

Proteolitička aktivnost probiotičkih starter kultura bakterija mliječne kiseline

Herout, Brigita

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:159:239187>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Brigita Herout
7059/BT

**Proteolitička aktivnost probiotičkih starter kultura
bakterija mliječne kiseline**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Zagreb, 2018.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Proteolitička aktivnost probiotičkih starter kultura bakterija mliječne kiseline

Brigita Herout, 7059/BT

Sažetak: Tema ovog rada bila je ispitati proteolitičku aktivnost autohtonih *Lactococcus lactis* sojeva s ciljem odabira starter kultura za proizvodnju svježeg dimljenog sira. Bakterije mliječne kiseline (BMK) su vrlo važne starter kulture u biotehnološkoj proizvodnji različitih fermentiranih mliječnih proizvoda. Proteolitički sustav ima važnu ulogu u toj proizvodnji jer omogućava rast bakterija mliječne kiseline u mlijeku, odnosno razgradnju kazeina do aminokiselina potrebnih za rast BMK, što pak osigurava uspješnu fermentaciju. Zbog toga je metodom rupama u agaru ispitana proteolitička aktivnost 12 odabranih *Lactococcus lactis* sojeva, a oni sojevi koji su pokazali najveću proteolitičku aktivnost su izabrani za daljnje ispitivanje Ansonovom metodom. Mjerenjem proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom utvrđeno je da soj *L. lactis* ZG 7-10 pokazuje znatno bolju aktivnost u odnosu na ostale sojeve te je ispitana njegova sposobnost razgradnje kazeina Tricine SDS-PAGE metodom.

Ključne riječi: *Lactococcus lactis* sojevi, probiotici, proteolitička aktivnost, starter kulture

Rad sadrži: 33 stranice, 8 slika, 4 tablice, 46 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Pomoć pri izradi: Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 9. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotics, Enzymes, Probiotics and Starter Cultures Technology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Proteolytic activity of probiotic starter cultures of lactic acid bacteria
Brigita Herout, 7059/BT

Abstract: The aim of this study was to examine the proteolytic activity of autochthonous *Lactococcus lactis* strains in order to select starter cultures for smoke fresh cheese production. Lactic acid bacteria are very important starter culture in biotechnological production of different fermented dairy products. The proteolytic system plays an important role in this production since it allows the growth of lactic acid bacteria in milk, meaning degradation of the casein to the amino acids necessary for the growth of LAB, thus ensuring successful fermentation. Using agar well assay proteolytic activity of 12 selected *Lactococcus lactis* strains has been tested and strains that expressed stronger proteolytic activity were selected for further testing by Anson's method. Measuring proteolytic activity by Anson's method revealed that *L. lactis* ZG 7-10 showed a significantly better activity compared to other strains so its ability to degrade casein was tested by Tricine SDS-PAGE method.

Keywords: *Lactococcus lactis* strains, probiotics, proteolytic activity, starter cultures

Thesis contains: 33 pages, 8 figures, 4 tables, 46 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor

Technical support and assistance: Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Defence date: 9 July, 2018.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1. Tipične bakterije mliječne kiseline	4
2.1.2. Netipične bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu	6
2.2. METABOLIČKI PUTEVI RAZGRADNJE UGLJIKOHIDRATA KOD BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	7
2.2.1. Laktoza	7
2.2.2. Metabolizam laktoze	8
2.2.3. Homofermentativni put laktoze u mliječnu kiselinu	8
2.3. METABOLIČKI PUTEVI RAZGRADNJE PROTEINA KOD BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	9
2.3.1. Proteini u mlijeku	9
2.3.2. Kazein	9
2.3.3. Proteini sirutke	10
2.4. PROTEOLITIČKI SUSTAV BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	10
2.4.1. Proteinaze	11
2.4.2. Sustavi za unos peptida	11
2.4.3. Peptidaze	12
2.4.4. Regulacija proteolitičkog sustava bakterija mliječne kiseline	12
2.4.5. Tehnološki aspekti proteolize	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Radni mikroorganizmi	15
U ovom radu korišteni su dolje navedeni sojevi bakterija mliječne kiseline. Navedeni sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).	15
3.1.2. Hranjive podloge	15
3.1.3. Kemikalije	16
3.1.4. Aparatura i pribor	17
3.2. METODE RADA	18
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	18
3.2.2. Fenotipska karakterizacija autohtonih <i>Lactococcus lactis</i> sojeva	18
3.2.2.1. Određivanje pH vrijednosti, stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline	18

3.2.2.2. Bojanje bakterijskih stanica po Gramu -----	19
3.2.2.3. KOH metoda-----	20
3.2.2.4. Katalaza test-----	20
3.2.2.5. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti rupama u agru -----	20
3.2.3. Određivanje proteolitičke aktivnosti odabranih autohtonih <i>Lactococcus lactis</i> sojeva -----	21
3.2.3.1. Ansonova metoda određivanja proteolitičke aktivnosti -----	21
3.2.3.2. Analiza hidrolize kazeina Tricine SDS–PAGE metodom -----	22
4. REZULTATI I RASPRAVA -----	23
4.1. Fenotipska karakterizacija autohtonih <i>Lactococcus lactis</i> sojeva za odabir sojeva s najboljom proteolitičkom aktivnošću -----	23
4.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti odabranih autohtonih <i>Lactococcus lactis</i> sojeva -----	25
4.2.1. Ansonova metoda određivanja proteolitičke aktivnosti -----	25
4.2.2. Analiza hidrolize kazeina Tricine SDS–PAGE metodom-----	27
5. ZAKLJUČCI -----	29
6. POPIS LITERATURE -----	30

1. UVOD

Pojam bakterije mliječne kiseline (BMK) obuhvaća specifičnu skupinu od oko 50 različitih vrsta srodnih mikroaerofilnih ili anaerobnih bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji produkt metabolizma. Prirodno su prisutne na biljnim i životinjskim supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, biljni materijali, a također naseljavaju i gastrointestinalni sustav. Koristan učinak bakterija mliječne kiseline, unesenih fermentiranim mliječnim proizvodima, na regulaciju mikroflore crijevnog trakta uočio je Metchnikoff još početkom prošlog stoljeća istražujući bakteriju *Bulgarian bacillus/Lactobacillus bulgaricus* (Metchnikoff, 1907). Bakterijama mliječne kiseline pripisuje se velik broj poželjnih svojstava intestinalne mikroflore, što u prvom redu obuhvaća: stimulaciju imunološkog sustava, sudjelovanje u metabolizmu laktoze, suzbijanje hepatičke encefalopatije, antikancerogeno djelovanje, suzbijanje alergijskih reakcija, snižavanje razine masnoće u krvi, sprječavanje bolesti srca i krvnih žila te suzbijanje urogenitalnih i gastrointestinalnih infekcija. Ta svojstva čine ih poželjnim za primjenu u prehrani i terapeutici kao probiotici, osobito kod liječenja poremećaja ravnoteže crijevne mikroflore (Kos, 2001; Sanders i Huis in't Veld, 1999; Conway i Henriksson, 1994).

Probiotici se definiraju kao pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji, primjenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković, 1996). Probiotičko djelovanje bakterija mliječne kiseline iskazuje se različitim mehanizmima djelovanja prema patogenim mikroorganizmima u intestinalnom traktu.

Zasigurno najvažnija primjena BMK je upotreba kao starter kultura u proizvodnji različitih fermentiranih mliječnih proizvoda. To se posebice odnosi na bakterije *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, koje su u širokoj upotrebi i imaju velik ekonomski značaj. U procesu fermentacije mlijeka, proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline ima glavnu ulogu jer osigurava rast tim bakterijama u mlijeku, tj. omogućava uspješnu fermentaciju mlijeka. BMK su mikroorganizmi koji zahtjevaju egzogeni izvor aminokiselina ili peptida koji se osigurava proteolizom kazeina, najvažnijeg proteina u mlijeku. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati proteolitičku aktivnost autohtonih *Lactococcus lactis* sojeva. S ciljem odabira sojeva s najboljom proteolitičkom aktivnošću, prvo je primjenjena metoda s rupama u agaru. Temeljem dobivenih rezultata, odabrani su sojevi s najvećom proteolitičkom aktivnosti koji su dalje ispitivani Ansonovom metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Iako mnogi rodovi bakterija proizvode mliječnu kiselinu kao primarni ili sekundarni krajnji produkt fermentacije, pojam bakterije mliječne kiseline (BMK) konvencionalno je rezerviran za rodove *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Actinomyces* i *Atopobium*. Općenito, to su gram-pozitivni, nesporogeni mikroorganizmi koji ne sintetiziraju porfirine, nemaju citokroma te su katalaza-negativni (König i Fröhlich, 2017). Primarno fermentiraju glukozu u mliječnu kiselinu ili u mliječnu kiselinu, CO₂ i etanol. BMK su fakultativno anaerobni mikroorganizmi; u prisutnosti kisika rastu kao aerotolerantni anaerobi. Iako im nedostaje katalaza, posjeduju enzim superoksid dismutazu te imaju alternativne načine detoksifikacije peroksidnih radikala, općenito preko peroksidaznih enzima.

