

# Karakterizacija proteolitičke aktivnosti sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

---

El Khalifa, Dina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:840889>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Dina El Khalifa  
0058216875**

**Karakterizacija proteolitičke aktivnosti sojeva bakterija  
mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biotehnologija 4**

**Mentor: dr. sc. Katarina Butorac**

**Zagreb, 2023.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Karakterizacija proteolitičke aktivnosti sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka**

**Dina El Khalifa, 0058216875**

**Sažetak:** Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina biotehnološko važnih mikroorganizama koji imaju sposobnost fermentacije šećera i proizvodnje proteolitičkih enzima. Proteolitički sustav *Lactobacillus* i *Enterococcus* sojeva omogućava hidrolizu kazeina prisutnog u fermentiranim mliječnim proizvodima do bioaktivnih peptida čime opskrbljuju stanicu aminokiselinama esencijalnim za rast te pridonose razvoju organoleptičkih svojstava mliječnih proizvoda. Cilj ovog rada bio je istražiti kazeinolitičko djelovanje BMK izoliranih iz majčinog mlijeka te odabrati soj s najboljom proteolitičkom aktivnošću. Analizom fenotipa hidrolize kazeina ustanovljeno je da sojevi *L. plantarum* MB18 i *E. faecium* AF16, prilikom inkubacije u obranom mlijeku, iskazuju značajno kazeinolitičko djelovanje. Ansonovom metodom, koja je provedena u svrhu kvantificiranja aktivnosti proteinaza, i analizom proteinskog profila razgradnje kazeina utvrđeno je da soj *L. plantarum* MB18 posjeduje najučinkovitije proteolitičko djelovanje, koji se može koristiti kao potencijalna starter kultura u svrhu proizvodnje funkcionalnih fermentiranih proizvoda.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, proteinaze, *Lactobacillus*, kazein

**Rad sadrži:** 29 stranica, 8 slika, 4 tablice, 32 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** dr. sc. Katarina Butorac

**Datum obrane:** 5. srpnja 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biotechnical Sciences  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Characterization of proteolytic activity of lactic acid bacteria strains isolated from human breast milk**

**Dina El Khalifa, 0058216875**

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) are a group of biotechnologically important microorganisms that have the ability to ferment sugars and produce proteolytic enzymes. The proteolytic system of *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains enables the hydrolysis of casein in fermented dairy products into bioactive peptides, providing the cell with amino acids essential for growth and contributing to the development of the organoleptic properties of dairy products. The aim of this study was to investigate the caseinolytic activity of LAB, isolated from human breast milk, and to select a strain with the highest proteolytic activity. Phenotypic analysis of casein hydrolysis revealed that *L. plantarum* MB18 and *E. faecium* AF16 strains exhibited significant caseinolytic activity during incubation in skim milk. Using the Anson method performed to quantify protease activity and analysing the protein degradation profile of casein, it was found that *L. plantarum* MB18 possessed the most efficient proteolytic activity, making it a potential starter culture for the production of functional fermented products.

**Keywords:** lactic acid bacteria, proteases, *Lactobacillus*, casein

**Thesis contains:** 29 pages, 8 figures, 4 tables, 32 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Katarina Butorac PhD

**Thesis defended:** July 5, 2023

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Katarine Butorac. Rad je izrađen u sklopu projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

## Sadržaj

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | <b>2</b>  |
| 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE.....   | 2         |
| 2.1.1. <i>LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM</i> .....   | 3         |
| 2.2. PROTEOLITIČKI SUSTAV BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....                                | 4         |
| 2.2.1. BIOAKTIVNI PEPTIDI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....                                | 7         |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | <b>9</b>  |
| 3.1. MATERIJALI.....  | 9         |
| 3.1.1. RADNI MIKROORGANIZMI .....   | 9         |
| 3.1.2. HRANJIVE PODLOGE .....   | 10        |
| 3.1.3. KEMIKALIJE.....  | 10        |
| 3.1.4. PRIBOR I APARATURA.....  | 10        |
| 3.2. METODE .....   | 11        |
| 3.2.1. ODRŽAVANJE I ČUVANJE MIKROORGANIZAMA .....   | 11        |
| 3.2.2. ODREĐIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI METODOM S RUPAMA U AGARU.....                 | 12        |
| 3.2.3. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI I POSTOTKA PROIZVEDENE MLIJEČNE KISELINE .....          | 12        |
| 3.2.4. TEST KOAGULACIJE MLIJEKA .....   | 13        |
| 3.2.5. ODREĐIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI ANSONOVOM METODOM .....                       | 13        |
| 3.2.6. ANALIZA PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI TRICIN SDS-PAGE.....                              | 14        |
| 3.2.7. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....   | 15        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>16</b> |
| 4.1. KVALITATIVNO ODREĐIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE .....  | 16        |
| 4.2. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE ..... | 22        |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>6. POPIS LITERATURE</b> .....  | <b>26</b> |

## 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) jedna su od najbolje istraženih skupina mikroorganizama. Prirodno su prisutne u mlijeku, različitim biljnim i životinjskim proizvodima, kao i u intestinalnom i reproduktivnom sustavu čovjeka (Kieliszek i sur., 2021; Kok i sur., 2011). Zbog proteolitičke aktivnosti, koja je jedna od najvažnijih fizioloških svojstava, najveću primjenu imaju u prehrambenoj i mliječnoj industriji kao starter kulture u fermentaciji mlijeka (Blaya i sur., 2018; Beganović i sur., 2013; Leboš Pavunc i sur., 2012). Proteolitički sustav BMK omogućava hidrolizu kazeina, glavnog proteina u mlijeku, pri čemu opskrbljuje stanice esencijalnim aminokiselinama tijekom rasta. Kao rezultat djelovanja proteolitičkog sustava mogu nastati specifični peptidi s bioaktivnim učincima na ljudsko zdravlje, koji kada su dio strukture kazeina, nisu biološki aktivni. BMK i njihov proteolitički sustav pridonose razvoju organoleptičkih svojstava fermentiranih mliječnih proizvoda (Novak i sur., 2022; Kieliszek i sur., 2021; Marcone i sur., 2017).

Cilj ovog rada bio je ispitati potencijalnu proteolitičku aktivnost pojedinih sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Enterococcus*, izoliranih iz majčinog mlijeka. Selekcija sojeva s najboljom proteinaznom aktivnošću provedena je kvalitativnim metodama određivanja acidifikacijskog kapaciteta stanica, sposobnosti koaguliranja mlijeka, odnosno određivanjem Fmc (*engl.* Fast milk coagulating) fenotipa te određivanjem razine razgradnje kazeina u hranjivoj podlozi obranog mlijeka uslijed djelovanja supernatanta ili biomase stanica. Kvantitativna analiza proteolitičke aktivnosti provedena je Ansonovom metodom i analizom proteinskog profila razgradnje kazeina primjenom Tricin SDS-PAGE (*engl.* Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Temeljem dobivenih rezultata, odabran je soj *L. plantarum* MB18 kao potencijalna starter kultura u svrhu dobivanja fermentiranih proizvoda visoke kvalitete s povećanim udjelom bioaktivnih peptida.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine skupinu Gram-pozitivnih, nespороgenih i katalaza-negativnih bakterija koje rastu u anaerobnim ili fakultativno aerobnim uvjetima. Tradicionalno, upotreba BMK bila je uglavnom ograničena na mliječnu industriju, industriju voća i povrća te stočnu hranu, međutim danas imaju veliku primjenu i u biotehnologiji. Važnost ovih bakterija neprestano raste jer se smatraju sigurnima za ljude i životinje (*engl.* Generally Recognized As Safe, GRAS) i pokazuju mnoge korisne učinke na ljudsko zdravlje (Kieliszek i sur., 2021).

Budući da imaju multifunkcionalne uloge u brojnim primjenama, smatraju se jednom od najvažnijih skupina industrijskih mikroorganizama. Sastoje se od heterogene skupine rodova koji posjeduju mnoga važna fiziološka svojstva, kao što je sposobnost fermentacije ugljikohidrata u mliječnu kiselinu putem homo- ili heterofermentativnog metabolizma. Homofermentativne vrste BMK pretvaraju glukozu uglavnom u mliječnu kiselinu, dok je heterofermentativne vrste pretvaraju u mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, etanol i ugljikov dioksid. Proizvodnja mliječne kiseline ovisi o soju te o uvjetima uzgoja bakterije (Coelho i sur., 2022; Febrisiantosa i Widyastuti, 2014). Zbog njihovih ograničenih biosintetskih mogućnosti i velike potrebe za izvorima ugljika i dušika, prirodna staništa BMK su supstrati bogati hranjivim tvarima, kao što su meso, mlijeko, različite vrste sireva i ostali fermentirani proizvodi. U novije vrijeme, kao bogat izvor različitih vrsta bakterija mliječne kiseline se istražuje i ljudsko majčino mlijeko (Banić i sur., 2022). Među bakterijama koje se nalaze u majčinom mlijeku najčešće su one koje pripadaju vrstama *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Lactobacillus*. Interes za određene vrste laktobacila iz majčinog mlijeka, poput *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* i *L. fermentum*, sve je veći zbog njihovog potencijalnog probiotičkog djelovanja (Lara-Villoslada i sur., 2007). Koncept probiotika se temelji na oralnom uzimanju korisnih živih mikroorganizama pri čemu se poboljšavaju svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava. Najvažniji kriteriji za izbor probiotičkih sojeva su sigurnost za ljudsku primjenu, sposobnost preživljavanja stresnih uvjeta koji prevladavaju u gastrointestinalnom sustavu te sposobnost adhezije i kolonizacije ciljnog mjesta djelovanja unutar organizma. Zdravstvena korist ovih bakterija uključuje smanjenje rizika od pojave gastrointestinalnih infekcija i upalnih bolesti crijeva, kao i modulatorno djelovanje na imunološki sustav (Šušković i sur., 2009).



### 2.1.1. *Lactiplantibacillus plantarum*

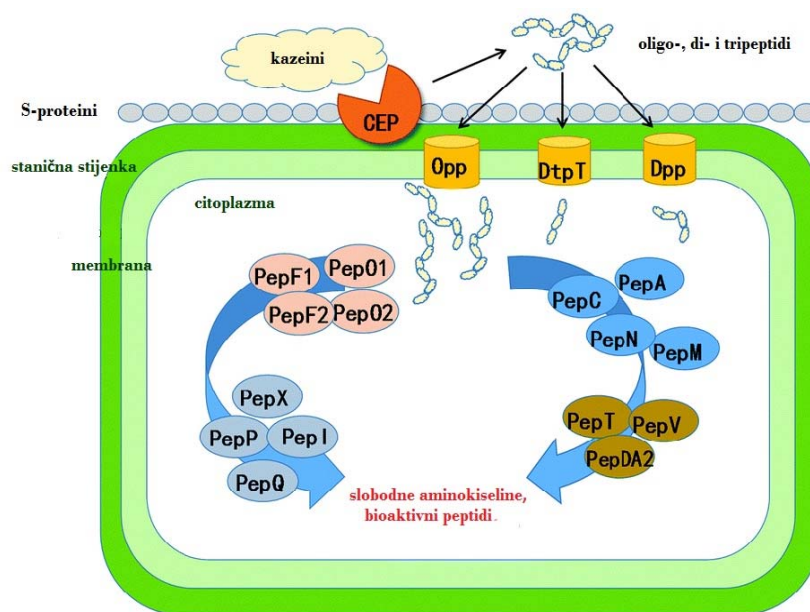
*Lactiplantibacillus plantarum* je jedna od vrsta bakterija mliječne kiseline koja se najčešće nalazi u spontano fermentiranom biljnom materijalu (npr. kiseli kupus, kineski kiseli kupus, kimchi, krastavci) te ima ključnu ulogu u fermentaciji biljnih proizvoda. Također se nalazi u mliječnim namirnicama, kobasicama, ribljem probavnom traktu, životinjskom i ljudskom izmetu te u tlu. Sposobnost kolonizacije raznolikih staništa ima zahvaljujući svom izvanrednom genomu koji sadrži varijabilne skupove gena. Ti geni se mogu modificirati te omogućavaju ovoj bakteriji prilagodbu i rast pri različitim uvjetima okoliša. Genom bakterije *L. plantarum* je veličine od 2,9 do 3,7 Mb, te je veći od genoma većine drugih bakterija mliječne kiseline (Skotniczny i Satora, 2023; Parlindungan i sur., 2021). Iako se ova BMK može prilagoditi različitim uvjetima okoliša, najbolje raste u aerobnim uvjetima pri 37 °C uz glukozu ili maltozu kao glavni izvor ugljika. Ima sposobnost proizvodnje antimikrobnih tvari, uključujući plantaricine, koji djeluju antagonistički prema srodnim bakterijskim vrstama, među kojima su i određene vrste patogenih bakterija, što predstavlja jedan od selekcijskih kriterija za izbor probiotičke kulture (Son i sur., 2009; Šušković i sur., 2009; de Vries i sur., 2006).

## 2.2. PROTEOLITIČKI SUSTAV BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Pojedine BMK mogu proizvesti proteolitičke enzime koje eksprimiraju unutar stanice ili u izvanstaničnom prostoru. Optimalna pH vrijednost za razvoj i rast proteolitičkih bakterija u mlijeku je između 7 i 7,5. Tijekom procesa fermentacije mlijeka proteolitički sustav BMK ima ključnu ulogu jer omogućava rast bakterija u mlijeku što osigurava uspješnu fermentaciju. BMK su mikroorganizmi kojima je potreban egzogeni izvor aminokiselina ili peptida, koje dobivaju proteolizom kazeina, najzastupljenijeg proteina u mlijeku (Kieliszek i sur., 2021; Savijoki i sur., 2006). Proteolitički sustav BMK sastoji se od proteinaza, peptidaza i specifičnih transportnih proteina. Razgradnja proteina započinje djelovanjem proteinaza, koje se nalaze na površini stanične stijenke. Te proteinaze razgrađuju proteine na manje fragmente, oligopeptide. Nastali oligopeptidi se pomoću specifičnog sustava za transport peptida transportiraju unutar stanice, nakon čega se odvija njihova daljnja razgradnja do kraćih peptida i aminokiselina, zajedničkim djelovanjem različitih unutarstaničnih peptidaza. Ti su putovi također od industrijske važnosti jer osim što omogućavaju rast, poznato je da peptidi, aminokiseline i njihovi derivati pridonose stvaranju teksture i okusa fermentiranih mliječnih proizvoda (Cirrincione i Pessione, 2016; Savijoki i sur., 2006).

Komparativnom analizom genoma BMK ustanovljeno je da sojevi koji pripadaju vrstama *Lactobacillus* i *Lactococcus* imaju ograničenu sposobnost sintetiziranja aminokiselina i stoga ovise o korištenju egzogenih izvora dušika za optimalan rast. Bakterijska vrsta *Lactococcus lactis* je najporeznije istražena BMK i druga najispitivanija Gram-pozitivna bakterija s obzirom na genetiku, fiziologiju i molekularnu biologiju. Zahvaljujući tome, uspostavljen je kompletan proteolitički sustav odgovoran za razgradnju kazeina do oligo-, di- i tripeptida, njihov transport unutar stanice te daljnju razgradnju do aminokiselina i bioaktivnih peptida (slika 1). Kako bi *Lc. lactis* mogla iskoristiti aminokiseline prisutne u kazeinu, protein se cijepa u peptide dovoljno male da budu dostupni proteinazama koje su smještene na vanjskoj strani bakterijske stanice (Villegas i sur., 2015; Kok i sur., 2011; Savijoki i sur., 2006; Juillard i sur., 1995). Glavni protein mlijeka je kazein, koji čini približno 80 % svih proteina mlijeka i 20-45 % proteina u ljudskom majčinom mlijeku, a dijeli se na  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazein, od kojih svaki sadrži veliki udio aminokiseline prolina. Proteinaze vezane na vanjsku površinu stanične stijenke (*engl.* Cell Envelope Proteinase, CEP), se prema specifičnosti za određeni supstrat dijele na PI-, PI/PII i PIII-tipove enzima. PI-tip proteinaza razgrađuje  $\beta$ -kazein na više od 100 različitih oligopeptida čija veličina varira od 4-30 aminokiselinskih ostataka. PI/PII-tip hidrolizira  $\beta$ -kazein, i u manjoj

mjeri  $\alpha$ 1-kazein, dok PIII-tip jednako dobro cijepa  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-,  $\beta$ -, i  $\kappa$ -kazeine (Tagliazucchi i sur., 2019; Savijoki i sur., 2006). Peptidi nastali razgradnjom kazeina pomoću spomenutih proteinaza transportiraju se u stanicu pomoću Opp, Dpp i DtpT transportnih sustava, budući da peptidi nemaju sposobnost slobodnog prolaska kroz citoplazmatsku membranu. Njihovu daljnju razgradnju provode endopeptidaze (oligopeptidaze) i aminopeptidaze. Endopeptidaze cijepaju unutarstanične veze u peptidima, dok aminopeptidaze uklanjaju aminokiseline s N- i C- terminalnog kraja peptida. Produkti nastali djelovanjem oligopeptidaza i amidopeptidaza supstrati su za di- i tripeptidaze, a njihova enzimska aktivnost razlikuje se kod pojedinih bakterijskih sojeva (Kok i sur., 2011; Savijoki i sur., 2006).



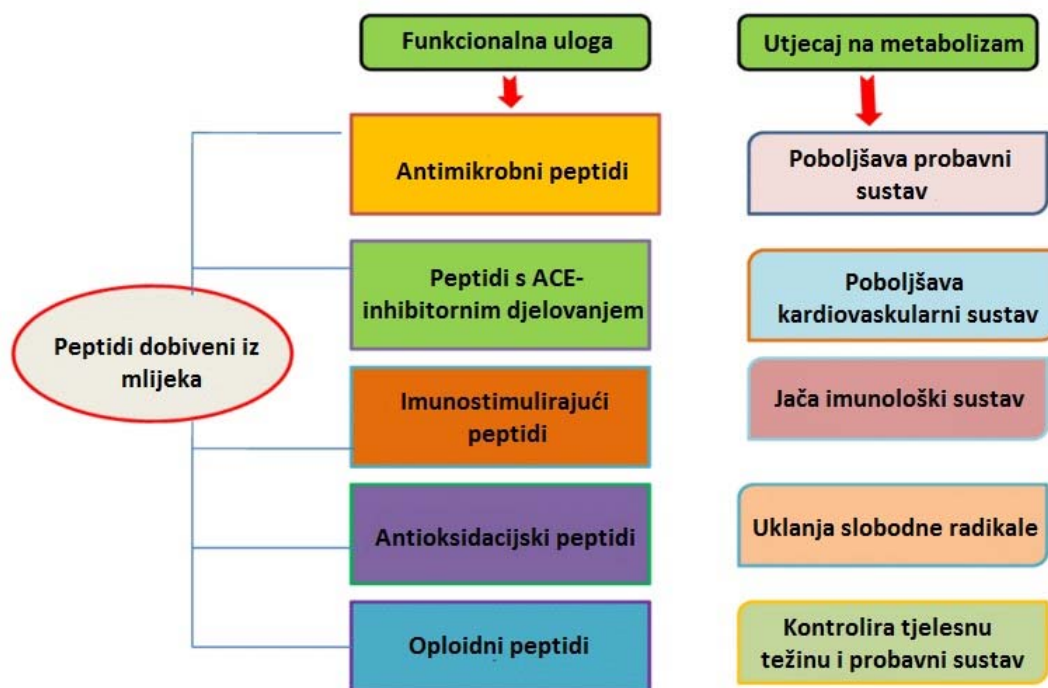
**Slika 1.** Proteolitički sustav razgradnje kazeina pomoću bakterije *Lc. Lactis* (prilagođeno prema Chen i sur., 2021)

Prvi korak u razgradnji kazeina provode izvanstanične proteinaze. Kod BMK postoji pet različitih tipova proteinaza. One su okarakterizirane kao PrtP iz *Lactococcus lactis* i *Lacticaseibacillus paracasei*, PrtH iz *Lactobacillus helveticus*, PrtR iz *Lacticaseibacillus rhamnosus*, PrtS iz *Streptococcus thermophilus* i PrtB iz *Lactobacillus bulgaricus* (Savijoki i sur., 2006). Izvanstanične proteinaze se nalaze na površini stanice i vezane su na strukturu stanične stijenke kovalentnim vezama. Sintetiziraju se kao preproteini od približno 2000 aminokiselinskih ostataka, a sastoje se od nekoliko različitih funkcionalnih domena. Prva domena je pre-pro domena (PP), koja se nalazi N-terminalnom kraju molekule enzima koja

sadrži signalnu sekvencu za transport proteinaze izvan stanice. Dio signalne sekvence uklanja se procesom autokatalize djelovanjem PrtM proteina koji se nalazi izvan stanične membrane. U strukturi proteina, nakon PP domene slijedi katalitička domena (PR). Ona sadrži aktivno mjesto enzima, kojeg tvore asparaginska kiselina, histidin i serin, i unutarnju (I) domenu koja ima 21 katalitičku ulogu. Domena A ima nepoznatu funkciju, prisutna je u svim ekstracelularnim proteinazama i neposredno joj prethodi PR domena. Domenu A slijede domena B, koja se nalazi samo u izvanstaničnim proteinazama laktokoka i laktobacila, i H domena koja je helikalni spacer. Domena H je sastavljena od  $\alpha$ -spiralnog lanca koji je, s jedne strane pričvršćen za staničnu stijenu, a s druge strane povezan s domenom B, koja se nalazi izvan stanične membrane. Svih pet spomenutih vrsta proteinaza posjeduju hidrofilnu domenu (W domena). Ova domena sadrži tipičan aminokiselinski sastav koji je bogat prolin-glicin i serin-treonin te je karakteristična za površinske proteine Gram-pozitivnih bakterija (Kieliszek i sur., 2021; Tagliazucchi i sur., 2019; Pastar i sur., 2003). Peptidi nastali razgradnjom kazeina djelovanjem izvanstaničnih proteolitičkih enzima transportiraju se u stanice djelovanjem triju sustava: Opp, DtpT i Dpp (Venegas-Ortega i sur., 2019). Opp sustav pripada skupini ABC transportera i sastoji se od pet proteina: proteina koji veže oligopeptid (OppA), dva integralna membranska proteina (OppB i OppC) i dva proteina koji vežu nukleotide (OppD i OppF) (Doeven i sur., 2005). ABC transporteri su kazetni transporteri koji vežu ATP, a dobivena energija omogućuje transport peptida dobivenih iz kazeina kroz staničnu membranu. Ovo je primjer aktivnog transporta, koji zahtijeva utrošak energije i uključuje specijalizirane integralne proteine koji povezuju transport s procesom oslobađanja energije. Opp sustav kod *Lc. lactis* transportira složene peptide koji sadrže 5 do 20 ili više aminokiselina, a priroda tih peptida značajno utječe na kinetiku transporta. Transportni sustav DtpT prenosi di- i tripeptide, a Dpp sustav može prenositi di-, tri- i tetrapeptide koji sadrže hidrofobne aminokiseline. Detaljnim istraživanjem bakterijske vrste *Lc. lactis* ustanovilo se da transportni sustav BMK omogućuje transport peptida u stanicu, ali i utječe na njihov rast tijekom proizvodnje raznih fermentiranih mliječnih proizvoda (Kieliszek i sur., 2021; Doeven i sur., 2005).

### 2.2.1. Bioaktivni peptidi bakterija mliječne kiseline

Zbog učinkovite razgradnje proteina prisutnih u različitim prehrambenim proizvodima, djelovanjem proteolitičkog sustava BMK, kao nusproizvod mogu nastati molekule s raznovrsnim bioaktivnim djelovanjem kao što je imunostimulirajuće, opioidno, antimikrobno ili ACE-inhibitorno djelovanje (*engl.* Angiotensin-Converting Enzyme) (Coelho i sur., 2022; Fields i sur., 2009) (slika 2). Najveći izvor bioaktivnih peptida porijeklom iz hrane su meso, kravlje mlijeko, jaja, sir i mliječni proizvodi, koje se oslobađaju enzimskom hidrolizom proteina tijekom fermentacije (Venegas-Ortega i sur., 2019; Sánchez i Vázquez, 2017; Mohanty i sur., 2016). Tvorba bioaktivnih peptida ovisi o proteolitičkoj aktivnosti korištene BMK, a u mliječnoj industriji najznačajniji sojevi pripadaju vrstama *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* i *Streptococcus thermophilus* (Kohronen i Pihlanto, 2006). Bioaktivni peptidi se smatraju novom generacijom biološki aktivnih regulatora za liječenje raznovrsnih medicinskih oboljenja te se u novije vrijeme u prehrambenoj industriji koriste u svrhu sprječavanja oksidacijske i mikrobne razgradnje hrane (Pessione i Ciricione, 2016). Zbog imunomodulacijskog i antioksidativnog djelovanja bioaktivni peptidi se koriste u terapiji osoba oboljelih od karcinoma. Određeni sojevi roda *Lactobacillus* kao što je *L. helveticus* proizvode bioaktivne peptide proteolitičkom razgradnjom mliječnog proteina kazeina, pri čemu iskazuju antihipertenzivno, imunomodulacijsko, antitumorsko djelovanje i sposobnost vezanja kalcija, zbog čega je ova vrsta BMK jedna od najučinkovitijih producenata bioaktivnih peptida (Gemechu, 2015).



**Slika 2.** Bioaktivni peptidi dobiveni iz mlijeka i njihovo djelovanje na ljudski metabolizam (prilagođeno prema Punia i sur., 2020)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korišteni sojevi bakterija mliječne kiseline, njihove oznake i mikrookoliš iz kojeg su izolirani prikazani su u tablici 1. Sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

**Tablica 1.** Sojevi bakterija mliječne kiseline čija je proteolitička aktivnost ispitana u ovom radu

| Naziv soja                     | Oznaka soja | Mikrookoliš     |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | KR19        | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | MC1         | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | MC19        | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus brevis</i>    | MB1         | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus brevis</i>    | MB2         | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | MB7         | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus brevis</i>    | MB13        | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | MB15        | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | MB18        | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus brevis</i>    | MB20        | majčino mlijeko |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | RS10        | majčino mlijeko |
| <i>Enterococcus faecium</i>    | KR20        | majčino mlijeko |
| <i>Enterococcus faecalis</i>   | MC2         | majčino mlijeko |
| <i>Enterococcus faecium</i>    | MC13        | majčino mlijeko |
| <i>Enterococcus durans</i>     | AF12        | majčino mlijeko |
| <i>Enterococcus faecium</i>    | AF16        | majčino mlijeko |

### 3.1.2. Hranjive podloge

U ovom radu je za čuvanje i uzgoj BMK korištena slijedeća hranjiva podloga:

- MRS tekuća hranjiva podloga za rast bakterija mliječne kiseline (*engl.* De Man, Rogosa i Sharpe), sastava (g/L destilirane vode) (Biolife, Italija): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.

### 3.1.3. Kemikalije

- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma“, SAD
- Coomassie Brilliant Blue otopina, „AppliChem“, Njemačka
- etanol, 70%, „Kemika“, Hrvatska
- fenolftalein, „Kemika“, Hrvatska
- folin fenol, „Merck“, Njemačka
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- kazein, „Sigma-Aldrich“, Njemačka
- L-tirozin, „Merck“, Njemačka
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev karbonat, „Sigma-Aldrich“, Njemačka
- obrano mljeko, „Milipore“, Njemačka
- sample buffer, „Sigma-Aldrich“, UK
- standard za Tricin SDS-PAGE, „Lonza“, SAD
- trikloroetena kiselina, „Sigma-Aldrich“, Njemačka

### 3.1.4. Pribor i aparatura

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- bireta, „Gram-mol“, Hrvatska
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD



- elektroforetska kadica, „Bio-Rad“, SAD
- epruvete, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmayerove tikvice, „Gram-mol“, Hrvatska
- filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ , „FILTRAK“, Njemačka
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- kivete za centrifugiranje 15 mL i 50 mL, „Falcon“, Engleska
- laboratorijske čaše, „Gram-mol“, Hrvatska
- magnetna mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrobiološka ušica, „Syntesys“, Italija
- mikrotitarska pločica (s 96 jažica), „Falcon“, SAD
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio-Rad“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH metar, „Metrohm“, Švicarska
- stalci za Ependorf kivete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- UV/VIS spektrofotometar, „Unicam Helios“, SAD
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije provođenja eksperimenta inokulirano je po 250  $\mu\text{L}$  pojedinačnog soja u svježi hranjivi medij pri optimalnim uvjetima rasta ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , anaerobno).

### 3.2.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti metodom s rupama u agaru

Proteolitička aktivnost prekonoćnih bakterijskih kultura rodova *Lactobacillus* i *Enterococcus* određena je metodom difuzije u podlogu koja sadrži obrano mlijeko s agrom. Podloga s obranim mlijekom (10 %, m/V) je prethodno pripremljena uz dodatak agra (1 %, m/V), izlivena u sterilne Petrijeve zdjelice i ostavljena na sobnoj temperaturi da se skrutne. Nakon skrutnjavanja hranjive podloge sterilno su borerom promjera 7 mm izbušene jažice u koje je zatim dodano 50 µL suspenzije stanica, odnosno supernatanta bakterijske kulture uzgojene u MRS bujonu pri 37 °C. Supernatanti kultura stanica su dobiveni centrifugiranjem suspenzije stanica pri 4200 x g tijekom 10 minuta. Priređene Petrijeve zdjelice s uzorcima su inkubirane u termostatu pri 37 °C do pojave bistrih zona što ukazuje na proteolitičku aktivnost pojedinog bakterijskog soja, čije zone hidrolize kazeina su izmjerene.

### 3.2.3. Određivanje pH vrijednosti i postotka proizvedene mliječne kiseline

Supernatantima kultura bakterija mliječne kiseline dobivenih centrifugiranjem suspenzije stanica pri 4200 x g tijekom 10 minuta, izmjerena je pH vrijednost pomoću pH metra uranjanjem pH elektrode u supernatant. Za određivanje koncentracije odnosno postotka sintetizirane mliječne kiseline, 1 mL svakog uzorka je razrijeđen s 19 mL destilirane vode u Erlenmayerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak je zatim titriran 0,1 M NaOH uz dodatak fenolftaleina kao indikatora do pojave ružičaste boje. Volumen NaOH utrošen za neutralizaciju pojedinog uzorka uzet je za izračun kiselosti u stupnjevima Soxhlet-Henkela (°SH), nakon čega je izračunat postotak proizvedene mliječne kiseline:

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

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

a = mL 0,1 M NaOH

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

(°SH ~ 0,0225 g mliječna kiseline (%))

°SH → stupanj kiselosti

### 3.2.4. Test koagulacije mlijeka

Sposobnost bakterija mliječne kiseline da koaguliraju mlijeko određena je prema Hebert i sur. (2001). Nakon prekonoćnog uzgoja, suspenzije stanice odabranih sojeva su centrifugirane pri 8000 x g tijekom 10 min pri 4 °C, nakon čega je talog stanica ispran dva puta sa sterilnim fosfatnim puferom (pH = 7,2). 200 µL suspenzije stanica je nacijepljeno u 10 % (m/V) obrano mlijeko, nakon čega je provedena inkubacija pri 37 °C tijekom 16 sati. Ovisno o brzini koagulacije mlijeka, rezultati su interpretirani kao:

- (-) nema koagulacije
- (+/-) slaba koagulacija
- (+) umjerena koagulacija
- (++) dobra koagulacija
- (+++) izvrsna koagulacija.

Prema dobivenim rezultatima odabrani su sojevi s najboljom kazeinolitičkom aktivnošću, odnosno sojevi koji su uzrokovali najveće zone proteolize i pokazali najbolji Fmc fenotip, u cilju daljnje karakterizacije proteolitičke aktivnosti.

### 3.2.5. Određivanje proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom

Prekonoćne kulture odabranih sojeva (MC1, MB1, MB2, MB15, MB18, AF16 i KR19), su centrifugirane 10 minuta pri brzini od 4200 o/min, a zatim su supernatanti suspendirani u 5 mL otopine kazeina, nakon čega je provedena inkubacije pri 37 °C tijekom 10 minuta. Reakcija je zaustavljena dodatkom 5 mL trikloroctene kiseline, što je rezultiralo taloženjem nehidroliziranih proteina. Nakon dodatne inkubacije od 30 minuta pri 37 °C i filtracije kako bi se uklonile sve netopljive tvari iz uzorka, u 2 mL filtrata dodano je 5 mL 0,4 M otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 1 mL Folin-Ciocalteau Fenol reagensa. Zatim su uzorci ponovno inkubirani (30 minuta, 37 °C), filtrirani te im je izmjerena apsorbancija pri 670 nm. Slijepa proba je pripravljena dodavanjem otopine kazeina u koju je prethodno dodana trikloroctena kiselina, a zatim je uslijedilo dodavanje supernatanta i svi prethodno opisani koraci. Nakon mjerenja apsorbancija, slijepa proba je oduzeta te je izračunata srednja vrijednost.

Na temelju pripremljenih standarada i njihovih izmjerenih apsorbancija konstruiran je baždarni dijagram ovisnosti množine (µmoL) o A<sub>670</sub> (slika 3). Očitavanjem apsorbancije i uvrštavanjem

u jednadžbu pravca, izračunata je količina oslobođenog L-tirozina tijekom hidrolize kazeina proteazama u uzorcima supernatanta sojeva. Enzimska aktivnost, izražena u internacionalnim jedinicama (I.J.) po mL supernatanta, izračunata je prema jednadžbi:

$$\frac{\text{I.J.}}{\text{mL enzima}} = \frac{n \cdot V_{\text{uk}}}{V_{\text{enz}} \cdot t \cdot V}$$

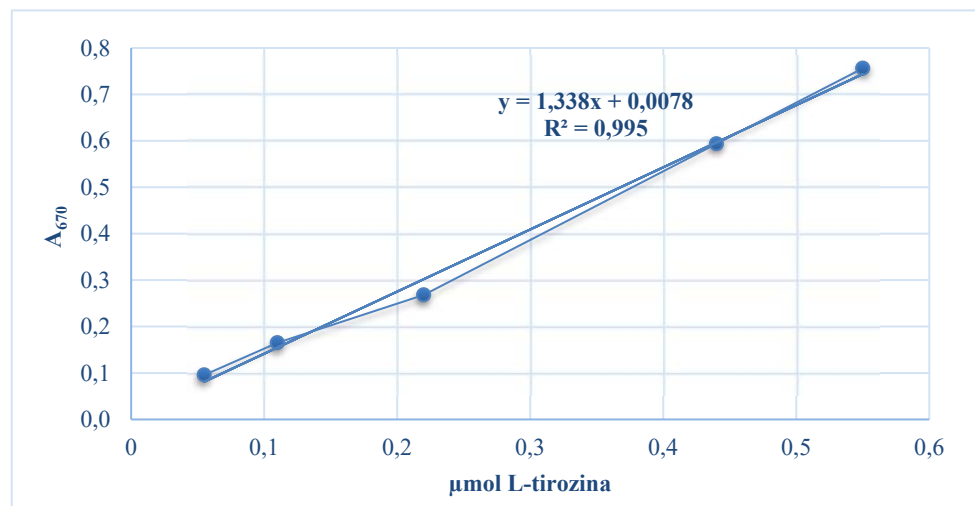
n (oslobođenog Tyr) = u  $\mu\text{mol}$

$V_{\text{uk}}$  = ukupni volumen eksperimenta u mL

$V_{\text{enz}}$  = volumen korištenog enzima

t = vrijeme eksperimenta u minutama

V = volumen (u mL) korišten u kolorimetrijskom određivanju



**Slika 3.** Baždarni dijagram za određivanje proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom

### 3.2.6. Analiza proteolitičke aktivnosti Tricin SDS-PAGE

Za određivanje proteolitičke aktivnosti Tricin SDS-PAGE metodom uzeti su uzorci korišteni za određivanje Fmc fenotipa nakon 48-satne inkubacije u 10 %-tnom obranom mlijeku. Nakon inkubacije uzeto je 100  $\mu\text{L}$  bistrog dijela suspenzije i centrifugirano 10 minuta pri 4200 o/min. Postupak je ponovljen s homogeniziranim suspenzijama. Nakon centrifugiranja, 10  $\mu\text{L}$  svakog supernatanta pomiješano je sa 10  $\mu\text{L}$  sample buffera nakon čega su smjese zagrijane 5-10 min pri 70 °C. Poliakrilamidni gel za elektroforezu i pufer za gel, pripremljeni su prema Haider i

sur. (2012). Pomoću Hamiltonove igle na gel je nanoseno 5 µL standarda te 20 µL supernatanta svakog soja i kontrole. Za kontrolu je uzeto obrano mlijeko (10 %, m/V). Tricin SDS-PAGE je proveden u kadici za elektroforezu spojena na napon od 125-150 V tijekom 90 minuta. Nakon elektroforeze, donji gel je stavljen u otopinu za fiksiranje sa 5% (v/v) glutaraldehidom tijekom 25 minuta na tresilici, a nakon toga u otopinu za bojanje u kojoj je bio 20 minuta. Odbojavanje je provedeno u otopini za odbojavanje također tijekom 20 min na tresilici, a nakon gubitka boje, gel je skeniran.

### 3.2.7. Statistička analiza podataka

Za statističku obradu podataka korišten je Microsoftov program Excel. Eksperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri nezavisna uzorka ± standardna devijacija (SD), koja služi kao mjera odstupanja podataka od srednje vrijednosti, prema sljedećim formulama:

$$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n}$$
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

gdje je  $\bar{x}$  srednja vrijednost uzoraka,  $x_i$  vrijednost uzorka,  $n$  veličina uzorka, a  $\sigma$  standardna devijacija.

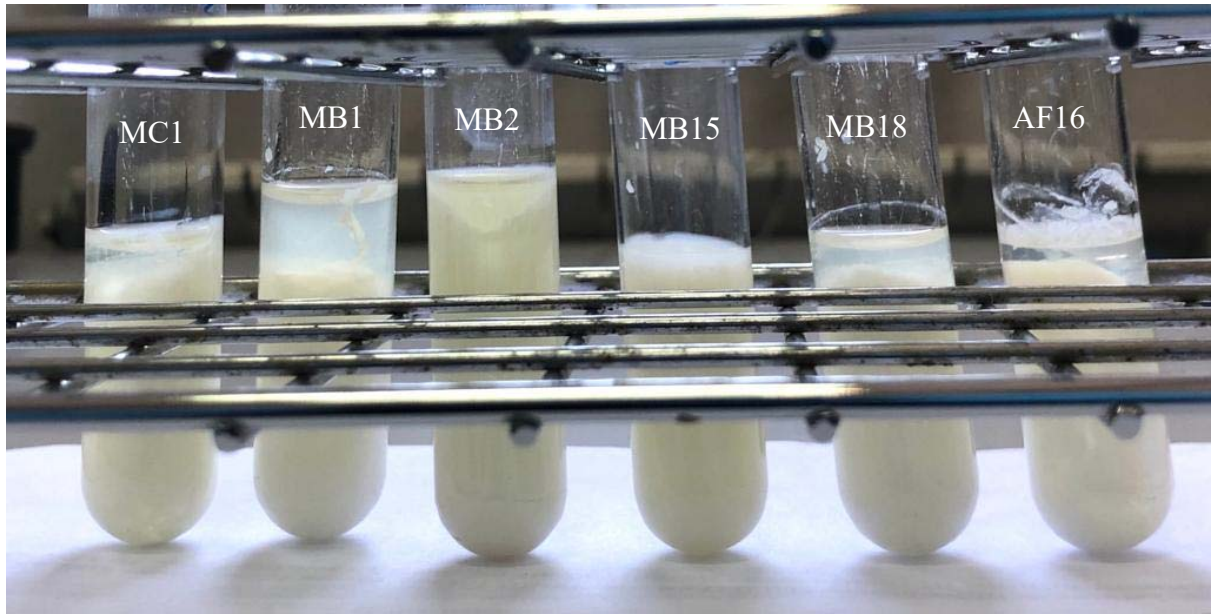
Statistički značajne razlike uzoraka određene su jednosmjernom analizom varijance (*engl.* one-way analysis of variance, one-way ANOVA), primjenom online računalnog programa Statistics Kingdom (<https://www.statskingdom.com/>). Statistička razlika između uzoraka se smatrala značajnom ukoliko su p vrijednosti bile manje od 0,05.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. KVALITATIVNO ODREĐIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Budući da neki sojevi BMK imaju veliki potencijal za proizvodnju bioaktivnih peptida razgradnjom kazeina iz obranog mlijeka, cilj ovog rada bio je ispitati proteolitički potencijal sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka. Specifični bioaktivni peptidi koje BMK oslobađaju tijekom fermentacije mlijeka posreduju u fiziološkim procesima povezanim s korisnim učincima na ljudsko zdravlje te mogu rezultirati dodatnim funkcionalnim učincima na krajnji proizvod (Novak i sur., 2022).

Mnoge BMK se koriste u mliječnoj industriji kao starter kulture za proizvodnju fermentiranih namirnica. Selekcija prikladnih sojeva za ovu primjenu temelji se na njihovoj sposobnosti koagulacije mlijeka. Prema Villegas i sur. (2015), proteolitička aktivnost BMK je povezana s brzinom koagulacije mlijeka zbog čega je za preliminarnu procjenu proteolitičke aktivnosti proveden test koagulacije mlijeka, odnosno ispitana je prisutnost Fmc fenotipa (slika 4). Test je proveden koristeći 16 različitih sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka koje pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Enterococcus*. Na temelju dobivenih rezultata ustanovljeno je da, od sojeva koji pripadaju *Lactobacillus* rodovima, najbolju sposobnost koagulacije mlijeka pokazuju *L. plantarum* KR19, *L. fermentum* MC1, *L. brevis* MB13 i *L. plantarum* MB18, dok od rodova *Enterococcus*, najbolju sposobnost pokazuje soj *E. faecium* AF16 (tablica 2). Kod pojedinih je sojeva, kao na primjer kod *E. faecium* MC13 i *L. plantarum* RS10, došlo do pojave spontane mutacije, tj. promjene iz Fmc<sup>+</sup> fenotipa u Fmc<sup>-</sup> fenotip. Time se gubi svojstvo koagulacije mlijeka što može biti povezano s gubitkom aktivnosti enzima potrebnih za metaboliziranje laktoze. Jedan od mogućih uzroka gubitka enzimske aktivnosti je gubitak plazmida koji sadrži gene koji kodiraju za te enzime (Hebert i sur., 2001).



**Slika 4.** Detekcija sposobnosti koagulacije mlijeka, odnosno prisutnost Fmc fenotipa kod određenih sojeva BMK nakon 16 sati uzgoja u 10 %-tnom obranom mlijeku: MC1 - *L. fermentum*; MB1 - *L. brevis*; MB2 - *L. brevis*; MB15 - *L. plantarum*; MB18 - *L. plantarum*; AF16 - *E. faecium*

**Tablica 2.** Detekcija sposobnosti koagulacije mlijeka, odnosno prisutnost Fmc fenotipa kod *Lactobacillus* i *Enterococcus* sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka

| Soj                      | 1.paralela | 2.paralela | 3.paralela |
|--------------------------|------------|------------|------------|
| <i>L. plantarum</i> KR19 | ++         | ++         | ++         |
| <i>L. fermentum</i> MC1  | +++        | ++         | ++         |
| <i>L. plantarum</i> MC19 | +          | +/-        | +/-        |
| <i>L. brevis</i> MB1     | +          | ++         | ++         |
| <i>L. brevis</i> MB2     | ++         | ++         | +          |
| <i>L. plantarum</i> MB7  | +          | +/-        | +          |
| <i>L. brevis</i> MB13    | ++         | ++         | ++         |
| <i>L. plantarum</i> MB15 | +/-        | +/-        | +/-        |
| <i>L. plantarum</i> MB18 | ++         | ++         | ++         |
| <i>L. brevis</i> MB20    | +          | +          | ++         |
| <i>L. plantarum</i> RS10 | +/-        | -          | -          |
| <i>E. faecium</i> KR20   | +++        | ++         | +          |
| <i>E. faecalis</i> MC2   | ++         | ++         | ++         |
| <i>E. faecium</i> MC13   | -          | ++         | ++         |
| <i>E. durans</i> AF12    | +/-        | +          | +          |
| <i>E. faecium</i> AF16   | +++        | +++        | +++        |

Legenda: (-) nema koagulacije; (+/-) slaba koagulacija; (+) umjerena koagulacija; (++) dobra koagulacija; (+++) izvrsna koagulacija

Istovremeno s koagulacijom se odvija i proces zakiseljavanja mlijeka. To se događa jer BMK tijekom fermentacije prevode laktozu u mliječnu kiselinu što rezultira snižavanjem pH vrijednosti okolnog medija. Zakiseljavanjem mikrokoliša inhibira se rast mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje fermentiranih namirnica, stoga je brzina zakiseljavanja mlijeka *Lactobacillus* i *Enterococcus* starter kulturama od velike tehnološke važnosti. Za selekciju sojeva BMK sa proteaznom aktivnošću, određeni su postotak sintetizirane mliječne kiseline i pH vrijednost supernatanata kultura (tablica 3).

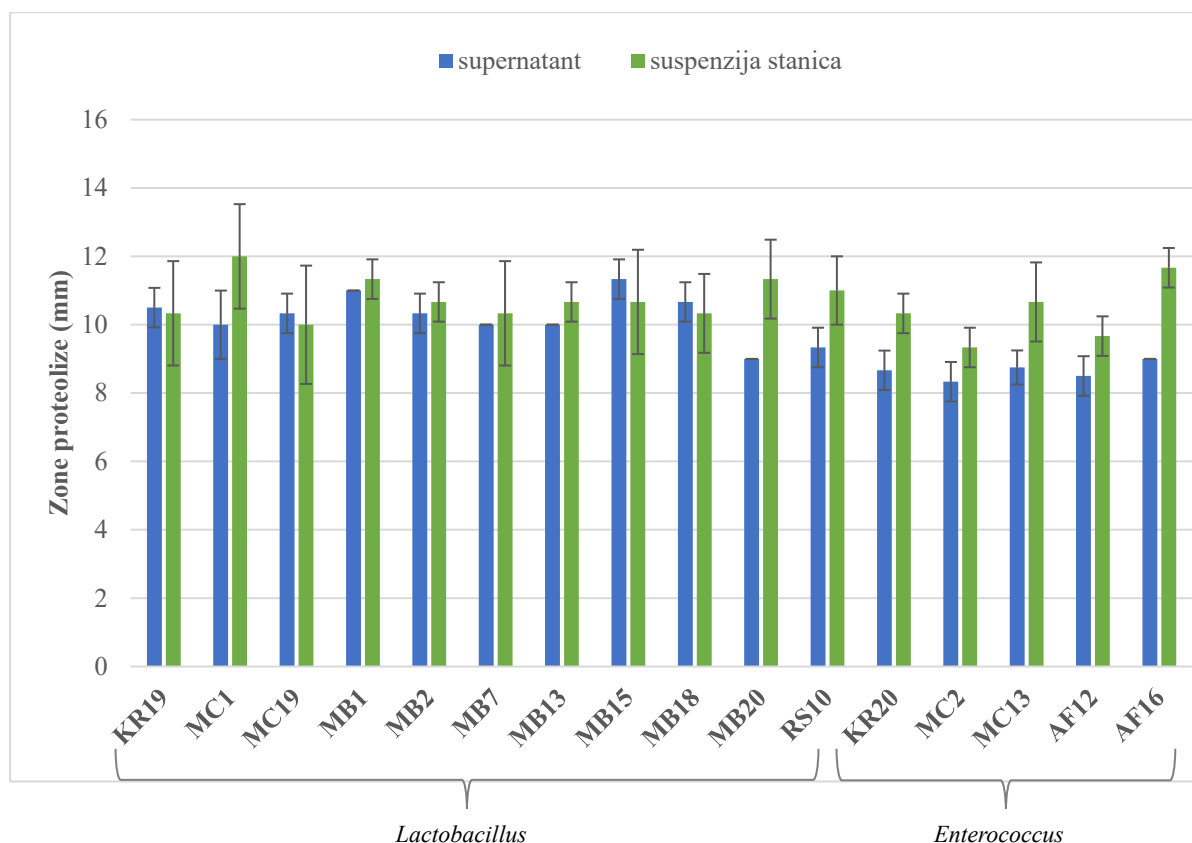


**Tablica 3.** pH vrijednosti i postotak proizvedene mliječne kiseline supernatanata kultura BMK nakon prekončne inkubacije u obranom mlijeku

| Soj                      | pH vrijednost | % mliječne kiseline |
|--------------------------|---------------|---------------------|
| <i>L. plantarum</i> KR19 | 3,87±0,18     | 1,78±0,23           |
| <i>L. fermentum</i> MC1  | 4,12±0,01     | 1,6±0,05            |
| <i>L. plantarum</i> MC19 | 3,87±0,16     | 1,73±0,23           |
| <i>L. brevis</i> MB1     | 3,86±0,11     | 1,8±0,14            |
| <i>L. brevis</i> MB2     | 3,85±0,09     | 1,85±0,14           |
| <i>L. plantarum</i> MB7  | 3,81±0,08     | 1,76±0,18           |
| <i>L. brevis</i> MB13    | 3,87±0,1      | 1,8±0,19            |
| <i>L. plantarum</i> MB15 | 3,86±0,14     | 1,62±0,24           |
| <i>L. plantarum</i> MB18 | 3,83±0,08     | 1,78±0,05           |
| <i>L. brevis</i> MB20    | 3,88±0,12     | 1,78±0,27           |
| <i>L. plantarum</i> RS10 | 3,81±0,08     | 1,8±0,1             |
| <i>E. faecium</i> KR20   | 4,05±0,03     | 1,58±0,14           |
| <i>E. faecalis</i> MC2   | 3,86±0,05     | 1,76±0,16           |
| <i>E. faecium</i> MC13   | 3,92±0,16     | 1,78±0,45           |
| <i>E. durans</i> AF12    | 4,09±0,19     | 1,49±0,39           |
| <i>E. faecium</i> AF16   | 3,95±0,09     | 1,67±0,23           |

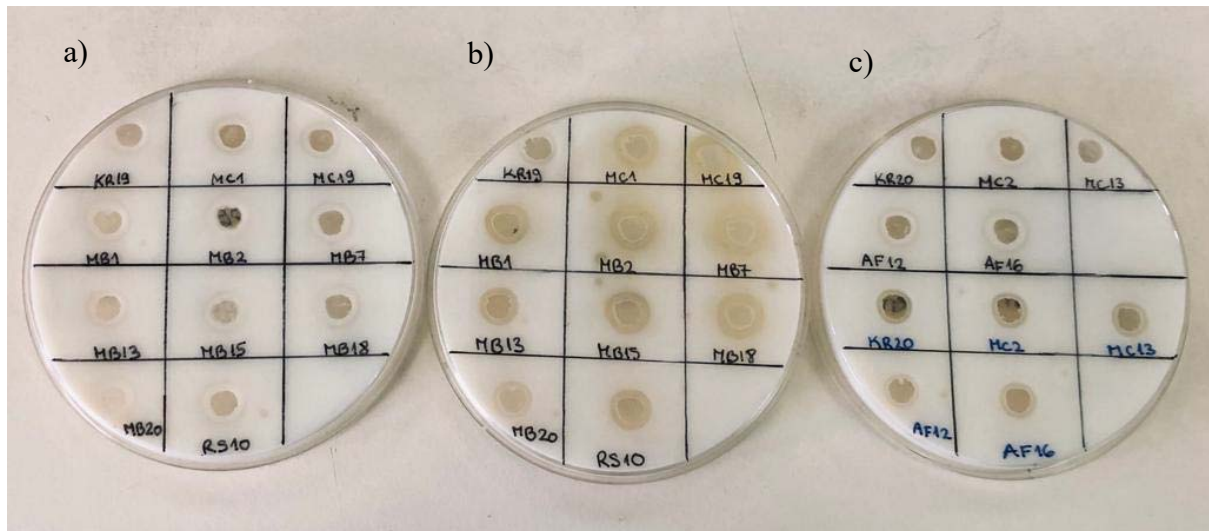
Nakon prekončne inkubacije u obranom mlijeku, sojevi *L. plantarum* MB7, *L. plantarum* MB18 i *L. plantarum* RS10 su najviše snizili pH vrijednost medija, a najveći postotak mliječne kiseline je proizvela bakterija *L. brevis* MB2.

Dodatna preliminarna metoda za selekciju sojeva BMK je mjerenje promjera bistrih zona nastalih uslijed hidrolize kazeina u krutoj hranjivoj podlozi, odnosno obranom mlijeku. Potencijalna proteolitička aktivnost ispitana je u koncentriranim suspenzijama stanica i u supernatantima bakterijskih kultura. Na temelju dobivenih rezultata, svi sojevi su pokazali vrlo dobru sposobnost hidrolize kazeina, pri čemu je određena potencijalna prisutnost ekstracelularnih proteinaza temeljem pojave bistrih zona u supernatantima kultura i proteinaza vezanih na površini stanične stijenke, temeljem pojave zona primjenom suspenzije stanica. Najbolja proteolitička aktivnost detektirana je kod sojeva *L. fermentum* MC1, *L. brevis* MB1, *L. brevis* MB2, *L. plantarum* MB15, *L. plantarum* MB18 i *E. faecium* AF16 (slika 5). Usporedbom izmjerenih bistrih zona, odnosno hidrolazne aktivnosti sojeva *Lactobacillus* i *Enterococcus* rodova, može se zaključiti da bakterije *Lactobacillus* roda učinkovitije razgrađuju kazein. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima Hati i sur. (2015), gdje su *L. rhamnosus* NS4 i *L. delbrückii* 009 sojevi pokazali značajniju proteolitičku i ACE inhibitornu aktivnost u odnosu na *Enterococcus* sojeve.



**Slika 5.** Kazeinolitička aktivnost koncentrirane suspenzije stanica i supernatanta prekonocnih kultura *Lactobacillus* i *Enterococcus* sojeva

Kod uzoraka suspenzije stanica, bistre zone nisu jasno vidljive jer je biomasa već počela rasti što ukazuje da ti izolati mogu iskoristiti i druge hranjive tvari prisutne u obranom mlijeku (slika 6). Na kraju, može se zaključiti da, iako je ova eksperimentalna metoda korisna za odabir sojeva s potencijalnom proteolitičkom aktivnošću, potrebno je koristiti druge metode, kao što je sekvencioniranje genoma ciljanih sojeva, kako bismo preciznije odredili lokalizaciju proteinaza.



**Slika 6.** Bistre zone hidrolize kazeina u obranom mlijeku nastale kao rezultat proteolitičke aktivnosti: a) biomase stanica roda *Lactobacillus* b) biomase stanica roda *Enterococcus* c) supernatanta bakterijske kulture rodova *Lactobacillus* (●) i *Enterococcus* (●)

Prema dobivenim rezultatima provedena je selekcija sojeva s najboljom kazeinolitičkom aktivnošću, odnosno najboljim Fmc fenotipom, najboljim acidifikacijskim kapacitetom i s najvećim zonama proteolize u cilju daljnje karakterizacije proteolitičke aktivnosti. Na temelju dobivenih rezultata odabrani su sljedeći sojevi: *L. fermentum* MC1, *L. brevis* MB1, *L. brevis* MB2, *L. plantarum* MB15, *L. plantarum* MB18 i *E. faecium* AF16.

#### 4.2. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PROTEOLITIČKE AKTIVNOSTI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Za daljnja istraživanja odabranih sojeva, provedeno je spektrofotometrijsko određivanje proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom. Proteolitička aktivnost enzima u izravnoj je korelaciji sa količinom oslobođenog tirozina uslijed hidrolize kazeina. Slobodni tirozin reagira sa Folin-Ciocalteu Fenol reagensom te daje plavo obojeni produkt koji se može kvantificirati spektrofotometrijski u vidljivom dijelu spektra ( $A_{670}$ ). Što je veća količina tirozina oslobođena hidrolizom kazeina, obojenost uzoraka je intenzivnija, što rezultira većom apsorbancijom. Veća vrijednost apsorbancije ukazuje na veću proteolitičku aktivnost proteaza. Usporedbom rezultata, može se zaključiti da najbolju proteolitičku aktivnosti pokazuje soj *L. plantarum* MB18 kod kojeg se oslobodila maksimalna količina tirozina i time očitana najveća apsorbancija (tablica 4). Kod sojeva *L. brevis* MB1 i *L. plantarum* MB15 proteazna aktivnost nije detektirana Ansonovom metodom.

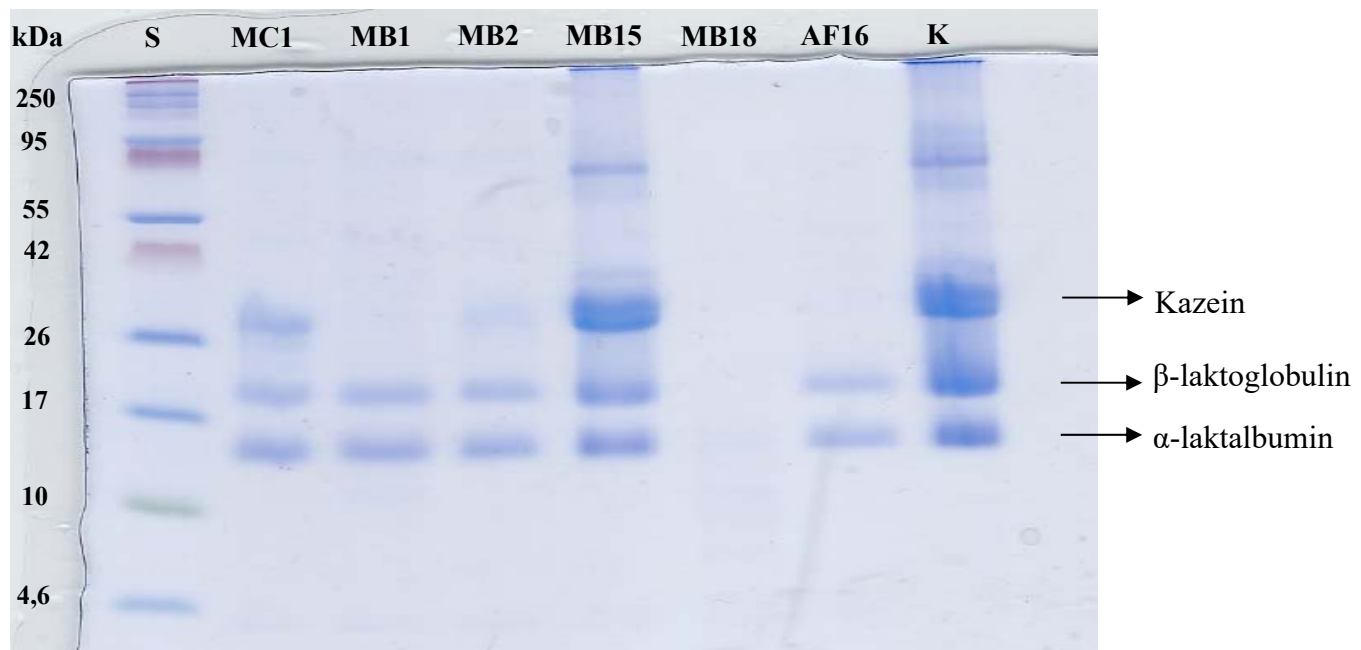
**Tablica 4.** Množina oslobođenog tirozina ( $\mu\text{mol}$ ) i proteolitička aktivnost ( $\text{U}/\text{mL}_{\text{supernatanta}}$ ) odabranih sojeva BMK određena Ansonovom metodom

| Soj                             | Množina ( $\mu\text{mol}$ )       | I.J. /mL enzima (U/mL)            |
|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>L. fermentum</i> MC1         | 0,025 $\pm$ 0,019                 | 0,005 $\pm$ 0,005                 |
| <i>L. brevis</i> MB1            | n.d.                              | n.d.                              |
| <i>L. brevis</i> MB2            | 0,024 $\pm$ 0,039                 | 0,004 $\pm$ 0,011                 |
| <i>L. plantarum</i> MB15        | n.d.                              | n.d.                              |
| <b><i>L. plantarum</i> MB18</b> | <b>0,046<math>\pm</math>0,009</b> | <b>0,013<math>\pm</math>0,002</b> |
| <i>E. faecium</i> AF16          | 0,028 $\pm$ 0,044                 | 0,008 $\pm$ 0,012                 |

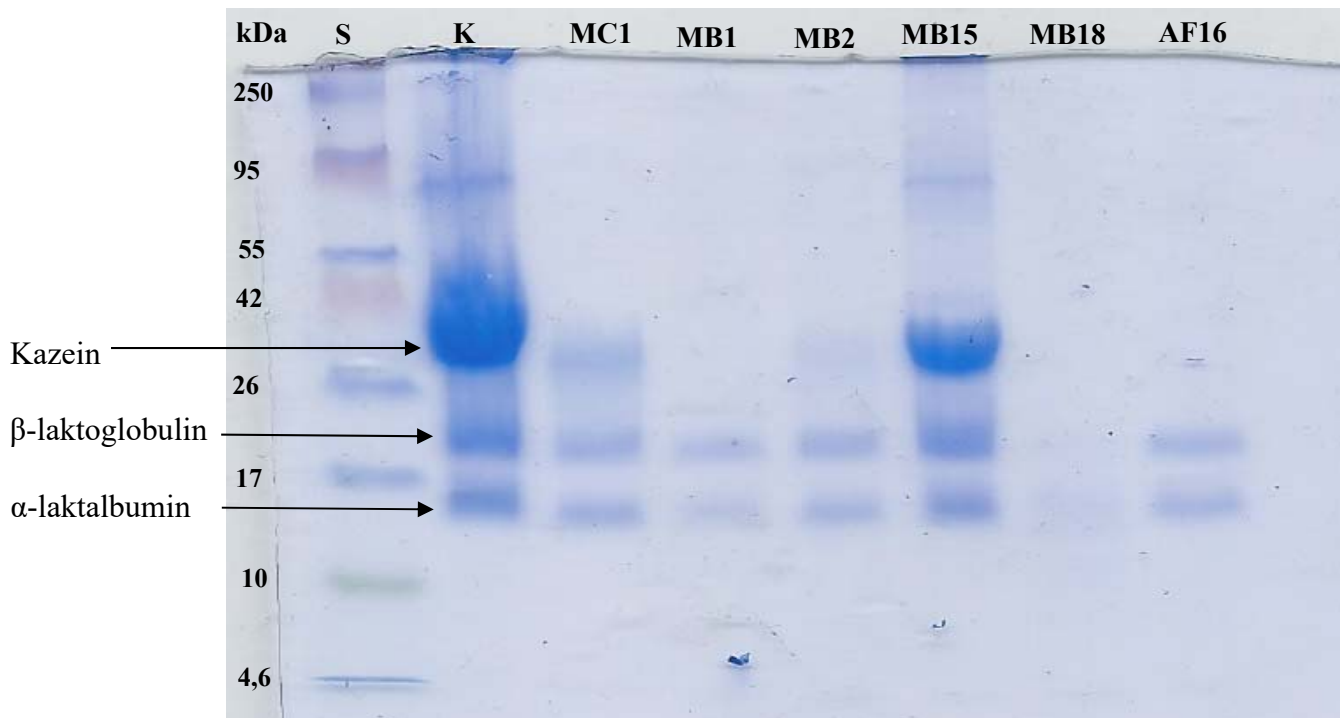
n.d. - nije detektirano

Kako bi se potvrdila proteolitička aktivnost sojeva analiziranih Ansonovom metodom, provedena je Tricin SDS-PAGE metoda. Ta metoda učinkovito razdvaja proteine/peptide niskih molekularskih masa pa tako i kazein kojem je molekulska masa između 25 i 35 kDa. Uzorci korišteni za određivanje Fmc fenotipa analizirani su Tricin SDS-PAGE metodom nakon inkubacije u 10 %-tnom obranom mlijeku.

Proteolitička aktivnost ispitana je u bistrim dijelovima suspenzija (slika 7) te u homogeniziranim suspenzijama (slika 8). Kao kontrola korišteno je obrano mlijeko. Mlijeko sadrži raznovrstan sadržaj proteina od kojih je kazein najzastupljeniji, dok značajan udio čine  $\beta$ -laktoglobulin (veličine oko 18 kDa) i  $\alpha$ -laktalbumin (veličine 14 kDa). Stoga su na gelu prikazane tri jasno vidljive vrpce koje predstavljaju te proteine. Na oba gela su kod većine sojeva vidljive sve tri vrpce slabijeg intenziteta u usporedbi s kontrolom. Ovo ukazuje na djelomičnu razgradnju kazeina iz mlijeka, što ukazuje na prisutnost proteolitičke aktivnosti ovih sojeva BMK. Kod soja *L. plantarum* MB18 nisu vidljive proteinske vrpce što upućuje da ovaj soj ima najbolju proteaznu aktivnost, dok soj *L. plantarum* MB15 posjeduje najslabiju sposobnost razgradnje kazeina. Prema istraživanjima, mnoge BMK koje pripadaju *L. plantarum* sojevima, fermentacijom mlijeka proizvode peptide s brojnim bioaktivnim djelovanjima poput protuupalnog, antihemolitičkog, antioksidativnog, antimutagenog ili antimikrobnog (Aguilar-Toalá i sur., 2017).



**Slika 7.** Razgradnja kazeina u bistrim dijelovima suspenzija kultura nakon inkubacije u obranom mlijeku pomoću odabranih sojeva BMK Tricin SDS-PAGE metodom; S - standard proteina; MC1 - *L. fermentum*; MB1 - *L. brevis*; MB2 - *L. brevis*; MB15 - *L. plantarum*; MB18 - *L. plantarum*; AF16 - *E. faecium*; K - otopina obranog mlijeka



**Slika 8.** Razgradnja kazeina u suspenzijama kultura nakon inkubacije u obranom mlijeku pomoću odabranih sojeva BMK Tricin SDS-PAGE metodom; S - standard proteina; K - otopina obranog mlijeka; MC1 - *L. fermentum*; MB1 - *L. brevis*; MB2 - *L. brevis*; MB15 - *L. plantarum*; MB18 - *L. plantarum*; AF16 - *E. faecium*

## 5. ZAKLJUČCI

1. Sojevi *Lactobacillus* i *Enterococcus* vrsta izolirani iz majčinog mlijeka iskazuju kazeinolitičku aktivnost koja proizlazi iz enzimatske aktivnosti njihovog proteolitičkog sustava.
2. *Lactobacillus* i *Enterococcus* sojevi s Fmc<sup>+</sup> fenotipom učinkovito koaguliraju i acidificiraju mlijeko što je značajno za njihovu potencijalnu primjenu u fermentaciji mliječnih namirnica.
3. Proteolitička aktivnost *L. plantarum* MB18 doprinosi je potencijalnoj primjeni ovog soja kao starter kultura u svrhu dobivanja fermentiranih proizvoda visoke kvalitete s povećanim udjelom bioaktivnih peptida.

## 6. POPIS LITERATURE

Aguilar-Toalá, JE, Santiago-López, L, Peres, CM, Peres, C, Garcia, HS, Vallejo-Cordoba, B, i sur. (2017) Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *J Dairy Sci* **100**, 65-75. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27865495/>

Banić M, Butorac K, Čuljak N, Leboš Pavunc A, Novak J, Bellich B, i sur.(2022) The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Biomolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *Int J Mol Sci* **23**, 14382. <https://doi.org/10.3390/ijms232214382>

Chen L, Wang L, Li J, Shu G (2021) Antihypertensive potential of fermented milk: the contribution of lactic acid bacteria proteolysis system and the resultant angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide. *Food Funct* **12**, 11121-11131. <https://doi.org/10.1039/D1FO02435C>

Coelho MC, Malcata FX, Silva CCG (2022) Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods* **11**, 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>

de Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, de Vos WM (2006) *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J* **16**, 1018-1028. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.003>

Doeven MK, Bert JK, Poolman B (2005) Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol Microbiol* **57(3)**, 640–649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04698.x>

Haider SR, Reid HJ, Sharp BL (2012) Tricine-SDS-PAGE. U: Kurien B, Scofield R (ured.) Protein Electrophoresis. Methods in Molecular Biology, vol 869., Humana Press, Totowa, NJ, str. 81-91. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_8)



Hati, S, Sreeja, V, Solanki, J, Prajapati, JB (2015) Significance of proteolytic microorganisms on ACE-inhibitory activity and release of bioactive peptides during fermentation of milk. *Indian J Dairy Sci* **68(6)**, 584-591.

Hebert EM, De Giori GS, Raya RR (2001) Isolation and characterization of a slowly milk-coagulating variant of *Lactobacillus helveticus* deficient in purine biosynthesis. *Appl Environ Microb* **67**, 1846-1850. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1846-1850.2001>

Fields K, Falla TJ, Rodan K, Bush L (2009) Bioactive peptides: signaling the future. *J Cosmet Dermatol* **8**, 8–13. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2009.00416.x>

Gemechu, T (2015) Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *Afr J Food Sci* **9**, 170-175. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1276>

Juillard V, Laan H, Kunji ERS, Jeronimus-Stratingh CM, Bruins AP, Konings WN (1995) The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyses beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. *J Bacteriol* **177**, 3472–3478. <https://doi.org/10.1128/jb.177.12.3472-3478.1995>

Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM (2021) Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules* **26**, 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>

Kohronen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J* **16(9)**, 945-960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>

Kok, J, Kunji ER, Steele JL, Broadbent JR (2011) Thirty Years of Research on Lactic Acid Bacteria. U: Ledebøer A, Hugenholtz J, Kok J, Konings W, Wouters J, ( red.) Protein breakdown by lactic acid bacteria 24 Media Labs, Rotterdam, The Netherlands. str. 133-150.

Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Miguel Rodríguez J, Boza J, Xaus J (2007) Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* **98(S1)**, S96-S100. <https://doi.org/10.1017/S0007114507832910>

Mohanty D, Jena R, Choudhury PK, Pattnaik R, Mohapatra S, Saini MR (2016) Milk derived antimicrobial bioactive peptides: A review. *Int J Food Prop* **19**, 837–846. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1048356>

Novak J, Butorac K, Leboš Pavunc A, Banić M, Butorac A, Lepur A, i sur. (2022) A Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules* **27(1)**, 160. <https://doi.org/10.3390/molecules27010160>

Parlindungan E, Dekiwadia C, Jones OAH (2021) Factors that influence growth and bacteriocin production in *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Process Biochem* **107**, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.009>

Pastar I, Tonić I, Golić N, Kojić M, van Kranenburg R, Kleerebezem M, i sur. (2003) Identification and Genetic Characterization of a Novel Proteinase, PrtR, from the Human Isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl Environ Microbiol* **69(10)**, 5802–5811. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5802-5811.2003>

Pessione E, Cirrincione S (2016) Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Front Microbiol* **7**, 876. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00876>

Punia H, Tokas J, Malik A, Sangwan S, Baloda S, Singh N, i sur. (2020) Identification and Detection of Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: Remarks about Agro-Foods. *Mol* **25(15)**, 3328. <https://doi.org/10.3390/molecules25153328>

Sánchez A, Vázquez A (2017) Biactive peptides: A review. *Food Qual Safe* **1**, 29-46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>

Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 394-406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>

Siezen RJ (1999) Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *A Van Leeuw* **76**, 139-155. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_6)

Skotniczny M, Satora P (2023) Molecular Detection and Identification of Plant-Associated *Lactiplantibacillus plantarum*. *Int J Mol Sci* **24(5)**, 4853. <https://doi.org/10.3390/ijms24054853>

Son VM, Chang CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH, Cheng W (2009) Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol* **26**, 691-698. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.018>

Šušković J, Kos B, Frece J, Beganović J, Leboš Pavunc A (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4 (3-4)**, 77-84.

Tagliazucchi D, Martini S, Solieri L (2019) Bioprospecting for Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Food. *Ferment* **5**, 96. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040096>

Venegas-Ortega MG, Flores-Gallegos AC, Martínez-Hernández JL, Aguilar CN, Nevárez-Moorillón GV (2019) Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: A sustainable approach for healthier foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **18**, 1039–1051. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12455>

Villegas JM, Brown L, Savoy de Giori G, Hebert EM (2015) Characterization of the mature cell surface proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl Microb Biotech* **99**, 4277–4286. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6258-6>

Widyastuti Y, Febrisiantosa A (2014) The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Nutr Food Sci* **5**, 435-442. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.54051>

## Izjava o izvornosti

Ja DINA EL KHALIFA izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat  
mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u  
njemu navedeni.

D Khalifa

Vlastoručni potpis