

Analiza sastava bioaktivnih peptida uslijed enzimske aktivnosti *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 primjenom spektrometrije masa

Zovko, Ljiljana

Master's thesis / Diplomski 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:159:801534>

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, rujan 2023.

Ljiljana Zovko

ANALIZA SASTAVA BIOAKTIVNIH
PEPTIDA USLIJED ENZIMSKE
AKTIVNOSTI *LACTOCOCCUS*
LACTIS ZGBP5-51 PRIMJENOM
SPEKTROMETRIJE MASA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak i u Centralnom laboratoriju Inkubacijskog centra za bio-znanosti i komercijalizaciju tehnologije – BICRO BIOCentar d.o.o. pod komentorstvom dr. sc. Ane Butorac, viši znan. sur. te uz pomoć Diane Nejašmić, str. sur.

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.

Najprije se želim zahvaliti prof. dr. sc. Jasni Novak na prenesenom znanju te susretljivosti tijekom izrade diplomskog rada. Želim se zahvaliti i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, osobito dr. sc. Katarini Butorac na savjetima i pristupačnosti.

Veliko hvala na pruženoj prilici za izradu eksperimentalnog rada u Centralnom laboratoriju Inkubacijskog centra za bio-znanosti i komercijalizaciju tehnologije – BICRO BIOCentar d.o.o. Bila mi je čast upoznati cijeli tim BIOCentra. Iznimno sam zahvalna na stručnim savjetima i prijateljskom pristupu u radu. Od srca zahvaljujem dr. sc. Ani Butorac, v. znan. sur. na stručnom i poticajnom vodstvu, prenesenom znanju kao i na stvaranju ugodne radne atmosfere. Htjela bih zahvaliti i Diani Nejašmić, str. sur koja mi je uvelike pomogla svojim znanjem i koja obavlja posao s osmijehom na licu.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na pomoći tijekom cijelog studiranja te na iskazanoj podršci i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

Analiza sastava bioaktivnih peptida uslijed enzimske aktivnosti *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 primjenom spektrometrije masa

Ljiljana Zovko, univ. bacc. ing.biotech. 0058212652

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada bila je analiza bioaktivnih peptida i aromatskih spojeva, za koje se pretpostavlja da se nakupljaju uslijed enzimske i metaboličke aktivnosti probiotičkog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Primijenjenom metodom spregnute tehnike plinske kromatografije i spektrometrije masa identificirani su spojevi arome. Ustanovljeno je da su karboksilne kiseline najzastupljenija kemijska skupina u analiziranim uzorcima fermentiranog mlijeka. Osim karboksilnih kiselina, nakon primjene ZGBP5-51 u monokulturi ili u kombinaciji sa starter kulturom, identificirani su raznovrsni spojevi arome koji pripadaju ketonima, aldehidima, alkanima, fenolima, alkoholima, esterima, laktonima i sulfidima. Identifikacija bioaktivnih peptida provedena je spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Identificirani peptidi, prema literaturi, iskazuju niz bioloških aktivnosti, uključujući ACE inhibitorno, antikancerogeno, imunomodulatorno, antidijabetičko, antioksidativno te cink-vezujuće djelovanje. Ciljana analiza bioaktivnih peptida provedena je spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije, višestrukog praćenja reakcije i spektrometrije masa. Ne postoji statistički značajna razlika između količine specifičnih peptida koju sintetiziraju korišteni bakterijski sojevi. Samo u napitku fermentiranom sa sojem ZGBP5-51 detektiran je peptid sekvence ARHPHLSFM iz κ -kazeina, s antioksidativnim učinkom.

Ključne riječi: bioaktivni peptidi, aromatski spojevi, proteolitički sustav, kazein, *Lactococcus lactis*

Rad sadrži: 56 stranica, 31 sliku, 18 tablica, 56 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Komentor: dr. sc. Ana Butorac, viša znan. sur., BICRO BIOCentar d.o.o.

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac, Diana Nejašmić, mag. ing. techn. aliment.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Novak (mentor)
3. dr. sc. Ana Butorac, viša znan. sur. (član)*
4. doc. dr. sc. Anita Horvatić

Datum obrane: 28. rujna 2023.

DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

Analysis of the composition of bioactive peptides due to the enzymatic activity of *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 using mass spectrometry

Ljiljana Zovko, univ. bacc. ing. biotechn., 0058212652

Abstract: The aim of this thesis was the analysis of bioactive peptides and aromatic compounds, which are assumed to accumulate due to the enzymatic and metabolic activity of the probiotic strain *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Aroma compounds were identified using the coupled technique of gas chromatography and mass spectrometry. It was found that carboxylic acids are the most represented chemical group in the analyzed samples of fermented milk. Besides carboxylic acids, various aroma compounds belonging to ketones, aldehydes, alkanes, phenols, alcohols, esters, lactones, and sulfides were identified after application of ZGBP5-51 in monoculture or in combination with starter culture. The identification of bioactive peptides was performed by a combined technique of liquid chromatography and mass spectrometry. According to the literature, the identified peptides show several biological activities, including ACE inhibitory, anticancer, immunomodulatory, antidiabetic, antioxidant, and zinc-binding activity. Targeted analysis of bioactive peptides was performed using the coupled technique of liquid chromatography, multiple reaction monitoring, and mass spectrometry. There is no statistically significant difference between the number of specific peptides synthesized by the used bacterial strains. A peptide sequence ARHPHPLSFM from κ -casein with an antioxidant effect was detected only in the sample fermented with strain ZGBP5-51.

Keywords: bioactive peptides, aromatic compounds, proteolytic system, casein, *Lactococcus lactis*

Thesis contains: 56 pages, 31 figures, 18 tables, 56 references, 0 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: Jasna Novak, PhD, Full professor

Co-mentor: Ana Butorac, PhD, *Scientific Adviser*, BICRO BIOCentar d.o.o.

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD, Diana Nejašmić, mag. ing. techn. aliment.

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor (president)
2. Jasna Novak, PhD, Full professor (mentor)
3. Ana Butorac, PhD, Senior Research Associate, BIOCentar (member)
4. Anita Horvatić, PhD, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: September 28th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE KARAKTERISTIKE MLIJEKA	2
2.2. AROMATSKE KOMPONENTE MLIJEKA	3
2.3. MLIJEKO KAO FUNKCIONALNA HRANA	5
2.4. BIOAKTIVNI PEPTIDI	7
2.5. PROIZVODNJA BIOAKTIVNIH PEPTIDA	8
2.6. PROTEOLITIČKI SUSTAV BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	9
2.7. ROD <i>Lactococcus</i>	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Radni mikroorganizam	13
3.1.2. Laboratorijski uređaji	13
3.1.3. Laboratorijski pribor.....	14
3.1.4. Kemikalije	14
3.1.5. Otopine	15
3.1.6. Programi i baze podataka	15
3.2. METODE	16
3.2.1. Uzorci	16
3.2.2. Određivanje aromatskog profila	16
3.2.2.1. Priprema uzoraka za određivanje aromatskog profila	16
3.2.2.2. Analiza i identifikacija aromatskih spojeva.....	17
3.2.3. Priprema uzoraka za određivanje bioaktivnih peptida	18
3.2.4. Ne-ciljna analiza peptida iz uzoraka mlijeka.....	18
3.2.4.1. Priprema uzoraka za nano LC.....	18
3.2.4.2. Analiza uzoraka MALDI-TOF/TOF	18
3.2.4.3. Razdvajanje peptida i skupljanje frakcija	19
3.2.4.4. Analiza peptida spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF	20
3.2.4.5. Identifikacija peptida.....	22
3.2.5. Ciljna analiza peptida	22
3.2.5.1. Priprema uzoraka za ciljnu analizu.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. IDENTIFIKACIJA AROMATSKIH SPOJEVA	25
4.2. NE-CILJNA ANALIZA PEPTIDA	33
4.3. CILJNA ANALIZA PEPTIDA	35

4.3.1.	Imunomodulatorni peptidi	47
4.3.2.	Antikancerogeni peptidi	48
4.3.3.	Antioksidacijski peptidi.....	48
4.3.4.	Peptidi s antidijabetičkom aktivnošću	49
4.3.5.	Peptidi koji vežu cink	49
4.3.6.	ACE-inhibitorni peptidi.....	50
5.	ZAKLJUČCI	51
6.	LITERATURA.....	52

1. UVOD

Posljednja dva desetljeća provedena su brojna istraživanja kojima je dokazano da je kravlje mlijeko bogat izvor bioaktivnih peptida. Bioaktivni peptidi nastaju proteolizom mliječnih proteina djelovanjem proteolitičkog sustava bakterija mliječne kiseline. Peptidi su neaktivni unutar svoje primarne proteinske sekvence, ali se proteolizom, iz neaktivnih proteina mogu nakupljati peptidi, pri čemu pojedini mogu imati biološke funkcije. Bioaktivni peptidi, osobito derivati kazeina, osim što imaju nutritivnu vrijednost, pokazuju i pozitivne učinke na zdravlje (Mohanty i sur., 2016). Bioaktivni peptidi mogu nastati na nekoliko načina: enzimskom hidrolizom djelovanjem probavnih enzima (*in vivo* ili *in vitro*), enzimskom hidrolizom mikrobnim ili biljnim enzimima te mikrobnom fermentacijom proteolitičkim bakterijskim kulturama (Jakopović, 2019). U mliječnoj industriji, mliječni proteini najčešće se fragmentiraju mikrobnom fermentacijom proteolitičkim bakterijskim kulturama, a proteolitička aktivnost bakterija može se pojačati metodama genetičkog inženjerstva. Bakterije mliječne kiseline su heterogena skupina mikroorganizama koja se najviše koristi za fermentaciju mlijeka i koja proizvodi mliječnu kiselinu kao krajnji produkt metabolizma. Osim što proizvode mliječnu kiselinu, čija je osnovna uloga konzerviranje novonastalog proizvoda, svojim metabolizmom pridonose i organoleptičkim svojstvima istog. Proteolitičkom aktivnošću bakterija nastaju slobodne aminokiseline unutar bakterijske stanice koje postaju prekursori za tvorbu aromatskih spojeva. Najčešće korištene bakterijske kulture za fermentaciju su: *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp. i bakterijski sojevi *Bifidobacterium* spp. (Samaržija, 2015).

Cilj ovog istraživanja bio je identificirati i kvantificirati bioaktivne peptide te identificirati aromatske spojeve nastale u uzorcima mlijeka Veronika nakon fermentacije provedene djelovanjem komercijalne mezofilne kulture Bioprox® DI-PROX M229, djelovanjem komercijalne mezofilne kulture Bioprox® DI-PROX M229 i soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 te usporediti s uzorkom mlijeka u kojem je primijenjen samo soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Identifikacija je provedena spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa MALDI-TOF/TOF, a relativna kvantifikacija peptida s bioaktivnim svojstvima provedena je LC-MS/MS metodom višestrukog praćenja reakcije (engl. *multiple reaction monitoring, MRM*). Identifikacija aromatskih spojeva provedena je metodom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FIZIKALNO-KEMIJSKE KARAKTERISTIKE MLIJEKA

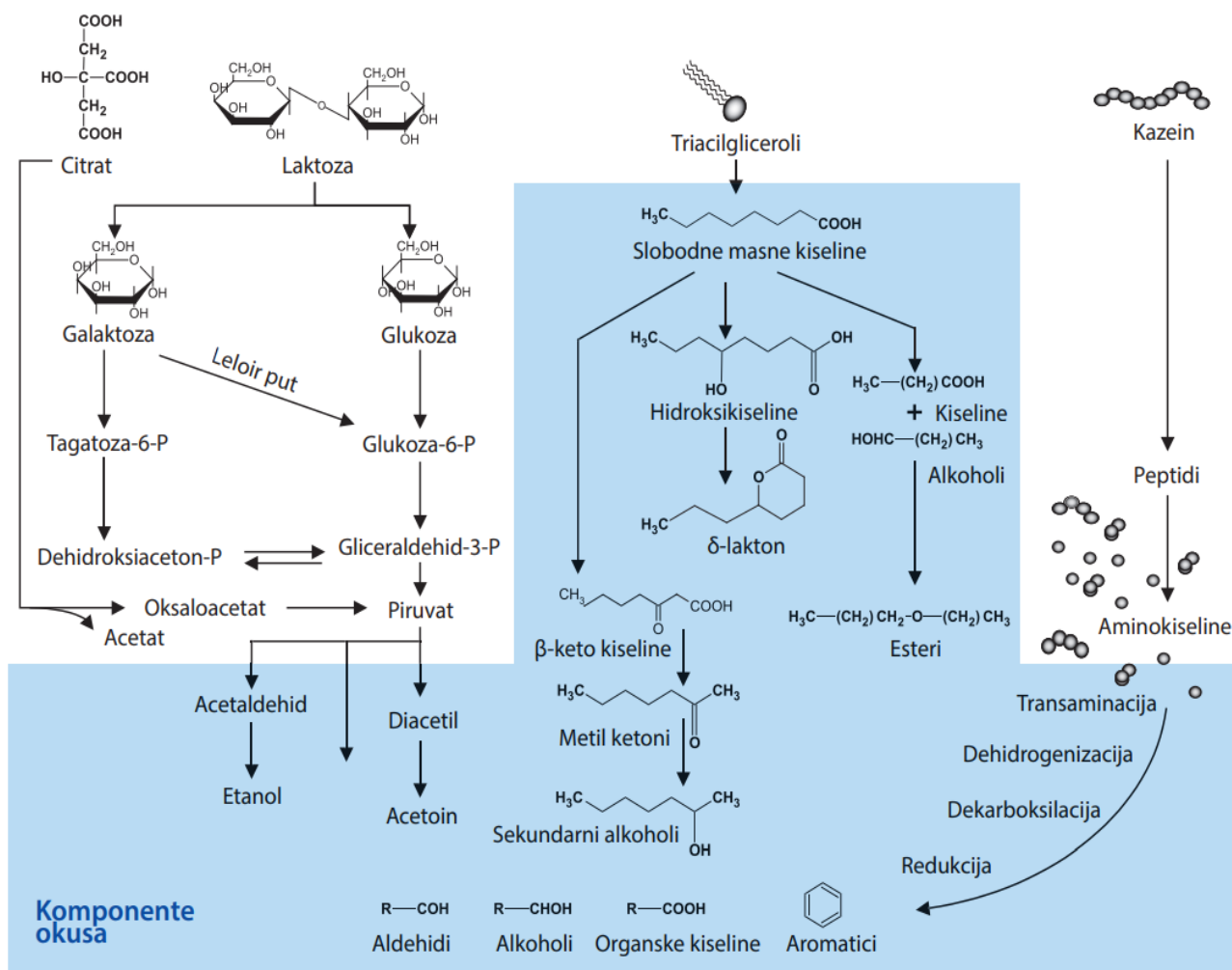
Mlijeko je prirodni sekret mliječne žlijezde sisavaca. Biološki služi kao hrana za dojenčad jer sadrži sve esencijalne tvari potrebne za optimalno funkcioniranje organizma.

Mlijeko se najvećim dijelom sastoji od vode u kojoj je suha tvar otopljena ili suspendirana. Samo mali dio vode (<2 %) je u obliku vezane vode u sastavu laktoze, soli i proteina. Suhu tvar čine hranjivi sastojci: proteini, ugljikohidrati, vitamini i minerali. Mlijeko je bogat izvor proteina koji se mogu podijeliti u dvije skupine: kazeini i proteini sirutke. Obje skupine proteina pripadaju heterogenim proteinima. Kazeini se mogu taloženjem izdvojiti iz otopine, dok će proteini sirutke, pri uvjetima u kojima se provodi taloženje, ostati otopljeni.

Mliječna mast je najveći izvor energije, a sastoji se od zasićenih i nezasićenih masnih kiselina, kao i vitamina topljivih u mastima A, D, E i K, stoga se smatra najvažnijom komponentom mlijeka. Komponente arome i karotenoidni pigmenti prisutni su u vrlo malim količinama u mliječnoj masti, ali su značajni pri određivanju nutritivne kvalitete i senzorskih osobina mlijeka. U svježem mlijeku, mliječna mast nalazi se u obliku okruglastih čestica obavijenih biološkom membranom. Sadržaj mliječne masti koristi se za klasifikaciju mliječnih proizvoda (npr. punomasno, obrano ili poluobrano). Laktoza je mliječni šećer građen od jedinice glukoze i jedinice galaktoze koja povećava energetska vrijednost mlijeka. U mlijeku je prisutna u dva izomerna oblika (α -laktoza i β -laktoza) koji se međusobno razlikuju prema položaju H^+ i OH^- skupine na prvom C-atomu glukozidnog dijela laktoze. Koncentracija pojedinog izomera ovisi o koncentraciji drugih ugljikohidrata, soli te o pH vrijednosti i temperaturi. Laktoza se ne nakuplja u jetri, stoga je pogodna i za dijabetičare (Tratnik i Božanić, 2012; Samaržija, 2015). Mlijeko obiluje vitaminima i mineralima. Od vitamina izdvaja se kompleks vitamina B (topljiv u vodi), a od minerala, u značajnoj koncentraciji, prisutne su soli kalcija i fosfata. Koncentracija vitamina B ovisi o prehrani sisavaca npr. koncentracija vitamina B12 u kravljem mlijeku je pet puta viša u usporedbi s kozjim mlijekom. Koncentracije kalcija i fosfata povezane su s ukupnim udjelom proteina u mlijeku. Sastav mlijeka mijenja se ovisno o vrsti sisavaca, fazi dojenja, prehrani, dobi, genetičkim i okolišnim čimbenicima (Dominguez-Salas i sur., 2019).

2.2. AROMATSKE KOMPONENTE MLIJEKA

Percepcija arome je složen proces koji uključuje interakciju između doživljaja mirisa i okusa putem svih osjetila. Hlapljive komponente mliječne masti daju jedinstven miris mlijeku i mliječnim prerađevinama. Kao što je nutritivni sastav mlijeka promjenjiv i pod utjecajem različitih čimbenika, tako je promjenjiv i sam miris mlijeka. Aromatski profil ovisi o porijeklu mlijeka, prehrani sisavca te načinu prerade mlijeka. Miris fermentiranog mlijeka može se značajno razlikovati od mirisa svježeg mlijeka. Fermentirano mlijeko, osim aromatskih spojeva koji su prvotno prisutni u mlijeku, sadržava i aromatske spojeve koji nastaju tijekom fermentacije i skladištenja djelovanjem bakterija mliječne kiseline. (Tong i sur., 2019). Tijekom fermentacije značajno se povećava i koncentracija hlapljivih masnih kiselina: octene, mravlje, kapronske, maslačne i izovalerijanske kiseline. Za okus kiselog mlijeka i srodnih fermentiranih mliječnih proizvoda ključan je aromatski spoj acetaldehid koji nastaje fermentacijom citrata prisutnog u mlijeku. *L. lactis*, *L. diacetylactis* i *Leuconostoc* spp. su citrat pozitivni laktokoki koji metabolizom citrata u fermentacijskom mlijeku akumuliraju acetaldehid koji daje okus po jogurtu. Koncentracija acetaldehida određena je koncentracijom mliječne kiseline, odnosno pH vrijednošću. Biosinteza acetaldehida započinje pri pH vrijednosti 5 i njegova koncentracija se povećava sve dok se pH vrijednost ne spusti na 4,4. Tada je povećanje koncentracije minimalno, a sinteza acetaldehida u potpunosti prestaje pri pH vrijednosti 4. Bakterijska vrsta *Leuconostoc* uz sintezu acetata, CO₂ i reduciranih C4 ima sposobnost konverzije acetaldehida u etanol, koji nema veliki značaj za okus fermentiranog mlijeka. Kombinacija navedenih mezofilnih kultura osigurava željeni okus fermentiranog mlijeka. Kako bi se u potpunosti formirali potencijalni aromatski spojevi, fermentacija mezofilnim kulturama mora trajati najmanje 10 h i odvijati se na temperaturi između 20 i 30 °C. Za formiranje karakterističnog okusa fermentiranog mlijeka, važan je i proteolitički sustav mezofilnih kultura jer slobodne aminokiseline (dobivene razgradnjom kazeina) postaju prekursori za tvorbu aromatskih spojeva (Samaržija, 2015).



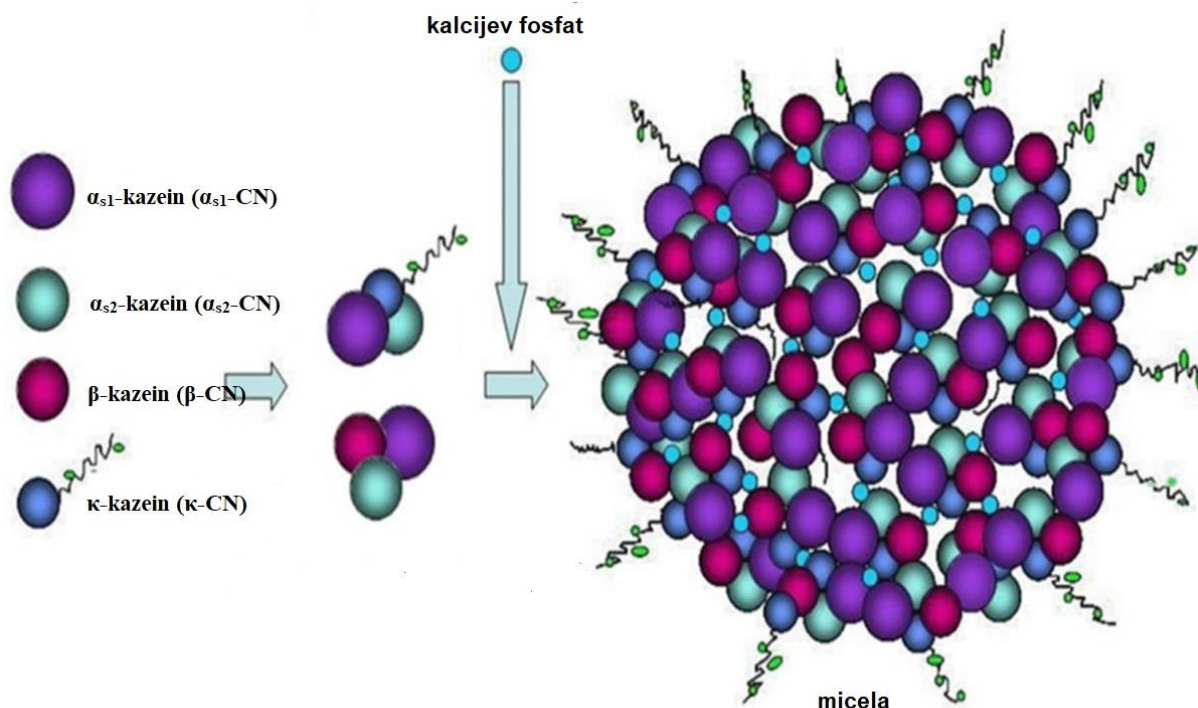
Slika 1. Biokemijske reakcije koje sudjeluju u formiranju aromatskih spojeva fermentiranog mlijeka. U plavo osjenčanom dijelu nalaze se spojevi koji imaju značajan utjecaj na konačnu aromu proizvoda (*preuzeto sa Samaržija, 2015*)

2.3. MLIJEKO KAO FUNKCIONALNA HRANA

Mlijeko, kada se konzumira kao dio uravnotežene prehrane, osim svoje nutritivne vrijednosti ima i dodatne pozitivne učinke na zdravlje. Mliječna industrija ostvarila je vodeću ulogu u razvoju funkcionalne hrane i već je komercijalizirala proizvode koji poboljšavaju imunološki sustav, smanjuju povišeni krvni tlak, suzbijaju gastrointestinalne infekcije, pomažu u regulaciji tjelesne težine te sprječavaju osteoporozi (Park, 2009). Za proizvodnju mliječnog funkcionalnog napitka koriste se funkcionalne kulture. Pojam funkcionalna kultura označava bakterijsku kulturu s najmanje jednim funkcionalnim svojstvom (stvaranje antimikrobnih spojeva, korisnih enzima, nutraceutika te bilo kojih drugih spojeva koji imaju povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje ili na organoleptička svojstva samog proizvoda). Bioaktivni sastojci mlijeka uglavnom potječu od kazeina i proteina sirutke što je rezultiralo povećanim znanstvenim i komercijalnim interesom usmjerenim na njihova svojstva (Jakopović i sur., 2019).

Glavni proteini mlijeka su kazein i proteini sirutke. Razlikuju se po aminokiselinskom sastavu, svojstvima te načinu koagulacije.

Kazein je najzastupljeniji protein i čini oko 80 % ukupnih proteina u mlijeku. Uglavnom se nalazi u obliku heterogenih koloidnih čestica koje, osim proteina, sadrže kalcij, magnezij, fosfat i citrat. Unutar kazeinske micelle zastupljene su četiri frakcije: α_{s1} -kazein (α_{s1} -CN), α_{s2} -kazein (α_{s2} -CN), β -kazein (β -CN) i κ -kazein (κ -CN). Po svom kemijskom sastavu, kazeinske frakcije su fosfoproteini jer imaju fosfatnu skupinu vezanu na serinski ostatak proteinskog lanca. Između kazeinskih molekula unutar micelle prisutne su elektrostatske i hidrofobne interakcije. Micela se stabilizira vezanjem fosfatne skupine na kalcijev ion te je vezanje kalcija za proteine kazeina proporcionalno udjelu fosfata u njihovoj strukturi. Struktura kazeina je relativno otvorena. Strukturu sva četiri kazeina karakterizira razdvojenost hidrofилnih i hidrofobnih područja. Hidrofobni ostatci izloženi su vodenoj fazi okoliša, stoga su kazeinske micelle visoko hidratizirane koloidne čestice (O' Kennedy, 2011; Samaržija, 2015).



Slika 2. Struktura kazeinske micela (*prilagođeno prema Petrova i sur., 2022*)

Proteini sirutke često se koriste u prehrambenoj industriji zbog visoke topljivosti u vodi i zbog svojih funkcionalnih svojstava (djeluju kao emulgatori, stabilizatori te poboljšavaju okus i teksturu mliječnog proizvoda). Također, obiluju esencijalnim aminokiselinama što ih čini izvrsnim izvorom hranjivih tvari potrebnih za rast, obnovu tkiva i održavanje zdravlja. Proteinski lanci proteina sirutke kraći su od proteinskih lanaca kazeina, jednostavnije su građe te su hidrofilniji i termolabilniji (Tratnik i Božanić, 2012).

Proteini koji se nalaze u sirutki uključuju α -laktoalbumin, β -laktoglobulin, serum albumine, imunoglobuline, proteoza-peptone, β -mikroglobulin, laktoferin, transferin, feritin, kalmodulin i skupinu acilglikoproteina. α -laktoalbumin i β -laktoglobulin dva su najzastupljenija proteina sirutke. α -laktoalbumin ima ulogu u regulaciji sinteze laktoze. β -laktoglobulin veže hidrofobne i amfilne molekule. Svi navedeni proteini pridonose nutritivnoj vrijednosti i funkcionalnim svojstvima sirutke (Deeth i Bansal, 2019).

2.4. BIOAKTIVNI PEPTIDI

Bioaktivni peptidi nastaju fragmentacijom proteina kazeina ili proteina sirutke. Obično u strukturi sadrže 3-20 aminokiselinskih ostataka po molekuli. Aktivnost bioaktivnih peptida rezultat je specifičnog aminokiselinskog sastava i redoslijeda aminokiselina unutar proteinske sekvence. Peptidi nisu aktivni dok su dio strukture proteinskog prekursora i tek nakon razgradnje proteinskog prekursora iskazuju bioaktivna svojstva (Janda, 2019). Bioaktivna svojstva podrazumijevaju antihipertenzivno, antioksidativno, imunomodulatorno, antitumorsko, opioidno djelovanje te aktivnost prenošenja minerala.

Antihipertenzivni peptidi (ACE inhibitorni peptidi) imaju povoljan učinak na regulaciju krvnog tlaka. Mogu inhibirati angiotenzin-konvertirajući enzim koji katalizira hidrolizu angiotenzina I u angiotenzin II. Inhibicija angiotenzina II može dovesti do smanjenja vazokonstrukcije krvnih žila i snižavanja krvnog tlaka (Park i Nam, 2015).

Antioksidativna svojstva peptida izoliranih iz mlijeka izražena su kroz neutralizaciju slobodnih radikala i inhibiciju oksidacijskih procesa čime se stanica štiti od oksidativnog stresa te se na taj način sprječava razvoj raznih bolesti i oštećenje tkiva (Pihlanto, 2006).

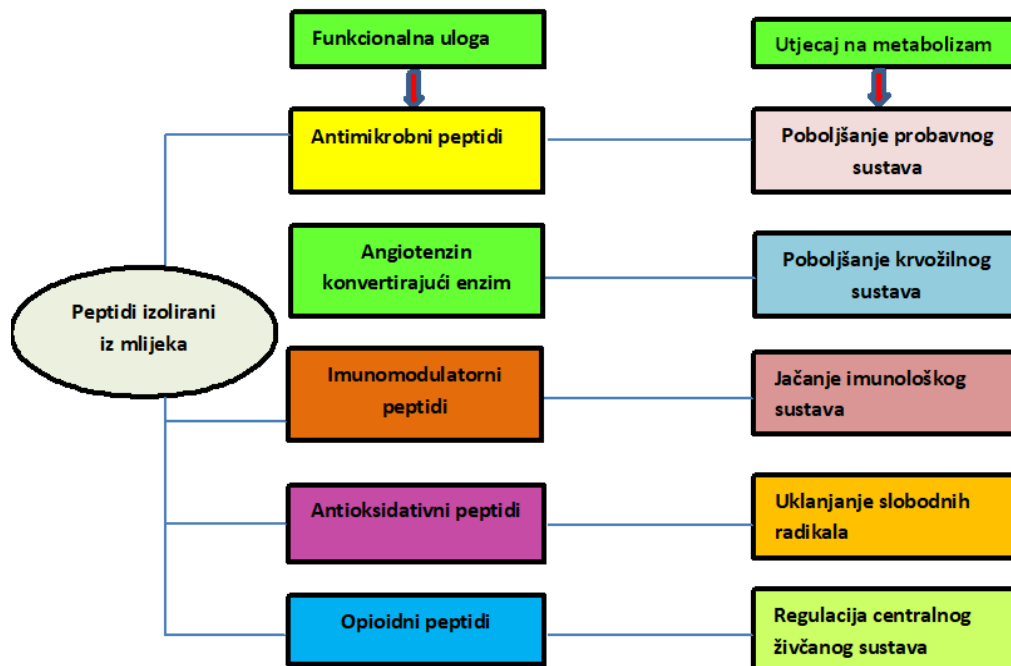
Imunomodulatorni peptidi dobiveni fragmentacijom kazeina i proteina sirutke imaju utjecaj na aktivnost, funkciju i odgovor imunološkog sustava tj. imaju funkcije imunoloških stanica (reguliraju proliferaciju limfocita, sintezu antitijela te proizvodnju, izlučivanje i aktivnost citokina).

Peptidi antitumorskog djelovanja sprječavaju rast i razvoj tumorskih stanica. Imaju različite mehanizme djelovanja protiv tumorskih stanica: indukcija stanične smrti tj. apoptoze, inhibicija angiogeneze odnosno inhibicija opskrbe tumorskih stanica krvlju te inhibicija metastaze odnosno širenja tumorskih stanica (Pepe i sur., 2013).

Antimikrobni peptidi imaju i antimikrobno djelovanje. U kolostrumu je prisutna najviša koncentracija navedenih peptida. Antimikrobni peptidi djeluju na bakterijske stanice tako da mijenjaju strukturu i funkciju staničnih membrana. Stvaraju pore ili kanale u membranama bakterijskih stanica čime se narušava propusnost i posljedično ometa ionska ravnoteža što uzrokuje oštećenja vitalnih staničnih funkcija (Benkerroum, 2010).

Opioidni peptidi reguliraju funkcije centralnog živčanog sustava. Prvi identificirani opioidni peptid je β -kazomorfin-7 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) iz kravljeg β -kazeina. Aminokiselinski slijed opioidnog peptida uvjetuje vezanje na specifični opioidni receptor što uvjetuje njihovo daljnje djelovanje u organizmu. Svi opioidni peptidi imaju isti N-terminalni kraj Tyr-Gly-Gly-Phe (Liu i Udenigwe, 2018).

Peptidi koji vežu mineralne tvari stvaraju komplekse s mineralima poput željeza, kalcija, fosfora i drugih. Nastali kompleksi stabiliziraju minerale tijekom transporta kroz probavni trakt što rezultira poboljšanom apsorpcijom minerala. Laktoferin je višefunkcionalni glikoprotein koji se nalazi u sirutki. Osim antimikrobnih i imunomodulatornih svojstava, ima značajnu ulogu u regulaciji koncentracije željeza u krvi (Vegarud i sur., 2000).



Slika 3. Različiti bioaktivni peptidi i njihove funkcionalne uloge (*prilagođeno prema* Punia i sur., 2020)

2.5. PROIZVODNJA BIOAKTIVNIH PEPTIDA

Fragmentacija mliječnih proteina odvija se na nekoliko načina: enzimskom hidrolizom djelovanjem probavnih enzima (*in vivo* ili *in vitro*), enzimskom hidrolizom mikrobnim ili biljnim enzimima te mikrobnom fermentacijom proteolitičkim bakterijskim kulturama (Jakopović, 2019). Konvencionalne metode za proizvodnju bioaktivnih peptida u mliječnoj industriji su mikrobnu fermentaciju i enzimsku hidrolizu mikrobnim ili biljnim enzimima. Važno je poznavati princip metoda te njihove prednosti i nedostatke kako bi se omogućio ispravan odabir (Murtaza i sur., 2022).

Enzimaska hidroliza mikrobnim ili biljnim enzimima uključuje enzime izolirane iz određenih mikroorganizama ili biljaka. Enzimi izolirani iz mikroorganizama su stabilniji. Također, mikroorganizmi su podložni genetičkoj manipulaciji što omogućava dobivanje željene koncentracije i karakteristike enzima, zbog čega se češće primjenjuju. Osnovna prednost procesa enzimske hidrolize jest brzina reakcije. Izvedba samog procesa, kao i optimizacija uvjeta pri kojima se proces odvija, je jednostavna. Također, proces je jednostavno zaustaviti inaktivacijom enzima. Kako bi se unaprijedio proces enzimske hidrolize, supstrat je ponekad potrebno prethodno obraditi. Nedostatak ove metode je korištenje toplinske predobrade koja može dovesti do denaturacije proteina. (Cruz-Casas i sur., 2021)

Fermentacija proteolitičkim starter kulturama uključuje korištenje odabranih mikroorganizama koji imaju sposobnost razgradnje proteina prisutnih u mlijeku. Proteolitičke starter kulture proizvode enzime (proteaze) koji hidroliziraju kazein i proteine sirutke na manje peptidne fragmente. Fermentacija se provodi prirodnim putem i pod kontroliranim uvjetima što poboljšava tehnološka i nutritivna svojstva hrane te formira specifičnu teksturu i okus. Vrsta odabranog mlijeka, specifični mikroorganizmi te različiti uvjeti fermentacije omogućavaju dobivanje bioaktivnih peptida s različitim funkcionalnim svojstvima. Prednost ove metode je to što se genetičkom manipulacijom može povećati proteolitička aktivnost bakterijskih sojeva. Također, prednost mikrobne fermentacije u usporedbi s enzimskom hidrolizom je jednostavnost i ekonomičnost procesa. (Murtaza i sur., 2022).

2.6. PROTEOLITIČKI SUSTAV BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline su skupina Gram-pozitivnih bakterija koje fermentacijom ugljikohidrata proizvode mliječnu kiselinu. Prema metaboličkom putu razgradnje šećera dijele se u dvije skupine: homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne bakterije razgrađuju šećer (laktozu) do mliječne kiseline, dok su produkti razgradnje laktoze heterofermentativnih bakterija, uz mliječnu kiselinu, etanol, octena kiselina i CO₂. Asporogene su i nepokretne, preživljavaju u anerobnim ili fakultativno aerobnim uvjetima. Tolerancija na nisku pH vrijednost omogućuje im preživljavanje i funkcioniranje u kiselom okruženju kao što je mliječni proizvod. U prehrambenoj industriji imaju važnu ulogu u proizvodnji fermentiranih proizvoda jer pružaju karakterističnu kiselost, okus i teksturu proizvodima. Proizvode i bakteriocine koji, inhibicijom rasta patogenih mikroorganizama, povećavaju rok trajanja samog proizvoda. Iako bakterije mliječne kiselina uključuju više od 60 rodova, najčešći rodovi prisutni

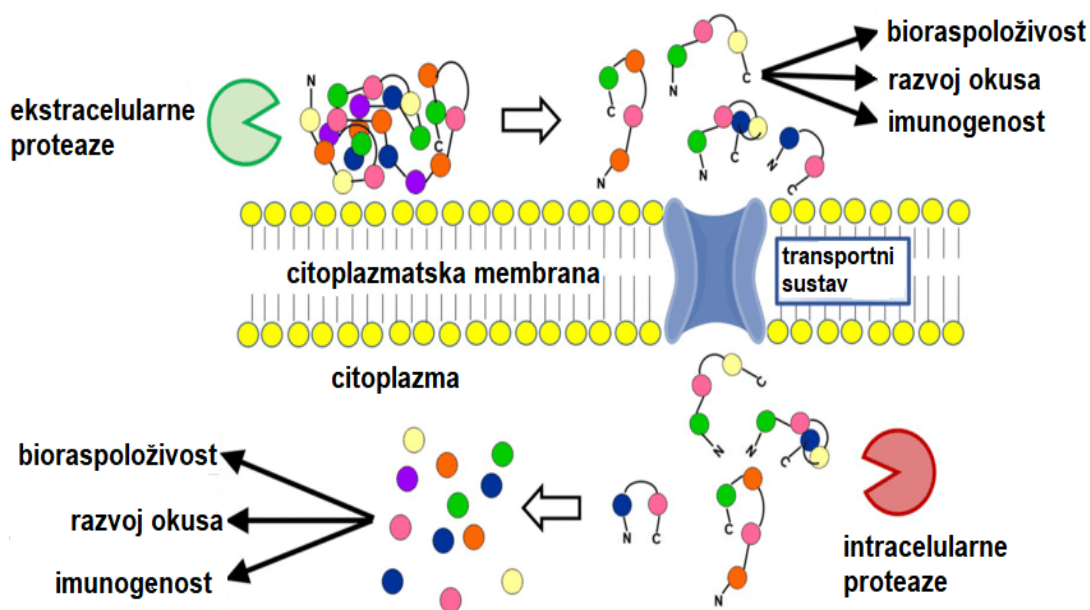
u fermentiranim proizvodima su: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Enterococcus* (Wang i sur., 2021; Samaržija, 2015).

Bakterije mliječne kiseline, za svoj rast i razvoj, trebaju unos esencijalnih aminokiselina. Glavni izvor esencijalnih aminokiselina je mliječni protein kazein kojeg fragmentiraju vlastitim proteolitičkim sustavom (Mirzapour-Kouhdasht i Garcia Vaquero, 2022).

Proteolitički sustav bakterija sastoji se od enzima i transportnih molekula koji omogućavaju razgradnju proteina na oligopeptide i aminokiseline te njihovu apsorpciju u stanice. (Rafiq i sur., 2020).

Proteaza koja se nalazi na vanjskoj staničnoj membrani (engl. *Cell-Envelope Proteinase*, *CEP*) ključni je enzim u početnoj hidrolizi kazeina (Raveschot i sur., 2018). Nakon hidrolize kazeina, oligopeptidi, pomoću peptidnog transportnog sustava prolaze kroz staničnu membranu i ulaze u stanice.

Svaki peptidni transporter specifično prepoznaje određene oligopeptide. Unutar stanica, peptidi podliježu djelovanju različitih intracelularnih peptidaza koje ih hidroliziraju najprije na kraće peptide, a naposljetku i na pojedinačne aminokiseline. Neke od njih su aminopeptidaze, endo- i egzopeptidaze. Aminopeptidaze hidroliziraju peptide od N-terminalnog kraja. Endopeptidaze hidroliziraju veze unutar polipeptidnih lanaca, dok egzopeptidaze hidroliziraju veze s krajeva polipeptidnih lanaca. Proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline, osim što osigurava esencijalne aminokiseline za rast i metabolizam bakterija, osigurava i poboljšana organoleptička svojstva fermentiranih mliječnih proizvoda. Razgradnja proteina utječe na konzistenciju i teksturu proizvoda te pridonosi razvoju karakterističnih okusa (Kieliszek i sur., 2021; Savijoki i sur., 2006).



Slika 4. Proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline (prilagođeno prema Garcia-Kano i sur., 2020)

2.7. ROD *Lactococcus*

Prema taksonomiji, rod *Lactococcus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Streptococcaceae*. Njihovo prirodno stanište su zelene biljke. Iako za mliječnu industriju je važan samo soj *Lactococcus lactis*, u dosadašnjim istraživanjima opisano je još 6 drugih vrsta: *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffi nolactis*, *L. fujiensis* i *L. chungangensis*. *L. lactis* ima dva genotipa: *L. lactis subsp. lactis* i *L. lactis subsp. cremoris* te tri industrijski važna fenotipa: *lactis*, *cremoris* i *diacetylactis*. *Lactococcus lactis* često se nalazi u sastavu komercijalnih mezofilnih kultura za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda jer u zadovoljavajućoj koncentraciji proizvodi mliječnu kiselinu i aromatske spojeve. U takvom sastavu kultura za proizvodnju kiselog mlijeka, u simbiotskom odnosu rasta i razmnožavanja s laktokokima se najčešće nalaze bakterije *Leuconostoc* spp. Uz to, *Leuconostoc* spp. imaju izraženu sposobnost sinteze aromatskih spojeva, dok *Lactococcus* spp. su važne za sintezu mliječne kiseline (Samaržija, 2015).

Glutaminska kiselina, glicin, leucin, izoleucin, histidin, valin i metionin neizostavne su aminokiseline potrebne za rast bakterija roda *Lactococcus*. Slobodne aminokiseline i ostali izvori dušika, prisutni u mlijeku, ne zadovoljavaju bakterijske potrebe, stoga moraju vlastitim

proteolitičkim sustavom hidrolizirati kazein do aminokiselina. U prvoj fazi hidrolize kazeina, ključnu ulogu ima proteinaza PrtP koja je vezana za staničnu ovojnici. Djelovanjem proteinaze PrtP, kazein se hidrolizira na peptide različite duljine. Za daljnju proteolizu, laktokoki koriste transportne sustave i intracelularno locirane peptidaze. Postoje tri transportna sustava koja su dio proteolitičkog sustava soja *Lactococcus lactis*: di- i tripeptidni transportni sustav DtpT i dva oligopeptidna transportna sustava: Opp i Opt. Opp i Opt sustav pripadaju ABC transporterima koji imaju transmembransku domenu i domenu koja veže ATP. Za razliku od Opt-a, Opp ima dva proteina (OptS i OptA) koji vežu peptide. Pomoću navedenih transportnih sustava, razgradni produkti kazeina unešeni su u stanicu. U stanicama se hidroliziraju na peptide nižih molekularnih masa ili na aminokiseline djelovanjem različitih peptidaza karakterističnih za sve rodove bakterija mliječne kiseline (Lamarque i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom poglavlju navedeni su mikroorganizmi korišteni za proizvodnju funkcionalnih probiotičkih napitaka kojima je određen aromatski profil te koji su korišteni za identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih peptida.

3.1.1. Radni mikroorganizam

Za proizvodnju prvog uzorka funkcionalnog napitka korištena je komercijalna mezofilna kultura Bioprox[®] DI-PROX M229 sljedećeg sastava: *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetyllactis* i *Leuconostoc mesenteroides*. Za proizvodnju drugog uzorka funkcionalnog napitka korištena je navedena komercijalna mezofilna kultura i autohtoni bakterijski soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 koji je dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta – ZBMK. Za proizvodnju trećeg uzorka funkcionalnog napitka korišten je samo bakterijski soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-51.

Tablica 1. Sojevi bakterija korišteni za fermentaciju mlijeka

Naziv i oznaka soja	Uvjeti čuvanja
<i>Lactococcus lactis</i> ZGBP5-51	37 °C, aerobno
mezofilna kultura Bioprox [®] DI-PROX M229	4°C, anaerobno

3.1.2. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, Mettler Toledo, XPE205, SAD
- Autoflex speed MALDI – TOF/TOF, Bruker, Njemačka
- Centrifuga Centric, Tehnica, Slovenija
- Centrifuga s hlađenjem 5804R, Eppendorf, SAD
- Centrifuga, Digitor21R, OrtoAlersa, Španjolska
- FVL-2400N Combi-Spin mini-centrifuga/vortex, Biosan, Latvija

- HPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC nano sustav, Thermo scientific, SAD
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka
- Magnetna mješalica, Thermo Scientific, SAD
- pH metar, Metrohm, Švicarska
- Sakupljač frakcija, PROTEINEER fcII, Bruker, Njemačka
- Termostat, Instrumentarija, Hrvatska
- Thermo Fisher GC Trace 1300 u sprezi s TSQ 9000 trostrukim kvadropolom
- Ultrazvučna kupelj, FALC Instruments, Italija
- 6460 TripleQuad LC/MS system, Agilent Technologies, SAD

3.1.3. Laboratorijski pribor

- Automatske pipete (0,1 – 5000 μ L), Eppendorf, SAD
- Eppendorf epruvete (1,5 mL; 2 mL; 5 mL), Eppendorf, SAD
- Epruveta za centrifugu tipa Falcon (50 mL), neoLab, Njemačka
- Epruvete, Scherf Präzision Europe GmbH, Njemačka
- Filtrak filter papir No.388
- Kivete za centrifugu
- MALDI pločica, MTP Anchor Chip 384 BC, Bruker, Njemačka
- NANOSEP filteri za centrifugiranje s porama 0,2 μ m, Pall Corporation, SAD
- Nastavci za automatske pipete (0,1 – 5000 μ L), Eppendorf, SAD
- Stalci za kivete/epruvete, neoLab, Njemačka
- Viale, Agilent Technologies, SAD
- Kolone :
 - Acclaim PepMap 100 C18, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m i.d. \times 15 cm, Thermo Scientific, SAD
 - ACQUITY UPLC[®] BEH C18 1,7 μ m, 2,1 \times 50 mm, Waters, SAD
 - DB-225MS, 30m x 0,25 mm, 0,25 μ m; Agilent Technologies (P/N 122-2932)

3.1.4. Kemikalije

- Acetonitril (ACN), VWR Chemicals, SAD

- Amonijev dihidrogenfosfat, Sigma-Aldrich, SAD
- HCCA (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina) stock otopina matrice, Sigma, SAD
- Izopropanol, Merck, Njemačka
- Kalibrant za MALDI/TOF-TOF, Sigma, SAD
- Mravlja kiselina (HCOOH), Merck, Njemačka
- Trifluoroctena kiselina (TFA), Merck, Njemačka

3.1.5. Otopine

- 0,1 % TFA
- 10 % TFA
- 100 mM NH₄H₂PO₄
- 95/5 0,1 % TFA u vodi/ ACN [v/v]
- TA30 (30/70 [v/v] ACN / 0,1 % TFA)
- TA95 (95/5 [v/v] ACN / 0.1 % TFA)
- za nano-LC:
 - Mobilna faza A: 98 % voda, 2 % ACN, 0,1 % TFA
 - Mobilna faza B: 98 % ACN, 2 % voda, 0,1 % TFA
- za HPLC:
 - Mobilna faza A: 100 % voda, 0,1 % FA
 - Mobilna faza B: 100 % ACN, 0,1 % FA

3.1.6. Programi i baze podataka

- BIOPEP-UWM – baza podataka
- MassHunterWorkstation - program za identifikaciju pikova i analizu spektra, Agilent Technologies, SAD
- NIST MS Search; verzija 2.3 - baza podataka
- ProteinScape, verzija 3.0 - program za pretragu baze podataka s integriranim MASCOT algoritmom za pretraživanje baze podataka, Bruker, Njemačka
- Skyline, verzija 4.2.0. - program za kreiranje metoda za ciljnu analizu proteina, MacCoss Lab Software, SAD
- SRplot - računalna aplikaciju za izradu grafičkog prikaza podataka
- Thermo TraceFinder 4.1 General Quan

- WARP-LC, verzija 1.3 - program za automatizirano snimanje MS i MS/MS spektara, Bruker, Njemačka

3.2. METODE

U ovom poglavlju prikazani su provedeni postupci identifikacije i kvantifikacije bioaktivnih peptida u proizvedenim uzorcima funkcionalnih probiotičkih napitaka, kao i postupci za određivanje njihovih aromatskih profila.

3.2.1. Uzorci

Za proizvodnju probiotičkih fermentiranih napitaka korišteno je mlijeko Veronika. Tri uzorka mlijeka fermentirana su tijekom 18 sati pri 22 °C u 3 paralele.

3.2.2. Određivanje aromatskog profila

3.2.2.1. *Priprema uzoraka za određivanje aromatskog profila*

Svi uzorci funkcionalnog napitka zamrznuti su nakon proizvodnje na -20 °C i skladišteni pri toj temperaturi.

Nekoliko sati prije analize, uzorci su ostavljeni na sobnoj temperaturi kako bi se odmrznuli. Priprema uzoraka provedena je prema Tong i sur., 2017. Nakon odmrzavanja, 3 mL uzorka pipetirano je u headspace vijalu. U vijalu stavljen je i magnet kako bi se ubrzalo uspostavljanje ravnoteže na magnetskoj miješalici. Uspostava ravnoteže provedena je pri 50 °C tijekom 20 min. Nakon uspostave ravnoteže, u headspace vijalu umetnuto je vlakno koje je prethodno očišćeno pri istim uvjetima instrumentalne metode. Adsorpcija na vlakno provedena je pri 50 °C tijekom 1 h, uz stalno miješanje. Nakon adsorpcije, uzorak je injektiran. Vrijeme desorpcije iznosilo je 5 min. Postupak pripreme bio je isti za sve uzorke.

3.2.2.2. Analiza i identifikacija aromatskih spojeva

Analiza i identifikacija aromatskih spojeva provedena je instrumentalom metodom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom mase prema navedenim parametrima (tablica 2). Metoda je opisana u članku Tong i sur. 2018.

Tablica 2. Parametri instrumentalne metode

	Thermo Fisher GC Trace 1300 u sprezi sa TSQ 9000 trosrukim kvadropolom
Software:	Thermo TraceFinder 4.1 General Quan Baza podataka: NIST MS Search; verzija 2.3
Plin nosač:	Helij (6.0)
Kolona:	DB-225MS, 30m x 0,25 mm, 0,25 μ m; Agilent Technologies (P/N 122-2932)
Temperaturni gradijent:	Zadržavanje 5 min na 35 °C porast temperature 4 °C/min sve do 140 °C zadržavanje 5 min na 140 °C porast temperature 10 °C/min sve do 240 °C zadržavanje 5 min na 240 °C
Temperatura inleta:	250 °C
Vrijeme i temperatura adsorpcije:	1 h / 50 °C
Vrijeme desorpcije:	5 min
Način injektiranja:	Splitless
Protok:	1.2 mL/min, konstantan protok
Vrijeme analize:	52 min
Detektor:	MS/MS
Način snimanja:	Snimanje raspona m/z 40-400 (engl. <i>Full Scan</i>)
Ionizacijski mod:	EI (engl. <i>Electron Impact</i>)
Temperatura MS transfer line-a:	250 °C
Temperatura ionskog izvora:	250

3.2.3. Priprema uzoraka za određivanje bioaktivnih peptida

U 40 mL pojedinačnog uzorka mliječnog napitka, dodano je 80 mL vode. Uzorak je homogeniziran vorteksiranjem tijekom 10 min. Dobivenom homogenatu izmjerena je pH vrijednost. Homogenat je inkubiran 1 h pri 40 °C. Nakon toga, provedeno je centrifugiranje na 3000 x g tijekom 30 min pri 4 °C. Supernatant je profiltriran kroz staklenu vunu i filter papir, a potom zamrznut na -80 °C te liofiliziran. Liofilizirani uzorci skladišteni su na + 4 °C.

3.2.4. Ne-ciljna analiza peptida iz uzoraka mlijeka

Za identifikaciju peptida u liofiliziranim uzorcima fermentiranog mlijeka korištena je metoda tekućinske kromatografije obrnutih faza (nano LC) i spektrometrija masa (MS i MS/MS). Opisan je cjelokupan proces provođenja ne-ciljne analize.

3.2.4.1. *Priprema uzoraka za nano LC*

Uzorci liofiziranog mlijeka (3 uzorka u 3 paralele), mase od 1 do 4 mg, odvagani su u Eppendorf epruvete volumena 5 mL. Odvagani uzorci otopljeni su u određenom volumenu otopine koja je sadržavala 95 % 0,1 % trifluorooctene kiseline (TFA) i 5 % acetonitrila (ACN) (v/v) kako bi konačna koncentracija uzoraka iznosila 1 mg/mL. Uzorci su izmiješani vorteksiranjem, a potom postavljeni u ultrazvučnu kupelj pri sobnoj temperaturi tijekom 10 min kako bi se otopile zaostale krute čestice. Volumen od 500 µL svakog uzorka filtriran je kroz filter veličine pora 0,2 µm (Sigma-Aldrich, SAD). Filtriranje je provedeno centrifugiranjem uzoraka na sobnoj temperaturi pri brzini od 10000 o/min. Volumen od 100 µL filtrata prenesen je u vijale za tekućinsku kromatografiju. Postupak je isti za sve uzorke kako bi se osigurala dosljednost između paralelnih uzoraka.

3.2.4.2. *Analiza uzoraka MALDI-TOF/TOF*

MALDI pločica isprana je izopropanolom i posušena papirnatim ubrusom. Nakon toga, isprana je destiliranom vodom i posušena papirnatim ubrusom. Pločica je uronjena u kadicu s izopropanolom i postavljena u ultrazvučnu kupelj pri sobnoj temperaturi tijekom 10 min. Nakon toga, pločica je uronjena u kadicu s otopinom koja je sadržavala 70 % TFA i 30 % ACN (v/v) i stavljena u ultrazvučnu kupelj pri istim uvjetima. Nakon ispiranja pločica je posušena

propuhivanjem komprimiranim zrakom. Za ionizaciju peptida metodom MALDI-TOF/TOF spektrometrijom masa korištena je matrica α -cijano-4-hidroksicimetna kiseline (CHCA) .

Tablica 3. Sastav CHCA matrice za kalibrante

	za 50 μ L
10 mg/mL CHCA	5 μ L
ACN	35,5 μ L
100mM NH₄H₂PO₄	0,5 μ L
0,1 % TFA	7 μ L

Tablica 4. Sastav radne otopine kalibranta

1,4 % CHCA matrica	50 μ L
Temeljna otopina kalibranta	1 μ L

Tablica 5. Sastav CHCA matrice za uzorke

Otopina 5 % TFA i 95 % ACN, v/v	748 μ L
HCCA (otopljena u otopini 10 % TFA i 90 % ACN, v/v)	36 μ L
100 mM NH₄H₂PO₄	8 μ L
10%TFA	8 μ L

3.2.4.3. Razdvajanje peptida i skupljanje frakcija

Razdvajanje je provedeno metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*). Korišten je instrument Dionex Ultimate 3000 RSLCnano System (Thermo Fischer Scientific, SAD) koji je direktno povezan s frakcijskim skupljačem PROTEINEER fcII (Bruker, Njemačka). Separacija peptida provedena je na koloni Acclaim PepMap 100 C18, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m i.d. \times 15 cm (Thermo Scientific, SAD) prema navedenim parametrima (tablica 6). Za svaki uzorak su automatski sakupljene 192 frakcije na MALDI pločicu prema navedenim parametrima (tablica 7).

Tablica 6. Parametri separacije proteina

Pokretna faza A	0,1 % TFA (v/v)		
Pokretna faza B	0.1 % TFA u acetonitrilu (v/v)		
Temperatura kolone	40 °C		
Protok	0,3 µL/min		
Ispiranje kolone	Gradijentno		
	Retencijsko vrijeme	B(%)	Protok (µL/min)
	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	
Detektor	UV/VIS detektor, valna duljina od 214 nm		

Tablica 7. Parametri sakupljanja frakcija peptida

Protok matrice	100 µL/h
Vrijeme sakupljanja frakcija	15-63 min
Vrijeme sakupljanja/frakcija	15 s
Ukupan broj sakupljenih frakcija	192

3.2.4.4. *Analiza peptida spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF*

Nakon separacije, peptidi su analizirani pomoću spektrometra masa Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF (Bruker, Njemačka). Vanjska kalibracija spektra izvedena je pomoću algoritma krivulje četvrtog stupnja. Snimljeno je minimalno 6 signala peptida čije su mase poznate. U tablici 8 i tablici 9 navedeni su parametri za provođenje MS i MS/MS metode.

Tablica 8. Parametri snimanja MS spektra nakon provedene nano LC separacije.

Tip analize	MS pozitiv
Detekcija iona	pozitivna
Vrsta lasera	Smartbeam-II laser
Ionsko zrcalo	reflektron
Raspon masa	700-4000 Da
Kalibracija MS spektra	Algoritam krivulje 4.reda uz signale dobivene snimanjem minimalno 6 peptida poznatih masa
Tolerancije mase pri kalibraciji	100 ppm
Vrsta fragmentacije	inducirana laserom

Tablica 9. Parametri snimanja MS/MS spektra nakon provedene nano LC separacije

Prekursori za MS/MS analizu	
Maksimalna tolerancija mase peptida unutar različitih frakcija	100 ppm
Maksimalan broj frakcija unutar kojih se dopušta ponavljanje istog peptida	6
Identifikacija pozadinskih signala	Ponavljanje signala u 70 % frakcija
Minimalan S/N	10
Minimalna razlika između peptida koji koeluiraju/Da	5 Da
Maksimalan broj peptida prekursora po frakciji	30
MS/MS analiza	
Tip analize	MS/MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Ionsko zrcalo	Reflektron
Broj snimaka/spektar	1500
Vrsta fragmentacije	Inducirana laserom

3.2.4.5. Identifikacija peptida

Podaci koji su dobiveni snimanjem MS i MS/MS spektara korišteni su za pretraživanje Swiss-Prot baze podataka uz pomoć Mascot 2.5.0. algoritma. Korištena je proteomska softverska platforma ProteinScape 3.0. Baza podataka pretraživana je prema navedenim parametrima (tablica 10).

Tablica 10. Parametri pretrage baze podataka

Baza podataka	Swiss Prot
Taksonomija	<i>Bos taurus</i>
Enzim	Nespecifično cijepanje
Varijabilne modifikacije	/
Tolerancija mase prekursora	100 ppm

3.2.5. Ciljna analiza peptida

Nakon provedene identifikacije bioaktivnih peptida, u svim uzorcima funkcionalnog napitka, provedena je ciljna analiza u svrhu kvantifikacije istih. Za kvantifikaciju peptida korištena je spregnuta tehnika RP – HPLC (engl. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) i QQQ – MS (engl. *Triple Quadrupole Mass Spectrometry*). Razvoj metode za analizu navedenih uzoraka, kao i sama analiza, proveden je na 1290 Infinity UHPLC sustavu (Agilent Technologies, SAD) koji je povezan na Agilent 6460 Triple Quad spektrometar masa s ugrađenim ESI (engl. *Electrospray Ionization*) izvorom (Agilent Technologies, SAD). Korištena je metoda MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring Method*) opisana u članku Novak i sur. 2021. Peptidi su identificirani i kvantificirani pomoću softvera MassHunter Workstation, verzija B.08.00. (Agilent Technologies, SAD).

3.2.5.1. Priprema uzoraka za ciljnu analizu

Priprema uzoraka za ciljnu analizu slična je pripremi uzoraka za ne-ciljnu analizu. Razlika u pripremi uzoraka jedino je u otapalu u kojem su uzorci otopljeni za analizu. Umjesto otopine od 95 % 0,1 % TFA i 5 % ACN (v/v) korištena je otopina 95 % 0,1 % mravlje kiseline i 5 % ACN (v/v).

Separacija peptida provedena je na 1290 Infinity HPLC sustavu (Agilent Technologies, SAD) prema navedenim parametrima (tablica 11).

Tablica 11. Parametri za separaciju peptida

Mobilna faza A	100 % voda, 0,1 % FA (v/v)		
Mobilna faza B	100 % ACN, 0,1 % FA (v/v)		
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm, 1/pk		
Temperatura kolone	40 °C		
Protok	0,3 mL/min		
Ispiranje kolone (gradijentno)	Retencijsko vrijeme (min)	A (%)	B (%)
	2,0	95,0	5,0
	16,0	60,0	40,0
	25,0	20,0	80,0
	26,0	20,0	80,0
	26,5	95,0	5,0
	35,0	95,0	5,0

Uzorci su ionizirani pomoću ESI ionskog izvora prema navedenim parametrima (tablica 12) postavljenim u MassHunter WorkStation softveru verzija B.08.00.

Tablica 12. Parametri ionskog izvora

Temperatura plina	300 °C
Protok plina	7 L/min
Tlak nebulizera	40 psi
Kapilarni napon	300 °C
Temperatura <i>engl.</i> Sheat Gas	9 L/min
Protok <i>engl.</i> Sheat Gas	3,5 kV

Praćene su tranzicije opisane u znanstvenom radu Novak i sur. 2021.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Različiti hlapljivi i nehlapljivi kemijski spojevi pridonose okusu i mirisu fermentiranog mlijeka. Nehlapljivi spojevi doprinose okusu, a hlapljivi spojevi doprinose aromi mliječnih proizvoda (Liu i sur., 2004). U ovom poglavlju prikazani su rezultati identifikacije aromatskih spojeva u tri različita uzorka fermentiranog mlijeka nakon primjene komercijalne mezofilne kulture Bioprox[®] DI-PROX M229, zatim združene primjene komercijalne mezofilne kulture Bioprox[®] DI-PROX M229 i soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 te primjenom samo soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Također, prikazani su rezultati ne-ciljne i ciljne analize peptida, odnosno relativne kvantifikacije peptida s bioaktivnim svojstvima iz istih uzoraka.

4.1. IDENTIFIKACIJA AROMATSKIH SPOJEVA

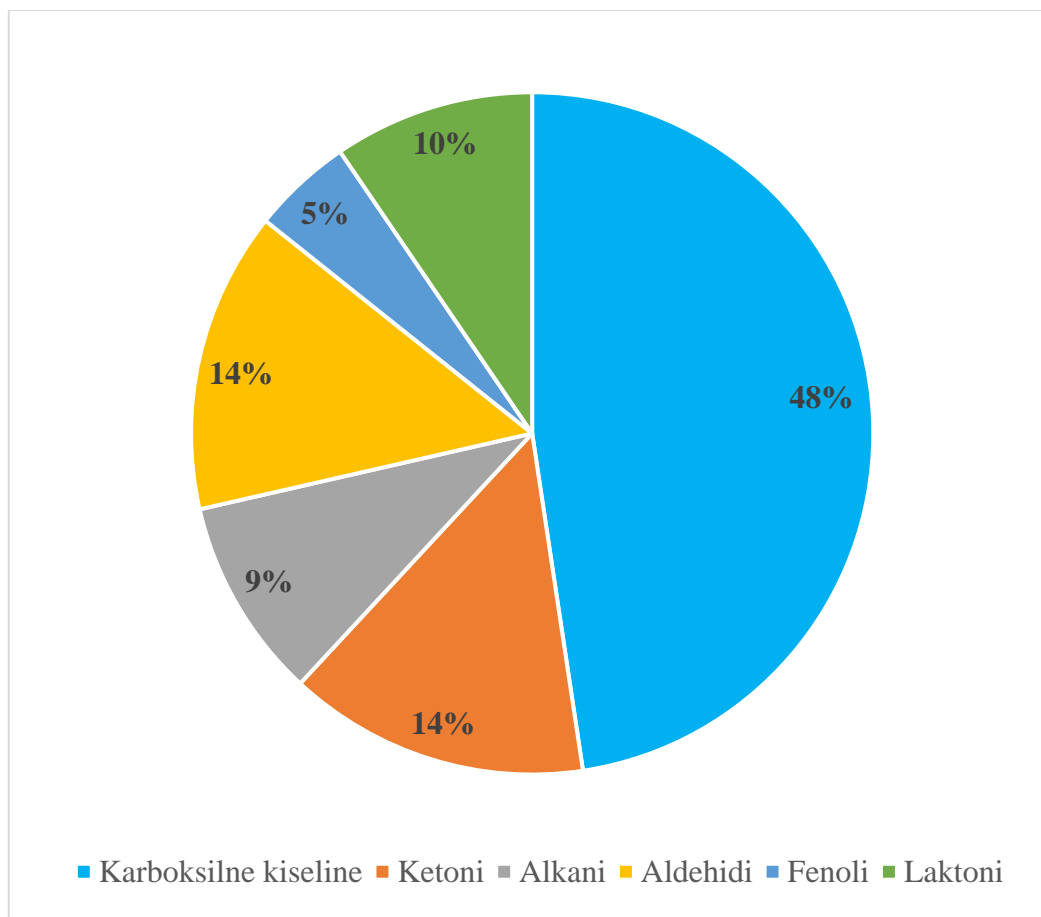
Rezultati identifikacije aromatskih spojeva prisutnih u uzorcima mlijeka fermentiranog djelovanjem komercijalne mezofilne kulture Bioprox[®] DI-PROX M229, djelovanjem komercijalne mezofilne kulture Bioprox[®] DI-PROX M229 i soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 te djelovanjem samo soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 prikazani su u sljedećim tablicama (tablica 13, tablica 14, tablica 15).

Tablica 13. Hlapivi spojevi identificirani u uzorku mlijeka koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox[®] DI-PROX M229

#	Naziv spoja	Molekulska formula	Kemijska skupina	Retencijsko vrijeme
1	Octena kiselina	CH ₃ COOH	Karboksilne kiseline	7,51
2	Acetoin	C ₄ H ₈ O ₂	Ketoni	9,62
3	Dodekan	C ₁₂ H ₂₆	Alkani	14,05
4	Butanska kiselina	C ₄ H ₈ O ₂	Karboksilne kiseline	14,94
5	Metional	C ₄ H ₈ OS	Aldehidi	18,03
6	Benzaldehid	C ₇ H ₆ O	Aldehidi	18,73
7	Nonan-2-on	C ₉ H ₁₈ O	Ketoni	19,24
8	Tetradekan	C ₁₄ H ₃₀	Alkani	20,59

Tablica 13. Hlapivi spojevi identificirani u uzorku mlijeka koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox[®] DI-PROX M229-nastavak

#	Naziv spoja	Molekulska formula	Kemijska skupina	Retencijsko vrijeme
9	Metoksi-fenil-oksim	C ₈ H ₉ NO ₂	Fenoli	20,91
10	Heksanska kiselina	C ₆ H ₁₂ O ₂	Karboksilne kiseline	21,89
11	Benzen acetaldehid	C ₈ H ₈ O	Aldehidi	22,80
12	Heptanska kiselina	C ₇ H ₁₄ O ₂	Karboksilne kiseline	24,78
13	Metil-nonil-keton	C ₁₁ H ₂₂ O	Ketoni	25,59
14	Oktanska kiselina	C ₈ H ₁₆ O ₂	Karboksilne kiseline	27,83
15	Nonanska kiselina	C ₉ H ₁₈ O ₂	Karboksilne kiseline	30,39
16	Benzojeva kiselina	C ₇ H ₆ O ₂	Karboksilne kiseline	32,31
17	n-dekanska kiselina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Karboksilne kiseline	33,43
18	9-decenska kiselina	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Karboksilne kiseline	34,16
19	Dodekanska kiselina	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Karboksilne kiseline	39,58
20	δ-dekalakton	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Laktioni	41,02
21	δ-dodekalakton	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	Laktioni	43,84



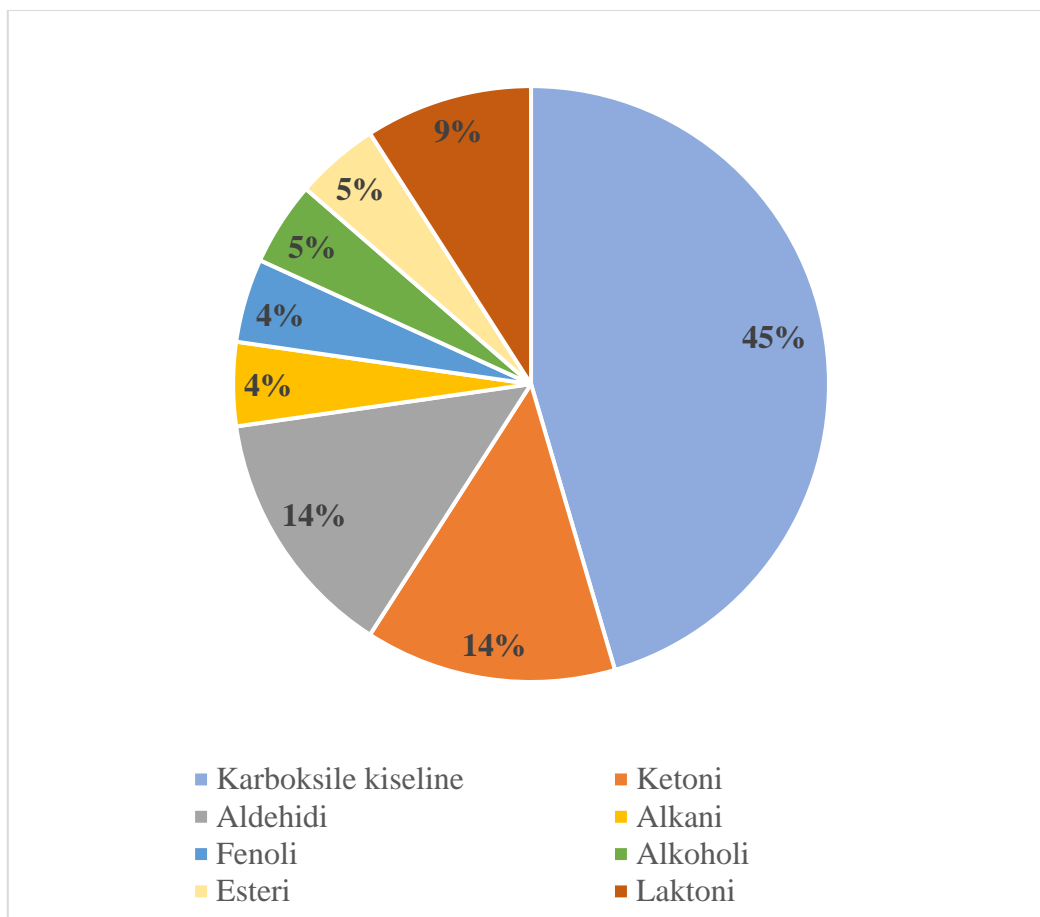
Slika 5. Udio pojedinih kemijskih skupina u ukupnoj količini identificiranih hlapivih spojeva u uzorku mlijeka koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox® DI-PROX M229

Tablica 14. Hlapivi spojevi identificirani u uzorku koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox® DI-PROX M229 i bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51

	Naziv spoja	Molekulska formula	Kemijska skupina	Retencijsko vrijeme
1	Octena kiselina	CH ₃ COOH	Karboksilne kiseline	7,62
2	2-heptanon	C ₇ H ₁₄ O	Ketoni	12,03
3	Butanska kiselina	C ₄ H ₈ O ₂	Karboksilne kiseline	14,95

Tablica 14. Hlapivi spojevi identificirani u uzorku koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox[®] DI-PROX M229 i bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP55-51-nastavak

#	Naziv spoja	Molekulska formula	Kemijska skupina	Retencijsko vrijeme
4	3-metilbutanska kiselina	C ₅ H ₁₀ O ₂	Karboksilne kiseline	16,49
5	Metional	C ₄ H ₈ OS	Aldehidi	18,03
6	Benzaldehid	C ₇ H ₆ O	Aldehidi	18,74
7	Nonan-2-on	C ₉ H ₁₈ O	Ketoni	19,25
8	Tetradekan	C ₁₄ H ₃₀	Alkani	20,59
9	Metoksi-fenil-oxsim	C ₈ H ₉ NO ₂	Fenoli	20,92
10	Heksanska kiselina	C ₆ H ₁₂ O ₂	Karboksilne kiseline	21,89
11	Benzen acetaldehid	C ₈ H ₈ O	Aldehidi	22,81
12	Heptanska kiselina	C ₇ H ₁₄ O ₂	Karboksilne kiseline	24,78
13	Metil-nonil-keton	C ₁₁ H ₂₂ O	Ketoni	25,59
14	Feniletil alkohol	C ₈ H ₁₀ O	Alkoholi	26,84
15	Oktanska kiselina	C ₈ H ₁₆ O ₂	Karboksilne kiseline	27,73
16	Nonanska kiselina	C ₉ H ₁₈ O ₂	Karboksilne kiseline	30,40
17	Benzojeva kiselina	C ₇ H ₆ O ₂	Karboksilne kiseline	32,31
18	n-dekanska kiselina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Karboksilne kiseline	33,45
19	Oktil oktanoat	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Esteri	37,99
20	Dodekanska kiselina	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Karboksilne kiseline	39,59
21	δ-dekalakton	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Laktoni	40,29
22	δ-dodekalakton	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	Laktoni	43,83



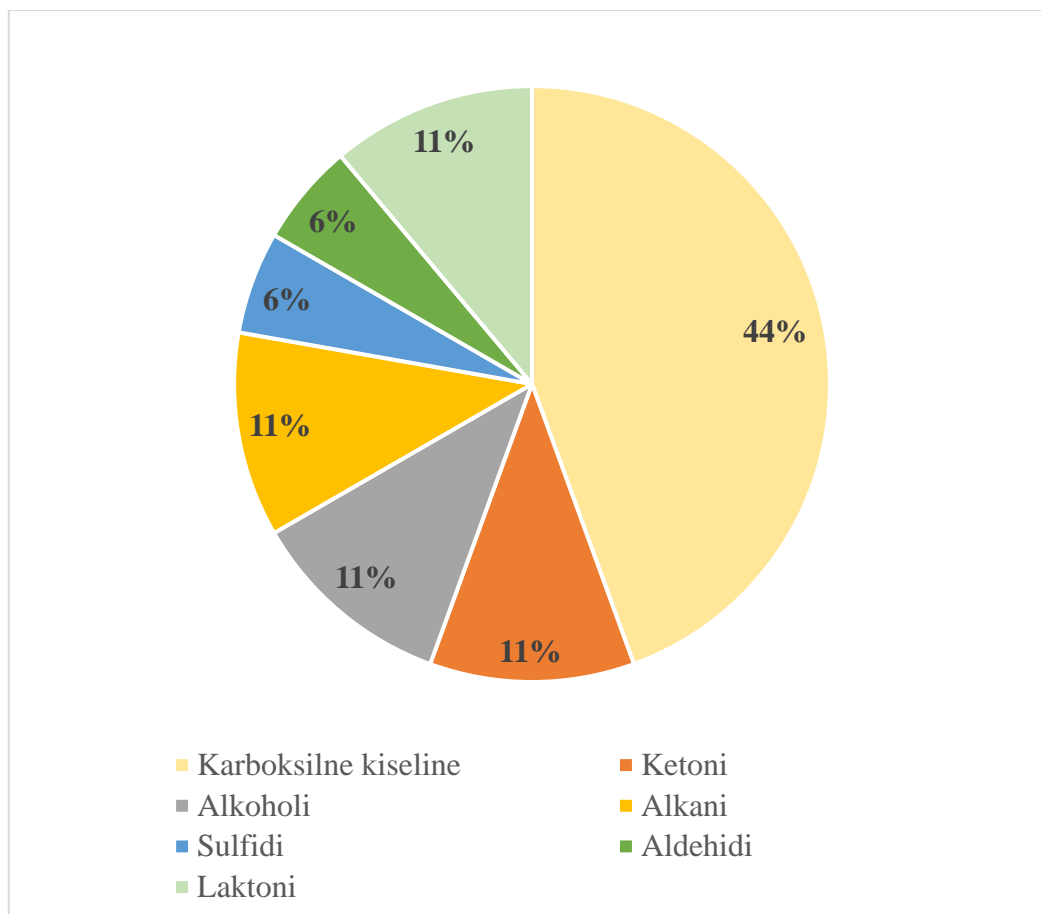
Slika 6. Udio pojedinih kemijskih skupina u ukupnoj količini identificiranih hlapivih spojeva u uzorku mlijeka koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox® DI-PROX M229 i bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP55-51

Tablica 15. Hlapivi spojevi identificirani u uzorku koji je fermentiran bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP55-51

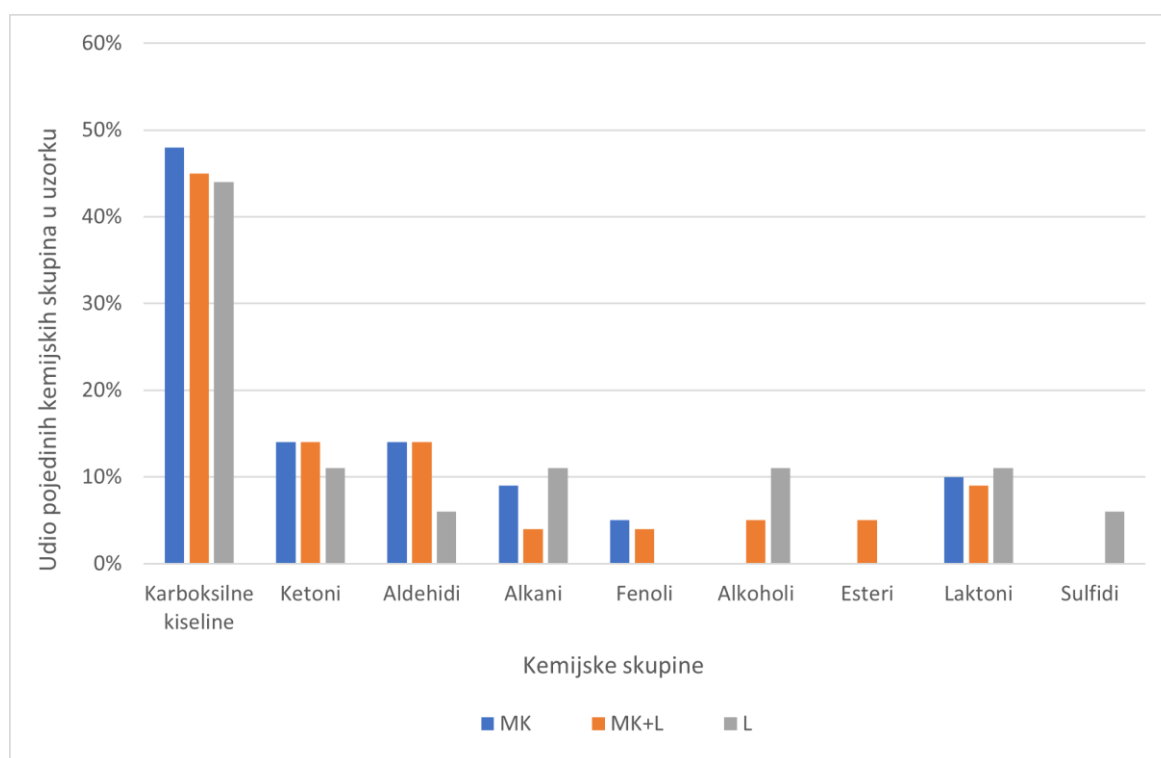
#	Naziv spoja	Molekulska formula	Kemijska skupina	Retencijsko vrijeme
1	Octena kiselina	CH ₃ COOH	Karboksilne kiseline	8,77
2	2-heptanon	C ₇ H ₁₄ O	Ketoni	13,02

Tablica 15. Hlapivi spojevi identificirani u uzorku koji je fermentiran bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP55-51-nastavak

#	Naziv spoja	Molekulska formula	Kemijska skupina	Retencijsko vrijeme
3	1-heksanol	C ₆ H ₁₄ O	Alkoholi	13,86
4	Dodekan	C ₁₂ H ₂₆	Alkani	15,01
5	Butanska kiselina	C ₄ H ₈ O ₂	Karboksilne kiseline	15,90
6	Dimetil trisulfid	C ₂ H ₆ S ₃	Sulfidi	16,21
7	Benzaldehid	C ₇ H ₆ O	Aldehidi	19,81
8	Tetradekan	C ₁₄ H ₃₀	Alkani	21,54
9	Heksanska kiselina	C ₆ H ₁₂ O ₂	Karboksilne kiseline	22,81
10	Heptanska kiselina	C ₇ H ₁₄ O ₂	Karboksilne kiseline	25,75
11	Metil-nonil-keton	C ₁₁ H ₂₂ O	Ketoni	26,61
12	Feniletil alkohol	C ₈ H ₁₀ O	Alkoholi	27,90
13	Oktanska kiselina	C ₈ H ₁₆ O ₂	Karboksilne kiseline	28,76
14	Benzojeva kiselina	C ₇ H ₆ O ₂	Karboksilne kiseline	33,52
15	n-dekanska kiselina	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Karboksilne kiseline	34,72
16	Dodekanska kiselina	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Karboksilne kiseline	40,41
17	δ-dekalakton	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	Laktoni	41,82
18	δ-dodekalakton	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	Laktoni	44,48



Slika 7. Udio pojedinih kemijskih skupina u ukupnoj količini identificiranih hlapivih spojeva u uzorku mlijeka koji je fermentiran bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP55-51



Slika 8. Usporedba udjela pojedinih kemijskih skupina u uzorcima (MK-mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)

Plinskom kromatografijom u sprezi sa spektrometrijom masa (GC-MS) provedene su analize hlapivih spojeva arome u uzorcima fermentiranog mlijeka. Identificirani spojevi arome mogu se svrstati u sljedeće kemijske skupine: karboksilne kiseline, ketoni, aldehidi, alkani, fenoli, alkoholi, esteri, laktoni i sulfidi. Hlapive tvari arome sintetiziraju se u reakcijama kemijske ili enzimske oksidacije te interakcijom nastalih spojeva s proteinima, peptidima i slobodnim aminokiselinama (Krvavica i sur., 2010). Također, razgradnjom slobodnih aminokiselina nastaju hlapive tvari koje imaju veliki utjecaj na aromu konačnog proizvoda. Po udjelu, najzastupljenija kemijska skupina u analiziranim uzorcima su karboksilne kiseline. Najveći udio karboksilnih kiselina ima uzorak mlijeka koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox[®] DI-PROX M229. Karboksilne kiseline nastaju lipolizom te hidrolizom laktoze i aminokiselina. Npr. 3-metilbutanska kiselina prisutna je samo u fermentiranom mlijeku jer nastaje razgradnjom slobodnih aminokiselina proteolitičkim sustavom mliječnih bakterija. Karboksilne kiseline daju oštru i užeglu aromu te su prekursori u sintezi ketona, aldehida, alkohola i estera (Beltrán-Barrientos i sur., 2019). Prema rezultatima prikazanim na slici 4. uzorak mlijeka koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox[®] DI-PROX M229 i uzorak mlijeka koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox[®] DI-PROX M229 i bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 imaju veći udio ketona od uzorka koji je fermentiran samo bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. To se, prvenstveno, odnosi na veće koncentracije acetoina. Naime, bakterijske vrste *Lactococcus diacetylactis* i *Leuconostoc mesenteroides* metabolizmom citrata sintetiziraju acetoin koji daje maslačnu aromu karakterističnu za fermentirane mliječne proizvode (Liu i sur., 2020). U mješovitim bakterijskim kulturama, *Leuconostoc* spp. koriste se za sintezu diacetila iz acetaldehida čime se smanjuje koncentracija acetaldehida koji uzrokuje „nezreli“ okus mlijeka (Samaržija, 2015). Uzorak koji je fermentiran samo bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 sadrži najmanji udio aldehida. U svim uzorcima prisutan je benzaldehid. Općenito, aldehidi su međuproducti u fermentiranom mlijeku, te se brzo reduciraju u alkohole ili oksidiraju u kiseline (Beltrán-Barrientos i sur., 2019). Neke od masnih kiselina, u mlijeku se nalaze u obliku n-alkana te njihov sastav ovisi o prehrani sisavca. Mogu se koristiti kao biomarkeri za određivanje prehrane sisavaca (Wright i sur., 2020). Sulfidi nastaju kao nusproizvod fermentacijskih procesa, a u fermentiranom mlijeku prisutni su u tragovima (Fang i sur., 2019). Alkani, alkoholi i sulfidi zastupljeniji su u uzorku koji je fermentiran samo bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 u odnosu na uzorak koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox[®] DI-PROX M229 i uzorak koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox[®] DI-PROX M229 i bakterijskim

sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Esteri su najviše prisutni u uzorku koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox® DI-PROX M229 i bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Laktoni su ciklički karboksilni esteri koji nastaju iz hidroksikiselina. Najzastupljeniji su δ -dekalakton i δ -dodekalakton čija se koncentracija dokazano povećava fermentacijom (Nishimura i sur., 2021). Aroma koju laktoni daju mliječnim proizvodima često se opisuje kao masna, orašasta i kremasta. Laktoni su identificirani u sva tri uzorka korištena u ovom istraživanju. Fenoli su kemijska skupina koju karakterizira prisutnost barem jednog arilnog prstena na koji je vezana barem jedna hidroksilna skupina. Fenolni spojevi identificirani su u uzorku mlijeka koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox® DI-PROX M229 te u uzorku koji je fermentiran komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox® DI-PROX M229 i bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. U niskim koncentracijama, fenolni spojevi pridonose poželjnom okusu sira, ali u većim koncentracijama uzrokuju negativne promjene organoleptičkih svojstava mliječnog proizvoda (O'Connell i Fox, 2001).

4.2. NE-CILJNA ANALIZA PEPTIDA

Ne-ciljnom analizom uzoraka fermentiranog mlijeka spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, ustanovljena je prisutnost niza raznovrsnih peptida. Prema rezultatima većina peptida proizlazi iz hidrolize α ₁-kazeina, β -kazeina i κ -kazeina. Identificirane peptidne sekvence pretraživane su u Biopep bazi podataka kako bi se pronašli peptidi kojima su, u znanstvenoj literaturi, prethodno opisana bioaktivna svojstva.

Tablica 16. Peptidi iz uzorka mlijeka fermentiranog komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox® DI-PROX M229 kojima su prethodno utvrđena bioaktivna svojstva

Sekvenca peptida	Protein	Molekulska masa (Da)	Bioaktivno djelovanje	Referenca
HKEMPFPKYPVEPF	β -kazein	1746.0322	Peptid koji veže Zn	Gagnaire i sur. (2020)
NLHLPLPLL	β -kazein	1029.2724	Antikancerogeno	Mohammed i Alhassan (2015)
			ACE inhibitorno	Robert i sur. (2004)
LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	β -kazein	2107.5295	Imunomodulatorno	Cermeño i sur. (2016)
			ACE inhibitorno	Nielsen i sur. (2018)
QEPVLGPVRGPFPP	β -kazein	1392.5971	ACE inhibitorno	Villegas i sur. (2014)
			Antidijabetičko	Gong i sur. (2020)
YFPFGPIP	β -kazein	1001.1320	Inhibitor dipeptidil peptidaze 4	Uenishi i sur. (2012)
			ACE inhibitorno	Lu i sur. (2016)
PFPFGPIP	β -kazein	837.9591	ACE inhibitorno	Lin i sur. (2017)
HQPHQPLPPTVMFPPQ	β -kazein	1851.1311	Peptid koji veže Zn	Tellez i sur. (2010)

Tablica 17. Peptidi iz uzorka mlijeka fermentiranog sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 i komercijalnom mezofilnom kulturom Bioprox® DI-PROX M229 kojima su prethodno utvrđena bioaktivna svojstva

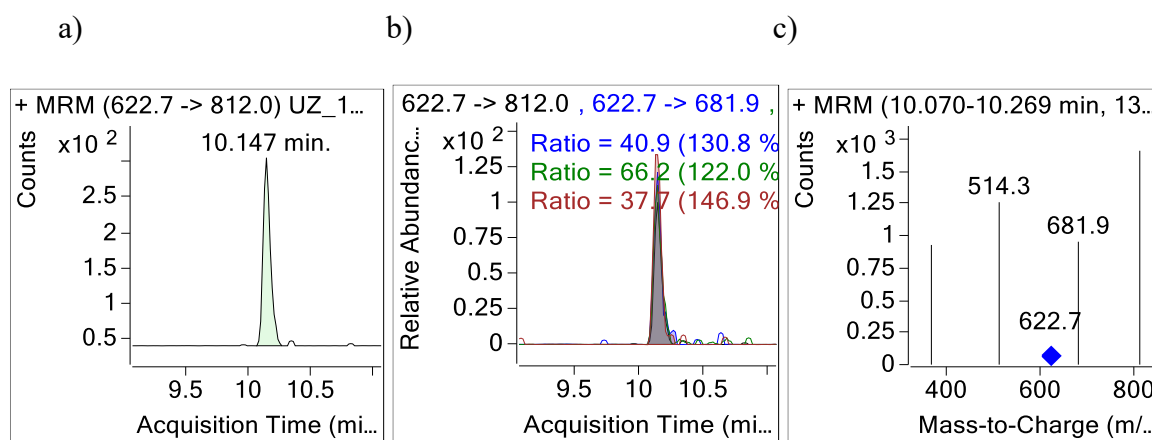
Sekvenca peptida	Protein	Molekulska masa (Da)	Bioaktivno djelovanje	Referenca
QEPVLGPVRGPFPP	β -kazein	1392.5971	ACE inhibitorno	Villegas i sur. (2014)
			Antidijabetičko	Gong i sur. (2020)
HKEMPFPKYPVEPF	β -kazein	1746.0322	Peptid koji veže Zn	Gagnaire i sur. (2020)

Tablica 18. Peptidi iz uzorka mlijeka fermentiranog sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 kojima su prethodno utvrđena bioaktivna svojstva

Sekvenca peptida	Protein	Molekulska masa (Da)	Bioaktivno djelovanje	Referenca
HKEMPFKYPVEPF	β -kazein	1746.0322	Peptid koji veže Zn	Gagnaire i sur. (2020)
PFPGPIP	β -kazein	837.9591	ACE inhibitorno	Lin i sur. (2017)
ARHPHPLSFM	κ -kazein	1329.5295	Antioksidativno	Tonolo i sur. (2018)

4.3. CILJNA ANALIZA PEPTIDA

Kvantifikacija bioaktivnih peptida provedena je MRM metodom koja je opisana u Poglavlju 3.2.5. Na slici 9 prikazani su reprezentativni kromatogrami peptida i spektar fragmentnih iona nakon fragmentacije ciljanog iona ($m/z = 622,7$).

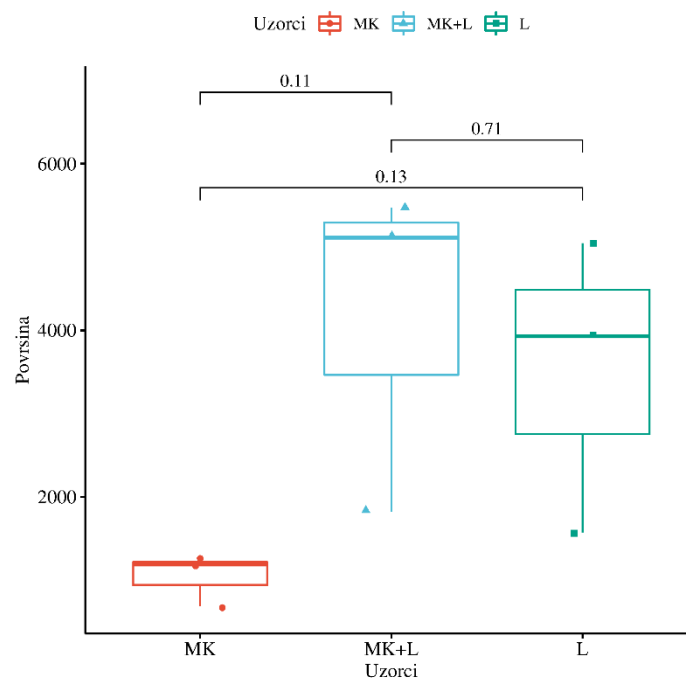


Slika 9. Reprezentativni MRM kromatogrami peptida SQSKVLPVPQKAVPYPQ koji je nastao djelovanjem proteolitičkog sustava bakterijskih sojeva koji se nalaze u sastavu komercijalne mezofilne kulture kulture Bioprox[®] DI-PROX M229 ($m/z = 622,7$)

a) MRM kromatogram fragmentnog iona korištenog za kvantifikaciju b) preklapljeni MRM kromatogrami svih fragmentnih iona; c) MS spektar svih fragmentnih iona

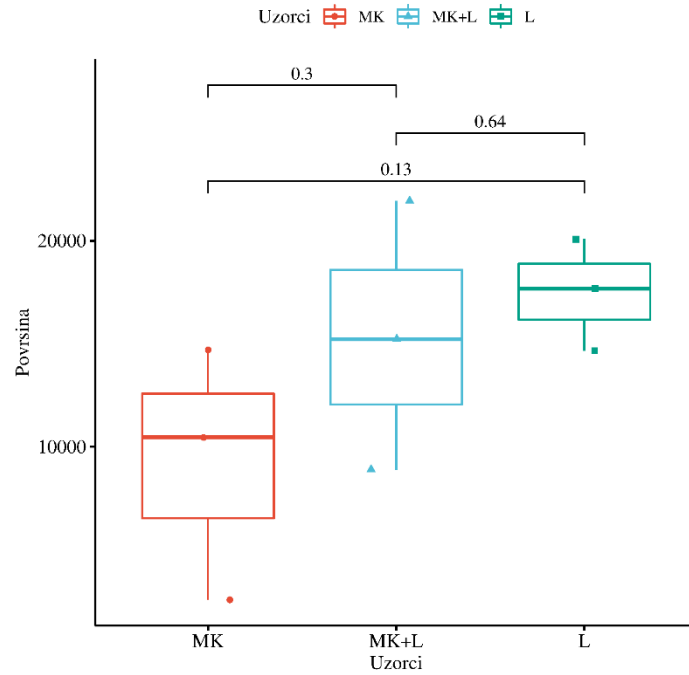
Provedena je statistička analiza rezultata dobivenih nakon provedene MRM metode koristeći računalnu aplikaciju za izradu grafičkog prikaza podataka SRplot. Primijenjen je t-test i rezultati su prikazani grafički. Na grafovima je prikazana p vrijednost koja pokazuje

statističku razliku između uzoraka. Statističke razlike između uzoraka smatrane su značajnima kada su p vrijednosti bile manje od 0,05. Sve dobivene p vrijednosti veće su od 0,05 što dovodi do zaključka da soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 svojim proteolitičkim sustavom proizvodi količinu peptida koja se statistički ne razlikuje od količine koju proizvode bakterijski sojevi koji se nalaze u sastavu komercijalne mezofilne kulture Bioprox® DI-PROX M229. Nadalje, korištenje bakterijskog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 zajedno s komercijalnom mezofilnom kulturom ne dovodi nužno do povećanja količine peptida. Grafički prikazi peptida detektiranih ciljanom analizom prikazani su u nastavku.

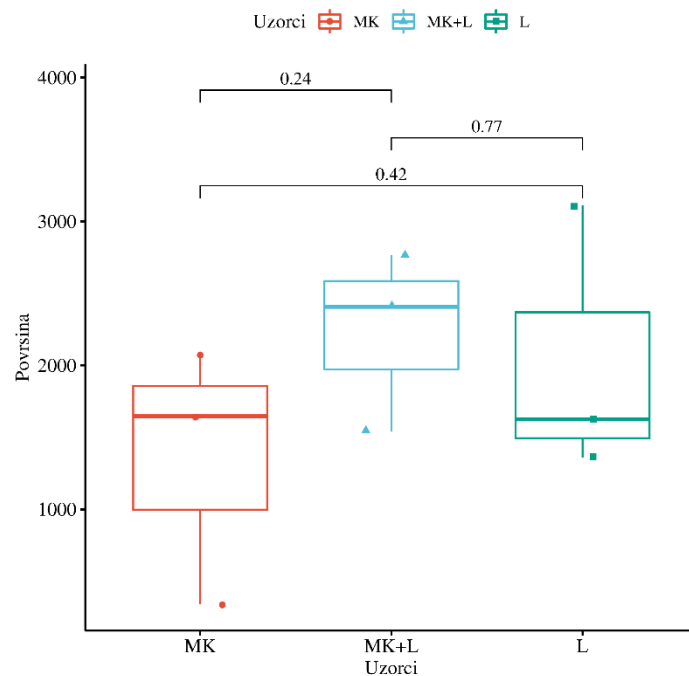


Slika 10. Zastupljenost HQPHQLPPT peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima

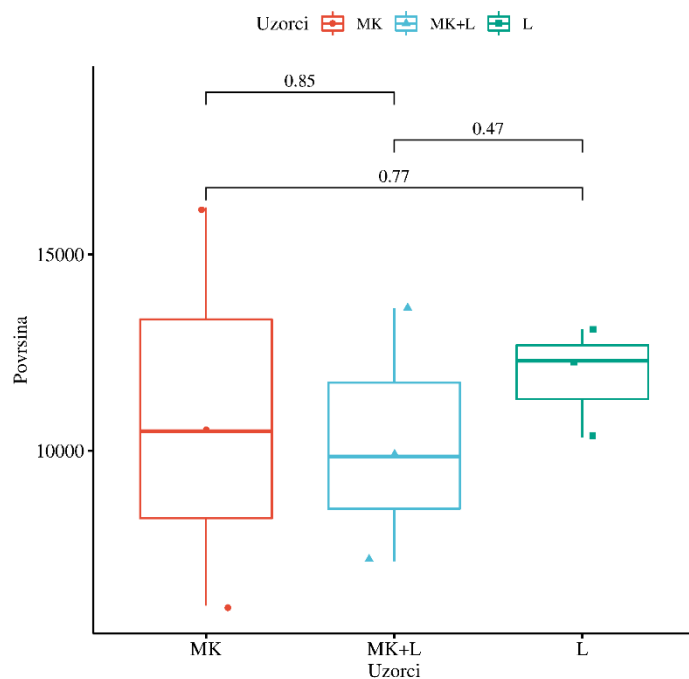
(Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



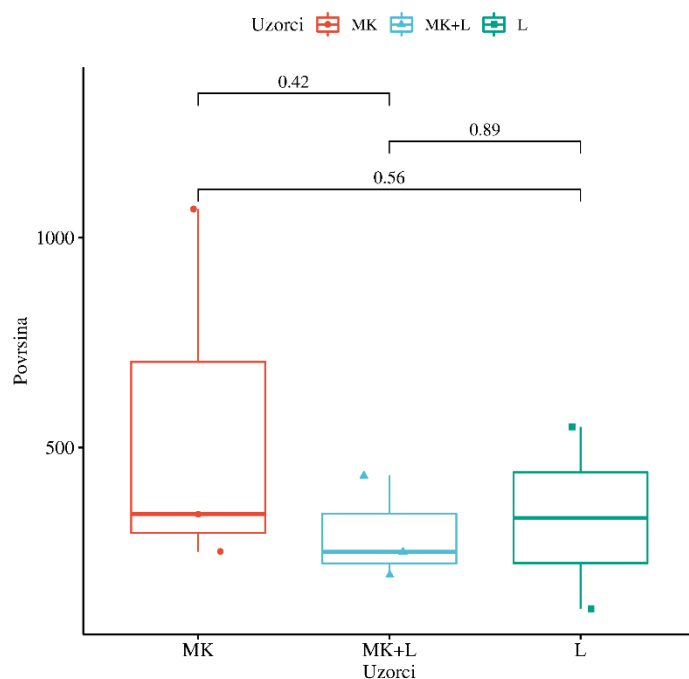
Slika 11. Zastupljenost SWMHQPHQLPPT peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



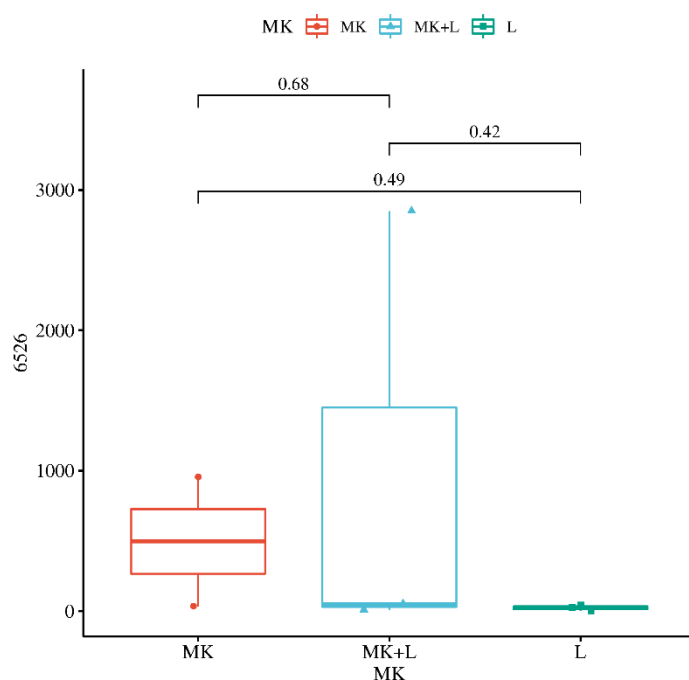
Slika 12. Zastupljenost WMHQPHQLPPT peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



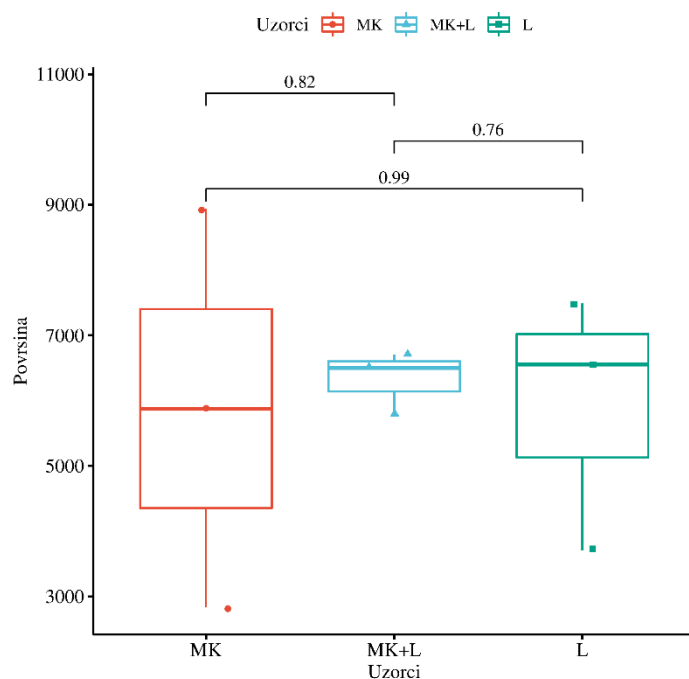
Slika 13. Zastupljenost ARHPHLSFM peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



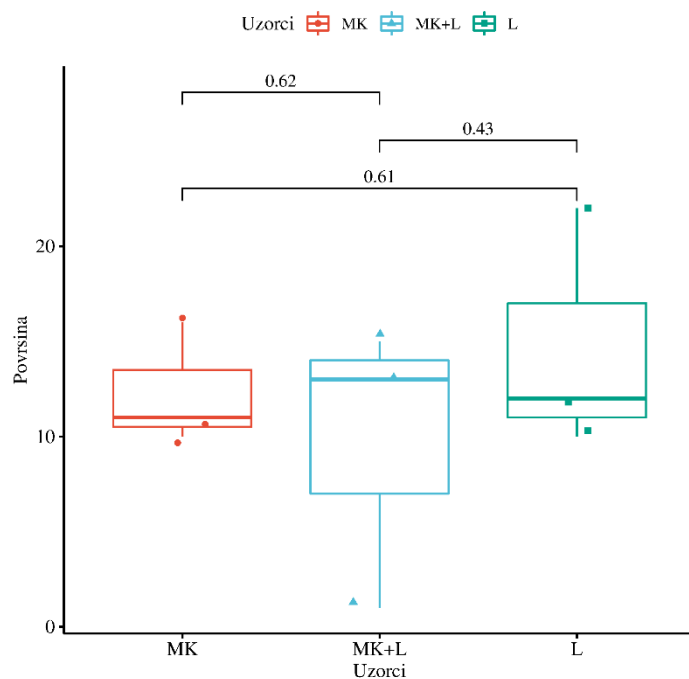
Slika 14. Zastupljenost SQSKVLPVPQKAVPYPO peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



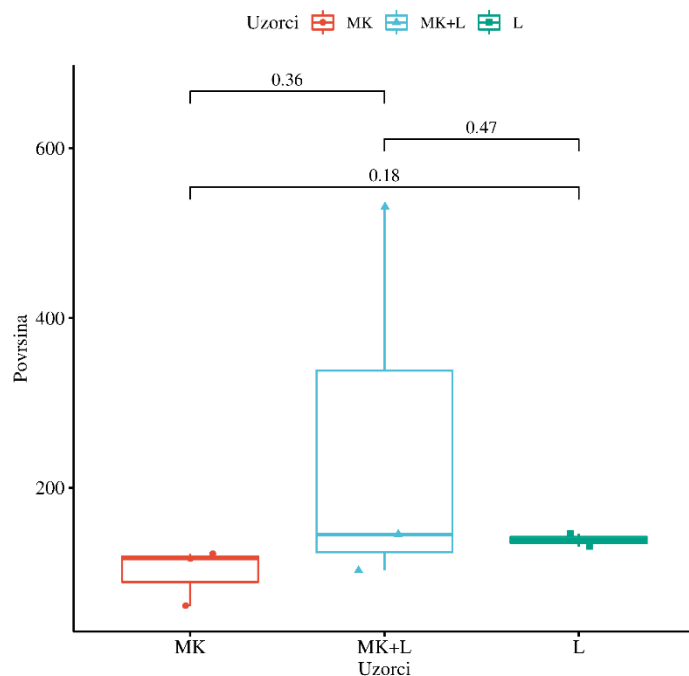
Slika 15. Zastupljenost YQEPVLGPVR peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



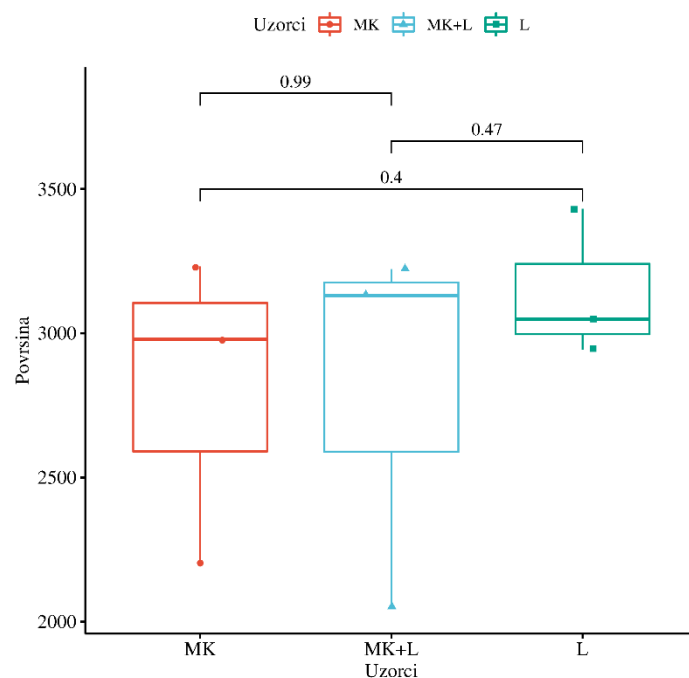
Slika 16. Zastupljenost RDMPIQAF peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



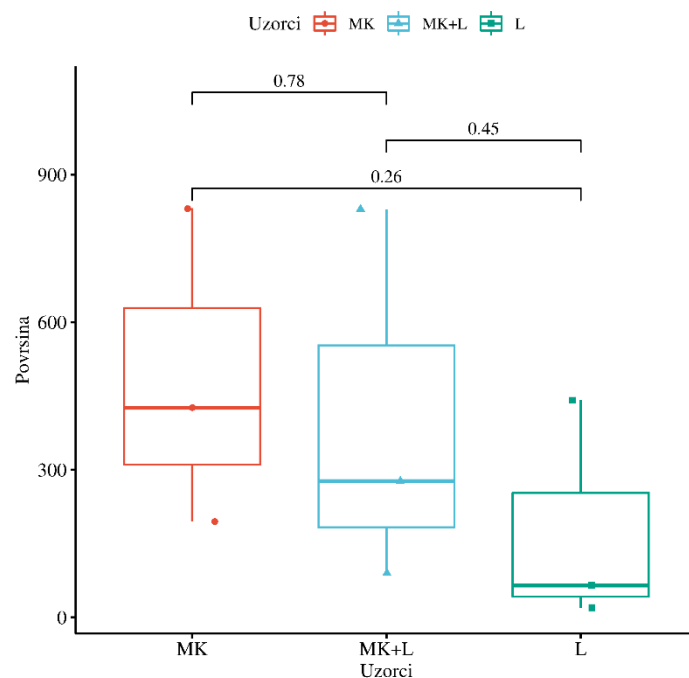
Slika 17. Zastupljenost ARHPHPLSFM peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



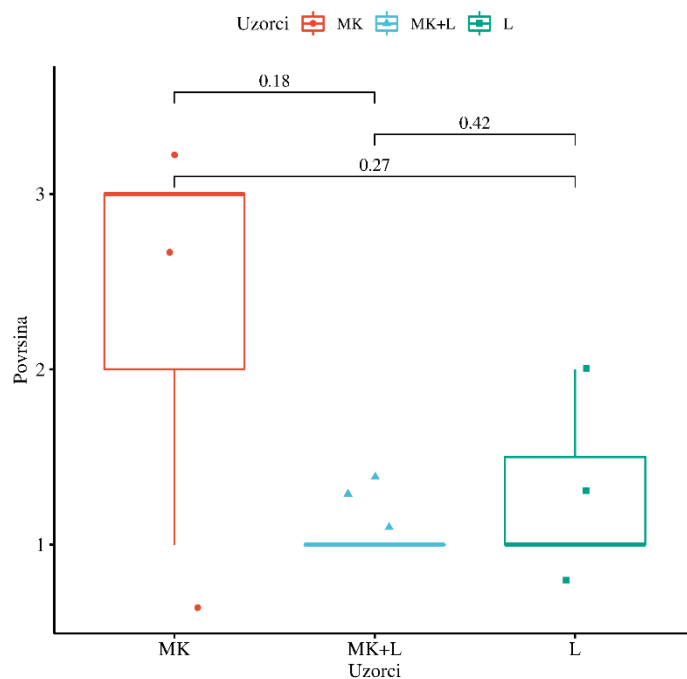
Slika 18. Zastupljenost HQPHQLPPTVMFPPQ peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



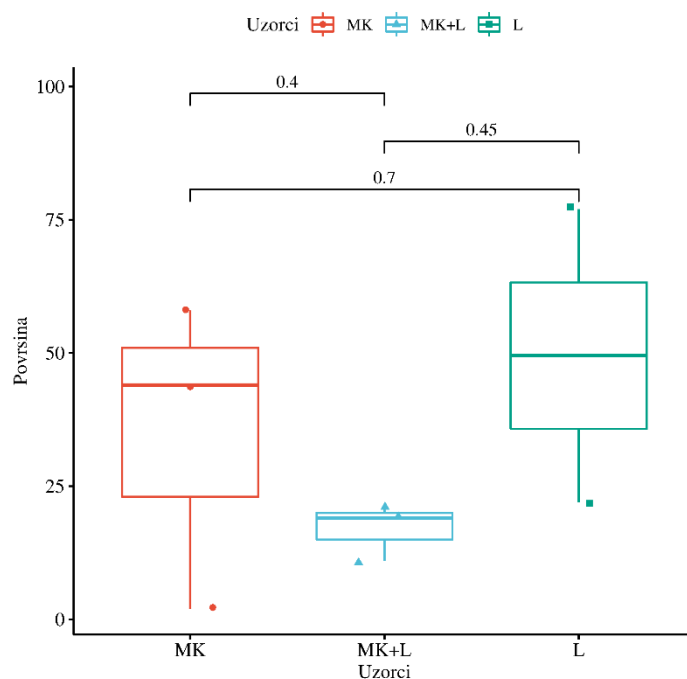
Slika 19. Zastupljenost TKVIPYVRYL peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



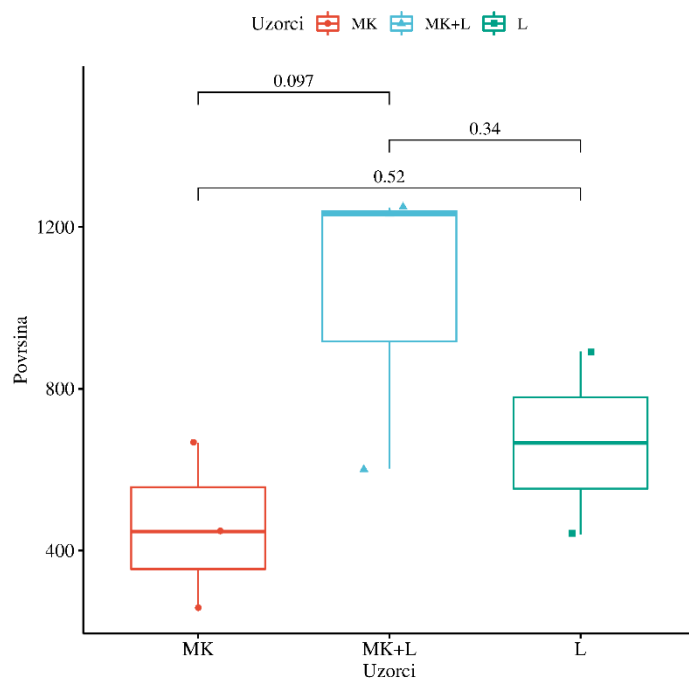
Slika 20. Zastupljenost VLGPVRGPF peptide u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



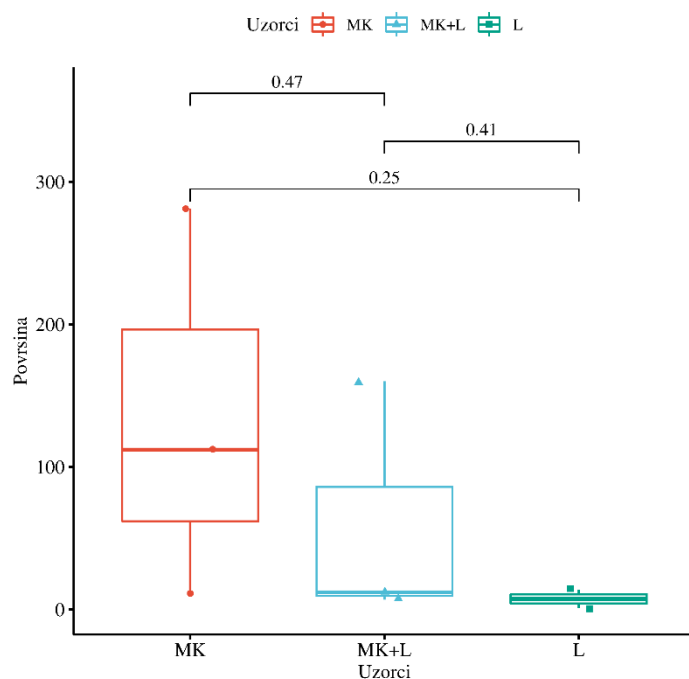
Slika 21. Zastupljenost WIQPCTKVIPYVRYL peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



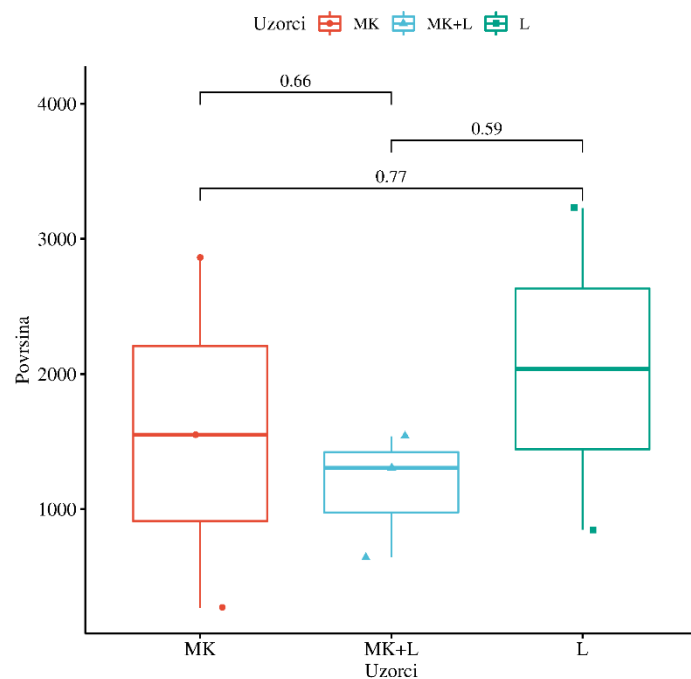
Slika 22. Zastupljenost APSFSDIPNPIGSENSE peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



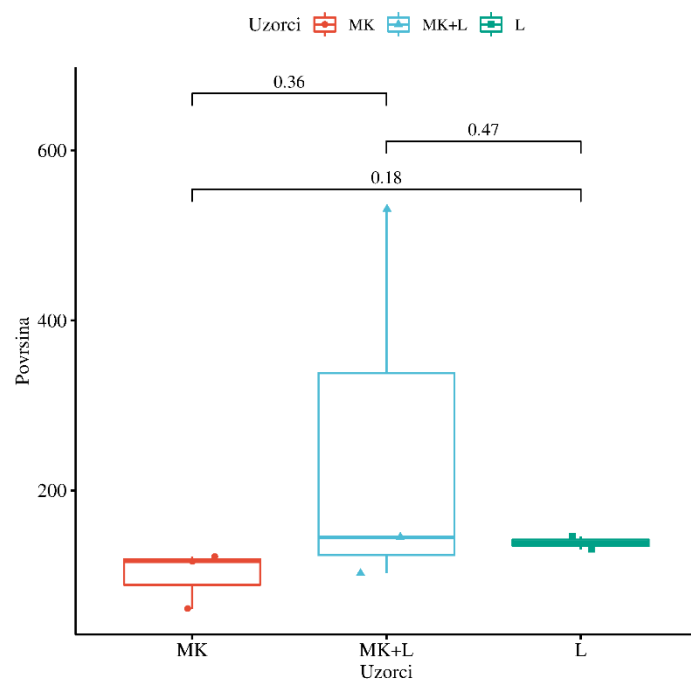
Slika 23. Zastupljenost KYIPIQYVLS peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



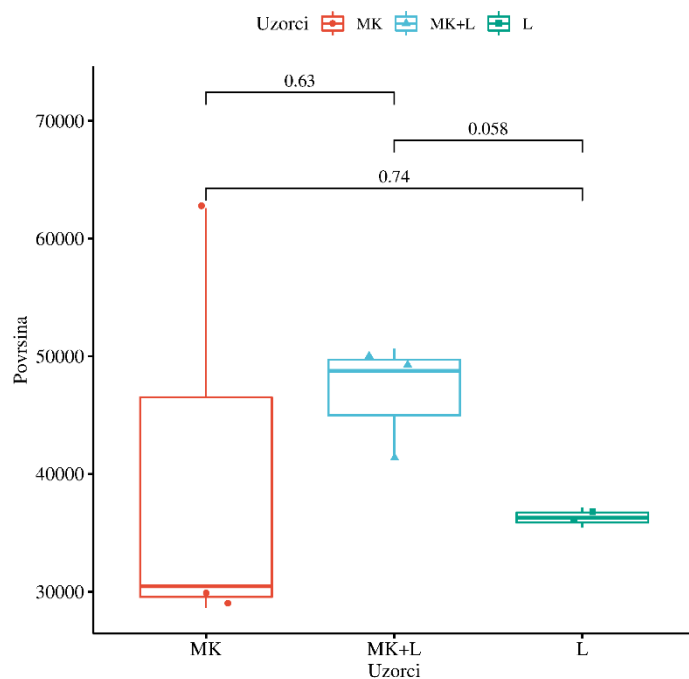
Slika 24. Zastupljenost LVYFPFGPIHNSLPQN peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



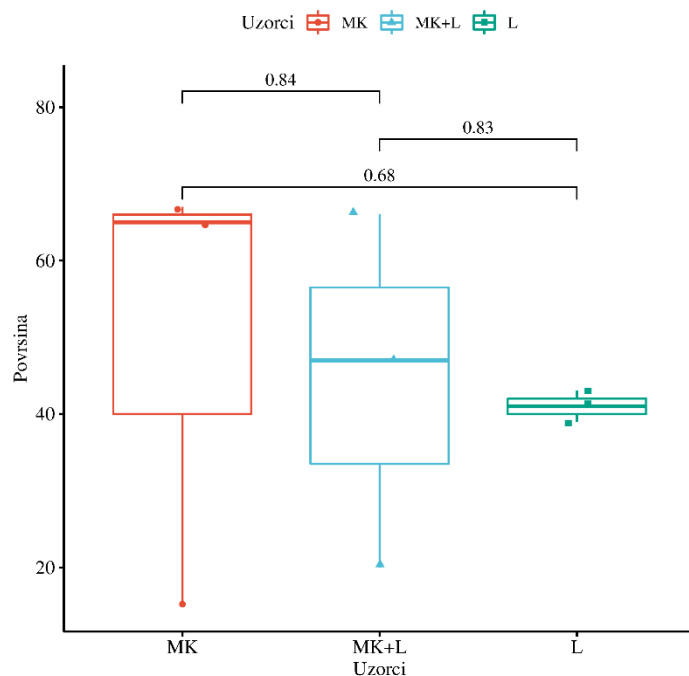
Slika 25. Zastupljenost LVYFPFGPIHNSLPQ peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



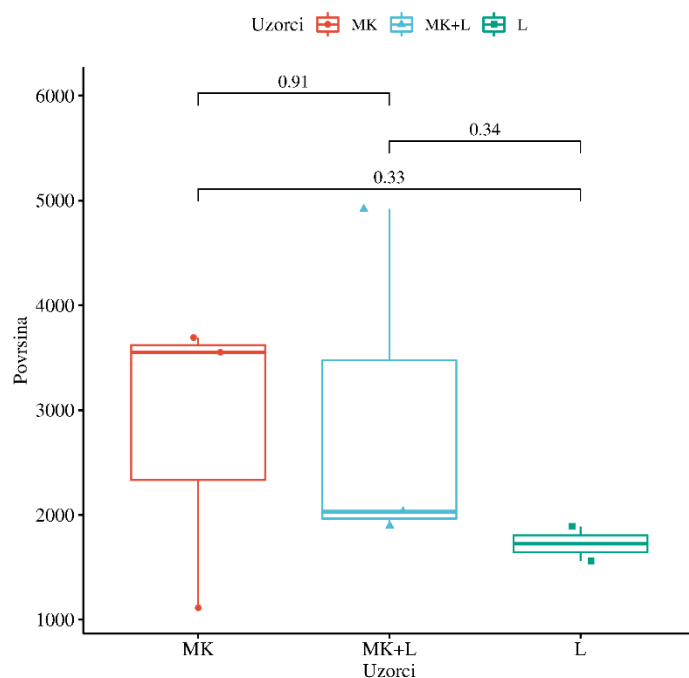
Slika 26. Zastupljenost VYFPFGPIP peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



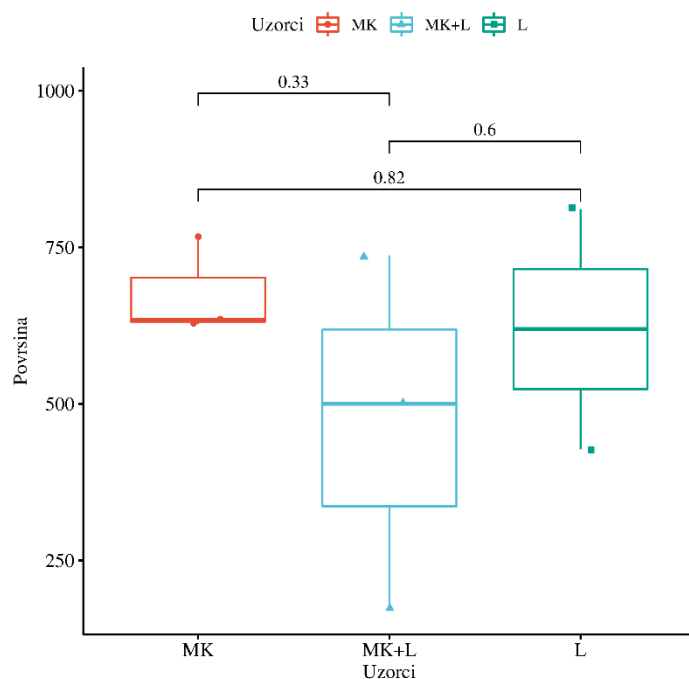
Slika 27. Zastupljenost QEPVLGPVRGPFPIIV peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



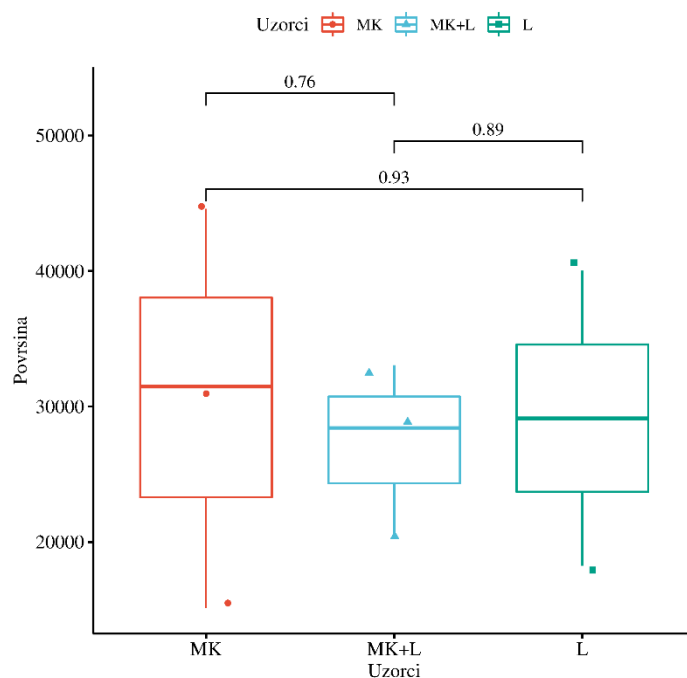
Slika 28. Zastupljenost FVAPFPEVFG peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



Slika 29. Zastupljenost LYQEPVLGPVRGPFPIIV peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



Slika 30. Zastupljenost LLYQEPVLGPVRGPFPIIV peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK- mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)



Slika 31. Zastupljenost YQEPVLGPVRGPFPIIV peptida u trima uzorcima mlijeka fermentiranim različitim radnim mikroorganizmima (Površina-površina ispod pika koja je u korelaciji s količinom detektiranog peptida; MK-mezofilna kultura; L- *Lactococcus lactis* ZGBP5-51)

4.3.1. Imunomodulatorni peptidi

Imunomodulatorni peptidi koriste se u proizvodnji funkcionalne hrane te u proizvodnji lijekova koji se koriste za liječenje raznih zdravstvenih poremećaja koji proizlaze iz oslabljene funkcije imunološkog sustava. Imunomodulatorni peptidi mogu imati proliferativno ili antiproliferativno djelovanje, proinflamatorno ili protupalno djelovanje te citoprotektivno ili citotoksično djelovanje. Proliferativni/antiproliferativni peptidi su oni koji su uključeni u stimulaciju (proliferativni), odnosno sprječavanje diobe tumorskih stanica (antiproliferativni). Zbog djelovanja na tumorske stanice nazivaju se još i kancerogenim ili antikancerogenim peptidima. Proupalni/protupalni peptidi pogoršavaju, odnosno ublažavaju upalno stanje. Citoprotektivni i citotoksični peptidi sudjeluju u regulaciji apoptoze. Provedeno je ispitivanje imunomodulatorne i antioksidativne aktivnosti peptida dobivenih hidrolizom kazeinata natrija. Utvrđeno je imunomodulatorno djelovanje peptida LLYQEPVLGPVRGPFPIIV. Peptid je sintetiziran modifikacijom prolinskog ostatka. Supstitucija posljednjeg prolina s izomerom prolina (D-Pro) imala je imunosupresivan učinak u stanicama slezene miševa (Cermeño i sur., 2016). Na dalje, prisutnost peptida LLYQEPVLGPVRGPFPIIV dokazana je i u istraživanju

koje su proveli Skrzypczak i sur. (2021). Peptid je dokazan u otopini α -laktalbumina (α -la) i kazeinoglikomakropeptida (CGMP) nakon primjene soja *Lactobacillus helveticus*.

4.3.2. Antikancerogeni peptidi

Tumor karakterizira nekontrolirana dioba stanica koje iscrpljuju organizam unutar kojeg rastu, a istovremeno ne stvaraju nova normalna tkiva ili organe. Kombinirana terapija je važna strategija suzbijanja rasta tumorskih stanica jer, najčešće, jedna metoda nije dovoljno učinkovita kako bi se bolest potpuno izliječila. Upotreba bioaktivnih peptida pokazala se kao dobra imunoterapeutska metoda zato što zaustavlja rast specifičnih stanica tumora te ima učinkovitu imunoreakciju (Mohammed i Alhassan, 2015). Većina peptida koji imaju svojstvo antikancerogenog djelovanja sastoji se od pozitivno nabijenih aminokiselina, kao što su lizin i arginin, te hidrofobnih ostataka. Budući da sadrže pozitivno nabijene aminokiseline, dolazi do elektrostatskih interakcija između peptida i negativno nabijenih membrana tumorskih stanica što onemogućava daljnju diobu tumorskih stanica (Zhang i sur., 2023). Bioaktivni peptid NLHLPLPLL identificiran je u uzorku obranog mlijeka koje je fermentirano bakterijskim sojem *L. helveticus* i pomoću Flavourzyme[®]-a (komercijalne endo- i egzopeptidaze koje se koriste za ekstrakciju životinjskih proteina) te je dokazano njegovo antikancerogeno djelovanje (Ahtesh i sur., 2022).

4.3.3. Antioksidacijski peptidi

Peptidi izolirani iz fermentiranih mliječnih proizvoda, koji sadrže antioksidativna svojstva, sastoje se od 5 do 11 aminokiselina. Uobičajen aminokiselinski sastav uključuje: hidrofobne aminokiseline, prolin, histidin, tirozin ili triptofan (Pihlanto, 2006). Mehanizam antioksidativnog djelovanja peptida ovisi o njihovoj sposobnosti vezanja slobodnih radikala te kelatnog vezanja iona prijelaznih materijala. U istraživanju koje su proveli Tonolo i sur. (2018) opisano je antioksidativno djelovanje ARHPPHLSFM peptida dobivenog iz goveđeg κ -kazeina. Antioksidativno djelovanje dokazano je *in vitro* na CaCo-2 staničnoj liniji kolorektalnog adenokarcinoma. Nakon oksidacije stanica izazvane djelovanjem vodikovog peroksida i tert-butil hidroperoksida, izmjerena je koncentracija tiola i glutationa. Antioksidativno djelovanje očitivalo se u smanjenju ukupne koncentracije navedenih spojeva te u djelovanju na antioksidacijske enzime: tioredoksin reduktazu i glutation reduktazu. Također, djelovanjem

ARHPHPLSFM peptida smanjena je sinteza reaktivnih oblika kisika (ROS) koja je inducirana djelovanjem tert-butil hidroperoksida u CaCo-2 staničnoj liniji.

4.3.4. Peptidi s antidijabetičkom aktivnošću

Inhibitori dipeptidil peptidaze 4 su učinkovita terapijska opcija u liječenju šećerne bolesti tipa 2. Dipeptidil peptidaza 4 (DPP 4) je serinska peptidaza koja, prvenstveno, razgrađuje inkretine te na taj način utječe na održavanje homeostaze glukoze. U istraživanju koje su proveli Uenishi i sur. (2012) utvrđena je i izmjerena inhibicijska aktivnost peptida YPFPGIPN dobivenog iz goveđeg β -kazeina. Inhibicijska aktivnost izražena je kao IC₅₀ vrijednost odnosno koncentracija peptida koja uzorkuje 50-postotnu inhibiciju DPP4. Izmjerena koncentracija iznosila je više od 200 μ M. Prema istraživanju koje je proveo Gong i sur. (2020), peptidne sekvence koje sadrže glicin i prolin, važne su za poboljšanje inzulinske osjetljivosti. Istraživanje je provedeno na HepG2 staničnoj liniji koja je tretirana visokom koncentracijom glukoze. Peptid QEPVLGPVRGPF izoliran iz hidrolizata β -kazeina sadrži glicin i prolin koji su poboljšali inzulinsku osjetljivost tretiranih stanica, odnosno spriječili inzulinsku rezistenciju koja podrazumijeva nemogućnost korištenja glukoze kao energetskog izvora stanice.

4.3.5. Peptidi koji vežu cink

Cink je kofaktor za brojne metaloenzime koji reguliraju ekspresiju gena, utječu na staničnu proliferaciju i na stanje imunološkog sustava. Unos cinka u organizam osigurava se prehranom, a bioraspoloživost cinka može se povećati stvaranjem kompleksa s polisaharidima ili peptidima. Različiti aminokiselinski ostatci peptida (fenilalanin, glutamin, histidin) snažno vežu cink. Učinkovitost vezanja cinka osobito je izražena kod peptida koji imaju histidinski ostatak na N-terminalnom kraju, kao i veliki udio prolina u svom sastavu (Udechukwu i sur., 2021). U istraživanju koje su proveli Tellez i sur. (2010) dokazana je prisutnost peptida HQPHQPLPPTVMFPPQ u mlijeku fermentiranom sojem *Lactobacillus helveticus*. Peptid HKEMPFKYPVEPF, kao i peptid HQPHQPLPPTVMFPPQ, ima karakterističan histidinski ostatak na N-terminalnom kraju. Peptid HKEMPFKYPVEPF identificiran je tijekom istraživanja koje su proveli Gagnaire i sur. (2020). Tijekom navedenog istraživanja, peptid je dobiven hidrolizom goveđeg β -kazeina koji je sastavni dio Ragusano sira proizvedenog od sirovog mlijeka.

4.3.6. ACE-inhibitorni peptidi

ACE-inhibitori inhibiraju angiotenzin konvertirajući enzim čime blokiraju pretvorbu angiotenzina I u angiotenzin II te smanjuju degradaciju bradikinina. Inhibirajući sintezu jakog vazokonstriktora (angiotenzin II) i inhibirajući razgradnju jakog vazodilatatora (bradikinina), snižavaju krvni tlak te se koriste za liječenje arterijske hipertenzije. ACE-inhibitorni peptidi mogu nastati hidrolizom svih kazeinskih frakcija. Mehanizam njihovog djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali je poznato da inhibicijska aktivnost ovisi o strukturi peptida. U istraživanju koje su proveli Lu i sur. (2016) identificirani su ACE-inhibitorni peptidi u cheddar siru različite starosti. Inhibicijska aktivnost izražena je kao IC₅₀ vrijednost. Peptid sastava Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (YPPFGPIP_N) ima nisku IC₅₀ vrijednost (14,8 μ M), odnosno izraženo inhibitorno djelovanje te je u najvećoj koncentraciji (6.8 mg/100 g sira) pronađen u uzorku cheddar sira starog 6 mjeseci. Peptid PFFGPIP_N ima IC₅₀ vrijednost od 12.79 μ M s nekompetitivnim mehanizmom djelovanja (Lin i sur., 2017). Identificiran je i *in silico* pristupom u istraživanju koje su proveli Fitzgerald i sur. (2020). Uz antikancerogeno svojstvo, peptid NLHLPLPLL ima i ACE inhibitorno svojstvo. Izmjerena IC₅₀ vrijednost navedenog peptida iznosi 15 μ M (Robert i sur., 2004). Još jedan ACE-inhibitorni peptid je i QEPVLGPVRGPFP. U istraživanju koje su proveli Villegas i sur. (2014), dobiven je hidrolizom β -kazeina iz mlijeka koje je fermentirano bakterijom *Lactobacillus delbrueckii*.

5. ZAKLJUČCI

1. Temeljem analize spektrometrijom masa ustanovljeno je da su karboksilne kiseline najzastupljenija kemijska skupina u analiziranim uzorcima fermentiranog mlijeka.
2. Osim karboksilnih kiselina, u fermentiranim napitcima, nakon primjene starter kulture i *Lactococcus lactis* ZGBP5-51, identificirani su raznovrsni spojevi arome koji pripadaju ketonima, aldehidima, alkanima, fenolima, alkoholima, esterima, laktonima i sulfidima.
3. Ne-ciljanom analizom identificirani su peptidi kojima je u znanstvenoj literaturi utvrđeno i opisano ACE inhibitorno, antikancerogeno, imunomodulatorno, antidijabetičko, antioksidativno te cink-vezujuće djelovanje.
4. Ciljanom analizom utvrđeno je da soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 ne sintetizira statistički značajno veću količinu peptida u usporedbi s koncentracijama koju proizvode bakterijski sojevi u sastavu komercijalne mezofilne kulture Bioprox® DI-PROX M229.

6. LITERATURA

- Aguilar-Toalá JE, Liceaga AM (2020) Cellular antioxidant effect of bioactive peptides and molecular mechanisms underlying: Beyond chemical properties. *Int J Food Sci Technol* **56**, 2193-2204. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14855>
- Ahtesh FB, Stojanovska L, Mishra V, Donkor O, Feehan J, Bosevski M i sur. (2022) Identification and effects of skim milk-derived bioactive antihypertensive peptides. *Biologics* **2**, 1-14. <https://doi.org/10.3390/biologics2010001>
- Benkerroum N (2010) Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *Int J Dairy Technol* **63**, 320–338. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00584.x>
- Cadwallader K (2010) Instrumental measurement of milk flavour and colour. Improving the Safety and Quality of Milk. U:Griffiths MW (Ured.) Improving the safety and quality of milk: Improving quality in milk products, Woodhead Publishing, Duxford/Cambridge/Kidlington, str. 181–206.
- Cermeño M, FitzGerald RJ, O'Brien NM (2016) In vitro antioxidant and immunomodulatory activity of transglutaminase-treated sodium caseinate hydrolysates. *Int Dairy J* **63**, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.007>
- Chen C, Liu Z, Yu H, Xu Z, Tian H (2022) Flavoromic determination of lactones in cheddar cheese by GC–MS–olfactometry, aroma extract dilution analysis, aroma recombination and omission analysis. *Food Chem* **368**, 130736. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130736>
- Cruz-Casas DE, Aguilar CN, Ascacio-Valdés JA, Rodríguez-Herrera R, Chávez-González ML, Flores-Gallegos AC (2021) Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chem* **3**, 100047. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.780151>
- Dan T, Ren W, Liu Y, Tian J, Chen H, Li T i sur. (2019) Volatile Flavor Compounds Profile and Fermentation Characteristics of Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Front Microbiol*, 10 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02183>
- Deeth HC, Bansal N (2019) Whey Proteins: An Overview U: Deeth HC, Bansal N (ured.) Whey Proteins From Milk to Medicine, Academic Press, Cambridge, Massachusetts, str. 1-50.
- Dominguez-Salas P, Galiè A, Omoro A, Omosa E, Ouma E (2018) Contributions of Milk Production to Food and Nutrition Security. *Reference Module in Food Science* **3**, 278-291. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21526-6>

- Fang X, Guo LW, Chen H, Ke, WC, Guo W, Guo XS i sur. (2019) Characteristics of volatile flavor components in traditional fermented yak milk produced in different ecoregions of the Qinghai-Tibetan plateau. *J Dairy Sci* **103**, 191-200. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17312>
- FitzGerald RJ, Cermeño M, Khalesi M, Kleekayai T, Amigo-Benavent M (2019) Application of in silico approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides. *J Funct Foods* **64**, 103636. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103636>
- Gagnaire V, Carpino S, Pediliggieri C, Jardin J, Lortal S, Licitra G (2011) Uncommonly Thorough Hydrolysis of Peptides during Ripening of Ragusano Cheese Revealed by Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **59**, 12443–12452. <https://doi.org/10.1021/jf2027268>
- García-Cano I, Rocha-Mendoza D, Kosmerl E, Zhang L, Jiménez-Flores R (2020) Technically relevant enzymes and proteins produced by LAB suitable for industrial and biological activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **104**, 1401-1422. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10322-2>
- Gong H, Gao J, Wang Y, Luo QW, Guo KR, Ren FZ i sur. (2020) Identification of novel peptides from goat milk casein that ameliorate high-glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells. *J Dairy Sci* **103**, 4907-4918. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17513>
- Janda D (2019) Bioaktivni peptidi mlijeka i mliječnih proizvoda (diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- 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>
- Korhonen HJ (2009) Bioactive Components in Bovine Milk U: Park YW (ured.) Bioactive Components in Milk and Dairy Products, Wiley-Blackwell, Ames, str. 15-43.
- Krvavica M, Babić I, Cvitković I, Đugum J, Konjačić M (2010) Hlapljive tvari istarskog pršuta u različitim periodima zrenja. *Meso* **12**, 276-282. <https://hrcak.srce.hr/66395>
- Lamarque M, Aubel D, Piard JC, Gilbert C, Juillard V, Atlan D (2011) The peptide transport system Opt is involved in both nutrition and environmental sensing during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Microbiology* **157**, 1612–1619. <https://doi.org/10.1099/mic.0.048173-0>
- Lin K, Zhang L, Han X, Cheng D (2017) Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study. *J Funct Foods* **32**, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.008>
- Lisak Jakopović K, Barukčić I, Božanić R (2019) Bioaktivni sastojci kravljeg mlijeka. *Mljekarstvo* **69**, 151-161. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2019.0301>

- Liu SQ, Holland R, Crow V.L (2004) Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *Int Dairy J*, 14, 923-945. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.010>
- Liu Z, Udenigwe CC (2018) Role of food-derived opioid peptides in the central nervous and gastrointestinal systems. *J Food Biochem* **43**, e12629. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12629>
- Lu Y, Govindasamy-Lucey S, Lucey JA (2016) Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *J Dairy Sci* **99**, 41–52. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9569>
- Mazić N, Božanić R (2008) Optimiranje minimalne podloge za proizvodnju tvari arome fermentiranih mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* **58**, 223-232. <https://hrcak.srce.hr/file/41248>
- Miclo L, Roux É, Genay M, Brusseau É, Poirson C, Jameh N i sur. (2012). Variability of Hydrolysis of β -, α 1-, and α 2-Caseins by 10 Strains of *Streptococcus thermophilus* and Resulting Bioactive Peptides. *J Agric Food Chem* **60**, 554–565. <https://doi.org/10.1021/jf202176d>
- Mirzapour-Kouhdasht A, Garcia-Vaquero M (2022) Cardioprotective Peptides from Milk Processing and Dairy Products: From Bioactivity to Final Products including Commercialization and legislation. *Foods* **11**, 1270. <https://doi.org/10.3390/foods11091270>
- Mohammed SZ, Alhassan AJ (2017) Biopeptides for management of chronic non communicable disease. *Int j sci res* **6**, 1263-1274. <https://doi.org/10.21275/ART2017699>
- Murtaza MA, Irfan S, Hafiz I, Ranjha MMAN, Rahaman A, Murtaza MS, Ibrahim SA, Siddiqui SA (2022) Conventional and Novel Technologies in the Production of Dairy Bioactive Peptides. *Front Nutr* **9**, 78015. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.780151>
- Nguyen HTH, Rsis MG, Wa Y, Alfante R, Chanyi RM, Altermann E (2023) Differences in aroma metabolite profile, microstructure and rheological properties of fermented milk using different cultures. *Foods* **12**, 1875. <https://doi.org/10.3390/foods12091875>
- Nielsen SD, Beverly RL, Underwood MA, Dallas DC (2018) Release of functional peptides from mother's milk and fortifier proteins in the premature infant stomach. *PLOS ONE* **13**, e0208204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208204>
- Nishimura J, Yoshinaga K, Matsuda T (2021) Volatile compounds in fermented butter-like products prepared using dairy starters. *Milk science*, **70**, 139-145. <https://doi.org/10.11465/milk.70.139>
- O'Kennedy BT (2011) Caseins. U: Phillis GO, Williams PA (Ured.) Handbook of Food Proteins, Woodhead Publishing, Duxford/Cambridge/Kidlington, str. 13-29.
- Park YW, Nam MS (2015) Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review *Korean J Food Sci Anim Resour* **35**, 831–840. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.835>

Pepe G, Tenore GC, Mastrocinque R, Stusio P, Campiglia P (2013) Potential Anticarcinogenic Peptides from Bovine Milk. *J. Amino Acids* **2013**, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/939804>

Petrova SY, Khlgatian SV, Emelyanova OY, Pishulina LA, Berzhets VM (2022) Structure and biological functions of milk caseins. *Russ Open Med J* **11**, 0209. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2022.0209>

Pihlanto A (2006) Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int Dairy J* **16**, 1306–1314. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.005>

Pihlanto A (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int Dairy J* **16**, 1306–1314. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.005>

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. *Molecules* **25**, 3328. <https://doi.org/10.3390/molecules25153328>

Rafiq S, Gulzar N, Sameen A, Huma N, Hayat I, Ijaz R (2020) Functional role of bioactive peptides with special reference to cheeses. *Int J Dairy Technol* **74**, 1–16. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12732>

Raveschot C, Cudennec B, Coutte F, Flahaut C, Fremont M, Drider D, Dhulster P (2018) Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus Species*: From Gene to Application. *Front Microbiol* **9**, 2354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354>

Robert MC, Razaname A, Mutter M, Juillerat MA (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. <https://doi.org/10.1021/jf049510t>

Samaržija D (2015) Fermentirana mlijeka, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Sarhir ST, Belkhou R, Bouseta A, Hayaloglu AA (2023) Evaluation of techno-functional and biochemical characteristics of selected lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) used for the production of Moroccan fermented milk: Lben. *Int Dairy J* **140**, 105592. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105592>

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>

Solieri L, Baldaccini A, Martini S, Bianchi A, Pizzamiglio V, Tagliazucchi D (2020) Peptide Profiling and Biological Activities of 12-Month Ripened Parmigiano Reggiano Cheese. *Biology* **9**, 170. <https://doi.org/10.3390/biology9070170>

- Tellez A, Corredig M, Brovko LY, Griffiths MW (2010) Characterization of immune-active peptides obtained from milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *J Dairy Res* **77**, 129-136. <https://doi.org/10.1017/s002202990999046x>
- Tratnik Lj, Božanić R (2012) Mlijeko i Mliječni proizvodi, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Tonolo F, Sandre M, Ferro S, Folda A, Scalcon V, Scutari G i sur. (2018) Milk-derived bioactive peptides protect against oxidative stress in a Caco-2 cell model, *Food Funct* **9**, 1245-1253. <https://doi.org/10.1039/C7FO01646H>
- Udechukwu MC, Dang C. Udenigwe CC (2021) Identification of zinc-binding peptides in ADAM17-inhibiting whey protein hydrolysates using IMAC-Zn²⁺ coupled with shotgun peptidomics. *Food Prod Process and Nutr* **3**, 5. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00048-4>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.08.002>
- Vegarud GE, Langsrud T, Svenning C (2000) Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *Br J Nutr* **84**, str. S91-S98. <https://doi.org/10.1017/s0007114500002300>
- Villegas JM, Picariello G, Mamone G, Espeche Turbay MB, Savoy de Giori G, Hebert EM (2014) Milk-derived angiotensin-I-converting enzymeinhibitory peptides generated by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Peptidomics* **1**, 22-29. <https://doi.org/10.2478/ped-2014-0002>
- Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J i sur. (2021) Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Front bioeng biotechnol* **9**, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Wright MM, Auldish MJ, Kennedy E, Dunshea FR, Galvin N, Hannah MC i sur. (2020) Evaluation of the n-alkane technique for estimating the individual intake of dairy cows consuming diets containing herbage and a partial mixed ration. *Anim Feed Sci Technol* **265**, 114524. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114524>
- Zhang Y, Wang C, Zhang W, Li X (2023) Bioactive peptides for anticancer therapies. *Biomater Transl* **4**, 5-17. <https://doi.org/10.12336/biomatertransl.2023.01.003>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LJILJANA ZOVKO 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.

Ljiljana Zovko

Vlastoručni potpis