Za razgradnju heksoza BMK koriste glikolizu ili Embden-Meyerhof-Parnasov put i 6-fosfoglukonat/fosfoketolazni put. BMK se dijele u tri grupe, s obzirom na način fermentiranja heksoze: obligatno homofermentativne, koje fermentiraju heksoze isključivo do mliječne kiseline Embden-Meyerhof-Parnasovim putem, dok pentoze i glukonat ne fermentiraju; obligatno heterofermentativne, koje fermentiraju heksoze u mliječnu kiselinu, octenu kiselinu ili etanol i CO₂; i fakultativno heterofermentativne bakterije koje fermentiraju heksoze do mliječne kiseline dok pri asimilaciji pentoza nastaju mliječna i octena kiselina pomoću fosfoketolaze (Šušković, 1996).

Budući da energiju osiguravaju samo metaboliziranjem šećera, bakterije mliječne kiseline su ograničene na obitavanje u okolini u kojoj su šećeri prisutni. Budući da imaju ograničenu biosintetsku sposobnost, evoluirale su u okruženjima koja su bogata aminokiselinama, vitaminima, purinima i pirimidinima. Zbog toga ih je moguće uzgajati samo u kompleksnim hranjivim podlogama koje zadovoljavaju sve njihove nutritivne potrebe. Bakterije mliječne kiseline su pronađene u mlijeku i mliječnim proizvodima te na raznim biljnim i životinjskim supstratima. Ubrajaju se u korisne bakterije jer se upotrebljavaju u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. BMK se također nalaze na grožđu, u moštu i vinu te pivu. To su bakterije rodova:

Lactobacillus, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* i *Weissella*. Tijekom procesa proizvodnje vina u nekim slučajevima je poželjna fermentacija jabučne kiseline pomoću bakterija mliječne kiseline. One su također dio prirodne mikroflore gastrointestinalnog trakta. Istraživanja utemeljena na sekvencioniranju 16S rRNA gena pokazala su da humani intestinalni trakt sadrži 500 do 1000 različitih vrsta bakterija, tj. čak 7000 različitih bakterijskih sojeva.

Iako je većina bakterija mliječne kiseline u prirodi u komenzalnom odnosu s ljudima, insektima i životinjama, nekoliko rodova BMK su patogeni, a to se odnosi prvenstveno na neke članove roda *Streptococcus*. U ljudi, *Streptococcus pyogenes* je glavni uzročnik bolesti (upala grla, upala pluća i druge piogene infekcije, crvena groznica i ostale toksemije); *Streptococcus pneumoniae* uzrokuje lobarnu pneumoniju i meningitis. Neki nehemolitički oralni streptokoki igraju ulogu u nastanku karijesa te mogu biti prikriveni uzrok endokarditisa (Vásquez i sur., 2012).

Bakterije mliječne kiseline su među najvažnijim skupinama mikroorganizama koji se koriste u fermentaciji hrane. One doprinose okusu i teksturi fermentiranih proizvoda, a također sprječavaju kvarenje hrane. Postižu to proizvodnjom tvari koje inhibiraju rast ostalih bakterijskih vrsta te stvaranjem visoke koncentracija mliječne kiseline. Dokazano je također da BMK proizvode i niskomolekularne spojeve koji imaju antifungalno djelovanje pa ih se istražuje mogućnost njihove upotrebe u kontroli plijesni i mikotoksina (Dalie i sur., 2010). Zbog mogućnosti provođenja fermentacije, bakterije mliječne kiseline sudjeluju u proizvodnji jogurta, sira, kiselog vrhnja i kiselog povrća, ali također neke vrste mogu uzrokovati kvarenje piva, vina i mesnih prerađevina.

Kod bakterija mliječne kiseline bitna značajka metabolizma je učinkovita fermentacija ugljikohidrata povezana s fosforiliranjem supstrata. Dobiveni adenzin trifosfat (ATP) se kasnije koristi kao energija za razne biosinteze. Bakterije mliječne kiseline generalno pokazuju veliku sposobnost razgradnje različitih ugljikohidrata i njima sličnih spojeva. Međutim, sposobne su prilagoditi se različitim uvjetima okoline te mijenjaju svoj metabolizam u skladu s tim. To može rezultirati značajno različitim krajnjim produktima.

Bakterije mliječne kiseline sudjeluju u provođenju različitih biotehnoloških procesa što ih čini industrijski vrlo važnim mikroorganizmima koji se upotrebljavaju kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda. Imaju široku primjenu tijekom niza godina kao starter kulture jer ih karakterizira GRAS status (engl. *Generally Recognized As Safe*) prema US FDA (USA Food and Drug Administration), odnosno QPS status (engl. *Qualified Presumption of Safety*)

prema EFSA (European Food Safety Authority). Također, sve je učestalija primjena bakterija mliječne kiseline kao probiotika ili u kombinaciji s prebioticima (sinbiotički koncept).

S obzirom na način primjene, probiotici su podijeljeni na bioterapeutike i funkcionalne dodatke hrani. Bioterapeutici spadaju u kategoriju živih lijekova jer su namijenjeni za terapiju ili prevenciju bolesti, dok probiotici kao funkcionalni dodaci hrani promoviraju zdravlje tj. pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore (Šušković, 2009; Periti i Tonelli, 2002). Probiotički konstitutivni sojevi mikroorganizama uspješno preživljavaju prolaz kroz gastrointestinalni trakt zbog čega ih je moguće primijeniti u prevenciji, ali i tretmanu širokog spektra bolesti (Chassard i sur., 2011).

Bakterije mliječne kiseline dio su prirodne mikroflore mlijeka te su u njemu gotovo uvijek prisutne, kao i u većini mliječnih proizvoda. S obzirom na fiziološke osobine to su tipične bakterije mliječne kiseline koje proizvode prvenstveno mliječnu kiselinu pri fermentaciji laktoze, fakultativno su anaerobne, ne reduciraju nitrate i sadrže katalazu. Uz njih postoje još neke bakterije koje mogu proizvesti mliječnu kiselinu. to su takozvane netipične bakterije koje više proizvode druge produkte fermentacije, a manje mliječnu kiselinu, aerobne su, sadrže katalazu i reduciraju nitrate.

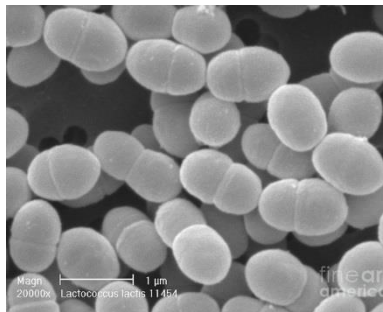
2.1.1. Tipične bakterije mliječne kiseline

U skupinu tipičnih bakterija mliječne kiseline spadaju laktokoki i laktobacili. Laktokoki su okrugle bakterije koje se nalaze u parovima ili lancima, dok su laktobacili štapići koji se također nalaze u lancima ili pojedinačno. Neke vrste od ovih mikroorganizama stvaraju većim dijelom mliječnu kiselinu, u odnosu na ostale produkte fermentacije, dok neke vrste uz mliječnu kiselinu stvaraju još i octenu, ugljični dioksid i alkohol.

a) Laktokoki

Rod *Lactococcus*

- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (stari naziv *Streptococcus lactis* ssp. *lactis*) raste optimalno pri temperaturi od oko 30°C.
- *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (stari naziv *Streptococcus lactis* spp. *cremoris*) stvara visoku koncentraciju mliječne kiseline. Optimalna temperatura je oko 30°C, ali možrasti u intervalu 10 - 40°C.



Slika 1. *Lactococcus lactis* (Anonymus 1, 2018)

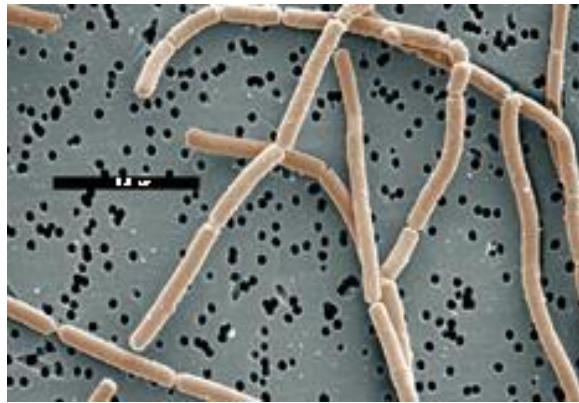
b) Laktobacili

Rod *Lactobacillus*

Štapičastog oblika, homofermentativne. Uglavnom proizvode mliječnu kiselinu, a ostale metabolite proizvode u tragovima. Optimalna temperature rasta iznosi 30 - 40°C, ali mogu rasti u temperaturnom interval 5 - 53°C. Aerobni ili fakultativno aerobni. U mlijeko dopijevaju iz vanjske sredine.

- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (stari naziv *Lactobacillus lactis*) koriste se u kulturi za proizvodnju tvrdih i polutvrdih sireva. Optimalna temperatura je u intervalu 40 - 43°C.
- *Lactobacillus helveticus* - sudjeluje u zrenju Ementalera i drugih tipova švicarskog sira. Optimalna temperatura rasta iznosi 45°C.
- *Lactobacillus acidophilus* - optimalna temperatura je oko 45°C. Fermentira acidofilno mlijeko, te se koristi u proizvodnji kefiru. Povoljan je za mikrofloru probavnog trakta.

- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (stari naziv *Lactobacillus bulgaricus*) - optimalna temperatura rasta iznosi 45°C. Koristi se u proizvodnji jogurta, kiselog mlijeka i tvrdih sireva.
- *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* - optimalna temperatura rasta je u intervalu 40 - 45°C. Nalazi se u mlijeku i mliječnim proizvodima te je značajan u proizvodnji fermentiranih napitaka.



Slika 2. *Lactobacillus delbrueckii* (Anonymus 2, 2018)

2.1.2. Netipične bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu

Ovoj skupini bakterija pripadaju rodovi *Escherichia* i *Propionibacterium*, koliformne bakterije i patogene bakterije. Rod *Escherichia* sadrži samo jednu bakterijsku vrstu – *E. coli*. Oblikom je to kratki gram-negativni pokretni ili nepokretni štapić. Fermentira glukozu i laktozu uz stvaranje mliječne, octene i mravlje kiseline. Hidrolizom mravlje kiseline u mlijeku nastaju jednake količine plinova CO₂ i H₂. Mogućnost stvaranja različitih spojeva fermentacijom šećera omogućava razlikovanje *E. coli* od ostalih koliformnih organizama (Havranek i sur., 2014).

Često su prisutne u mlijeku što ukazuje na lošu higijenu postupanja s mlijekom. Negativno utječu na organoleptička svojstva u smislu nadimanja sireva te stvaranja neugodnog okusa i mirisa.

Bakterije iz roda *Propionibacterium* fermentiraju mliječnu kiselinu u propionsku, mravlju, octenu i jantarnu kiselinu te CO₂. Stvaranjem CO₂ formiraju se karakteristične šupljine kod tvrdih sireva (Ementaler).

Koliformne bakterije su bakterije koje pripadaju skupini gram-negativnih, oksidaza-negativnih štapićastih bakterija koje mogu rasti aerobno i fermentirati laktozu uz stvaranje kiselina i plina. U odnosu na psihrotrofne bakterije, ova skupina bakterija raste znatno sporije. Nekoliko bakterijskih rodova spada u skupinu koliformnih mikroorganizama, ali u sirovom mlijeku se najčešće mogu pronaći rodovi *Enterobacter*, *Aerobacter*, *Echerichia*, *Citrobacter* i ponekad *Klebsiella*.

Iako mlijeko nije pogodan medij za rast i razmnožavanje za većinu patogenih mikroorganizama, može biti medij za prenošenje na ljude i životinje. Primjer patogenog mikroorganizma iz mlijeka je *E. coli*, tj. patogeni sojevi te bakterije – enteropatogena (EPEC), enterotoksigena (ETEC), enteroinvazivna (EIEC) i enterohemoragična (EHEC); te određene bakterijske vrste rodova *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium* i *Bacillus* koje proizvode bakterijske toksine (Havranek i sur., 2014).

2.2. METABOLIČKI PUTEVI RAZGRADNJE UGLJIKOHIDRATA KOD BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Dugi niz godina provode se intenzivna istraživanja na bakteriji *Lactococcus lactis* kao modelnom mikroorganizmu. Unatoč svim dostupnim genetičkim metodama koje su na raspolaganju za istraživanja, još uvijek nije potpuno razumljivo metaboliziranje šećera i regulacija metabolizma u tom mikroorganizmu. Nuklearna magnetska rezonancija (eng. Nuclear magnetic resonance spectroscopy – NMR), je metoda koja se koristi kako bi se dobila realna informacija u vremenu o koncentraciji intracelularnih metabolita u živoj stanici (Foschi i sur., 2017).

2.2.1. Laktoza

Laktoza je mliječni šećer, disaharid ($C_{12}H_{22}O_{11}$) sastavljen od molekula α -D-glukoze i β -D-galaktoze. U mlijeku se uglavnom pojavljuje kao mješavina dvaju strukturno izomernih oblika: α -oblik i β -oblik, koji se razlikuju po položaju –H i –OH skupine na prvom C atomu glukozidnog dijela laktoze. Taj asimetrični ugljikov atom čini laktozu optički aktivnom pa se može odrediti polarimetrijskom metodom. Toplinska obrada mlijeka uzrokuje promjene

laktoze, ali ipak najveće promjene događaju se pod utjecajem mikroorganizama, uzročnika fermentacije. To se u prvom redu odnosi na bakterije mliječne kiseline (Tratnik, 1998).

2.2.2. Metabolizam laktoze

U mlijeku se laktoza može razgraditi pod djelovanjem mikroorganizama koji metaboliziraju laktozu. Razgrađuje se preko brojnih međuprodukata do mliječne ili drugih kiselina, te alkohola i plinova (CO₂ i H₂). Bakterije mliječne kiseline za rast i aktivnost u mlijeku upotrebljavaju laktozu koju unose u stanicu te ju prvo hidroliziraju u monosaharide svojim enzimima. Nastale šećere metaboliziraju različitim putevima te proizvode brojne metabolite. Unos laktoze u stanicu bakterije te putovi metabolizma razlikuju se od vrste bakterija mliječne kiseline (McSweeney i sur., 2017). Bakterije *Lactococcus* za prijenos laktoze u stanicu koriste specifični sustav koji uključuje fosfoenolpiruvat fosfotransferazni sustav (PTS), pri čemu se laktoza fosforilira u laktoza-fosfat, uz utrošak fosfoenolpiruvata (translokacijska grupa, vektorska fosforilacija). PTS sustav se sastoji od dva glavna proteina: enzima I (EI) i HPr proteina (histidin protein) te nekoliko specifičnih enzima vezanih u kompleks.

2.2.3. Homofermentativni put laktoze u mliječnu kiselinu

Nakon što je laktoza unešena u stanicu u obliku laktoza-fosfata fosfotransferaznim sustavom, cijepa se pomoću enzima fosfo-β-D-galaktozidaze na glukozu i galaktoza-6-fosfat. Putem glikolize glukozu se preko međuprodukata prevodi u piruvat, a redukcijom piruvata nastaje mliječna kiselina (laktat), djelovanjem laktat-dehidrogenaze. Taj put fermentacije laktoze provode homofermentativne bakterije mliječne kiseline te se naziva homofermentativni put laktoze u mliječnu kiselinu. Takve bakterije proizvode uglavnom mliječnu kiselinu (90%) te vrlo malu količinu ostalih međuprodukata: diacetil, acetoin, acetaldehid, etanol, organske kiseline i druge tvari.

2.3. METABOLIČKI PUTEVI RAZGRADNJE PROTEINA KOD BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Za rast bakterija mliječne kiseline potrebna je dostatna količina slobodnih aminokiselina i niskomolekularnih peptida. Mlijeko kao medij ih ne obiluje pa bakterije mliječne kiseline moraju posjedovati aktivni sustav proteinaza za uspješnu hidrolizu proteina mlijeka do aminokiselina i peptide.

2.3.1. Proteini u mlijeku

Mlijeko sadrži oko sto tipova različitih dušikovih tvari, od kojih je 95% proteina, a 5% su neproteinske dušikove tvari (NPN). Razlikuju se dva glavna tipa proteina: kazein i proteini sirutke, u omjeru 80:20 (Tratnik, 1998). U NPN tvari mlijeka spadaju mali peptidi, slobodne aminokiseline, aminošećeri, kreatin, urea, amonijak.

Proteini mlijeka su vrlo različiti, kako po kemijskom sastavu, tako i po svojstvima, stabilnosti te načinu koagulacije. Djelovanjem kiselina ili enzima iz mlijeka se lako talože kazeini, dok protein sirutke zaostaju u otopini pošto su neosjetljivi na njihovo djelovanje, ali su osjetljivi na djelovanje topline pa će koagulirati već pri temperaturi iznad 80°C.

2.3.2. Kazein

Najzastupljeniji protein u mlijeku je kazein koji se sastoji od nekoliko frakcija različitog aminokiselinskog sastava koje su podložne međusobnim interakcijama. Na tome se temelji teorija o strukturi kazeinskog kompleksa nazvanog "micele kazeina". Micele su globularne koloidne čestice, spužvaste strukture, s nepravilno oblikovanom površinom zbog prisutnih pobočnih aminokiselinskih ostataka (Huppertz i sur., 2018). Molekula kazeina je amfoterna u neutralnoj sredini, ali zbog prisutnosti karboksilnih skupina ima blago kisela svojstva te je micela negativno nabijena. U mlijeku su micele obavijene hidratnim slojem te su vrlo stabilne, ali pod utjecajem različitih čimbenika može doći do promjene stabilnosti, razgradnje i koagulacije kazeina te interakcije s drugim sastojcima mlijeka. Stabilnost kazeina ovisit će prvenstveno o kiselosti mlijeka, količini soli i temperature. Koagulacija kazeina postiže se djelovanjem kiseline ili enzimskim pripravkom što se primjenjuje u proizvodnjih fermentiranih mliječnih proizvoda.

2.3.3. Proteini sirutke

Proteini sirutke su izrazito hidrofilni te nisu osjetljivi na djelovanje kiselina i enzima kao kazein. Međutim, vrlo su termolabilni te koaguliraju pod utjecajem topline. Strukturno su to kompaktni, globularni proteini, s podjednakom raspodjelom aminokiselinskih ostataka. Najzastupljeniji su β -laktoglobulin i α -laktalbumin, proizvodi mliječne žlijezde.

2.4. PROTEOLITIČKI SUSTAV BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline su mikroorganizmi koji zahtijevaju egzogeni izvor aminokiselina ili oligopeptida za rast. Budući da mlijeko kao medij ne sadržava dostatnu količinu slobodnih aminokiselina, proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline je od ključne važnosti za osiguravanje dovoljnog broja bakterija mliječne kiseline za provođenje uspješne fermentacije (Savijoki i sur., 2006). Glavni izvor aminokiselina u mlijeku je protein kazein, čiju proteolizu iniciraju proteinaze stanične stijenke koje razgrađuju protein na oligopeptide. Dalje se oligopeptidi unose u stanicu specifičnim transportnim sustavom gdje se razgrađuju na kraće peptide i aminokiseline djelovanjem različitih intracelularnih peptidaza. Ovi metabolički putevi su i od industrijske važnosti jer, osim što omogućavaju rast bakterija mliječne kiseline, peptidi, aminokiseline i njihovi derivati doprinose formiranju teksture i organoleptičkih svojstava fermentiranih mliječnih proizvoda (Kok i de Vos, 1994). Proteolitički sustav *L. lactis* je istražen do te mjere da je postavljen kompletan model razgradnje kazeina, transport, degradacija peptida te regulacija cijelog sustava, tj. *L. lactis* služi kao modelni mikroorganizam (Hagting i sur., 1994). Istraživanja genoma bakterija mliječne kiseline pokazala su da se njihovi proteolitički sustavi mogu međusobno razlikovati. Kao primjer, laktobacili u usporedbi s *L. lactis* imaju manju sposobnost biosinteze aminokiselina što nadoknađuju mogućnošću kodiranja za velik broj peptidaza, aminokiselinskih permeaza i transportnim sustavom koji omogućava istovremeni prijenos više oligopeptida (Klaenhammer i sur., 2005).

2.4.1. Proteinaze

Prvi korak pri razgradnji kazeina provode proteinaze stanične stijenke. Do sada je okarakterizirano 5 različitih tipova ovih enzima, uključujući PrtP iz *L. lactis* (Kok i sur., 1988). Najčešće BMK posjeduju jedan tip proteinaza, uz iznimku nekih sojeva vrsta *L. helveticus* i *L. bulgaricus*, kod kojih su prisutna dva različita tipa (Stefanitsi i sur., 1995).

Kod laktokoka prtP geni mogu biti kodirani u plazmidu ili u genomu, a proteinaze se sintetiziraju kao preproteini od približno 2 tisuće aminokiselinskih ostataka, raspoređenih u nekoliko funkcionalnih domena (Fernandez-Espla i sur., 2000).

Proteinaze imaju jaku preferenciju za hidrofobni kazein, količinski najzastupljeniji protein u mlijeku. Svaka frakcija kazeina sadrži velik broj prolinskih ostataka koji sprječavaju nastajanje α -heliksa i β -ploča te potiče stvaranje spontanih uzvojnica. Te karakteristike sekundarne strukture dovode do formiranja nestrukturiranih, otvorenih molekula kazeina, osjetljivih na djelovanje proteinaza (Fox, 1989).

PrtP proteinaza iz *L. lactis* također je pokazala djelovanje na autolizin koji je potreban za odvajanje stanica i autolizu tijekom stacionarne faze rasta (Buist i sur., 1998).

2.4.2. Sustavi za unos peptida

Drugi korak u razgradnji kazeina uključuje transport peptida u stanicu pomoću ATP-vezujućih kasetnih transportera. Transportni sustav *L. lactis* transportira peptide od najmanje 18 aminokiselinskih ostataka, a priroda tih ostataka značajno utječe na kinetiku prijenosa (Detmers i sur., 1998). Generalno, transportni sustavi ostalih bakterija mliječne kiseline nisu detaljno istraženi, ali poznato je da se građa transportnog sustava peptida kod *S. thermophilus* i *L. bulgaricus* ne razlikuje značajno od sustava *L. lactis* (Garault i sur., 2002; Peltoniemi i sur., 2002).

2.4.3. Peptidaze

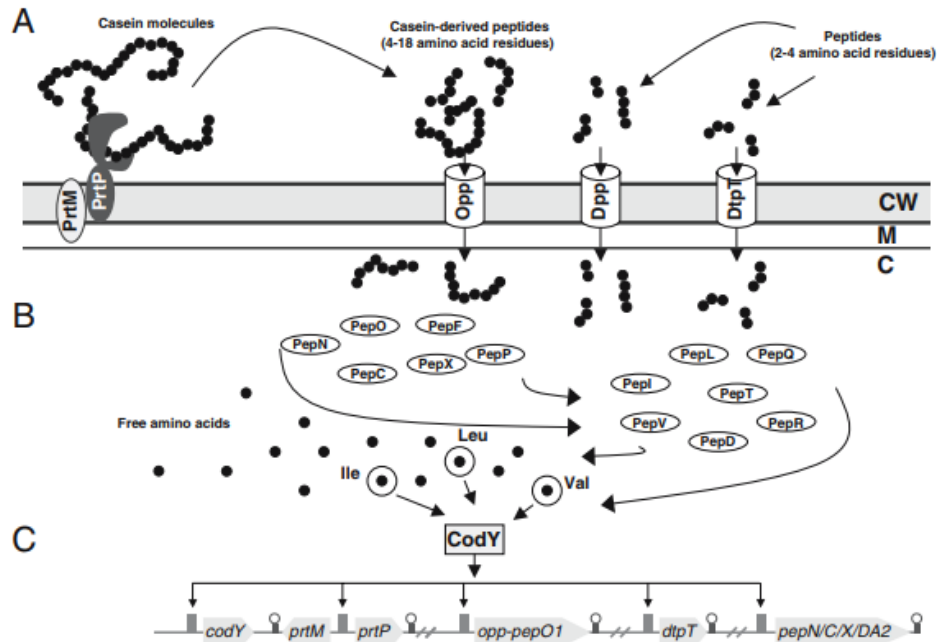
Velik broj peptidaza je uspješno pročišćeno i biokemijski okarakterizirano iz *S. thermophilus* i različitih *Lactococcus* sojeva. Također, u većini slučajeva odgovarajući gen je kloniran i sekvencioniran (Christensen i sur., 1999).

Nakon što se peptidi nastali razgradnjom kazeina unesu u bakterijsku stanicu, degradiraju se djelovanjem peptidaza. Intracelularne endopeptidaze, opće aminopeptidaze (PepN i PepC) i X-prolil dipeptidil aminopeptidaza (PepX) su prvi enzimi koji djeluju na oligopeptide. Do sada sve poznate i okarakterizirane endopeptidaze su metalopeptidaze, izuzev PepE iz *L. helveticus* koja pokazuje tiol-ovisnu aktivnost (Savijoki i sur., 2006; Fenster i sur., 1997). Zajedničko svim endopeptidazama je nemogućnost hidrolize intaktnog kazeina, ali imaju sposobnost hidrolize unutarnjih peptidnih veza u peptidima dobivenih razgradnjom kazeina.

2.4.4. Regulacija proteolitičkog sustava bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline će kao odgovor na dostupnu količinu dušika, regulirati aktivnost proteolitičkog sustava kako bi se osigurala ravnoteža u stanici. Pretpostavlja se da dipeptidi i tripeptidi s hidrofobnim ostacima djeluju kao efektorne molekule u transkripcijskom reguliranju sustava kod *L. lactis* (Kunji i sur., 1995). Regulatorni mehanizmi proteolitičkog sustava laktobacila su istraženi u manjoj mjeri. Dokazano je da koncentracija peptida u mediju za rast kontrolira biosintezu PrtH i PrtR proteinaza kod *L. helveticus*. Pokazalo se da je aktivnost PrtH u *L. helveticus* bila reprimirana 11 do 32 puta u mediju bogatom peptidima. Točnije, dipeptid sastavljen od leucina i prolina ima najvažniju ulogu u regulaciji aktivnosti PrtH proteinaze (Hebert i sur., 2000).

Poznato je da okolišni faktori također mogu utjecati na ekspresiju određenih gena za peptidaze. Kao odgovor na stanični stres javlja se brza indukcija proteolitičke aktivnosti kako bi se stanica uspješno borila s abnormalnostima. Tijekom industrijskih procesa starter kulture su neprestano izložene stresnim uvjetima što pokazuju brojna istraživanja, tj. otkriveni su stresni proteini starter kultura u siru koji sazrijeva (Gagnaire i sur., 2004).



Slika 3. Pojednostavljen prikaz funkcija i regulacije proteolitičkog sustava laktokoka pri razgradnji kazeina (Savijoki i sur., 2006)

2.4.5. Tehnološki aspekti proteolize

U proizvodnji mnogih fermentiranih mliječnih proizvoda najvažniji biokemijski proces je upravo proteoliza. Primjerice, tijekom proizvodnje sira taj korak je ključan jer aminokiseline nastale proteolizom su glavni prekursori specifičnih komponenti okusa, kao što su alkoholi, aldehidi, kiseline i esteri (Smit i sur., 2005). Međutim, mogućnost nastanka glavnog problema u proizvodnji sireva je velika, a odnosi se na pojavu gorčine čiji uzrok je nakupljanje hidrofobnih proteina (Smukowski i sur., 2003). Nedavne studije sugeriraju upotrebu određenih sojeva *L. lactis* i *L. helveticus* koje proizvode specifične proteinaze čime se može reducirati gorčina u sirevima (Sridhar i sur., 2005). Također, poznato je da BMK proizvode egzopolisaharide, biopolimere koji nose mnoge beneficije, uostalom i poboljšavaju strukturu samog proizvoda (Zannini i sur., 2016).

Iz ekonomskih razloga javila se potreba za ubrzanjem procesa zrenja sireva. Predložene su mnoge metode kao primjerice povišenje temperature skladištenja, upotreba bakteriofaga, dodatak selektivnih nonstarter kultura bakterija mliječne kiseline, ali i primjena

proteinaza (Fox i sur., 1996). Obogaćivanje proteolitičkog potencijala *L. lactis* konstrukcijom rekombinantnog starter soja koji eksprimira peptidaze izvedene iz *L. helveticus* ili *L. delbrueckii* pod konstitutivnim ili inducibilnim promotorom, također se može ubrzati proteoliza u siru, a samim time i postupak zrenja (Wegmann i sur., 1999).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korišteni su dolje navedeni sojevi bakterija mliječne kiseline. Navedeni sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

SOJEVI:

- 1) *Lactococcus lactis* ZG 1-51
- 2) *Lactococcus lactis* ZG 2-4
- 3) *Lactococcus lactis* ZG 2-11
- 4) *Lactococcus lactis* ZG 4-1
- 5) *Lactococcus lactis* ZG 4-2
- 6) *Lactococcus lactis* ZG 5-32
- 7) *Lactococcus lactis* ZG 5-51
- 8) *Lactococcus lactis* ZG 6-51
- 9) *Lactococcus lactis* ZG 7-6
- 10) *Lactococcus lactis* ZG 7-10
- 11) *Lactococcus lactis* ZG 9-2
- 12) *Lactococcus lactis* ZG 9-11

3.1.2. Hranjive podloge

U radu je korištena hranjiva podloga za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline

- GM17 agar uz dodatak glukoze, sastava (g/L destilirane vode): hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; goveđi ekstrakt 5; natrijev glicerofosfat 19; MgSO₄·7H₂O 0,25; askorbinska kiselina 0,5; laktoza 5.

•GM17 bujon uz dodatak glukoze,sastava (g/L destilirane vode): hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; goveđi ekstrakt 5; Natrijev glicerofosfat 19; MgSO₄x7H₂O 0,25; askorbinska kiselina 0,5; laktoza 5.

3.1.3. Kemikalije

- Agar, „Merck“, Njemačka
- Destilirana voda
- Etanol, „Gram Mol“, Hrvatska
- Fenolftalein
- Folin-Ciocalteu Fenol reagens „Merck“, Njemačka
- Fosfatni pufer (pH=7,4)
- Glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Imerziono ulje, „Kemika“, Hrvatska
- Kalijev hidroksid, „Prolabo“, UK
- Kazein, „Sigma-Aldrich“, Njemačka
- Kristal violet, „Merck“, Njemačka
- L-tirozin, „Merck“, Njemačka
- Lugolovom otopinom (otopina I₂ u KI)
- Natrijev hidroksid, „Carlo ERBA“, Italija
- Natrijev karbonat, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Obrano mlijeko, „Fluka“, Švicarska
- Safranin, „Merck“, Njemačka
- Trikloroctena kiselina, „Thermo Fischer Scientific“ SAD
- Vodikov peroksid, „Gram Mol“, Hrvatska
- Akrilamid/bisakrilamid 30 % (w/v), „Sigma“, SAD
- TEMED, „Biorad“, SAD
- Amonij-persulfat (30 mg/ml) „Biorad“, SAD
- Tris-baza, „Fischer Scientific“, SAD
- Klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Tricine, „Fischer Scientific“, SAD

- SDS, „Sigma“, SAD
- Pufer za nanošenje uzoraka za Tricine-SDS PAGE, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Coomassie Brilliant Blue, „Sigma“, SAD
- Octena kiseline, „J.T. Baker“, Njemačka
- ProSieve™ Color Protein Marker, „Lonza“, SAD

3.1.4. Aparatura i pribor

- Autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- Automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik
- Bušać
- Centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- Eppendorf kivete
- Epruvete
- Erlenmeyerove tikvice
- Filter papir
- Hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- Kadica za SDS-PAGE, „Biorad“, SAD
- Lijevak
- Menzura
- Mikrobiološke ušice
- Mikroskop, „Olympus“, Japan
- Petrijeve zdjelice
- Predmetnica
- Stakalce
- Stalci za ependorfice
- Stalci za epruvete
- Termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- Vaga, „Sartorius“, Njemačka
- Vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- Vodena kupelj VK2EN „Inkolab“, Hrvatska
- Zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri -80°C (New Brunswick Scientific, SAD) u GM17 tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola (Alkaloid, Makedonija). Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta.

3.2.2. Fenotipska karakterizacija autohtonih *Lactococcus lactis* sojeva

3.2.2.1. Određivanje pH vrijednosti, stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline

Određena je pH vrijednost supernatanta prekonoćnih kultura *Lactococcus lactis* sojeva izoliranih iz zagrebačkog svježeg sira (Terzić-Vidojević i sur., 2015). Stupanj kiselosti određen je iz 1 mL uzorka supernatanta razrijeđenog s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak titriran je s 0,1 M NaOH (Carlo ERBA, Italija) uz fenolftalein kao indikator do pojave ružičaste boje. Stupanj kiselosti, odnosno postotak (%) mliječne kiseline određen je prema navedenim formulama:

$$\begin{aligned} \text{°SH} &= a \cdot 20 \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 2 \\ \% \text{ mliječne kiseline} &= \text{°SH} \cdot 0,0225 \end{aligned}$$

a = volumen (ml) 0,1 M NaOH

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

($\text{°SH} \sim 0,0225$ g mliječna kiseline (%))

$\text{°SH} \rightarrow$ stupanj kiselosti

3.2.2.2. Bojanje bakterijskih stanica po Gramu

Bojanje po Gramu jedna je jedna od najvažnijih i najučestalijih metoda za razlikovanje Gram-pozitivnih od Gram-negativnih bakterija, koje se međusobno razlikuju u građi stanične stjenke. Supenzija prekonocnih kultura bakterija mliječne kiseline ravnomjerno su prenesene pomoću mikrobiološke ušice na očišćenu predmetnicu, nakon čega su uslijedili sljedeći postupci:

1. sušenje na zraku i fiksiranje kroz plamen Bunsenovog plamenika
2. bojanje preparata s kristal violet (Merck, Njemačka) 1-2 min
3. ispiranje destiliranom vodom
4. tretiranje preparata s lugolovom otopinom (otopina I₂ u KI) 1 min
5. ispiranje preparata 96%-tnim etanolom (Gram Mol, Hrvatska), a zatim destiliranom vodom
6. bojanje safraninom (Merck, Njemačka) 3-5 min
7. ispiranje destiliranom vodom
8. sušenje na zraku i filter papirom
9. mikroskopiranje uz dodatak imerzionog ulja (Kemika, Hrvatska) (povećanje 100 x)

Na temelju priređenih mikroskopskih preparata, određeno je radi li se o Gram-negativnoj (crvene stanice) ili Gram-pozitivnoj (plave stanice) bakteriji, te su utvrđene morfološke karakteristike, odnosno jesu li stanice u obliku štapića ili koka.

3.2.2.3. KOH metoda

Ova metoda se koristi za određivanje Gram-pozitivnih odnosno Gram-negativnih bakterija. Vidljiva količina bakterijskih stanica se prenese u 10 µL 3% kalijevog hidroksida (Prolabo, UK), koji se nalazi na predmetnom stakalcu. Smjesa je promiješana, proširujući mjesto do promjera od 1,5 cm. Ukoliko suspenzija postane viskozna ili gelasta unutar 5-60 s, ispitivana bakterija je Gram-negativna, a u protivnom je Gram-pozitivna (Buck, 1982).

3.2.2.4. Katalaza test

Ovaj test se provodi kako bi se utvrdilo da li odabrani bakterijski soj proizvodi enzim katalazu. Mikrobiološkom ušicom prenesen je dio ispitivane bakterijske kulture na predmetno stakalce, a zatim je dodano 1-2 kapi svježeg 3% vodikovog peroksida (Gram Mol, Hrvatska). Prisutnost katalaze vidljiva je pojavom mjehurića uslijed oslobađanja kisika.

3.2.2.5. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti rupama u agru

Sterilna kruta podloga s obranim mlijekom (10%) (Sigma-Aldrich, Njemačka) uz dodatak agra (2%) (Merck, Njemačka) ohladi se u vodenoj kupelji temperiranoj na 50°C i izlije u Petrijevu zdjelicu. Nakon skrutnjavanja podloge, izbuše se „rupe“ u agaru bušačem promjera 7 mm, u koje se zatim ukapa 50 µL uzorka. Uzorci su suspenzija stanica i supernatant bakterijske kulture. Petrijeve zdjelice se inkubiraju pri sobnoj temperaturi, a promjeri zona, nastalih uslijed hidrolize kazeina, koji upućuju na proteolitičku aktivnost pojedinog soja bakterije mliječne kiseline, se određuju nakon 2, 4, 12 i 24 sata.

3.2.3. Određivanje proteolitičke aktivnosti odabranih autohtonih *Lactococcus lactis* sojeva

3.2.3.1. Ansonova metoda određivanja proteolitičke aktivnosti

Ispitana je proteolitička aktivnost sojeva koji su pokazali najbolju proteolitičku aktivnost metodom rupama u agru, u 0,65%-tnom kazeinu (Sigma-Aldrich, Njemačka) prema Anson-ovoj metodi (Beganović i sur., 2013). Filtrat supernatanta prekonocnih kultura svakog soja (1 ml) resuspendiran je u 5 ml otopine kazeina, nakon čega je uslijedila inkubacija od 10 min pri 37°C. U ovom koraku djelovanjem proteaza dolazi do hidrolize kazeina, pri čemu dolazi do oslobađanja tirozina, ostalih aminokiselina i peptida. Reakcija je prekinuta dodatkom 5 ml trikloroctene kiseline (Thermo Fischer Scientific, SAD), pri čemu dolazi do taloženja svih proteina koji su nehidrolizirani. Nakon ponovne inkubacije (30 minuta, 37°C) i filtracije, u 2 ml filtrata dodano je 5 ml 0,4 M otopine Na₂CO₃ (Kemika, Hrvatska) i 1 ml Folin-Ciocalteu Fenol reagensa (Merck, Njemačka). Folin-Ciocalteu Fenol reagens reagira sa slobodnim tirozinom te daje plavo obojeni kromofor, koji se kvantificira spektrofotometrijski. Uzorak je ponovno inkubiran (30 min, 37°C) i filtriran, nakon čega je izmjerena apsorbanacija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006 (Italija) pri 670 nm. Slijepa proba sadrži predinkubiranu otopinu kazeina kojoj je na početku eksperimenta dodana trikloroctena kiselina, nakon čega slijedi dodavanje supernatanta i svi prethodno opisani postupci.

S ciljem određivanja aktivnosti proteolitičkih enzima, potrebno je napraviti graf ovisnosti množine (μmol) L-tirozina (Merck, Njemačka) o apsorbanaciji (A_{670}), jednadžbu pravca i koeficijent determinacije (R^2). Standardna krivulja je pripremljena mjerenjem apsorbanacija (A_{670}) poznatih koncentracija L-tirozina tretiranih na isti način kao i uzorci (tablica 1). Svi uzorci su pripremljeni u tri paralele, pri čemu je izračunata srednja vrijednost, nakon oduzimanja slijepe probe.

Priprema standardne krivulje:

Tablica 1. Prikaz potrebni reagenasa (ml) za pripremu standardne krivulje ovisnosti množine (μmol) o apsorbanciji (A_{670})

	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Slijepa proba
1,1 mM L-Tirozina (ml)	0,05	0,10	0,20	0,40	0,50	0
Deionizirana voda (ml)	1,95	1,90	1,80	1,60	1,50	2,00
0,4 M Na₂CO₃	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Folin fenol reagens	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
UKUPNO:	8	8	8	8	8	8

Iz dobivene jednadžbe pravca, na temelju eksperimentalnih rezultata mjerenja apsorbancije (A_{670}), izračunata je množina (μmol) oslobođenog L-tirozina, uslijed hidrolize kazeina djelovanjem proteaza, u uzorcima supernatanta korištenih sojeva. Dobivene množine su uvrštene u navedenu formulu, nakon čega je izračunata aktivnost (I.J.) enzima po ml supernatanta.

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

n (oslobođenog Tyr) = u μmol

V_{uk} = ukupni volumen uzorka u ml (supernatant + kazein + TCA = 11 ml)

V_{enz} = volumen korištenog enzima (u ovom slučaju supernatanta; 1 ml)

t = vrijeme enzimske reakcije u minutama (10 min)

V = volumen (u ml) korišten u kolorimetrijskom određivanju (100 μL ; 0,1 ml)

3.2.3.2. Analiza hidrolize kazeina Tricine SDS–PAGE metodom

Prekonoćne kulture odabranih bakterijskih sojeva su centrifugirane (10 min, 4200 o/min), a zatim isprane fosfatnim puferom (pH = 7,4). Dobivena biomasa reuspendirana je u 2%-tnoj otopini obranog mlijeka (Sigma-Aldrich, Njemačka) te inkubirana 48 sati pri 37°C, nakon čega se pratila razgradnja kazeina koja upućuje na proteolitičku aktivnost, primjenom Tricine SDS-PAGE metode. Kao kontrola je korištena neinokulirana otopinu obranog mlijeka (2%). Gel za Tricine-SDS-PAGE pripremljen prema Haider i sur. (2012).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fenotipska karakterizacija autohtonih *Lactococcus lactis* sojeva za odabir sojeva s najboljom proteolitičkom aktivnošću

Prvi korak u odabiru potencijalnih starter kultura je fenotipska karakterizacija različitih bakterijskih sojeva. O ovom radu je provedena fenotipska karakterizacija autohtonih *Lactococcus lactis* sojeva, izoliranih iz tradicionalno proizvedenih svježih sireva, mikroskopiranjem stanica nakon bojanja po Gramu (skika 4), KOH metodom, katalaza testom, mjerenjem pH vrijednosti nakon prekonoćne inkubacije te ispitivanjem proteolitičke aktivnosti metodom rupama u agru (tablica 2).

Tablica 2. Fenotipska karakterizacija odabranih autohtonih *Lactococcus lactis* sojeva

Soj	Mikrosk opiranje	KOH metoda	Katalaza test	pH	% mliječne kiseline	Zona rupe/superna tanta (cm)	Zona rupe/kultura (cm)
<i>L. lactis</i> ZG 1-51	koki	Gram +	-	5,44	0,27	0	0
<i>L. lactis</i> ZG 2-4	koki	Gram +	-	5,3	0,18	0.7/0.75	0.7/1.2*
<i>L. lactis</i> ZG 2-11	koki	Gram +	-	5,1	0,09	0	0
<i>L. lactis</i> ZG 4-1	koki	Gram +	-	5,06	0,18	0.7/1.1**	0.7/1.1**
<i>L. lactis</i> ZG 4-2	koki	Gram +	-	5,15	0,18	0	0
<i>L. lactis</i> ZG 5-32	koki	Gram +	-	5,49	0,27	0.7/2*	0.7/1.7*
<i>L. lactis</i> ZG 5-51	koki	Gram +	-	4,75	0,09	0.7/1.00**	0.7/1.00**
<i>L. lactis</i> ZG 6-51	koki	Gram +	-	5,4	0,09	0.7/1.10**	0.7/1.00**
<i>L. lactis</i> ZG 7-6	koki	Gram +	-	4,95	0,18	0.7/1.00*	0.7/1.5*
<i>L. lactis</i> ZG 7-10	koki	Gram +	-	5,01	0,153	0.7/1.4**	0.7/1.8**
<i>L. lactis</i> ZG 9-2	koki	Gram +	-	5,0	0,18	0.7/1.1*	0.7/1.4*
<i>L. lactis</i> ZG 9-11	koki	Gram +	-	4,96	0,63	0	0

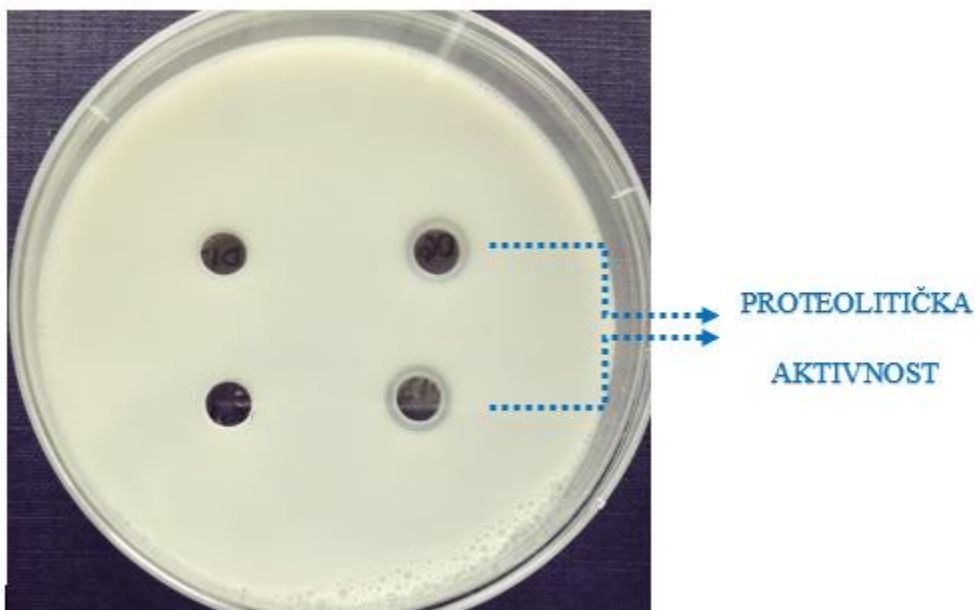
*bistra zona uz poraslu kulturu

**cijela zona mutna



Slika 4. Mikroskopski prikaz koka - *Lactococcus lactis* ZG7-10 nakon bojanja po Gramu

Pojava bistrih i mutnih zona oko nanesenih supernatanta i bakterijskih kultura pojavila se već nakon 12 sati i zadržala se tijekom naredih 24 sata inkubacije (slika 5).



Slika 5. Određivanje proteolitičke aktivnosti (plave strelice) razgradnjom kazeina na Petrijevim pločama koje sadrže obrano mlijeko (10%) uz dodatak agra (2%)

Pojava mutnih zona upućuje na mogućnost rasta odabrane kulture u obranom mlijeku, dok pojava bistrih zona upućuje na sposobnost razgradnje kazeina (glavnog proteina u mlijeku). Temeljem dobivenih rezultata, odnosno mjerenjem zona i međusobnom usporedbom, odabrani su sojevi s najvećim promjerima, što upućuje i na njihovu jaču proteolitičku aktivnost. Sojevi koji su izabrani za daljnje ispitivanje proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom su *L. lactis* ZG 7-10, *L. lactis* ZG 7-6, *L. lactis* ZG 9-2 i *L. lactis* ZG 5-32.

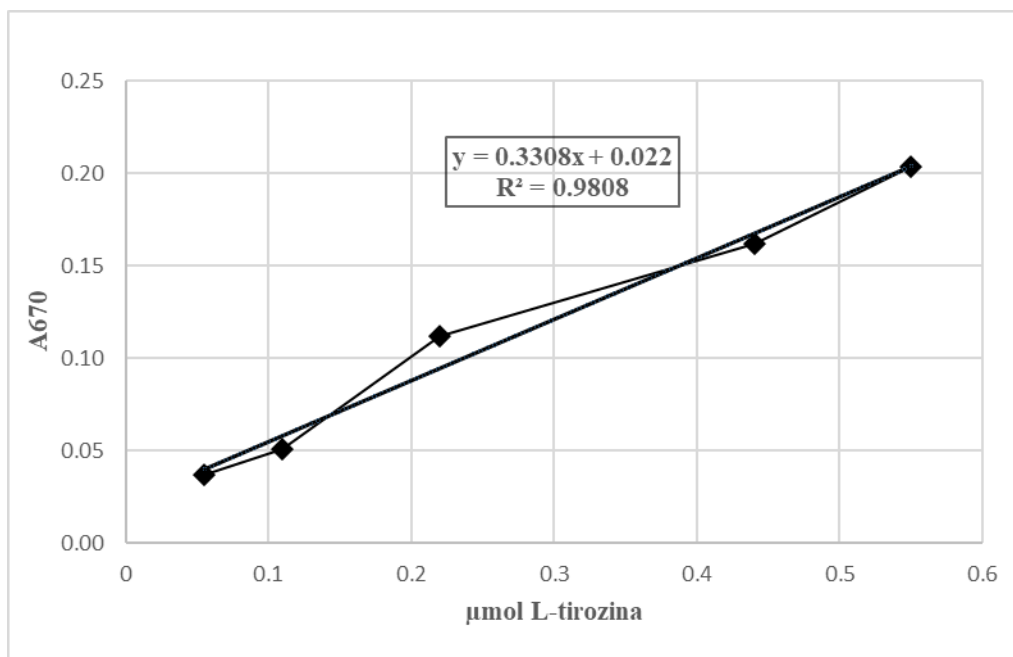
4.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti odabranih autohtonih *Lactococcus lactis* sojeva

4.2.1. Ansonova metoda određivanja proteolitičke aktivnosti

Proteolitička aktivnost enzima odabranih izolata u izravnoj je korelaciji s količinom oslobođenog tirozina uslijed hidrolize kazeina. Što je veća proteolitička aktivnost, to je više slobodnog tirozina koji reagira s Folin-Ciocalteu Fenol reagensom što daje plavo obojeni produkt, koji se zatim kvantificira spektrofotometrijski u vidljivom dijelu spektra (A_{670}).

Tablica 3. Prikaz izračunatih množina L-tirozina i izmjerene apsorpcije (A_{670}) za izradu standardne krivulje za određivanje proteolitičke aktivnosti

	A_{670}	n (μmol)
<i>Standard 1</i>	0.04	0.055
<i>Standard 2</i>	0.05	0.11
<i>Standard 3</i>	0.11	0.22
<i>Standard 4</i>	0.16	0.44
<i>Standard 5</i>	0.20	0.55



Slika 6. Standardna krivulja za određivanje proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom

Tablica 4. Množina oslobođenog tirozina (μmol) i proteolitička aktivnost (U/ml_{supernatanta}) ezima prisutnih u spernatantu određena Ansonovom metodom

Soj:	n (μmol)	U/ml _{supernatanta}
<i>L. lactis</i> ZG 5-32	-0.0504	-0.5542
<i>L. lactis</i> ZG 7-6	0.0071	0.0776
<i>L. lactis</i> ZG 7-10	0.3204	3.5248
<i>L. lactis</i> ZG 9-2	-0.0413	-0.45445

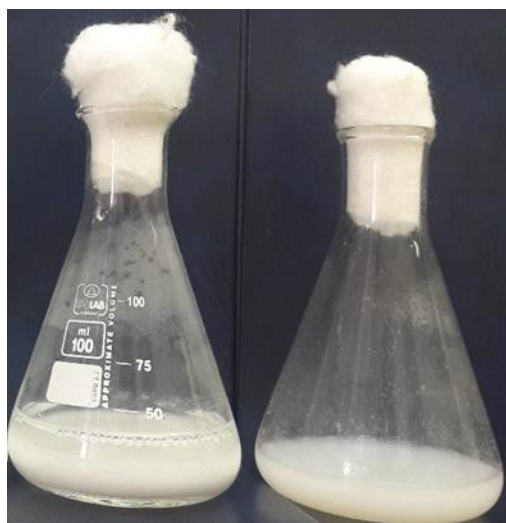
Ansonovom metodom mjerenja proteolitičke aktivnosti, soj *L. lactis* ZG 7-10 je pokazao znatno bolju aktivnost u odnosu na ostale *Lactococcus lactis* sojeve (tablica 4), zbog čega je ispitana njegova sposobnost razgradnje kazeina, glavnog proteina u mlijeku, Tricine SDS-PAGE metodom.

4.2.2. Analiza hidrolize kazeina Tricine SDS–PAGE metodom

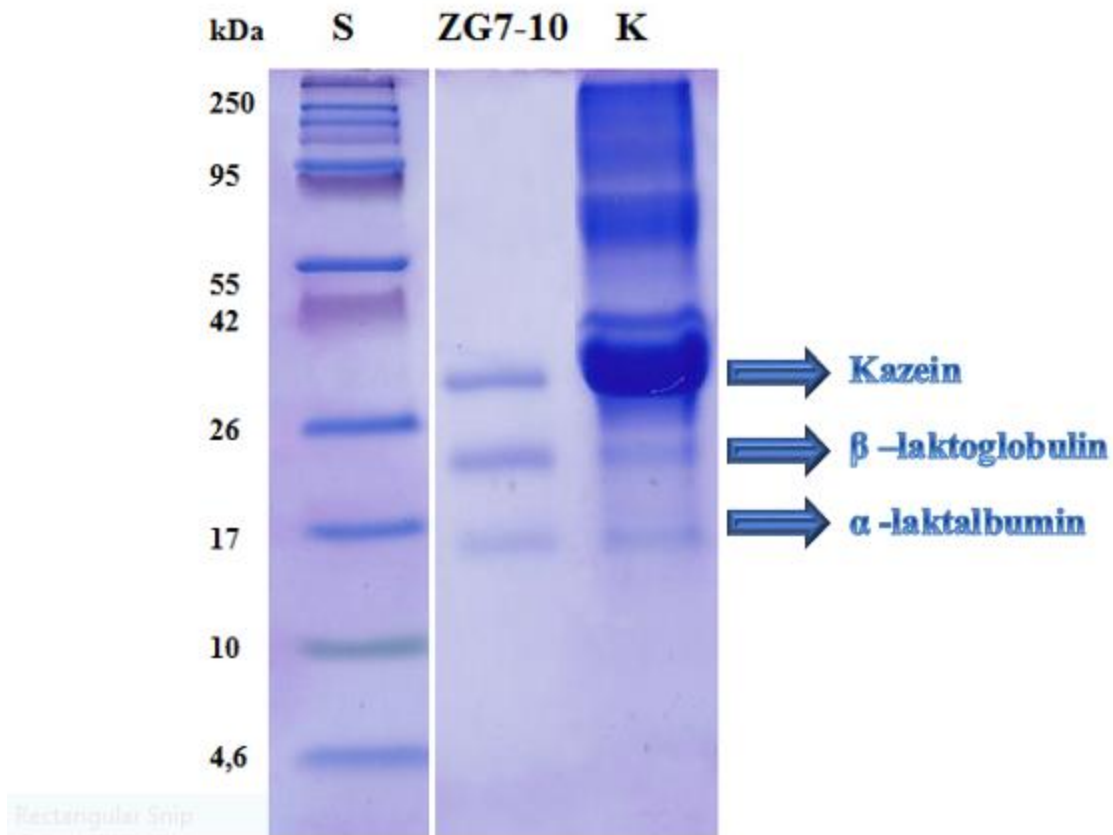
Sadržaj proteina u mlijeku je raznovrsan, s općenitom podjelom u dvije grupe. Prva grupa su kazeini kojih ima 3-4 različite vrste u mlijeku sa sličnom strukturom, a svi ostali proteini nađeni u mlijeku spadaju u drugu grupu, zajedničkim imenom nazvani sirutkini proteini (većina proteina u kravljem mlijeku su β -laktoglobulin i α -laktalbumin). Relativna veličina kazeina kod većine vrsta je između 25 i 35 kDa, dok je većina β -laktoglobulina veličine 18 kDa α -laktalbumina oko 14 kDa (Hurley, 2010).

S obzirom da je molekulska masa kazeina u mlijeku između 25 i 35 kDa, za detekciju proteolitičke aktivnosti soja *L. lactis* ZG 7-10, provedena je poliakrilamidna gel elektroforeza za niske molekulske mase (Tricine-SDS-PAGE). Kultura stanica inkubirana je 48 sati u otopini obranog mlijeka u svrhu ispitivanja proteolitičke aktivnosti (slika 4), odnosno provedena je Tricine-SDS-PAGE elektroforeza supernatanata kulture nakon inkubacije u cilju utvrđivanja prisutnosti glavnog proteina (kazeina) koji se nalazi u obranom mlijeku (slika 5).

Iz slike 4 vidljivo je bistrenje otopine nakon 48-satne inkubacije soja ZG7-10, usporedbom sa kontrolom te je vidljivo formiranje gruša uslijed djelovanja proizvedene mliječne kiseline. Provođenjem Tricine-SDS-PAGE elektroforeze, na gelu su vidljive slabije proteinske vrpce koji odgovaraju molekulskoj masi kazeina (oko 27 kDa) (slika 5) što potvrđuje pretpostavku da je uslijed djelovanja proteaza ovog soja došlo do razgradnje kazeina.



Slika 7. Određivanje proteolitičke aktivnosti u obranom mlijeku nakon inkubacije pri 37°C ZG7-10 – *Lactococcus lactis*; K - otopina obranog mlijeka



Slika 8. Utvrđivanje prisutnosti kazeina u supernatantu nakon inkubacije pomoću odabranih sojeva bakterije mliječne kiseline Tricine-SDS-PAGE elektroforezom; S- standard proteina niske molekulske mase; ZG7-10 – *Lactococcus lactis*; K - otopina obranog mlijeka.

5. ZAKLJUČCI

1. Metodom rupama u agaru dokazana je mogućnost rasta odabranih sojeva *Lactococcus lactis* u obranom mlijeku. Međusobnim mjerenjem zona, odabrani su sojevi s najvećim promjerima što upućuje na jaču proteolitičku aktivnost. Sojevi koji su izabrani za daljnje ispitivanje proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom su *L. lactis* ZG 7-10, *L. lactis* ZG 7-6, *L. lactis* ZG 9-2 i *L. lactis* ZG 5-32.
2. Soj *L. lactis* ZG 7-10 je pokazao znatno bolju aktivnost u odnosu na ostale *Lactococcus lactis* sojeve što je ispitivano Ansonovom metodom mjerenja proteolitičke aktivnosti.
3. Sposobnost razgradnje kazeina, glavnog proteina u mlijeku, soja *L. lactis* ZG 7-10 dokazana je Tricine SDS-PAGE elektroforezom.

6. POPIS LITERATURE

1. Anonymus 1 <https://fineartamerica.com/featured/lactococcus-lactis-scimat.html?product=poster>. Pristupljeno 13. lipnja 2018.
2. Anonymus 2 <https://genome.jgi.doe.gov/lacde/lacde.home.html>. Pristupljeno 13. lipnja 2018.
3. Beganović J., Kos B., Leboš Pavunc A., Uroić K., Džidara P., Šušković J. (2013) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe* **20**: 58-64.
4. Buck J. D. (1982) Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria *Appl Environ Microbiol* **44**: 992-993.
5. Buist G., Venema G., Kok J. (1998) Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *J Bacteriol* **180**: 5947–5953.
6. Chassard C., Grattepanche F., Kneifel C. W., Salminen S. (2011) Probiotics-and-health claims, Wiley-Blackwell, Oxford, pp.: 49-67.
7. Christensen J. E., Dudley E. G., Pederson J. A., Steele J. L. (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 217–246.
8. Conway P. L. i Henrikson A. (1994) Strategies for the Isolation and Characterisation of Functional Probiotics. U: Human Health: The Contribution of Microorganisms, S. A. W. Gibson (ured.), Springer Verlag, London, str. 75-93.
9. Dalić D. K. D., Deschamps A. M., Richard-Forget F., (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review, *Food Control*, Volume 21, Issue 4, str. 370-380.
10. Detmers F. J., Kunji E. R., Lanfermeijer F. C., Poolman B., Konings W. N. (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* **37**: 16671–16679.
11. Fenster K. M., Parkin K. L., Steele J. L. (1997) Characterization of a thiol-dependent endopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J Bacteriol* **179**: 2529–2533.
12. Fernandez-Espla M. D., Garault P., