
<i>Lactobacillus brevis</i>	D6	MRS, 37°C, anaerobno	Eksprimira S-proteine na površini svojih stanica
<i>Lactobacillus fermentum</i>	D12	MRS, 37°C, anaerobno	Proizvodi funkcionalne makromolekule egzopolisaharide
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D13	MRS, 37°C, anaerobno	Producent bakteriocina
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ZG7-10	M17, 37°C, aerobno	Odabran zbog proteolitičke aktivnosti koja je nužan preduvjet u proizvodnji sireva (pridonosi njegovoj aromi)

3.1.2. Hranjive podloge

Sastavi hranjivih podloga korištenih u eksperimentu prikazani su u Tablicama 2, 3, 4 i 5.

a) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline roda *Lactobacillus*

Tablica 2. Sastav MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) krute hranjive podloge

SASTOJAK	g L ⁻¹ DESTILIRANE VODE
Pepton	10,0
Mesni ekstrakt	10,0
Kvašćev ekstrakt	5,0
Glukoza	20,0
Tween 80	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
Natrijev acetat	5,0
Agar	20,0

MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.

b) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline roda *Lactococcus*

Tablica 3. Sastav M17 krute hranjive podloge

SASTOJAK	g L ⁻¹ DESTILIRANE VODE
Tripsinski hidrolizat kazeina	2,5
Pepton	2,5
Sojin pepton	5,0
Kvašćev ekstrakt	2,5
Mesni ekstrakt	5,0
Laktoza	5,0
Natrijev glicerofosfat	19,0
Magnezijev sulfat	0,25
Askorbinska kiselina	0,5
Agar	20,0

M17 bujon je istog sastava kao podloga M17 agar, ali bez dodatka agara.

pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

c) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterije *E. coli*

Tablica 4. Sastav **LB** (Luria Bertani) krute hranjive podloge

SASTOJAK	g L ⁻¹ DESTILIRANE VODE
Trypton	10,0
Natrijev klorid	10,0
Kvašćev ekstrakt	5,0
Agar	15,0

LB bujon je istog sastava kao podloga LB agar, ali bez dodatka agara.

pH vrijednost podloge iznosi 7,5-8, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

d) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterije *K. pneumoniae*

Tablica 5. Sastav **Nutrient** krute hranjive podloge

SASTOJAK	g L ⁻¹ DESTILIRANE VODE
Peptinski hidrolizat životinjskog tkiva	5,0
Natrijev klorid	5,0
Govedi ekstrakt	1,5
Kvašćev ekstrakt	1,5
Agar	15,0

Nutrient bujon (NB) je istog sastava kao podloga Nutrient agar, ali bez dodatka agara.

pH vrijednost podloge iznosi 7,4±0,2, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

3.1.3. Uzorci za analizu

U svrhu proizvodnje svježeg sušenog sira i sirutke zaostale nakon proizvodnje sira, s poboljšanim nutritivnim svojstvima i dodanom funkcionalnom vrijednošću, odabrane su kombinacije starter kultura prikazane u Tablici 6.

Tablica 6. Kombinacije različitih autohtonih izolata bakterija mliječne kiseline (BMK) za proizvodnju sira i zaostale sirutke

Kontrolni sir/ Kontrolna sirutka	Komercijalna kultura sljedećeg sastava: <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> / <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> i <i>Leuconostoc</i> sp.
Sir 1/Sirutka 1	<i>Lactobacillus brevis</i> ZG1, <i>Lactobacillus plantarum</i> ZG1C, <i>Lactobacillus fermentum</i> D12, <i>Lactococcus lactis</i> ZG7-10
Sir 2/Sirutka 2	<i>Lactobacillus brevis</i> D6, <i>Lactobacillus plantarum</i> D13, <i>Lactobacillus fermentum</i> D12, <i>Lactococcus lactis</i> ZG7-10
Sir 3/Sirutka 3	<i>Lactobacillus helveticus</i> M92, <i>Lactobacillus plantarum</i> M92C, <i>Lactobacillus fermentum</i> D12, <i>Lactococcus lactis</i> ZG7-10

3.1.4. Laboratorijski uređaji

- Mikroskop, MICROS, Austrija
- Mini centrifuga, LLG LABWARE
- Magnetna miješalica, Thermo Scientific, SAD
- Spektrofotometar, Agilent, Cary100, SAD
- Spektrofotometar/Fluorimetar, DeNovix DS-11 FX, SAD
- Kabinet s laminarnim strujanjem zraka, EuroClone Spa, Italija
- Inkubator s mješalicom, Certomat T plus, Sartorius Stedim Biotech, Njemačka
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka

- Analitička vaga, Mettler Toledo, XPE205, SAD
- Centrifuga, Digitor21R, OrtoAlerisa, Španjolska
- Stolna miješalica, KONCEPT MEDIA, Hrvatska
- ÄKTA avant 25, GE Healthcare Life Sciences, SAD
- HPLC 1260 Infinity sa sakupljačem frakcija, Agilent Technologies, SAD
- HPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC nano sustav, Thermo scientific, SAD
- Sakupljač frakcija, PROTEINEER fcII, Bruker, Njemačka
- Autoflex speed MALDI-TOF/TOF, Bruker, Njemačka
- Uređaj za pročišćavanje vode-Synergy UV ultrapure Water (Type 1), Sigma, Njemačka

3.1.5. Laboratorijski pribor

- Pinceta
- Špatula
- Tarionik i tučak
- Pasteurove pipete
- Falkonice (50 mL)
- Šprica (2, 5, 10 mL)
- Eppendorf epruvete
- Staklene pipete (5-25 mL)
- Staklene Petrijeve zdjelice
- Plastične sterilne Petrijeve zdjelice
- Erlenmeyerove tikvice (50 mL, 100 mL)
- Plastične epruvete s čepom
- Igla injekcijska
- Kolone:
 - Bio SEC-3, 3 μ m, 100Å, 4,6 x 300 mm, Agilent technologies, SAD
 - Acclaim PepMap 100 C₁₈, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m i.d. x 15 cm, Thermo Scientific, SAD
- Predkolona:
 - Acclaim PepMap 100 C₁₈, 5 μ m, 100 Å, 300 μ m i.d. x 5 mm, Thermo Scientific, SAD

- PCR tubice
- Filtrak filter papir No.388
- Filter papirići, Whatmann, 55 mm Ø
- Sterilni filteri (veličina pora 0,2 µm i 0,4 µL)
- Stalak za kivete
- Kivete za spektrofotometar
- Stalak za Eppendorf epruvete
- Automatske pipete (0,1-1000 µL)
- Nastavci za automatske pipete (0,1-1000 µL)
- MALDI pločica, MTP Anchor Chip 384 BC, Bruker, Njemačka
- Mikroviale, Agilent Technologies, SAD
- Viale, Agilent Technologies, SAD

3.1.6. Kemikalije

- Ultračista voda, 18 M Ω cm⁻¹
- Acetonitril, VWR Chemicals, SAD
- Kalibrant za MALDI/TOF-TOF, Sigma, SAD
- TFA (trifluoroctena kiselina), Merck, Njemačka
- HCCA (α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina) stock otopina matrice, Sigma, SAD
- Izopropanol, Merck, Njemačka
- Amonijev dihidrogenfosfat, Merck, Njemačka
- Klorovodična kiselina, Sigma, SAD
- Fosfatna kiselina, Merck, Njemačka
- Metanol, Sigma, Njemačka
- Natrijev klorid, Carlo Erba, Italija
- QubitTM protein set, INVITROGEN, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Glicerol, Merck, Njemačka
- Antibiotik kanamicin, Carl Rorth, Njemačka
- Antibiotik ampicilin, Carl Rorth, Njemačka
- Inzulin, Sigma, Njemačka
- Vitamin B12, Acros organics, SAD

- RNaza H, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Albumin goveđeg seruma – BSA, Sigma, Njemačka
- DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) slobodni radikal, TCI-Tokio, Japan
- Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) standard, TCI-Tokio, Japan

3.1.7. Otopine

1) Pufer za anionsku izmjenu

a) startni pufer: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0

- | | |
|--------------------|---------|
| • Tris-HCl | 2,42 g |
| • Destilirana voda | 1000 mL |

b) eluacijski pufer: 20 mM Tris-HCl, 1M NaCl

- | | |
|--------------------|---------|
| • Tris-HCl | 2,42 g |
| • Natrijev klorid | 58,44 g |
| • Destilirana voda | 1000 mL |

2) Pufer za kationsku izmjenu

a) startni pufer: 50 mM Na-acetat, pH 5,0

- | | |
|--------------------|---------|
| • Natrijev acetat | 4,10 g |
| • Destilirana voda | 1000 mL |

b) eluacijski pufer: 50 mM Na-acetat, 1M NaCl

- | | |
|--------------------|---------|
| • Natrijev acetat | 4,10 g |
| • Natrijev klorid | 58,44 g |
| • Destilirana voda | 1000 mL |

3) Pufer za kromatografiju isključivanja: 150 mM Na₂HPO₄

- | | |
|---------------------------|---------|
| • Natrijev hidrogenfosfat | 21,29 g |
| • Destilirana voda | 1000 mL |

3.1.8. Programi i baze podataka

- WARP-LC, verzija 1.3-software za automatizirano snimanje MS i MS/MS spektara, Bruker, Njemačka
- ProteinScape, verzija 3.0-program za pretragu baze podataka, Bruker, Njemačka s integriranim MASCOT algoritmom za pretraživanje baze podataka
- SwissProt-baza podataka (pristupljeno 24. siječnja 2020.)
- Milk Bioactive Peptides-baza podataka (pristupljeno 25. ožujka 2020.)

3.2. METODE RADA

U ovom poglavlju opisani su svi provedeni postupci potrebni za karakterizaciju i identifikaciju bioaktivnih peptida izoliranih iz sira i sirutke. Opisani su koraci, od pripreme uzoraka do statističke obrade podataka.

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Bakterijski sojevi *E. coli* i *K. pneumoniae* čuvaju se pri -80 °C u 25 %-tnom (v/v) glicerolu koji služi kao krioprotektivno sredstvo. Prije eksperimenta, *E. coli* je inokulirana u tekuću LB hranjivu podlogu, a *K. pneumoniae* u tekuću NB hranjivu podlogu. Obje kulture su inkubirane prekoćonočno na 37 °C u aerobnim uvjetima.

Probiotički sojevi čuvaju se pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 %-tnog (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u svježju optimalnu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u Tablici 1.

3.2.2. Određivanje optičke gustoće bakterijske suspenzije

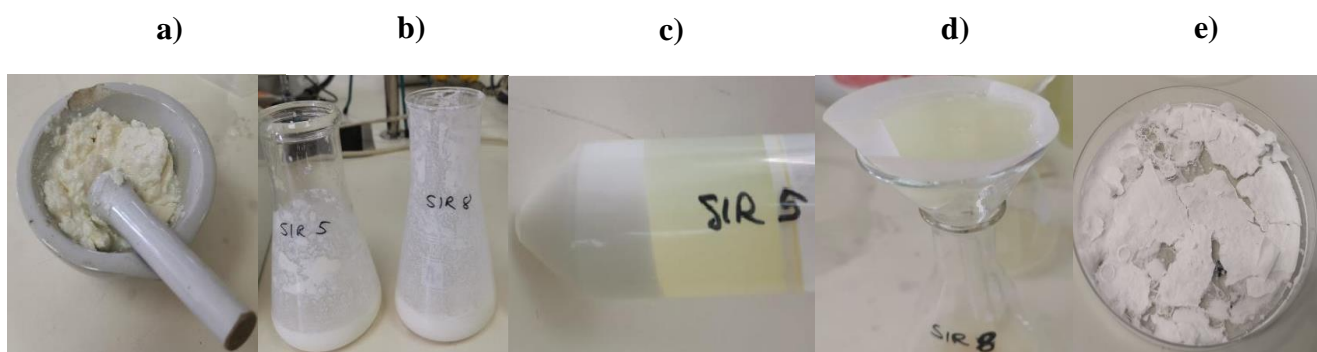
Prekonoćne kulture *E. coli* DSM 300893 i *K. pneumoniae* uzgojene su u 5 mL LB-a odnosno NB-a, na 37 °C s konstantnim miješanjem na 200 okretaja po minuti. Rast stanica praćen je spektrofotometrijski, mjerenjem optičke gustoće (eng. *Optical density* - OD) uzoraka na valnoj duljini 600 nm svakih ~1 h. Kao slijepa proba korištena je čista nenacjepljena hranjiva podloga. Eksperiment je rađen u duplikatu.

3.2.2.1. Izrada krivulje rasta bakterijskih kultura

Budući da se istovremeno pratio rast dvije bakterijske kulture, bilo je neophodno osigurati iste početne uvjete za stanični rast. Bakterijske kulture *E. coli* i *K. pneumoniae* razrijedile su se tako da je optička gustoća OD₆₀₀ pri t₀ za obje kulture iznosila 0,2. Prvo mjerenje izvedeno je sa 100 μL bakterijske suspenzije razrijeđene u 1900 μL LB medija za *E. coli*, tj. 1900 μL NB medija za *K. pneumoniae*. Iz rezultata je upotrebom formule $OD_1 V_1 = OD_2 V_2$ dobiven volumen kulture (V₁) koji je potrebno dodati u tikvice za uzgoj mikroorganizama, pri čemu su poznate vrijednosti OD₁ (optička gustoća bakterijske kulture izmjerena na početku eksperimenta), OD₂ (željena početna optička gustoća, OD₆₀₀ = 0,2) te V₂ (konačni volumen medija). Rast bakterija pratio se sve dok OD₆₀₀ nije dosegla vrijednost koja upućuje na fazu odumiranja stanica u kulturi.

3.2.3. Izolacija bioaktivnih peptida iz sira i sirutke

Bioaktivni peptidi iz tri uzorka sira, proizvedenih kombinacijom 4 autohtona izolata bakterija mliječne kiseline prema Tablici 6, te iz tri uzorka sirutke, zaostalih nakon proizvodnje svježeg sušenog sira, određeni su frakcioniranjem peptida prema Baptista i sur. (2018). Uzorci svakog sira (40 grama) homogenizirani su u tarioniku s tučkom dodatkom 80 mL destilirane vode tijekom 10 minuta. Uzorci svake sirutke (40 mL) suspendirani su dodatkom 80 mL destilirane vode tijekom 10 minuta. Dobivene smjese sira i sirutke inkubirane su pri 40 °C tijekom 1 sata, nakon čega je provedeno centrifugiranje pri 3000 x g tijekom 30 minuta pri 4 °C. Supernatanti su profiltrirani kroz staklenu vunu i kroz Filtrak filter papir No.388, a zatim zamrznuti na -80 °C i koncentrirani liofilizacijom u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, pri čemu su dobiveni uzorci nalik vati (Slika 5). Detekcija izoliranih i liofiliziranih bioaktivnih peptida iz sira i sirutke provedena je u Laboratoriju za proteomiku u BIOCentru (Zagreb, Hrvatska).



Slika 5. a) Homogenizacija sira u destiliranoj vodi u tarioniku s tučkom, b) Homogenat spreman za inkubaciju pri 40 °C tijekom 1 sata, c) Uzorak nakon centrifugiranja s vidljiva 3 sloja, s lijeva na desno: talog, supernatant s izoliranim bioaktivnim peptidima i površinski sloj masti, d) Filtracija supernatanta kroz Filtrak filter papir No.388, e) Uzorak u obliku bijelih pahulja nakon liofilizacije (vlastite fotografije)

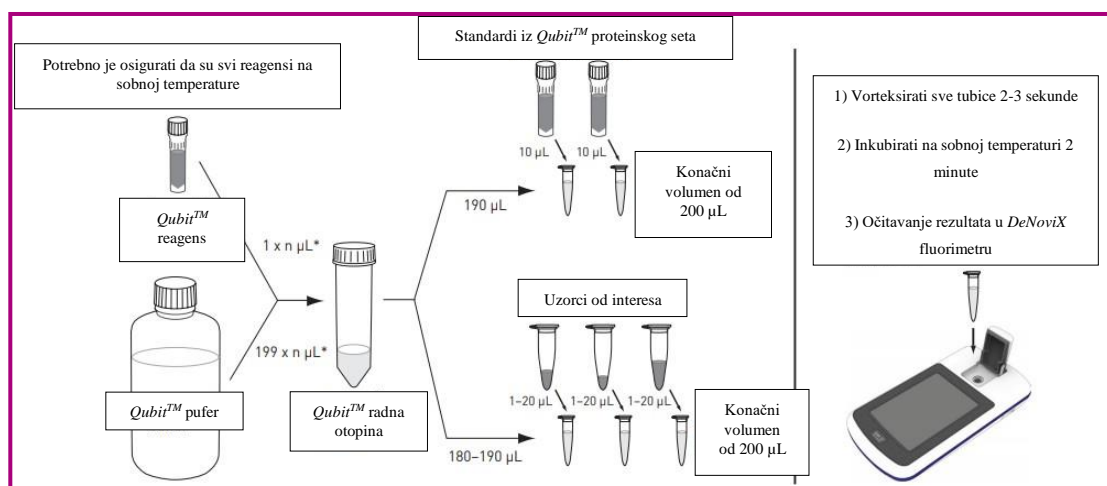
3.2.4. Određivanje ukupne koncentracije proteina *QubitTM Protein setom s DeNoviX fluorimetrom*

Fluorescencija je proces fotoluminescencije u kojem su atomi ili molekule pobuđeni elektromagnetskim zračenjem nakon čega relaksacijom prelaze u osnovno stanje oslobađajući višak energije u obliku svjetla. Nemaju sve molekule sposobnost fluorescencije.

Spojevi alifatske i acikličke građe te konjugati s dvostrukim vezama pokazuju svojstvo fluorescencije, a naročito intenzivno fluoresciraju spojevi s aromatskom jezgrom. Intenzitet fluorescencije proporcionalan je koncentraciji proteina, a mjeri se instrumentom koji se naziva fluorimetar (Skoog i sur., 2014).

Prethodno liofilizirani uzorci sira i sirutke se za određivanje ukupne koncentracije proteina *Qubit™ Protein* setom (prema uputama proizvođača), s *DeNoviX* fluorimetrom pripreme tako da se špatulom sastruže dio liofiliziranog uzorka, prebaci u Eppendorf epruvete, a potom otopi u 200 μL 20 mM Tris-HCl + 1M NaCl pufera za anionsku izmjenju (eng. *Anion exchange elution buffer*).

Qubit™ Protein set za određivanje koncentracije proteina zahtjeva pripremu 3 standardne otopine poznatih koncentracija za kalibraciju *DeNoviX* fluorimetra. Kao standard se koristi albumin goveđeg seruma poznate molekulske mase u sljedećim koncentracijama: 0 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, 200 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ i 400 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Radna otopina pripremi se razrjeđivanjem *Qubit™ Protein* reagensa u *Qubit™ Protein* puferu u omjeru 1:200. Pripreme se i PCR tubice za mjerenje fluorescencije: 3 tubice koje sadrže 190 μL radne otopine i 10 μL standardne otopine točno poznate koncentracije te 8 tubica koje sadrže 190 μL radne otopine i 10 μL uzorka od interesa. Slijedi vorteksiranje svih tubica i inkubiranje na sobnoj temperaturi tijekom 2 minute. Tubice se postavljaju na predviđena mjesta u *DeNoviX* fluorimetru, u kojemu se uzorak ekscitira pri 530 nm, a mjeri se emisija pri 485 nm (Slika 6). Eksperiment se radi u duplikatu.

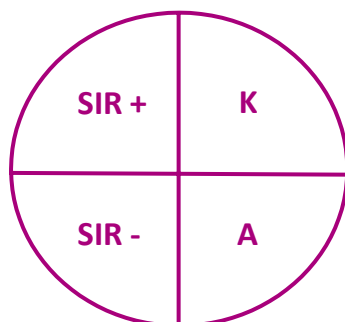


Slika 6. Skica postavljenog eksperimenta određivanja ukupne koncentracije proteina fluorimetrijski (preuzeto i prilagođeno s Anonymous, 2020)

3.2.5. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja bioaktivnih peptida izoliranih iz sira i sirutke

Modificiranom antibiogram metodom u *in vitro* uvjetima ispitana je osjetljivost patogenih mikroorganizama *E. coli* i *K. pneumoniae* na bioaktivne peptide izolirane iz uzoraka sira i sirutke. Kao pozitivna kontrola korišten je antibiotik kanamicin, a kao negativna kontrola antibiotik ampicilin. *E. coli* i *K. pneumoniae* su rezistentne na antibiotik ampicilin budući da stvaraju β -laktamaze proširenog spektra djelovanja te mogu hidrolizirati ampicilin (Katzung, 2011).

Uzorci sira i sirutke otope se u 20 mM Tris-HCl + 1 M NaCl elucijskom puferu za anionsku izmjenu te u 20 mM NaOAc puferu za kationsku izmjenu u koncentraciji od 200 mg mL⁻¹. Dobivene otopine sterilno se filtriraju kroz filter veličina pora 0,2 μ m. Na Petrijeve ploče s 10 mL 0,8 %-tnog LB agara, metodom razmaza po površini, nacijepi se 100 μ L i dva puta po 200 μ L *E. coli* suspenzije optičke gustoće, OD₆₀₀ = 0,2. Na isti način pripreme se i Petrijeve ploče s radnim mikroorganizmom *K. pneumoniae* s napomenom da se koriste dvije Nutrient agar ploče i dvije ploče s 0,8 %-tnim LB agarom. Filter papirići se postave na prazne sterilne ploče te se na njih nakapa 10 μ L odabranog uzorka. Zatim se tako pripremljeni filter papirići sa sterilnom pincetom rasporede na hranjive podloge s prethodno nacijepjenim bakterijama, prema shemi prikazanoj na Slici 7. Slijedi inkubacija na 37 °C tijekom 24 sata nakon čega se mjeri promjer zona inhibicije oko svakog filter papirića.



Slika 7. Shema prema kojoj su nakapani filter papirići raspoređeni na ploči: A (antibiotik ampicilin), K (antibiotik kanamicin), SIR + (uzorak otopljen u puferu za kationsku izmjenu), SIR - (uzorak otopljen u puferu za anionsku izmjenu)

Nakon što je provjerena uspješnost postavljene metode na jednom uzorku, ispitan utjecaj pufera za anionsku odnosno kationsku izmjenu te utjecaj korištenih antibiotika, napravljeni su antibiogrami za svih 8 početnih uzoraka otopljenih u puferu za anionsku izmjenu.

Pripremljeno je 8 ploča s 0,8 %-tnim LB agarom. Na 4 ploče naciijepljeno je 1 mL *E. coli* ($OD_{600} = 0,2$), a na preostalih 4 ploča 1 mL *K. pneumoniae* ($OD_{600} = 0,2$). Na svaku ploču izlije se pripremljeni agar tako da prekrije dno i lagano promiješa.

10 μ L pojedinog uzorka nanosi se na za to predviđene filter papiriće. Tako pripremljeni filter papirići nanose se na hranjive podloge naciijepljene patogenim mikroorganizmima. Petrijeve zdjelice stave se na temperaturu od 37 °C, optimalnu za rast korištenih mikroorganizama tijekom 24 sata. Nakon toga mjeri se promjer zona inhibicije oko svakog filter papirića. Eksperiment je rađen u duplikatu.

3.2.6. Pročišćavanje i razdjeljivanje bioaktivnih peptida kromatografijom ionske izmjene (eng. *Ion Exchange Chromatography*)

500 mg pojedinog uzorka sira i sirutke otopljeno je u 4 mL 20 mM Tris-HCl pufera za anionsku izmjenu (eng. *Anion exchange start buffer*), pH 8,0. Uzorci su potom centrifugirani i filtrirani kroz filter veličina pora 0,2 μ m. Tako pripremljeni uzorci koncentracije 125 mg mL⁻¹ spremni su za kromatografsko razdvajanje koje je provedeno na uređaju ÄKTA avant 25, a čiji su uvjeti dani u Tablici 7.

Tablica 7. Uvjeti kromatografske analize

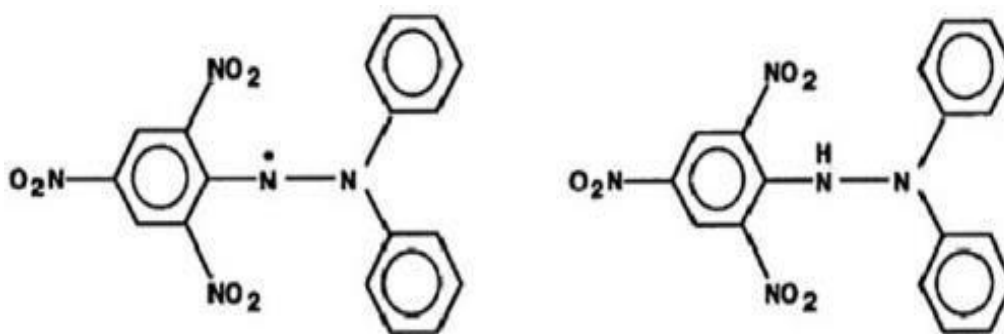
Uređaj	GE Healthcare Life Sciences ÄKTA avant 25
Kolona	HiPrep Q HP, 16/10, GE Healthcare
Startni pufer	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
Eluacijski pufer	20 mM Tris-HCl + 1M NaCl, pH 8,0
Valna duljina	215 nm
Temperatura	4 - 8 °C
Volumen frakcija	3,0 mL, tijekom faze elucije
Volumen injektiranja	3,0 mL – 4,0 mL

3.2.7. Ispitivanje antioksidativnog učinka bioaktivnih peptida DPPH metodom

U ovom dijelu eksperimenta, spektrofotometrijski je ispitana antioksidativna aktivnost 42 liofilizirane frakcije dobivene nakon kromatografije anionske izmjene. U ovoj metodi mjeri se apsorbancija otopine uzorka nakon reakcije s DPPH radikalom. DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) radikal jedan je od rijetkih organskih dušikovih radikala koji je vremenski stabilan, intenzivno ljubičasto obojen i komercijalno dostupan (Slika 8). Metoda se temelji na sposobnosti uklanjanja radikala antioksidansom. Antioksidans donira vodik dušiku koji sadrži jedan nespareni elektron odgovarajućeg hidrazina.

DPPH radikal je stabilni radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule, pa on ne dimerizira kao ostali slobodni radikali. Delokalizacija uzrokuje ljubičastu boju s maksimumom apsorbancije na 515 nm u otopini metanola. Metoda se izvodi u otopini metanola jer se time olakšava ekstrakcija antioksidativnih spojeva iz uzorka. Tijekom reakcije DPPH radikala sa spojem koji može donirati vodikov atom, dolazi do gubitka ljubičaste boje. Apsorbancija DPPH u metanolu se smanjuje i pod utjecajem svjetla pa se reakcija odvija u tami (Brand-Williams i sur., 1995).

Kao referentna otopina uzima se Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) s dokazanom antioksidativnom aktivnošću. Uzorak i Trolox reagiraju s DPPH u otopini metanola, a promjena apsorbancije mjeri se na 515 nm. Antioksidativni kapacitet uzorka izračunava se na temelju postotka obezbojenja DPPH radikala.



Slika 8. Prikaz DPPH slobodnog radikala (lijevo) i njegove stabilne neradikalne forme (desno) (Kedare i Singh, 2011)

Uzorci su pripremljeni na način da je 50 mg liofiliziranog uzorka otopljeno u 0,5 mL ultračiste vode, kako bi se pripremili uzorci koncentracije 100 mg mL⁻¹. Otopina Trolox standarda (Trolox stock) koncentracije 0,25 mg mL⁻¹ pripremljena je otapanjem 25 mg Troloxa u 100 mL metanola. Otapanjem 20 mg DPPH u 200 mL metanola, pripremljena je otopina DPPH (DPPH stock) koncentracije 0,1 mg mL⁻¹. Radnu otopinu čini 25 mL DPPH stocka i 100 mL metanola.

Prema Tablici 8 pripremljeno je 6 kalibracijskih otopina Troloxa. U Eppendorf epruvete od 5 mL dodano je 3,9 mL radne otopine i 100 µL kalibracijske otopine ili uzorka. U slijepu probu dodano je 3,9 mL radne otopine i 100 µL 80 % metanola. Reakcija se provodi točno 30 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri 515 nm.

Tablica 8. Priprema kalibracijskih otopina

Točke kalibracijskog pravca	c (Trolox)/mg mL ⁻¹	V (stock)/µL	V (80 % MetOH)/mL
0	0 (s.p)*	/	2,500
L1	0,0025	25	2,475
L2	0,005	50	2,450
L3	0,01	100	2,400
L4	0,02	200	2,300
L5	0,03	300	2,200
L6	0,05	500	2,000
L7	0,07	700	1,800
L8	0,1	1000	1,500

*s.p. = slijepa proba

Antioksidativna aktivnost izražena kao % smanjenja apsorbancije (eng. %-Scavenging rate)

izračunava se prema formuli:

$$((1 - (A_{uzorka} / A_{slijepa\ probe})) \times 100)$$

3.2.8. Određivanje intaktne mase peptida tekućinskom kromatografijom isključivanja po veličini (eng. *Size-Exclusion Chromatography*)

Kromatografija isključivanja provedena je kako bi se ustanovio raspon masa peptida koji su nastali nakon hidrolize 8 uzoraka sira i sirutke. Pokretna faza bila je 150 mM otopina natrijevog hidrogenfosfata u vodi, pH 7,0. Korišten je instrument za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC), 1260 Infinity binarni HPLC s UV/VIS (DAD) detektorom.

3.2.8.1. Priprema standarda

U viali se promiješa po 10 μL svakog od sljedećih standarda poznatih koncentracija: vitamin B12 ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$), albumin goveđeg seruma - BSA (25 mg mL^{-1}), RNaza H ($12,5 \text{ mg mL}^{-1}$) i inzulin (2 mg mL^{-1}).

3.2.8.2. Priprema uzoraka

Liofilizirani uzorci se odvažu i otape u 150 mM natrij hidrogenfosfatnom puferu (pH 7,0) u konačnoj koncentraciji od 1 mg mL^{-1} te se centrifugiraju pri $3000 \times g$ tijekom 5 minuta u ohlađenoj centrifugi na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant se potom filtrira kroz filter veličina pora $0,4 \mu\text{m}$. Tako pripremljeni uzorci koriste se za separaciju kromatografijom isključivanja pri uvjetima danim u Tablici 9.

Tablica 9. Uvjeti za kromatografiju isključivanja

Protok	$0,4 \text{ mL min}^{-1}$
Volumen injektiranja	$20 \mu\text{L}$ (uzorak), $3 \mu\text{L}$ (standardi)
Temperatura autosamplera	$7 \text{ }^\circ\text{C}$
Kolona	Agilent, Bio SEC-3, $3\mu\text{m}$, 100\AA , $4,6 \times 300 \text{ mm}$
Temperatura kolone	$30 \text{ }^\circ\text{C}$
Valna duljina	$214,4 \text{ nm}$, Ref. 400, 100
Vrijeme analize	20 min
Ispiranje	Izokratno
Raspon masa/Da	100-100 000 Da

3.2.9. Neciljana analiza peptida iz uzoraka sira i sirutke

Kako bismo mapirali peptide u kompleksnoj smjesi koristile su se spregnute tehnike tekućinske kromatografije i spektrometrije masa.

3.2.9.1. Priprema uzoraka

Uzorci se otope se u ultračistoj vodi u konačnoj koncentraciji 1 mg mL^{-1} te se potom filtriraju kroz filter veličina pora $0,2 \text{ }\mu\text{m}$.

3.2.9.2. Korištene otopine

- 0,1 %-tna vodena otopina TFA (v/v),
- 10 %-tna vodena otopina TFA (v/v),
- otopina acetonitril/voda/TFA (2/97,9/0,1, v/v/v),
- otopina acetonitril/voda/TFA (95/4,9/0,1, v/v/v),
- 100 mM otopina amonijevog dihidrogenfosfata,
- otopina CHCA matrice ($3,6 \text{ mg mL}^{-1}$ u otopini acetonitril/voda/TFA, 30/69,9/0,1).

3.2.9.3. Pročišćavanje i separacija peptida te sakupljanje frakcija

Separacija peptida izvodi se s tekućinskim kromatografom koji ima mogućnost separacije pri niskim protocima (do $2 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$). Uzorci se separiraju koristeći Dionex Ultimate 3000 RSLC nano sustav uz UV/VIS detektor koji je direktno spregnut sa sakupljačem frakcija PROTEINEER fcII. Dionex Ultimate 3000 RSLC nano System sadrži pokretni ventil s 10 otvora što omogućava istovremeno korištenje dvije različite kolone.

U ovom eksperimentu koristila se kolona za pročišćavanje peptida te kolona za razdvajanje. Metoda pročišćavanja peptida izvedena je na koloni Acclaim PepMap 100 C₁₈, $5 \text{ }\mu\text{m}$, $100 \text{ }\text{Å}$, $300 \text{ }\mu\text{m}$ i.d. x 5 mm prema parametrima navedenim u Tablici 10. Separacija je provedena na koloni Acclaim PepMap 100 C₁₈, $3 \text{ }\mu\text{m}$, $100 \text{ }\text{Å}$, $75 \text{ }\mu\text{m}$ i.d. x 15 cm prema parametrima navedenim u Tablici 11. Separirane frakcije peptida potom su sakupljene uz pomoć sakupljača frakcija koji direktno sakuplja frakcije na MALDI pločicu prema parametrima opisanim u Tablici 12.

Tablica 10. Parametri pročišćavanja peptida

Pokretna faza A	Otopina acetonitril/voda/TFA (1,9/98/0,1, v/v/v)
Pokretna faza B	Otopina acetonitril/voda/TFA (95/4,9/0,1, v/v/v)
Volumen injektiranja	1 μL
Predkolona	Acclaim PepMap100 C ₁₈ , 5 μm , 100 Å, 300 μm i.d. x 5 mm, Thermo Scientific, SAD
Temperiranje predkolone	40 °C
Ispiranje kolone	Izokratno, A/B = 98/2 (v/v), 5 min
Protok	10 $\mu\text{L min}^{-1}$

Tablica 11. Parametri separacije peptida

Pokretna faza A	Otopina acetonitril/voda/TFA (1,9/98/0,1, v/v/v)		
Pokretna faza B	Otopina acetonitril/voda/TFA (95/4,9/0,1, v/v/v)		
Temperiranje kolone	40 °C		
Protok	0,3 $\mu\text{L min}^{-1}$		
Ispiranje kolone	Gradijentno		
	Retencijsko vrijeme	B (%)	Protok ($\mu\text{L min}^{-1}$)
	0	2,0	0,3
	10	2,0	0,3
	58	40,0	0,3
	59	90,0	0,3
	69	90,0	0,3
	70	2,0	0,3
	75	2,0	0,3
Detekcija	UV/VIS detektor, valna duljina od 215 nm		

Tablica 12. Parametri sakupljanja peptidnih frakcija

Matrica	3,6 mg mL ⁻¹ u TA30
Protok matrice	100 µL h ⁻¹
Vrijeme sakupljanja frakcija	15 - 63 min
Vrijeme sakupljanja/frakcija	15 s
Ukupan broj sakupljanja frakcija	192

3.2.9.4. Analiza peptida spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF

Analiza peptida provodila se uz pomoć spektrometra masa MALDI-TOF/TOF Autoflex speed. Vanjska kalibracija spektara (eng. *External Calibration*) napravi se koristeći algoritam krivulje četvrtog reda (eng. *Cubic Enhanced*) uz signale dobivene snimanjem standardnih peptida poznatih masa (minimalno 6 signala). Parametri MS i MS/MS podese se koristeći WARP-LC software (Tablice 13 i 14).

Tablica 13. Parametri snimanja MS spektara nakon LC separacije

Tip analize	MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Ionsko zrcalo	Reflektron
Broj snimaka/spektar	1 000
Raspon masa/Da	700 – 4 000
Kalibracija MS spektara	Algoritam krivulje četvrtog reda uz signale dobivene snimanjem standardnih peptida poznatih masa (minimalno 6)
Tolerancija mase pri kalibraciji	100 ppm

Tablica 14. Parametri snimanja MS/MS spektara nakon LC separacije

Odabir prekursora za MS/MS analizu	
Maksimalna tolerancija mase peptida unutar različitih frakcija	100 ppm
Maksimalan broj frakcija u kojima se dopušta ponavljanje istog peptida	6
Identifikacija pozadinskih signala	Ponavljanje signala u 70 % frakcija
Minimalan s/n za snimanje MS/MS	50
Minimalna razlika između peptida koji koeluiraju/Da	5
Maksimalan broj peptida prekursora po frakciji	10
MS/MS analiza	
Tip analize	MS/MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Ionsko zrcalo	Reflektron
Broj snimaka/spektar	1 500
Vrsta fragmentacije	Inducirana laserom

3.2.9.3. Identifikacija proteina

Nakon snimanja MS i MS/MS spektara dobiveni podaci su se koristili za pretragu baze podataka. U ovom radu koristio se program ProteinScape, verzija 3.0. Podaci dobiveni MS i MS/MS analizama kombiniraju se pri pretrazi baze kako bi se identificirali proteini uz parametre navedene u Tablici 15.

Tablica 15. Parametri pretrage baze podataka

Baza podataka	SwissProt
Taksonomija	<i>Bos taurus</i>
Enzim	Nespecifično cijepanje
Varijabilne modifikacije	Oksidacija metionina i deamidacija asparagina i glutamina
Tolerancija mase prekursora	500 ppm
Tolerancija mase fragmentiranih iona	0,5 Da

4. REZULTATI I RASPRAVA

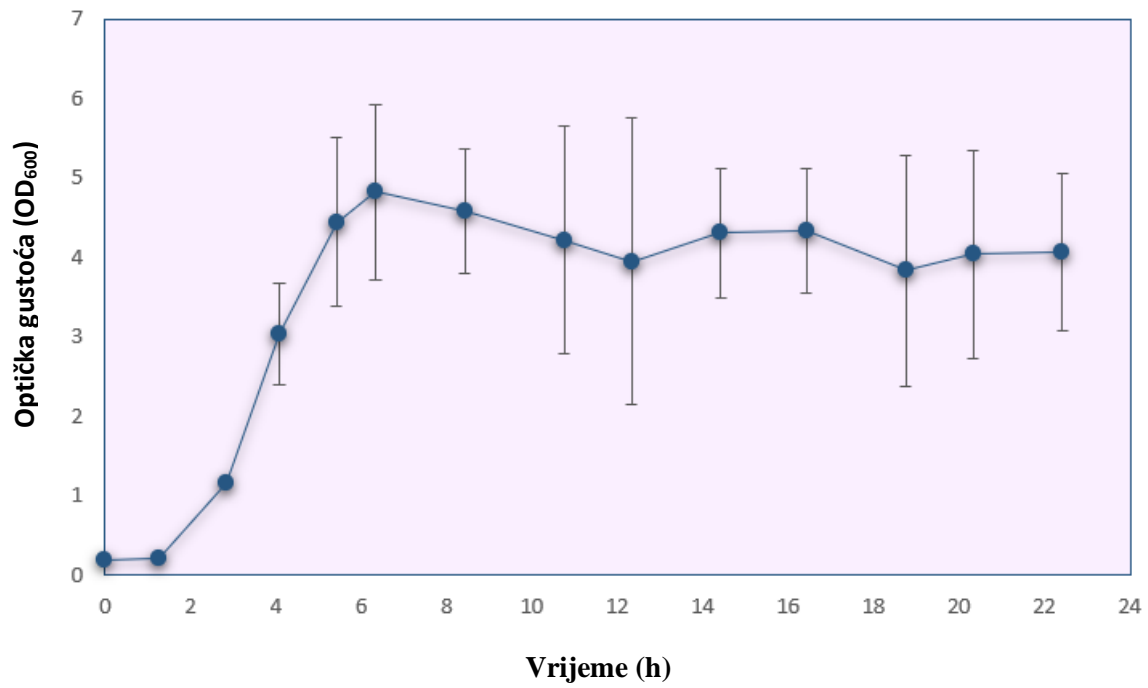
U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja antimikrobnog i antioksidacijskog učinka bioaktivnih peptida iz sira i sirutke. Antimikrobno djelovanje ispitano je modificiranom antibiogram metodom, dok je antioksidativno djelovanje ispitano DPPH metodom. Također je provedena ciljana analiza proteina u početnih 8 uzoraka sira i sirutke u svrhu karakterizacije peptida s bioaktivnim djelovanjem. Primijenjeni sojevi bakterija mliječne kiseline za proizvodnju uzoraka sušenih sireva i sirutke pokazali su u prethodnim istraživanjima proteolitičku aktivnost koja je najbolje okarakterizirana kod probiotičkog soja *L. helveticus* M92 koji posjeduje proteazu PrtM, proteini koji sudjeluju u transportnom sustavu Opp peptida i unutarstanične peptidaze PepE, PepN i PepQ (Beganović i sur., 2013).

4.1. UZGOJ I KONSTRUIRANJE KRIVULJA RASTA PATOGENIH MIKROORGANIZAMA

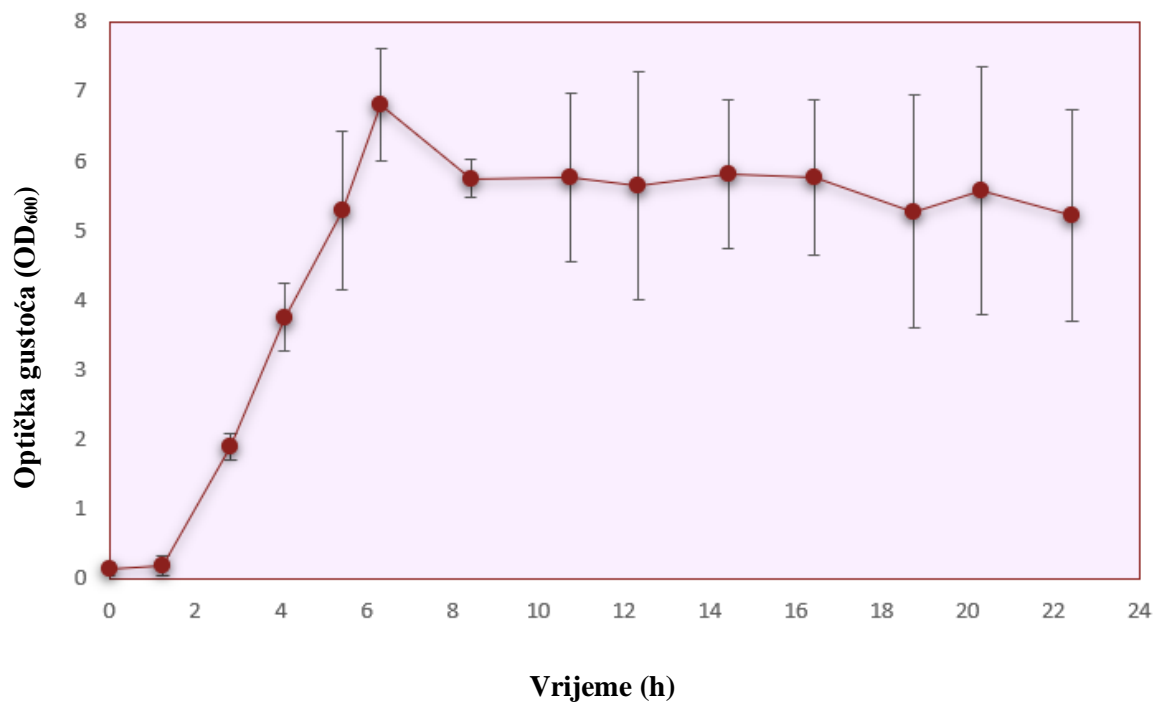
Kako bi se mogao provesti test antimikrobne aktivnosti peptida, uzgojeni su patogeni mikroorganizmi *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, konstruirane su njihove krivulje rasta (Slike 9 i 10), a potom su mikroorganizmi i mikroskopirani (Slike 11 i 12).

Porodicu *Enterobacteriaceae* čine gram-negativni, uglavnom pokretni štapići (0,5 – 3,0 μm) koji ne stvaraju spore i fakultativni su anaerobi. *Enterobacteriaceae* ili crijevne bakterije normalna su mikroflora probavnog sustava u ljudi i životinja. Jedan od predstavnika je i najpoznatiji mikroorganizam sadašnjice, bakterija *Escherichia coli*. Prvi ju je otkrio i opisao njemačko-austrijski pedijatar i mikrobiolog Theodor Escherich, 1885. godine. Sredinom četrdesetih godina prošlog stoljeća dolazi do saznanja da su određeni sojevi *E. coli* patogeni te uzrokuju proljev, osobito kod dojenčadi. Sojevi *E. coli* koji mogu uzrokovati oboljenja probavnog sustava čovjeka nazivaju se enterovirulentni sojevi, a podijeljeni su u više skupina ovisno o sposobnosti stvaranja toksina te vezanja i napadanja epitelnih stanica (Marinculić i sur., 2009).

Unatrag dvadesetak godina javlja se sve veći broj sojeva *Klebsiella pneumoniae* rezistentnih na β -laktamske antibiotike zahvaljujući biosintezi enzima β -laktamaze proširenog spektra (engl. *Extended Spectrum Beta-lactamases* - ESBL). Osobito je značajna otpornost *Klebsiella pneumoniae* prema ampicilinu i karbencilinu, a u bolničkoj sredini može steći otpornost na sve antibiotike. Najčešće uzrokuje pneumoniju (3 % svih bakterijskih pneumonija), ali može izazvati i infekcije mokraćnog sustava te bolničke infekcije, od kojih su najteže sepsa i meningitis (Kalenić i sur., 2013).

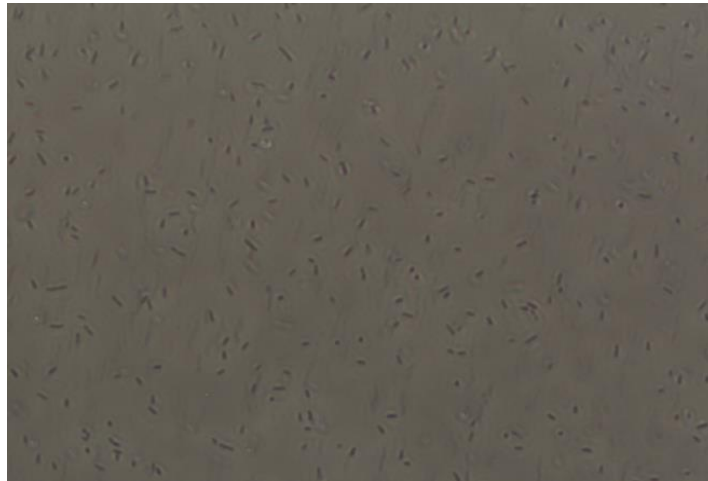


Slika 9. Krivulja rasta bakterije *E. coli* ovisno o vremenu

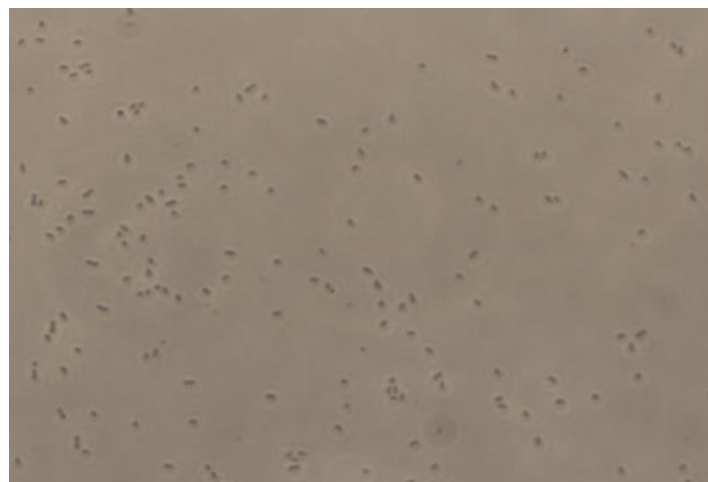


Slika 10. Krivulja rasta bakterije *K. pneumoniae* ovisno o vremenu

Usporedbom krivulja rasta patogenih bakterija, uočen je brži rast bakterije *K. pneumoniae* u odnosu na rast bakterije *E. coli*. Oba soja istovremeno ulaze u fazu eksponencijalnog rasta nakon ~2 h uzgoja. Nakon ~6 h, u točki u kojoj završava LOG-faza rasta, zabilježena je znatno veća vrijednost optičke gustoće bakterijskih stanica *K. pneumoniae* ($OD_{600} = 6,803$), u odnosu na vrijednost optičke gustoće bakterijskih stanica *E. coli* ($OD_{600} = 4,819$), što upućuje na brže razmnožavanje stanica *K. pneumoniae*. U periodu od ~6 h do ~22 h nakon početka uzgoja, oba soja su bila u stacionarnoj fazi rasta gdje je brzina rasta mikroorganizama izjednačena s brzinom ugibanja mikroorganizama. Životni ciklus oba bakterijska soja pratio se kroz ~22 h i 30 min, odnosno do trenutka kada je zabilježena vrijednost OD_{600} koja upućuje na fazu odumiranja stanica u kulturi.



Slika 11. Patogeni mikroorganizam *Escherichia coli* (vlastita fotografija)



Slika 12. Patogeni mikroorganizam *Klebsiella pneumoniae* (vlastita fotografija)

4.2. FLUORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE UKUPNE KONCENTRACIJE PROTEINA QUBIT™ PROTEIN SETOM

Prije ispitivanja bioaktivnog djelovanja peptida, potrebno je odrediti ukupnu koncentraciju proteina u svim uzorcima kako bi se odabrala prikladna koncentracija uzorka za provođenje testova antimikrobne i antioksidativne aktivnosti. Na taj način će se dobiveni rezultati moći međusobno usporediti.

U ovom eksperimentu, određena je ukupna koncentracija proteina u 8 početnih uzoraka sira i sirutke. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Ukupna koncentracija proteina u 8 početnih uzoraka sira i sirutke

Naziv uzorka	Ukupna koncentracija proteina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Kontrolni sir	9,98
Sir 1	10,87
Sir 2	13,05
Sir 3	9,38
Kontrolna sirutka	9,52
Sirutka 1	17,08
Sirutka 2	19,49
Sirutka 3	14,62

Mliječni proteini sastoje se od kazeina (proteina koji se ugrađuje u sir) i sirutkinih proteina (proteina koji se ugrađuju u sirutku). Od ukupne količine mlijeka dobiva se oko 10 % sira, a ostalih 90 % je sirutka. Sirutkine proteine čine α -laktalbumini, β -laktoglobulini, imunoglobulini i albumin krvnog seruma. U manjim količinama nalaze se i proteini poput lizozima, laktoperoksidaze, glikoproteina, krvnog transferina i laktoferina (Damodoran, 1997).

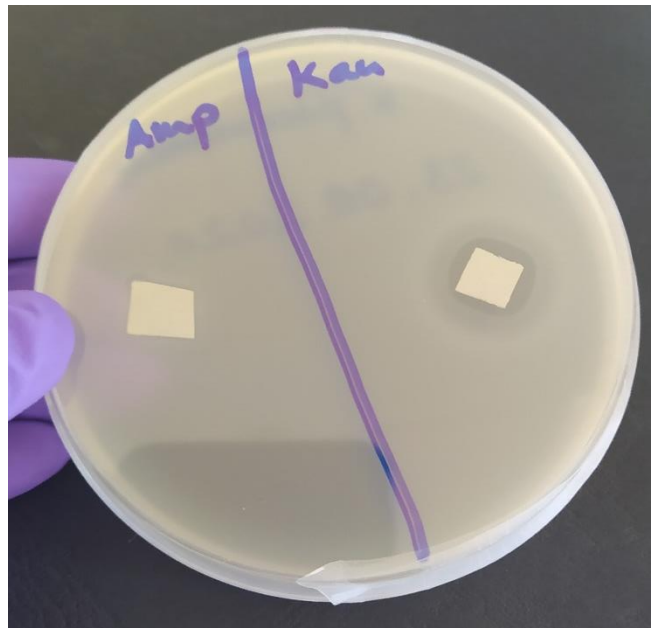
Kako bi se uzorci dobro otopili u puferu, kao optimalna koncentracija uzorka za ispitivanje bioaktivnog djelovanja peptida u daljnjem eksperimentu (poglavlje 4.3 i 4.5) uzeta je ona od 1 mg mL^{-1} , ako se radi o početnim uzorcima sira i sirutke, odnosno koncentracija od 100 i 200 mg mL^{-1} , ako se radi o uzorcima separiranim u frakcije nakon kromatografije ionske izmjene.

4.3. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA BIOAKTIVNIH PEPTIDA IZOLIRANIH IZ SIRA I SIRUTKE

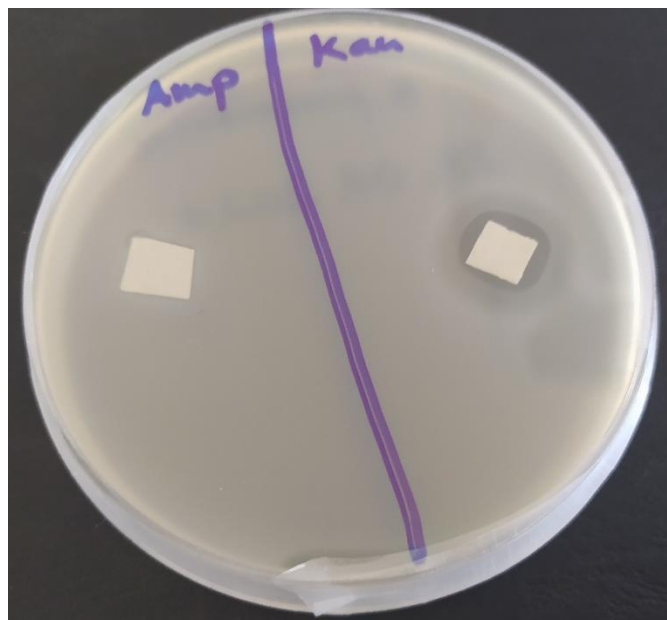
Mehanizam djelovanja antimikrobnih peptida povezuje se s narušavanjem normalne propusnosti membrane bakterijskih stanica formiranjem ionskih kanala kroz membranke dvosloje bakterijske stanice (Gobbetti i sur., 2004). Većina antimikrobnih peptida je pozitivno nabijena, međutim njihovo antimikrobno djelovanje nije ograničeno samo na gram-pozitivne, već često uključuje i gram-negativne bakterije. Razlika u raspodjeli naboja, veličini i aminokiselinskom slijedu, sekundarnoj strukturi i svojstvu amfipatičnosti među peptidima mogla bi biti razlogom njihovog različitog antimikrobnog učinka na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Zbog razlika u sastavu membrane između gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, antimikrobni peptidi pokazuju različito djelovanje i bakterijsku specifičnost. Neki su izrazito učinkoviti u antimikrobnom djelovanju na jednu skupinu bakterija, a ne djeluju na drugu skupinu bakterija (Mann i sur., 2019).

U ovom eksperimentu ispitano je antimikrobno djelovanje bioaktivnih peptida izoliranih iz 8 početnih uzoraka sira i sirutke, otopljenih u elucijskom puferu za anionsku izmjenu, u koncentraciji od 200 mg mL⁻¹. Antibiogram metoda opisana je u poglavlju 3.2.5. Stanice patogenih mikroorganizama *E. coli* i *K. pneumoniae* tretirane su navedenim uzorcima u periodu od 24 h. U prvom dijelu eksperimenta, nasumično je odabran jedan uzorak - Sir 3, kako bi se verificirala modificirana antibiogram metoda prije nego se metoda primjeni na sve uzorke. Antibiotik kanamicin korišten je kao pozitivna kontrola. Kanamicin je aminoglikozidni antibiotik koji inhibira rast radnih mikroorganizama, stoga su oko filter papirića nakapanih s antibiotikom kanamicinom vidljive bistre zone u kojima nema bakterijskog rasta, tzv. zona inhibicije. Kao negativna kontrola korišten je β-laktamski antibiotik ampicilin jer *E. coli* i *K. pneumoniae* sadrže enzim β-laktamazu i razgrađuju ampicilin. Oko filter papirića nakapanih s ampicilinom nisu vidljive bistre zone jer su bakterije uniformno narasle preko cijele površine hranjive krute podloge (Slike 13a i 13b).

Ispitano je i antimikrobno djelovanje puferu za anionsku i pufera za kationsku izmjenu, a uzorak Sir 3 je korišten kao testni uzorak. Budući da na pločama oko filter papirića s nakapanim uzorkom Sir 3 u puferu za anionsku i u puferu za kationsku izmjenu nisu vidljive zone inhibicije, potvrđeno je niti jedan od pufera ne djeluje inhibicijski na rast bakterija. U daljnjim eksperimentima ispitivano je djelovanje bioaktivnih peptida iz uzoraka otopljenih samo u anionskom puferu.

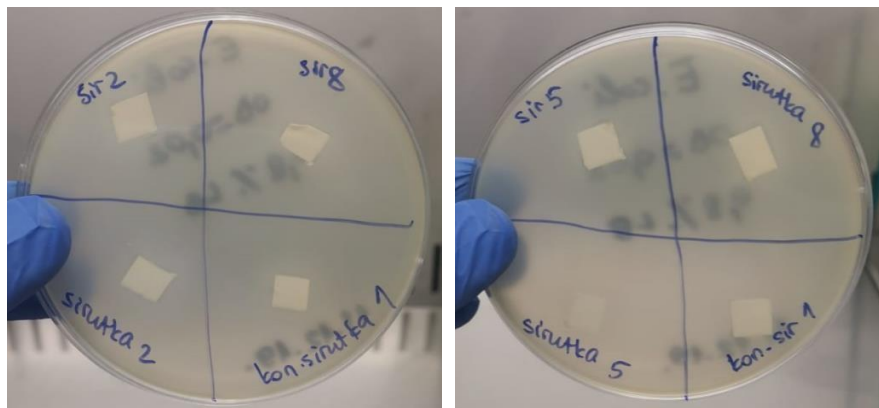


Slika 13a. Antibiogram s pozitivnom i negativnom kontrolom za patogeni mikroorganizam *E. coli* (vlastita fotografija)

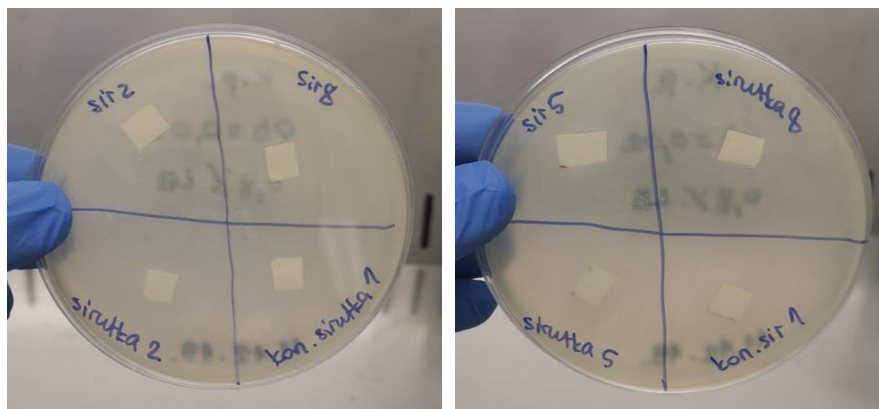


Slika 13b. Antibiogram s pozitivnom i negativnom kontrolom za patogeni mikroorganizam *K. pneumoniae* (vlastita fotografija)

Ispitano je antimikrobno djelovanje bioaktivnih peptida izoliranih iz svih 8 početnih uzoraka sira i sirutke. Nacijepljeni su radni mikroorganizmi *E. coli* i *K. pneumoniae*, $OD_{600} = 0,2$, na krutu LB hranjivu podlogu te nanieseni filter papirići s uzorcima, a nakon inkubacije od 24 h očitane su zone inhibicije. Nisu uočene bistre zone oko niti jednog filter papirića s uzorcima (Slika 14a i 14b). Bioaktivni peptidi porijeklom iz 8 uzoraka sira i sirutke zaostalih prilikom sirenja, ne pokazuju antimikrobno djelovanje na patogene mikroorganizme *E.coli* i *K.pneumoniae*.



Slika 14a. Ploče s nacijepljenim mikroorganizmom *E. coli* bez vidljivih zona inhibicije (vlastita fotografija)

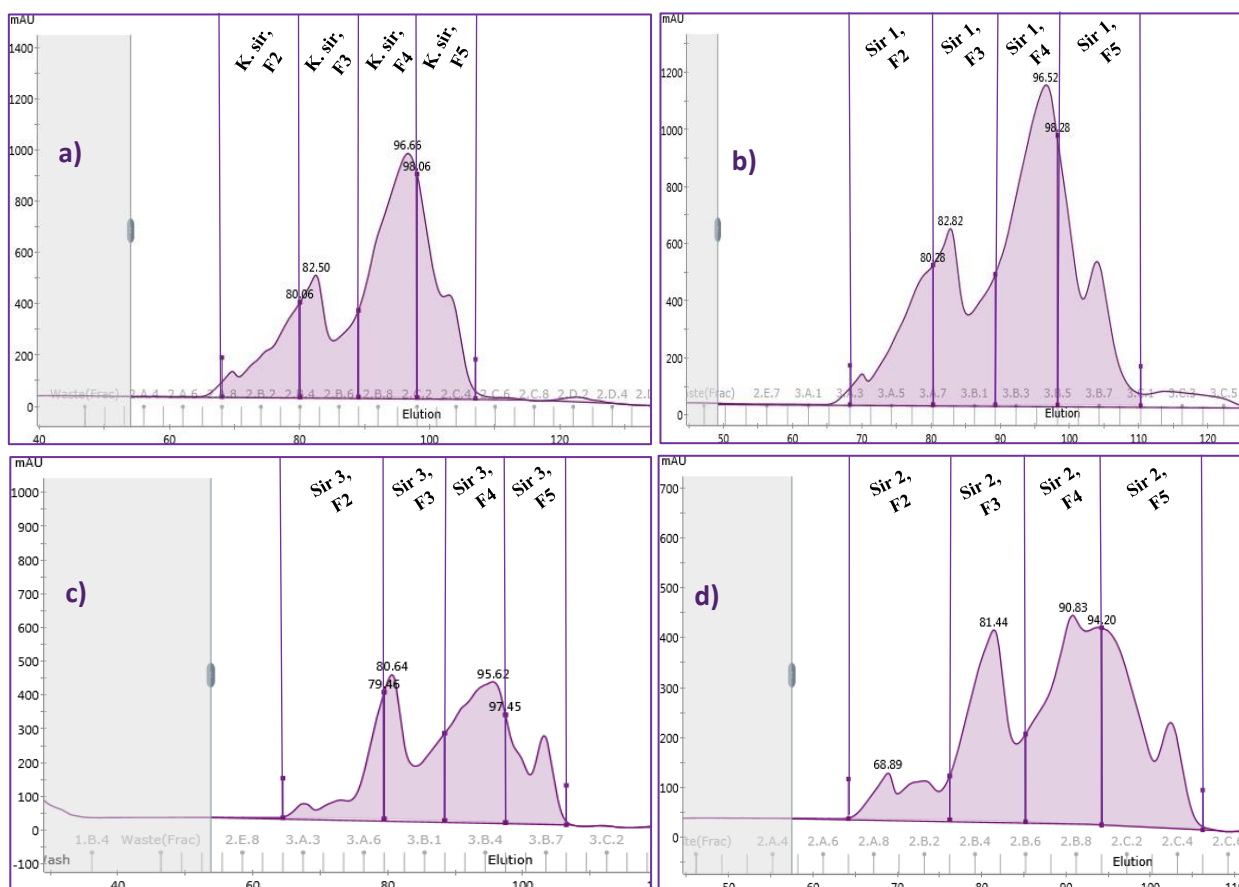


Slika 14b. Ploče s nacijepljenim mikroorganizmom *K. pneumoniae* bez vidljivih zona inhibicije (vlastita fotografija)

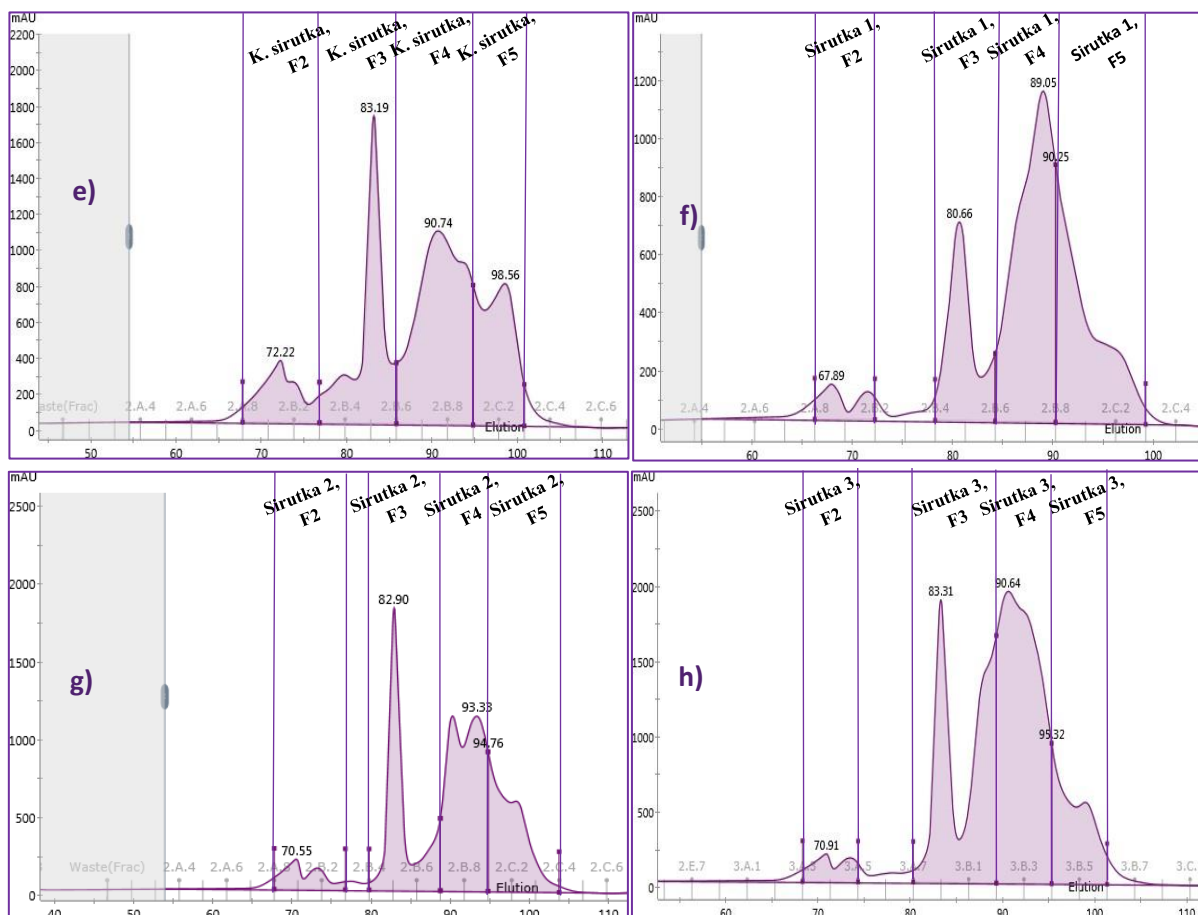
Iz svega navedenog slijedi da peptidi izolirani iz 8 uzoraka sira i sirutke u ovom eksperimentu, ne pokazuju antimikrobno djelovanje na ispitivane gram-negativne bakterije *E. coli* i *K. pneumoniae*.

4.4. PROČIŠĆAVANJE I RAZDJELJIVANJE BIOAKTIVNIH PEPTIDA U FRAKCIJE KROMATOGRAFIJOM IONSKE IZMJENE

Od početnih 8 uzoraka koji su podvrgnuti kromatografiji ionske izmjene, u konačnici su dobivena 42 uzorka. Za 6 uzoraka, prikupljene proteinske frakcije nakon kromatografije spojene su u 5 grupnih frakcija, jedna frakcija koja se nije zadržala na koloni, tzv. nevezana frakcija (N1) i četiri frakcije u kojima je nekoliko manjih pikova spojenih u jednu frakciju (F2-F5). Za 2 uzorka napravljeno je 6 grupnih frakcija, 2 nevezane frakcije (N1 i N2) i 4 vezane frakcije (F2-F5). Frakcije su naznačene na Slikama 15 i 16, sivom oznakom ispod kromatograma naznačene su frakcije kako su eluirale sa kolone, dok su ljubičastom oznakom naznačene frakcije koje su združene. Uzorci su liofilizirani u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“.



Slika 15. Prikaz i oznaka frakcija na kromatogramu koje su združene nakon ionske izmjene (AIEX): a) Kontrolni sir, b) Sir 1, c) Sir 2, d) Sir 3



Slika 16. Prikaz pikova na kromatogramu koji su spojeni u frakcije nakon ionske izmjene (AIEX): e) Kontrolna sirutka, f) Sirutka 1, g) Sirutka 2, h) Sirutka 3

Primjer: uzorak „Kontrolni sir“ je nakon kromatografije ionske izmjene separiran u 6 grupnih frakcija: 2 nevezane frakcije (nisu prikazane na slici) i 4 vezane frakcije (Slika 15). Nevezane frakcije se dalje u tekstu označavaju slovom „N“, dok se vezane frakcije označavaju slovom „F“, a nakon slova slijedi redni broj same frakcije. U Tablici 17 nevedeni su nazivi svih sakupljenih frakcija.

Tablica 17. Nazivi frakcija sakupljenih nakon ionske izmjene koje su korištene za daljnju analizu

a) Kontrolni sir	b) Sir 1	c) Sir 2	d) Sir 3
K. sir, N1	Sir 1, N	Sir 2, N	Sir 3, N1
K. sir, N2	Sir 1, F2	Sir 2, F2	Sir 3, N2
K. sir, F2	Sir 1, F3	Sir 2, F3	Sir 3, F2
K. sir, F3	Sir 1, F4	Sir 2, F4	Sir 3, F3
K. sir, F4	Sir 1, F5	Sir 2, F5	Sir 3, F4
K. sir, F5	/	/	Sir 3, F5
e) Kontrolna sirutka	f) Sirutka 1	g) Sirutka 2	h) Sirutka 3
K. sirutka, N1	Sirutka 1, N	Sirutka 2, N	Sirutka 3, N
K. sirutka, N2	Sirutka 1, F2	Sirutka 2, F2	Sirutka 3, F2
K. sirutka, F2	Sirutka 1, F3	Sirutka 2, F3	Sirutka 3, F3
K. sirutka, F3	Sirutka 1, F4	Sirutka 2, F4	Sirutka 3, F4
K. sirutka, F4	Sirutka 1, F5	Sirutka 2, F5	Sirutka 3, F5

4.5. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG UČINKA BIOAKTIVNIH PEPTIDA IZ SIRA I SIRUTKE DPPH METODOM

Oksidacijski mehanizam ključan je za normalno funkcioniranje pojedine stanice i posljedično organizma. Kada u stanici nastaje višak slobodnih radikala, dolazi do oksidacije staničnih proteina, membranskih lipida, DNA i enzima, odnosno oksidacijskog stresa te tako oštećene stanične strukture više ne mogu vršiti svoju funkciju te stanica odumire. Oštećenja nastala u stanici mogu biti pokretač raznih bolesti kao što su ateroskleroza, dijabetes, reumatoidni artritis, a oksidativna oštećenja DNA mogu dovesti do maligne transformacije stanica te raka.

Redoviti unos namirnica koje su prirodni antioksidansi može utjecati na smanjenje oksidativnog stresa u organizmu. Zbog toga su i antioksidativni peptidi podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda predmet istraživanja. Antioksidativni peptidi podrijetlom iz mlijeka sastoje se od pet do jedanaest hidrofobnih aminokiselina, uključujući prolin, histidin, tirozin ili triptofan, a pretpostavlja se da svoj antioksidativni učinak iskazuju uklanjanjem slobodnih radikala ili sprječavanjem njihovog nastanka (Mann i sur., 2019; Mohanty i sur., 2016). Za iskazivanje antioksidativnog učinka važno je ispravno pozicioniranje aminokiselina u slijedu peptida te promjena u tripeptidnom nizu aminokiselina mijenja antioksidativnu aktivnost. Također, ključan faktor predstavljaju strukturna konformacija peptida i sama peptidna veza jer mogu djelovati sinergistički i antagonistički naspram antioksidativne aktivnosti slobodnih aminokiselina (Mann i sur., 2019).

U našem eksperimentu prikupljene proteinske frakcije su liofilizirane te su korištene za ispitivanje antioksidativnog djelovanja DPPH metodom, kao što je opisano u poglavlju 3.2.7. Ispitivano je antioksidativno djelovanje 42 frakcije otopljene u koncentraciji od 100 mg mL^{-1} i 8 početnih uzoraka sira i sirutke (u Tablici 18 označeno slovom „P“) otopljenih u koncentraciji od 1 mg mL^{-1} . Uzorci su otopljeni u ultračistoj vodi. Nakon 30-minutne reakcije DPPH radikala i spojeva iz uzoraka, mjerena je apsorbacija pri 515 nm, a dobivena vrijednost ukazuje na sposobnost antioksidansa iz uzoraka da reduciraju DPPH radikal. Antioksidativni kapacitet uzorka izračunava se na temelju postotka obezbojenja DPPH radikala, odnosno „%- Scavenging rate“.

U ovom eksperimentu se kao standard koristi 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox). Standard je dodan uzorku, slijepoj probi i svim standardnim otopinama te je njegova koncentracija poznata.

Napravljena su 4 mjerenja, te je za svako mjerenje konstruiran kalibracijski pravac ovisnosti koncentracije Trolox standarda o apsorbanciji pri 515 nm. Pravac služi za provjeru linearnosti, gdje korelacijski koeficijent R^2 govori o korelaciji i smjeru linearne povezanosti između dvije varijable. Ako je $R^2 = 0,99$ to znači da se 99 % ukupne varijacije u y može objasniti linearnom ovisnošću između x i y, dok se preostalih 1 % ne može objasniti. Rezultati provedenih mjerenja dani su u Tablici 18.

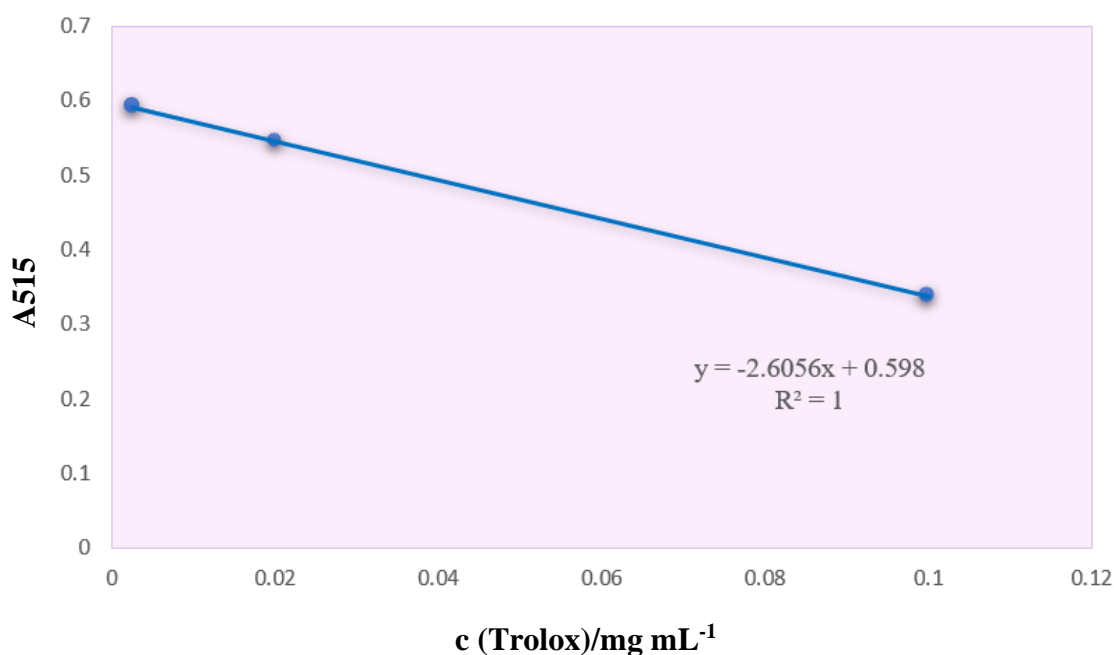
Tablica 18. Antioksidacijski učinak proteinskih frakcija sakupljenih nakon ionske izmjene uzoraka sira i sirutke DPPH metodom

Uzorak	%-Scavenging rate	Uzorak	%-Scavenging rate
K. sir, P	-32,63513514	K. sirutka, P	-5,861486486
K. sir, N1	6,891891892	K. sirutka, N	-24,90229795
K. sir, N2	-9,121621622	K. sirutka, F2	-5,893387525
K. sir, F2	-4,560810811	K. sirutka, F3	-6,71641791
K. sir, F3	0,855488286	K. sirutka, F4	4,361419415
K. sir, F4	-13,72116689	K. sirutka, F5	-4,126934501
K. sir, F5	-0,210581732	/	/
Sir 1, P	-24,71283784	Sirutka 1, P	-35,4222973
Sir 1, N	0,719087072	Sirutka 1, N	-23,53040541
Sir 1, F2	-2,272727273	Sirutka 1, F2	-3,885135135
Sir 1, F3	-0,984836642	Sirutka 1, F3	-5,810810811
Sir 1, F4	0,921295078	Sirutka 1, F4	-9,158751696
Sir 1, F5	-0,816004212	Sirutka 1, F5	-8,242876526
Sir 2, P	-17,26351351	Sirutka 2, P	-9,915540541
Sir 2, N	-2,668918919	Sirutka 2, N	-14,06909489
Sir 2, F2	-4,679054054	Sirutka 2, F2	-5,580740972
Sir 2, F3	-12,17774763	Sirutka 2, F3	1,316135825
Sir 2, F4	-0,171097657	Sirutka 2, F4	-4,06440519
Sir 2, F5	-0,329033956	Sirutka 2, F5	-4,549007347
Sir 3, P	-22,28040541	Sirutka 3, P	-18,53040541
Sir 3, N1	-2,110364233	Sirutka 3, N	5,444369064
Sir 3, N2	-13,47506644	Sirutka 3, F2	-1,729986431
Sir 3, F2	-3,704861654	Sirutka 3, F3	-1,766453025
Sir 3, F3	-4,361419415	Sirutka 3, F4	-8,81953867
Sir 3, F4	-1,210844959	Sirutka 3, F5	-9,124830393
Sir 3, F5	-0,342195315	/	/

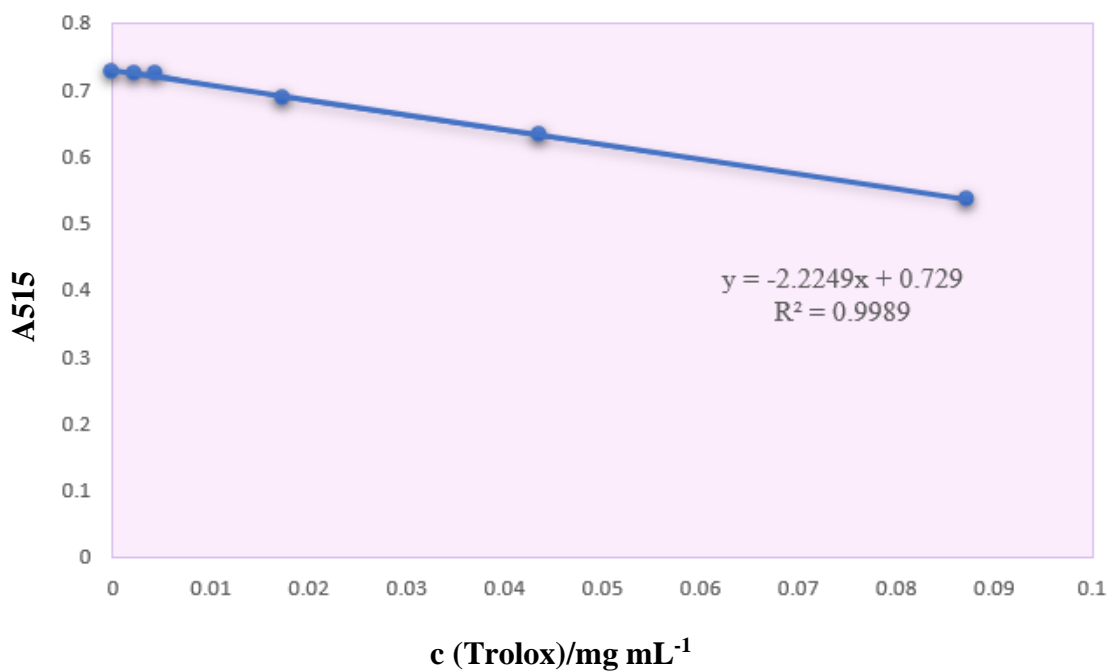
Prema literaturi, uzorci koji imaju „%-Scavenging rate“ veći od 50 % pokazuju antioksidativni učinak (Okoh i sur., 2014). Budući da takvi rezultati nisu dobiveni, uzete su četiri frakcije označene žutom bojom u Tablici 18 koje su pokazale najveće smanjenje apsorbancije te je s njima ponovljen eksperiment u triplikatu (Tablica 19).

Kod ponovljenog eksperimenta, kalibracijska krivulja se izrađuje na dva načina. Jedan način kao i u prethodnim mjerenjima, gdje se uzimaju tri točke za izradu pravca (Slika 17), a za drugi način se u Eppendorf epruvete doda 3,8 mL radne otopine, 100 μ L vode i 100 μ L kalibracijske otopine te se uzima šest točaka kalibracijskog pravca (Slika 18). Tako se stvore jednaki uvjeti za uzorke, budući da su oni otopljeni u vodi.

Iz napravljenih kalibracijskih krivulja uspoređuju se korelacijski koeficijenti kako bi se vidjela razlika u linearnosti koja bi eventualno mogla utjecati na rezultate. Vidljivo je da postoji razlika u korelacijskim koeficijentima, ali ona nije značajna, što znači da otapalo (metanol ili voda) ne utječe na rezultate ispitivanja antioksidacijskog učinka bioaktivnih peptida izoliranih iz sira i sirutke DPPH metodom.



Slika 17. Kalibracijska krivulja ovisnosti A515 o koncentraciji Troloxa u prisutnosti metanola



Slika 18. Kalibracijska krivulja ovisnosti A515 o koncentraciji Troloxa u prisutnosti vode

Tablica 19. Antioksidacijski učinak proteinskih frakcija sakupljenih nakon ionske izmjene uzoraka sira i sirutke DPPH metodom koji su u Tablici 18 pokazali najveće vrijednosti za „%-Scavenging rate“

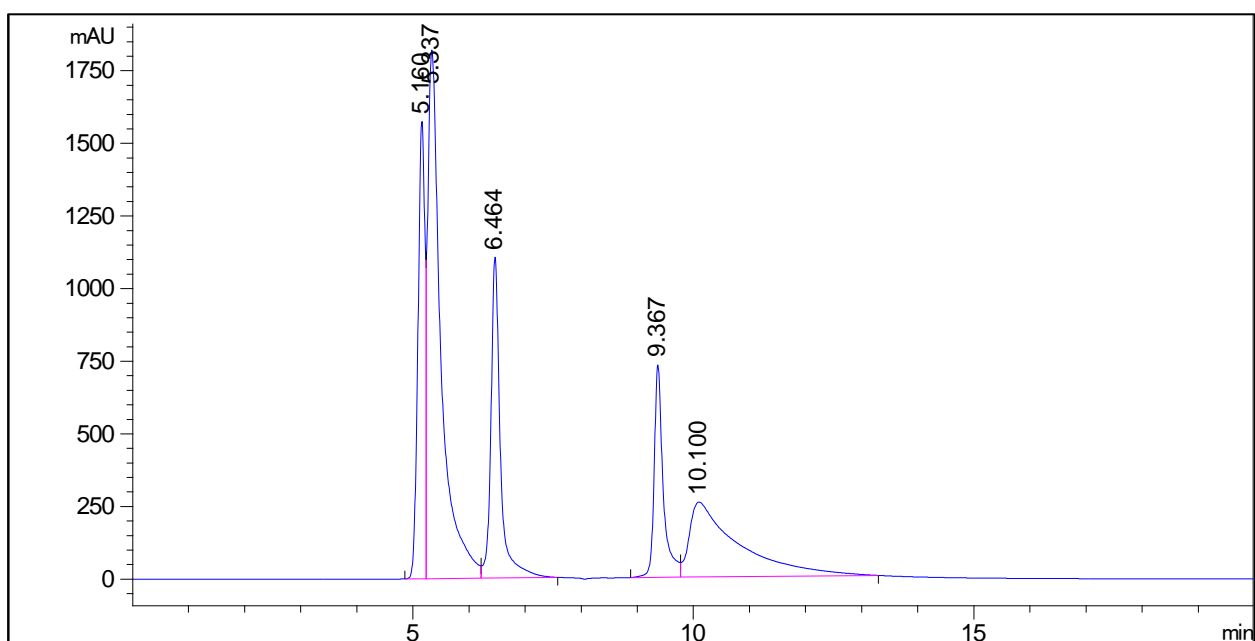
Uzorak	%-Scavenging rate
K. sir, N1	-0.51851512
K. sirutka, F4	3.803973753
Sirutka 2, F3	-7.043546093
Sirutka 3, N	-0.305143854

U ponovljenom eksperimentu, odabrani uzorci, osim uzorka K. sirutka F4, ne pokazuju ponovljivost „%-Scavenging rate“, a niti jedna vrijednost nije viša od 50 %. Bioaktivni peptidi iz 8 početnih uzoraka sira i sirutke te 42 frakcije dobivene nakon kromatografije, ne pokazuju antioksidativno djelovanje.

4.6. ODREĐIVANJE INTAKTNE MASE PROTEINA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM ISKLJUČIVANJA (eng. *Size-Exclusion Chromatography*)

Kako bi se pobliže karakterizirao proteinski profil 8 početnih uzoraka sira i sirutke, provedena je kromatografija isključivanja po veličini, kao što je opisano u poglavlju 3.2.8. Korišteni su standardi poznatih molekulskih masa i bilježena su retencijska vremena pri kojima pojedini proteini eluiraju s kolone.

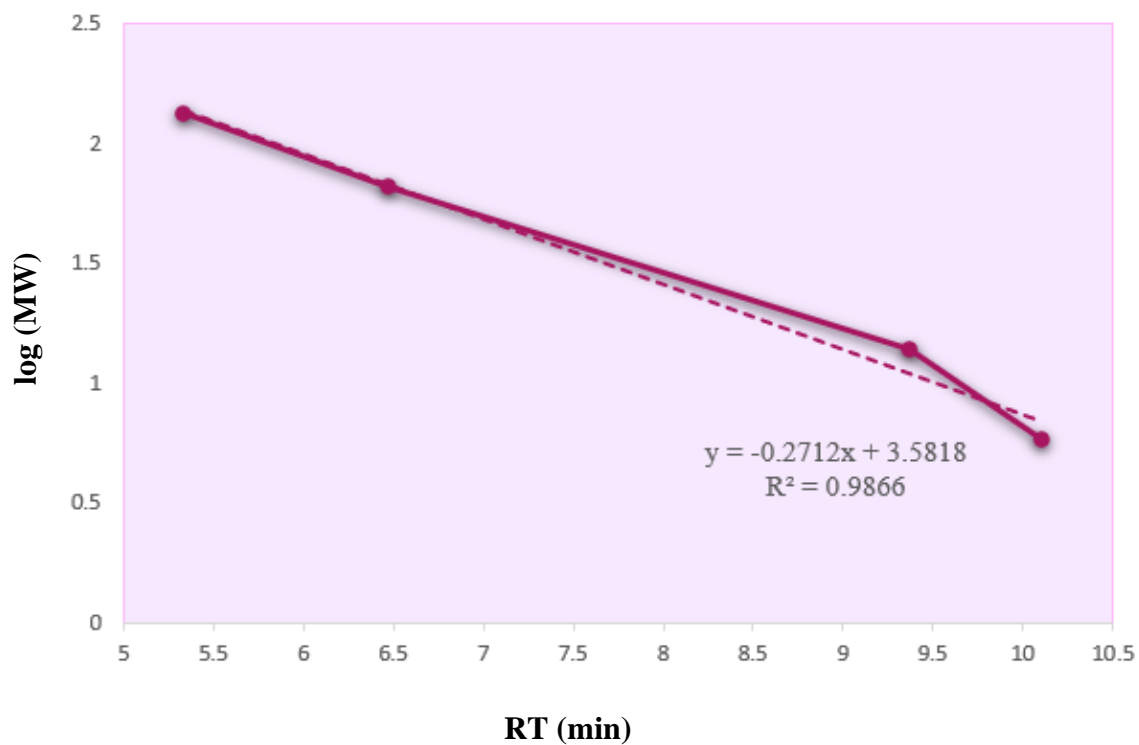
Prvo se analiziraju standardi te se napravi kalibracijska krivulja ovisnosti logaritamske vrijednosti molekulske mase standarada, $\log(MW)$, o vremenu zadržavanja (Slike 19 i 20, Tablica 20). Iz jednadžbe pravca kalibracijske krivulje izračunaju se molekulske mase proteina i peptida nastalih proteolitičkim cijepanjem uslijed djelovanja bakterija mliječne kiseline (BMK). Na Slikama 21a i 21b prikazani su proteinski profili sadržani u smjesi proteina ispitivanih uzoraka.



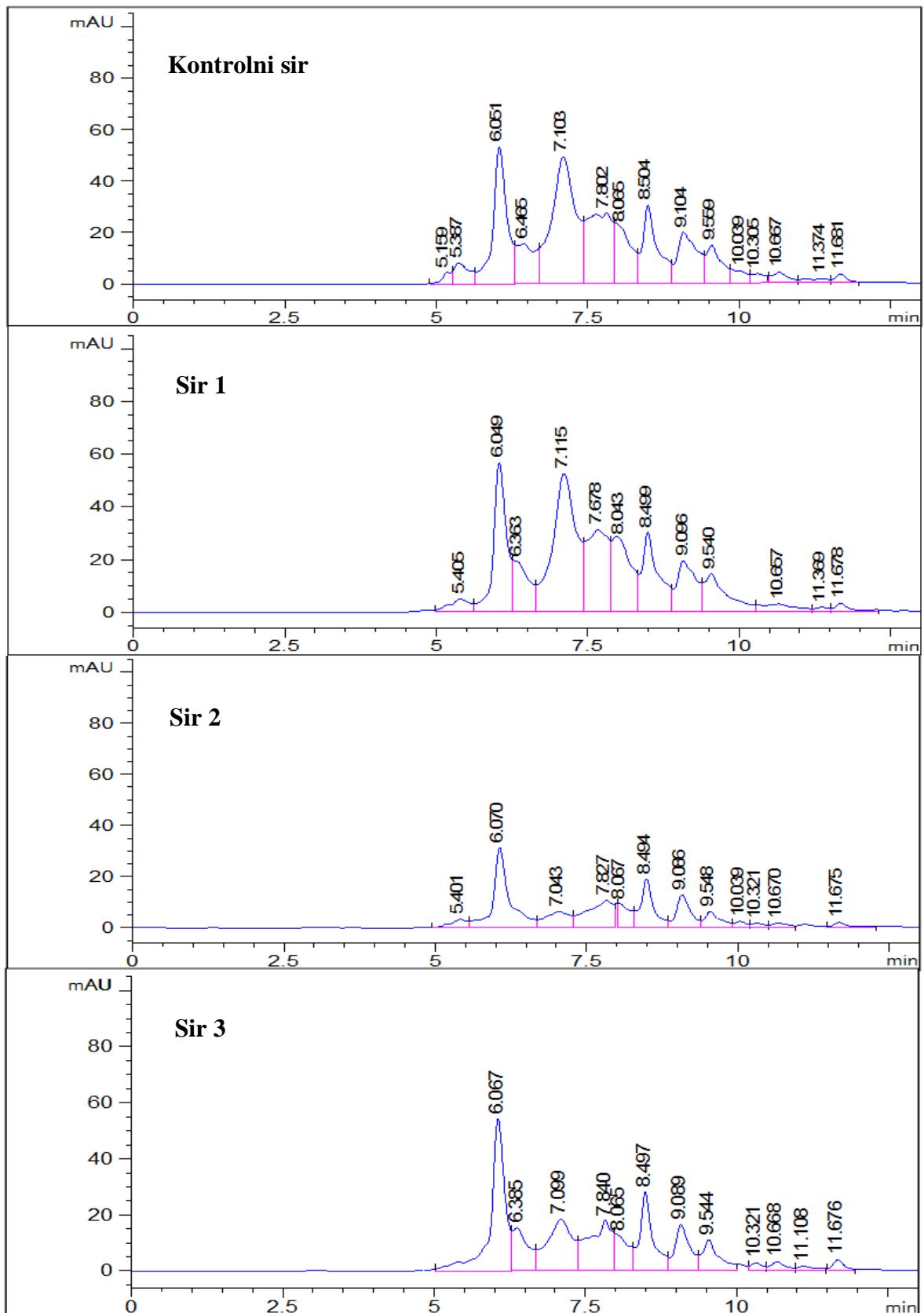
Slika 19. Kromatogram standardne otopine proteina poznatih molekulskih masa

Tablica 20. Standardi poznatih molekularskih masa i njihovo vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni

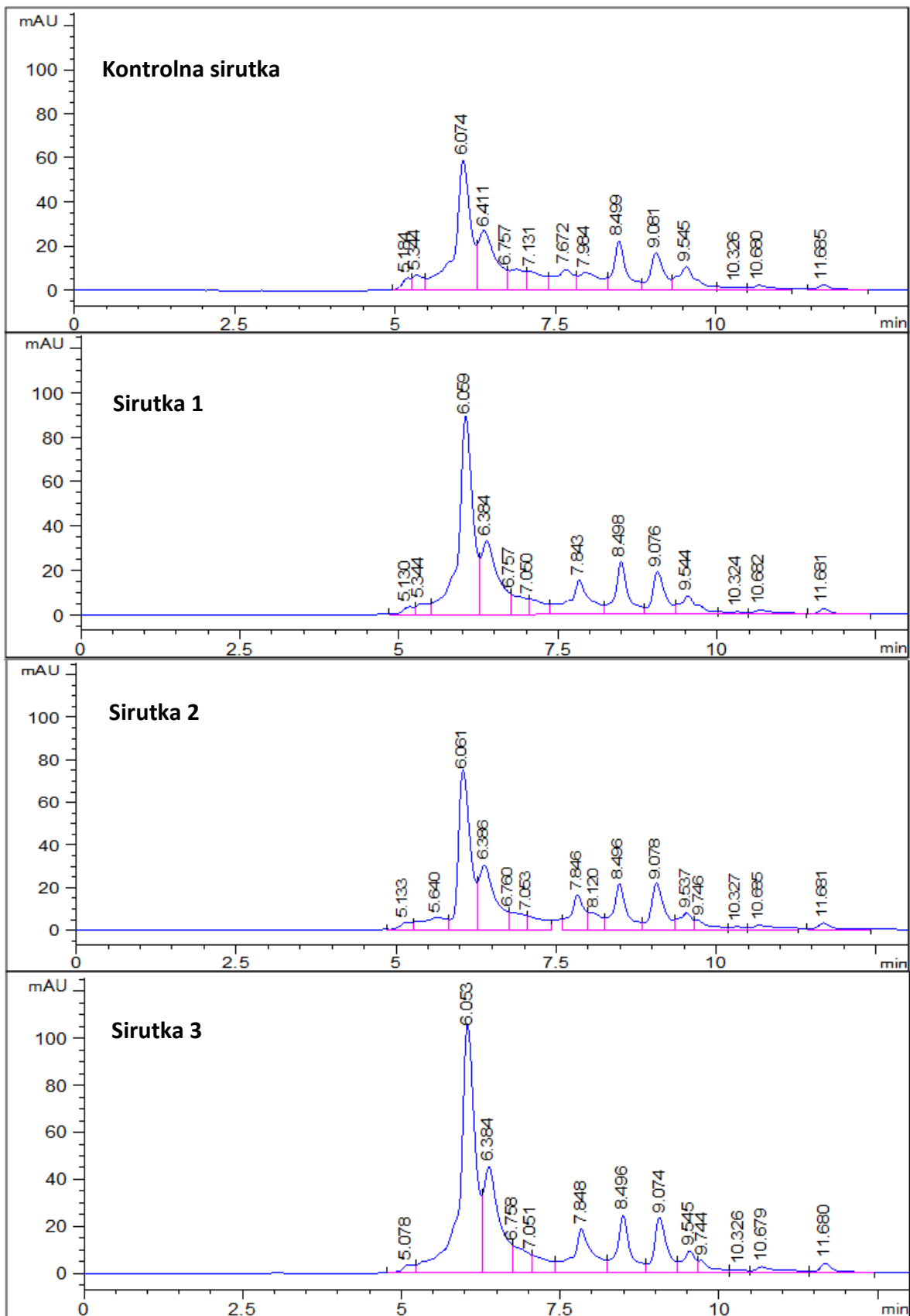
Standard	MW (kDa)	log (MW)	RT (min)
BSA-dimer	133	2,124	5,160
BSA	66,5	1,823	5,337
Rnaza	13,7	1,137	6,464
Inzulin	5,8	0,763	9,367
Vitamin B12	1,4	0,146	10,100



Slika 20. Kalibracijska krivulja ovisnosti log (MW) standarda poznatih molekularskih masa o vremenu zadržavanja (RT)



Slika 21a. Prikaz profila peptida sadržanih u smjesi proteina ispitivanih uzoraka sira



Slika 21b. Prikaz profila peptida sadržanih u smjesi proteina ispitivanih uzoraka sirutke

Usporedbom dobivenih kromatograma, uočen je sličan peptidni profil u svim uzorcima sirutki, dok se među uzorcima sireva vide veće razlike u profilu peptida koji su nastali djelovanjem bakterija mliječne kiseline (BMK).

U uzorcima sireva veći je udio proteina i peptida manje molekulske mase od 2,6-47 MW koji eluiraju s kromatografske kolone između 7-11,7 min. Peptidi s najvećom molekulskom masom od 152,3 MW detektirani su u uzorku Kontrolni sir i eluiraju nakon približno 5,2 min (Slika 21a). Nadalje, vidljivo je da pik koji eluira nakon približno 6,1 min, a odgovara peptidima s molekulskom masom od ~87 MW, manji je u uzorcima sireva nego u uzorcima sirutki.

Gotovo identičan peptidni profil vidljiv je u svim uzorcima sirutki u vremenu elucije između 6,1-11,7 min kada s kromatografske kolone izlaze peptidi s odgovarajućim molekulskim masama u iznosu od 87 MW, 70 MW, 56 MW, 46 MW, 28 MW (s izuzetkom kod uzorka Kontrolna sirutka gdje su vidljiva dva pika koja odgovaraju MW od 32 i 26), 19 MW, 13 MW, 10 MW, 8 MW (pik je prisutan samo u uzorcima Sirutka 2 i Sirutka 3), 6 MW, 5 MW i 2,6 MW. Također, u uzorcima sirutki uočen je veći udio proteina veće molekulske mase od 56-160,2 MW koji eluiraju između 5,1-6,8 min s dominantnim pikom koji eluira nakon približno 6,1 min te odgovara molekulskoj masi od ~87 MW. Peptid s najvećom molekulskom masom od 160,2 MW detektiran je u uzorku Sirutka 3. U uzorcima sirutki manji je udio proteina i peptida manje molekulske mase od 2-47 MW koji eluiraju između 7-11,7 min (Slika 21b).

Mliječni protein kazein ima otvorenu, odnosno slabu sekundarnu i tercijarnu strukturu, pa je podložniji proteolizi od proteina sirutke koji su kompaktni, jer imaju visoki stupanj sekundarne i tercijarne strukture (Korhonen i Pihlanto, 2006). Prema tome, očekivan je veći udio proteina i peptida manjih molekulskih masa u uzorcima sireva, kao i veći udio proteina većih molekulskih masa u uzorcima sirutki.

4.7. NECILJANA ANALIZA PEPTIDA IZ UZORAKA SIRA I SIRUTKE

Nakon provedene analize proteinskih smjesa spregnutim tehnikama tekućinske kromatografije i spektrometrije masa te pretraživanjem SwissProt baze podataka, dobiven je veliki broj peptida, kojima je određen slijed aminokiselina, a potječu prvenstveno iz α_{S1} -kazeina i β -kazeina, cijepanih na različitim mjestima unutar proteina. Kako bi se ustanovilo jesu li za detektirane peptide opisana bioaktivna svojstva u znanstvenoj literaturi, sve identificirane peptidne sekvence uspoređene su sa sekvencama koje su pohranjene u bazi podataka *Milk Bioactive Peptide Database* (MBPD). Peptidi za koje je prethodno ustanovljeno da imaju bioaktivno djelovanje prikazani su u sljedećim tablicama.

4.7.1. ACE-inhibitorni peptidi podrijetlom iz sira i sirutke

Sir se smatra dobrim izvorom antihipertenzivnih peptida, točnije ACE-inhibitornih peptida koji spadaju u najveću i najznačajniju skupinu bioaktivnih peptida podrijetlom iz kazeina. Ovi peptidi nose naziv kazokinini, a u njihovoj tvorbi kao prekursor mogu poslužiti sve kazeinske frakcije (Yamamoto i sur., 1994).

Angiotenzin I-konvertirajući enzim (ACE) se povezuje s reninsko-angiotenzinskim sustavom, koji regulira periferni krvni tlak pa tako inhibicija ovog enzima može uzrokovati antihipertenzijski učinak. ACE je primarna katalitička proteaza koja cijepajući C-terminalni dipeptid angiotenzina I, pretvara angiotenzin I u aktivni oktapeptid angiotenzin II koji je snažan vazokonstriktor. ACE također cijepa C-terminalni dipeptid bradikinina, koji je jak vazodilatator, i na taj ga način inaktivira. ACE-inhibitorni peptidi sprječavaju pretvorbu angiotenzina I u angiotenzin II, kao i razgradnju bradikinina, čime značajno mogu utjecati na snižavanje krvnog tlaka (Robert i sur., 2004). Iako puni mehanizam interakcije između ACE-inhibitornih peptida i ACE-a još uvijek nije razjašnjen, dokazano je da inhibicija aktivnosti ACE-a značajno ovisi o strukturi peptida. Do interakcije dolazi preko C-terminalnog dijela oba sudionika, gdje C-terminalni dio ACE-a preferira hidrofobne (aromatske ili razgranate bočne lance) aminokiselinske ostatke na tri položaja C-terminalnog dijela ACE-inhibitornog peptida (Pihlanto, 2016). To potvrđuje i istraživanje u kojem su Robert i sur. (2004) ispitivali IC_{50} vrijednosti za inhibiciju ACE-a koristeći pritom sintetički tripeptid N-[3-(2-Furil)akriloil]-L-fenilalanilglicilglicin kao supstrat. Rezultati su pokazali da dodavanjem glutaminske kiseline u niz NLHLPLPLL dolazi do povećanja vrijednosti IC_{50} s 15 μ M na 250 μ M, dok dodavanje jednog asparagina u niz ENLLRFFVAPFPEVFG uzrokuje smanjenje IC_{50} vrijednosti s 250 μ M na 55 μ M.

Prikazani bioaktivni peptidi u Tablicama 21a, 21b, 22a, 22b, 23a, 23b, 24, 25a i 25b nastali su u *in vitro* uvjetima djelovanjem kombinacije različitih autohtonih izolata bakterija mliječne kiseline pri proizvodnji sira i zaostale sirutke.

Tablica 21a. Peptidi iz uzoraka sireva čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je utvrđeno i u literaturi opisano **ACE-inhibitorno** djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interval AK (prema izvoru)
Sir 1	α_{S1} -kazein	FVAPFPEVFG	39-48	1109,5803	Robert i sur. (2004)	39-48
	β -kazein	RDMPIQAF	198-205	977,5109	Yamamoto i sur. (1994)	198-205
		LLYQEPVLPVVRGPFPIIV	206-224	2107,2312	Yamamoto i sur. (1994)	206-224
		YQEPVLPVVRGPFPIIV	208-224	1881,0983	Yamamoto i sur. (1994)	208-224
		QEPVLPVVRGPFPIIV	209-224	1718,0264	Lu i sur. (2016)	209-224
Sir 2	β -kazein	YQEPVLPVVRGPFPIIV	208-224	1881,0586	Yamamoto i sur. (1994)	208-224
		QEPVLPVVRGPFPIIV	209-224	1718,0177	Lu i sur. (2016)	209-224
		VYPPFGPIP	74-83	1100,5621	Eisele i sur. (2013)	74-83
Sir 3	β -kazein	YQEPVLPVVRGPFPIIV	208-224	1881,0902	Yamamoto i sur. (1994)	208-224
		QEPVLPVVRGPFPIIV	209-224	1718,0286	Lu i sur. (2016)	209-224

U Tablici 21a prikazani su svi identificirani ACE-inhibitorni peptidi iz sireva. Pronađeno je deset peptida iz različitih uzoraka sireva koji u potpunosti odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, za koje je utvrđeno i u literaturi opisano ACE-inhibitorno djelovanje. Za te peptide može se pretpostaviti da iskazuju ACE-inhibitorni učinak.

Tablica 21b. Peptidi iz uzoraka sirutki čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je utvrđeno i u literaturi opisano ACE-inhibitorno djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interval AK (prema izvoru)
Sirutka 1	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,1181	Yamamoto i sur. (1994)	208-224
		QEPVLGPVRGPFPIIV	209-224	1718,0555	Lu i sur. (2016)	209-224
Sirutka 2	β- kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0778	Yamamoto i sur. (1994)	208-224
		QEPVLGPVRGPFPIIV	209-224	1718,0310	Lu i sur. (2016)	209-224
		YPFPGIPN	75-83	1001,5295	Saito i sur. (2000)	75-83
Sirutka 3	β- kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,1274	Yamamoto i sur. (1994)	208-224
		QEPVLGPVRGPFPIIV	209-224	1718,0612	Lu i sur. (2016)	209-224

Tablica 21b daje prikaz svih identificiranih ACE-inhibitornih peptida iz sirutki. Pronađeno je nekoliko peptida koji svojom sekvencom i položajem unutar proteina u potpunosti odgovaraju bioaktivnim peptidima s opisanim ACE-inhibitornim djelovanjem. Može se pretpostaviti da ti peptidi iskazuju ACE-inhibitorni učinak, a kako bi se to sa sigurnošću utvrdilo, potrebno je provesti dodatna istraživanja. Usporedbom identificiranih peptida s potencijalnim ACE-inhibitornim učinkom iz svih uzoraka sireva i sirutki, vidljivo je da se svi peptidi pronađeni u sirutkama nalaze i u sirevima, s izuzetkom peptida YPFPGIPN pronađenog u uzorku Sirutka 2, koji u uzorku Sir 2 sadrži jednu aminokiselinu više, YPFPGIPN.

Neki od ACE-inhibitornih peptida mogu se proteolitički razgraditi na manje, inaktivne fragmente pomoću proteinaza i peptidaza koje oslobađaju bakterije mliječne kiseline prilikom proizvodnje sira. U nekim slučajevima hidrolizom ACE-inhibitornih peptida nastaje druga vrsta bioaktivnih peptida. Saito i sur. (2000) navode da ACE-inhibitorni peptid YPFPGIHN, dobiven iz β-kazeina, može razgraditi staničnim zidom vezana proteinaza X-prolil-dipeptidil aminopeptidaza iz *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* u YP i FPGIHN.

Novonastali peptid FPGPIHN dalje se može razgraditi aminopeptidazom P kako bi se uklonila N-terminalna aminokiselina, što rezultira nastankom slobodne aminokiseline Phe i peptida PGPIHN koji pokazuje imunomodulatorno djelovanje.

4.7.2. Imunomodulatorni peptidi podrijetlom iz sira i sirutke

Sve je veći interes za proučavanjem odnosa između prehrane i imuniteta budući da mliječne komponente mogu imati regulatornu ulogu u razvoju imunološkog sustava. Važnu skupinu imunomodulatornih peptida čine peptidi podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke, a svoj učinak iskazuju vezanjem na specifični receptor čime potiču imunološki odgovor te tako djeluju na određene funkcije ciljanih stanica (Reyes-Diaz i sur., 2017).

Poznato je da mlijeko sadrži razne biološke tvari poput imunoglobulina, enzima i faktora rasta koji u dječjoj dobi pružaju imunitet i štite od infekcija. Također, smatra se da su određeni faktori iz mlijeka uključeni u imunološke mehanizme povezane s imunotolerancijom i intolerancijom na hranu, a nedavno je otkriveno da peptidi dobiveni iz β -kazeina stimuliraju fagocitozu djelovanjem makrofaga. Zanimljivo je da su ti peptidi u proteinu locirani na mjestu gdje su identificirani i β -kazomorfini, peptidi s opioidnom aktivnošću (Coste i sur., 1992).

Tablica 22a. Peptidi iz uzoraka sireva čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je utvrđeno i u literaturi opisano **imunomodulatorno** djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interva l AK (prema izvoru)
Sir 1	β -kazein	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	207-224	1994,1832	Coste i sur. (1992)	207-224
		YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0983	Sandré i sur. (2001)	208-224
Sir 2	β -kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0586	Coste i sur. (1992)	208-224
Sir 3	α_{S1} -kazein	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF	16-38	2763,5295	Lahov i Regelson (1996)	16-38
	β -kazein	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	207-224	1994,1832	Coste i sur. (1992)	207-224
		YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0902	Sandré i sur. (2001)	208-224

U Tablici 22a prikazani su svi identificirani imunomodulatorni peptidi iz sireva. Za tih 6 pronađenih peptida iz uzoraka sireva može se pretpostaviti da iskazuju imunomodulatorni učinak, budući da u potpunosti odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka za koje je već ranije dokazano i u literaturi opisano imunomodulatorno djelovanje.

Tablica 22b. Peptidi iz uzoraka sirutke čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je utvrđeno i u literaturi opisano **imunomodulatorno** djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interval AK (prema izvoru)
Sirutka 1	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,1181	Sandré i sur. (2001)	208-224
Sirutka 2	β- kazein	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	207-224	1994,1680	Coste i sur. (1992)	207-224
		YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0778	Sandré i sur. (2001)	208-224
Sirutka 3	β- kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,1274	Lavoh i Regelson (1996)	208-224

Tablica 22b prikazuje identificirane imunomodulatorne proteine podrijetlom iz sirutke. Peptidi pronađeni u uzorcima sirutke, nalaze se i u uzorcima sireva. U uzorku Sir 3 pronađen je peptid koji se ne nalazi niti u jednom uzorku sirutke, RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF, za kojeg je ranije utvrđeno i u literaturi opisano imunomodulatorno djelovanje (Lahov i Regelson, 1996).

4.7.3. Antitrombotični peptidi podrijetlom iz sira i sirutke

Osim ACE-inhibitornih peptida, na kardiovaskularni sustav djeluju i peptidi s antitrombotičnim djelovanjem. U istraživanju koje su proveli Rojas-Ronquillo i sur. (2012) ispitana je ACE-inhibitorna i antitrombotična aktivnost u mlijeku fermentiranom zasebno sojevima *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus casei Shirota*. Dok mlijeko fermentirano sojem *Streptococcus thermophilus* ne iskazuje antitrombotičnu aktivnost, iz mlijeka fermentiranog sojem *Lactobacillus casei Shirota* izoliran je i identificiran peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV koji osim ranije utvrđene ACE-inhibitorne aktivnosti ima utvrđenu potencijalnu antitrombotičnu aktivnost. Isti peptid pronađen je i u svim uzorcima sireva korištenim u eksperimentu.

Tablica 23a. Peptidi iz uzoraka sireva čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je utvrđeno i u literaturi opisano **antitrombotično** djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interval AK (prema izvoru)
Sir 1	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0983	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)	208-224
Sir 2	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0586	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)	208-224
Sir 3	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0902	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)	208-224

Iz Tablice 23a vidljivo je da je u svim uzorcima sireva pronađen isti peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV. Rojas- Ronquillo i sur. (2012) su u svojem istraživanju dokazali da spomenuti peptid ima antitrombotično djelovanje.

Tablica 23b. Peptidi iz uzoraka sirutki čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je utvrđeno i u literaturi opisano **antitrombotično** djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interval AK (prema izvoru)
Sirutka 1	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	243-259	1881,1181	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)	208-224
Sirutka 2	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	243-259	1881,0778	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)	208-224
Sirutka 3	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	243-259	1881,1274	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)	208-224

Peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV pronađen je i u svim uzorcima sirutki korištenim u eksperimentu. To je ujedno jedini peptid koji je identificiran u uzorcima sireva i sirutki, a da odgovara bioaktivnim peptidima iz baze podataka, za koje je ranije utvrđeno i opisano antitrombotično djelovanje.

4.7.4. Antioksidativni peptidi podrijetlom iz sira i sirutke

Antioksidativni peptidi mogu biti podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke, a u ovom eksperimentalnom radu pronađen je samo jedan peptid s potencijalnim učinkom uklanjanja slobodnih radikala: β -CN f(74-83) izoliran i identificiran iz uzorka Sir 2 iz proteina β -kazeina.

Tablica 24. Peptid iz uzorka sira čije aminokiselinska sekvenca odgovara bioaktivnom peptidu iz baze podataka, a za koji je utvrđeno i u literaturi opisano **antioksidativno** djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interval AK (prema izvoru)
Sir 2	β -kazein	VYFPFGPIP	74-83	1100,5621	Eisele i sur. (2013)	74-83

Eisele i sur. (2013) navode da peptid VYFPFGPIP iskazuje antioksidativni učinak u *in vitro* uvjetima, ali je za daljnju potvrdu o stvarnom učinku na humani organizam potrebno provesti dodatna istraživanja u *in vivo* uvjetima na humanom modelu.

U ovom eksperimentu, provedeno je ispitivanje antioksidativne aktivnosti bioaktivnih peptida izoliranih iz 8 početnih uzoraka sira i sirutke i kao što je prikazano u poglavlju 4.5, nije dokazano antioksidativno djelovanje peptida. Budući da je peptid s potencijalnim antioksidativnim djelovanjem identificiran u uzorku Sir 2, trebala bi se provesti dodatna istraživanja za utvrđivanje antioksidativne aktivnosti navedenog uzorka.

4.7.5. Antimikrobni peptidi podrijetlom iz sira i sirutke

Dosadašnja istraživanja opisuju izolaciju i karakterizaciju tri peptida s antimikrobnom aktivnošću podrijetlom iz svježeg goveđeg kolostruma: kazecidin 17, YQEPVLGPVRGPFPIV [β -CN f(193-209)]; kazecidin 15, YQEPVLGPVRGPFPI [β -CN f(193-207)] i izracidin, RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF [α _{S1}-CN f(16-38)]. Kazecidini pripadaju skupini pozitivno nabijenih, glikoliziranih peptida visoke molekularne mase, a oslobađaju se digestijom s kimozinom, kao i izracidin. Izracidin ima širok spektar djelovanja na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. U koncentraciji između 0,1 i 1 mg mL⁻¹ iskazuje antimikrobno djelovanje na različite gram-pozitivne bakterije *in vitro* (Lahov i Regelson, 1996).

U istraživanju kojeg su proveli Birkemo i sur. (2009) ispitano je antimikrobno djelovanje tri spomenuta peptida na mikroorganizme *Enterobacter sakazakii* i *Escherichia coli*. Unatoč otkriću ovih peptida s potencijalnim antimikrobnim djelovanjem, Birkemo i sur. (2009) navode kako ispitivani peptidi vjerojatno nemaju direktnu ulogu u sprječavanju kontaminacije patogenima, već imaju zaštitnu ulogu budući da djeluju sinergistički s drugim antimikrobnim komponentama iz goveđeg kolostruma. Zaključno, oba kazecidina 17 i 15 pružaju osnovu za dizajn novih antimikrobnih peptida u budućnosti.

U poglavlju 4.3. prikazani su rezultati provedene antibiogram metode za ispitivanje antimikrobne aktivnosti bioaktivnih peptida izoliranih iz sira i sirutke na patogenim mikroorganizmima *E. coli* i *K. pneumoniae*. Iako antimikrobno djelovanje u eksperimentu nije dokazano, u uzorcima sira i sirutke identificirani su peptidi s potencijalnim antimikrobnim djelovanjem i prikazani su u Tablicama 25a i 25b.

Tablica 25a. Peptidi iz uzoraka sireva čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je utvrđeno i u literaturi opisano **antimikrobno** djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interval AK (prema izvoru)
Sir 1	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPI	206-220	1668,9003	Almaas i sur. (2011)	206-220
		YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0983	Birkemo i sur. (2009)	208-224
Sir 2	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0586	Birkemo i sur. (2009)	208-224
Sir 3	α _{S1} - kazein	RPKHPIKHQGLPQEVN NENLLRF	16-38	2763,5295	Birkemo i sur. (2009)	16-38
		LRLKKYKVPQL	114-124	1385,9211	McCann i sur. (2006)	114-124
	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0902	Birkemo i sur. (2009)	208-224

U Tablici 25a prikazani su svi identificirani peptidi iz sireva čije sekvence odgovaraju sekvencama bioaktivnih peptida s ranije opisanim antimikrobnim djelovanjem. U svakom uzorku sira pronađen je peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV, dok su u uzorcima Sir 1 i Sir 3 pronađeni i drugi peptidi s potencijalnim antimikrobnim učinkom.

Tablica 25b. Peptidi iz uzoraka sirutki čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je utvrđeno i u literaturi opisano **antimikrobno** djelovanje

Uzorak	Protein	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Izvor	Interval AK (prema izvoru)
Sirutka 1	β-kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,1181	Birkemo i sur. (2009)	208-224
Sirutka 2	β- kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0778	Birkemo i sur. (2009)	208-224
Sirutka 3	α _{S1} -kazein	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF	16-38	2763,5483	Birkemo i sur. (2009)	16-38
	β- kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,1274	Birkemo i sur. (2009)	208-224

U Tablici 25b prikazani su peptidi s potencijalnim antimikrobnim djelovanjem pronađenim u uzorcima sirutki. Svi ti peptidi pronađeni su i u uzorcima sireva.

Pored svih bioaktivnih peptida identificiranih u siru i sirutki, kod uzorka Sirutka 3 pronađen je i peptid YPFPGIPN iz proteina β-kazeina, molekulske mase 1001,5295, koji u potpunosti odgovara bioaktivnom peptidu s ranije utvrđenim i u literaturi opisanom DPP-IV inhibitornim učinkom (Uenishi i sur., 2012). Dipeptidil-peptidaza IV je prolin-specifična proteaza koja cijepa dvije aminokiseline s N-terminalnog dijela proteinskog lanca s prolinom ili alaninom na preposljednjem mjestu. Kako mnogi biološki aktivni peptidi poput citokina, kemokina, faktora rasta i neuropeptida imaju evolucijski očuvani prolin ili alanin na preposljednjem mjestu u proteinskom lancu, upravo oni predstavljaju potencijalne supstrate DPP-IV. Stoga, vidljivo je kako DPP-IV ima vrlo važnu ulogu u moduliranju aktivnosti mnogih biološki aktivnih peptida (Boonacker i sur., 2003). Berger i sur. (2018) dokazali su u svojem istraživanju kako svi inhibitori DPP-IV dijele zajedničko vezujuće mjesto u interakciji s DPP-IV, bez obzira na to što se međusobno razlikuju u strukturi, ali se razlikuju u sposobnosti inhibicije aktivnosti ove molekule.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je kod svakog uzorka pronađeno nekoliko sekvenci koje se u potpunosti preklapaju sa sekvencama bioaktivnih peptida iz baze podataka „*Milk Bioactive Peptide Database*“. Zanimljivo je uočiti da je u svakom uzorku pronađena sekvenca YQEPVLGPVRGPFPIIV koja odgovara bioaktivnom peptidu s imunomodulatornim, antimikrobnim, antitrombotskim i ACE-inhibitornim djelovanjem te sekvenca QEPVLGPVRGPFPIIV koja odgovara bioaktivnom peptidu s ACE-inhibitornim djelovanjem.

Nadalje, sekvenca RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF pronađena u uzorcima Sir 3 i Sirutka 3 odgovara bioaktivnom peptidu s antimikrobnim djelovanjem. Kod uzoraka Sir 1, Sir 3 i Sirutka 2 pronađena je sekvenca LYQEPVLGPVRGPFPIIV koja odgovara bioaktivnom peptidu s imunomodulatornim djelovanjem. Navedena sekvenca LYQEPVLGPVRGPFPIIV, koja odgovara peptidu s imunomodulatornim djelovanjem, se od ranije spomenute sekvence YQEPVLGPVRGPFPIIV, koja odgovara peptidu s imunomodulatornim, antimikrobnim, antitrombotskim i ACE-inhibitorskim djelovanjem, razlikuje samo u jednoj aminokiselini, a biološko djelovanje peptida nije jednako, što govori o važnosti slijeda aminokiselina u peptidu odnosno proteinu. Ostale sekvence specifične su za pojedini uzorak i nisu pronađene u drugim ispitanim uzorcima.

4.8. PROTEOMSKA ANALIZA UZORKA S POTENCIJALNOM ANTIOKSIDATIVNOM AKTIVNOŠĆU

Uzorak „Kontrolna sirutka, F4“ dobiven nakon kromatografske separacije opisane u poglavlju 3.2.6., uzet je za proteomsku analizu budući da je u ponovljenom eksperimentu određivanja antioksidativne aktivnosti pokazao bolje antioksidativno djelovanje od ostalih uzoraka. LC-MS/MS (engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) analiza opisana u poglavlju 3.2.9. korištena je za identifikaciju peptida u uzorku, a identificirani peptidi iz uzorka „Kontrolna sirutka, F4“ prikazani su u Tablici 26.

Tablica 26. Identificirani peptidi iz uzorka „Kontrolna sirutka, F4“ nakon proteomske analize

Sekvenca peptida
PNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMI
EELNVPGEIVESLSSEESITRINK
MKVLILACLVALALARELE
DKIHPFAQTQSLVYPPFG
CLVALALARELEELN

Sekvence peptida iz Tablice 26 ne odgovaraju bioaktivnim peptidima pohranjenim u MBPD bazi podataka. Međutim, postoji mogućnost da se korištenim eksperimentalnim pristupom otkriju novi, do sada neopisani peptidi s bioaktivnim djelovanjem.

Biološka aktivnost bioaktivnih peptida podrijetlom iz sira i sirutke istražena je u mnogim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima korištenjem animalnih i humanih modela. Ipak, značajno veći dio istraživanja proveden je u *in vitro* uvjetima, dok je dio istraživanja provedenih u *in vivo* uvjetima stavio naglasak na korištenje animalnog modela. Stoga, potencijalni i dokazani učinak mnogih spomenutih bioaktivnih peptida na zdravlje čovjeka treba biti dodatno istraženo.

Mnogi od navedenih peptida izoliranih iz kazeina ili proteina sirutke mogu imati više potencijalnih ili dokazanih bioloških funkcija odjednom, a često puta je teško utvrditi koja funkcija se smatra najvažnijom. Budući da je u kravljem mlijeku prisutna raznolikost bioaktivnih peptida, mlijeko se smatra najvažnijim izvorom prirodnih bioaktivnih komponenti (Park i Nam, 2015).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Rezultati provedene antibiogram metode pokazuju da bioaktivni peptidi izolirani iz početnih 8 uzoraka sira i sirutke ne iskazuju antimikrobni učinak na ispitivane patogene mikroorganizme, *E. coli* i *K. pneumoniae*.

2. Provedenom DPPH metodom ustanovljeno je da bioaktivni peptidi iz početnih 8 uzoraka sira i sirutke te 42 frakcije dobivene nakon kromatografije, ne pokazuju antioksidativni učinak.

3. Iako u eksperimentu nije dokazano antimikrobno i antioksidativno djelovanje bioaktivnih peptida izoliranih iz uzoraka sira i sirutke, neciljanom analizom proteina identificirani su bioaktivni peptidi čije aminokiselinske sekvence odgovaraju bioaktivnim peptidima iz baze podataka, a za koje je ranije utvrđeno i u literaturi opisano:

- ✚ ACE-inhibitorno djelovanje,
- ✚ Imunomodulatorno djelovanje,
- ✚ Antitrombotično djelovanje,
- ✚ Antioksidativno djelovanje,
- ✚ Antimikrobno djelovanje.

4. Iz svega navedenog može se zaključiti da iako rezultati ovog eksperimenta nisu potvrdili rezultate dosadašnjih istraživanja o bioaktivnom djelovanju mliječnih proteina, postoji mogućnost da se korištenim eksperimentalnim pristupom otkriju novi, do sada neopisani peptidi s bioaktivnim djelovanjem. Kako bi se dokazao stvarni učinak mnogih spomenutih bioaktivnih peptida na zdravlje čovjeka, potrebno je provesti daljnja istraživanja.

6. LITERATURA

Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q., Imran, M. (2010) *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview. *Afr. J. Biotechnol.* **9**, 2843–2850.

Akuzawa, R., Miura, T., Kawakami, H. (2009) Bioactive Components in Caseins, Caseinates, and Cheeses. U: Bioactive Components in Milk and Dairy Products, (Park, Y. W., ured.), Wiley-Blackwell, Iowa, SAD, str. 215-233.

Alichanidis, E., Polychroniadou, A. (1995) Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. U: Production and utilization of ewe and goat milk, FIL-IDF, Grčka, str. 21-43.

Almaas, H., Eriksen, E., Sekse, C., Comi, I., Flengsrud, R., Holm, H., Jensen, E., Jacobsen, M., Langsrud, T., Vegarud, G. E. (2011) Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *Br. J. Nutr.* **106**, 896-905.

Andrén, A. (2002) Rennets and coagulants. U: Encyclopaedia of Dairy Sciences, (Roginski, H. I sur., ured.), Academic Press, London, str. 281-286.

Anonymous (2020) Quant-iT™ Protein Assay Kit, <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FQuant_iT_Protein_Assay_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUXVhbnQtaVQgUHJvdGVpbiBBc3NheSBLaXQ=>>. Pristupljeno 10. travnja 2020.

Bali, V., Panesar, P. S., Bera, M. B. (2014) Potential of immobilization technology in bacteriocin production and antimicrobial packaging. *Food. Res. Int.* **30**, 244–263.

Baptista, D. P., Galli, B. D., Cavalheiro, F. G., Negrão, F., Eberlin, M. N., Gigante, M. L. (2018) *Lactobacillus helveticus* LH-B02 favours the release of bioactive peptide during Prato cheese ripening. *Int. Dairy J.* **87**, 75-83.

Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Džidara, P., Šušković, J. (2013) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe.* **20**, 58-64.

Berger, J. P., SinhaRoy, R., Poci, A., Kelly, T. M., Scapin, G., Gao, Y-D., Pryor, K. A. D., Wu, J. K., Eiermann, G. J., Xu, S. S., Zhang, X., Tatosian, D. A., Weber, A. E., Thornberry, N. A., Carr, R. D. (2018) A comparative study of the binding properties, dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity and glucose-lowering efficacy of the DPP-4 inhibitors alogliptin, linagliptin, saxagliptin, sitagliptin and vildagliptin in mice. *Endocrinol. Diab. Metab.* **2**, 1-8.

Birkemo, G. A., O'Sullivan, O., Ross, R. P., Hill, C. (2009) Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 233-240.

Boonacker, E., Van Noorden, C. J. (2003) The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 53-73.

- Bosnić, P. (2003) Svjetska proizvodnja i kvaliteta kravljeg mlijeka. *Mljekarstvo* **53**, 37-50.
- Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, *Priručnik*, (Ranić, I., ured.), Plejada d.o.o., Zagreb.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.
- Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L. (1994) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Apl. Environ Microbiol.* **60**, 3914-3919.
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., Anand, S. (2012) Bioactive peptides in dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* **65**, 1-12.
- Coghlan, A. (1996) Slime city. *New. Sci.* **2045**, 32–36.
- Coste, M., Rochet, V., Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S., Tomé, D. (1992) Identification of C-terminal peptides of bovine β -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunol. Lett.* **33**, 41-46.
- Damodaran, S. (1997) Food proteins: an overview. U: Food Proteins and their Applications, (Damadoran, S., Paraf, A., ured.), Marcel Dekker Inc, New York, str. 1-24.
- De Vuyst, L., Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Microbiol. Rev.* **23**, 153-177.
- De Wit, J. N. (1998) Nutritional and functional characteristics of whey protein in food products. *J. Dairy Sci.* **81**, 597-608.
- Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B., Fischer, L. (2013) Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using *Bacillus lentus* alkaline peptidase. *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 483-490.
- Gobbetti, M., Minervini F., Rizzello, C. G. (2004) Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* **57**, 173-188.
- Griffiths M. W., Tellez, A. M. (2013) *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Front. Microbiol.* **4**, 1-9.
- Hallén, E. (2008) Coagulation Properties of Milk, Association with Milk Protein Composition and Genetic Polymorphism, (doktorska disertacija), Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Johnson, J. L., Phelps, C. F., Cummins, C. S., London, J., Gasser, F. (1980) Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 53–68.

- Kalenić, S., Bedenić, B., Bošnjak, Z. (2013) Enterobakterije. U: Medicinska mikrobiologija (Kalenić i sur., ured.), Medicinska naklada, str. 182-197.
- Katzung, B. G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (2011) Temeljna i klinička farmakologija, Medicinska naklada, Zagreb, str. 774-898.
- Kedare, S. B., Singh, R. P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 412-422.
- Kongo, J. M. (2013) Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. U: Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, (Kongo, J. M., ured.), IntechOpen, str. 4-19.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2007) Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Curr. Pharm. Des.*, **13**, 829-843.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006) Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* **16**, 945-960.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A. (2004) Milk-derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion U: Handbook of functional dairy products, (Shortt, C., O'Brien, J., ured.), CRC Press, Florida, USA, str. 109-124.
- Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Lahov, E., Regelson, W. (1996) Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* **34**, 131-145.
- Lu, Y., Govindasamy-Lucey, S., Lucey, J. A. (2016) Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *J. Dairy Sci.* **99**, 41-52.
- Lukač Havranek, J. (1995) Autohtoni sirevi Hrvatske. *Mljekarstvo.* **45**, 19-37.
- Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2010) *Invited review*: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Int. J. Dairy Sci.* **93**, 437-455.
- Mann, B., Athira, S., Sharma, R., Kumar, R., Sarkar, P. (2019) Bioactive Peptides from Whey Proteins. U: Whey Proteins, (Deeth, C. H., Bansal, N., ured.), Academic Press, str. 519-547.
- Marinculić, A., Habrun, B., Barbić, Lj., Beck, R. (2009) Biološke opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu, Osijek.
- McCann, K. B., Shiell, B. J., Michalski, W. P., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., Coventry, M. J. (2006) Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{S1} -casein. *Int. Dairy J.* **16**, 316-323.

- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P. S. (2016) Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review. *Saudi J. Biol. Sci.* **23**, 577-583.
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P. S. (2015) Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review, *Saudi J Biol. Sci.* str. 1-7.
- Okoh, S. O., Asekun, O. T., Familoni, O. B., Afolayan, A. J. (2014) Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacity of Seed and Shell Essential Oils Extracted from *Abrus precatorius* (L). *Antioxidants*. **3**, 278-287.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., Soccol, C. R. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Tech.* **50**, 512-542.
- Park, Y. W., Nam, M. S. (2015) Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **35**, 831-840.
- Park, Y. W. (2009) Bioactive Components in Goat Milk. U: Bioactive Components in Milk and Dairy Products, (Park, Y. W., ured.), Wiley-Blackwell, Iowa, SAD.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F. W. (2007) Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **68**, 88-113.
- Pause, B., Lembke, J. (1993) Comparative examination of anticaries effect of cheese. *Milchwissenschaft*. **48**, 137-141.
- Pihlanto, A. (2016) Milk Proteins: Bioactive Peptides. U: Encyclopedia of Dairy Sciences, (Fuquay, J. W., ured.), Academic Press, str. 879-886.
- Pihlanto, A. (2011) Bioactive Peptides. U: Milk Proteins Products, (Fuquay, J., W., ured.), Academic Press, str. 879-886.
- Recio, I., Fuente, M. A., Juárez, M., Ramos, M. (2009) Bioactive Components in Sheep Milk. U: Bioactive Components in Milk and Dairy Products, (Park, Y. W., ured.), Wiley-Blackwell, Iowa, SAD.
- Reyes-Díaz, A., González-Córdova, A. F., Hernández-Mendoza, A., Reyes-Díaz, R., Vallejo-Cordoba, B. (2017) Immunomodulation by hydrolysates and peptides derived from milk proteins. *Int. J. Dairy Technol.* **70**, 1-9.
- Robert, M.-C., Razaname, A., Mutter, M., Juillerat, M. A. (2004) Identification of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Sodium Caseinate Hydrolysates Produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6923-6931.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., García-Garibay, M. (2012) Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy J.* **26**, 147-154.

- Rollema, H. S. (1992) Casein Association and Micelle Formation. U: *Advanced Dairy Chemistry*, (Fox, P., F., ured.), Elsevier Science Publication, Ltd., UK, str. 63-140.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. (2000) Isolation and Structural Analysis of Antihypertensive Peptides That exist Naturally in Gouda Cheese. *J. Dairy Sci.* **83**, 1434-1440.
- Samaržija, D. (2015) Fermentirana mlijeka, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 413.
- Sandré, C., Gleizes, A., Forestier, F., Gorges-Kergot, R., Chilmoczyk, S., Léonil, J., Moreau, M.-C., Labarre, C. (2001) A Peptide Derived from Bovine β -Casein Modulates Functional Properties of Bone Marrow-Derived Macrophages from Germfree and Human Flora-Associated Mice. *J. Nutr.* **131**, 2936-2942.
- Sára, M., Sleytr, U. B. (2000) S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 859–868.
- Schlimme, E., Meisel, H. (1995) Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung.* **39**, 1-20.
- Silva, S. V., Malcata, F. X. (2005) Caseins as source of bioactive peptides. *Int. Dairy J.* **15**, 1-15.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Stanley, R. C. (2014) Fundamentals of analytical chemistry, 9. izd., Brooks/Cole, Belmont, str. 802-814.
- Sleytr, U. B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B. (2001) Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog. Surf. Sci.* **68**, 231–278.
- Sutherland, I. W. (2002) A sticky business. Microbial exopolysaccharides: current products and future trends. *Microbiol. Today* **29**, 70-1.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K. (2010) Antimicrobial Activity - the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 296-307.
- Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 23-69.
- Tratnik, Lj. (2003) Uloga sirutke u proizvodnji funkcionalne mliječne hrane. *Mljekarstvo* **53**, 325-352.
- Tratnik, Lj. (1998) Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija, U: Hrvatska mljekarska udruga, (Volarić, V., ured.), Zagreb, str. 390.
- Uenishi, H., Kabuki, T., Seto, Y., Serizawa, A., Nakajima, H. (2012) Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *Int. Dairy J.* **22**, 24-30.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994) Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* **77**, 917-922.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Katarina Brajković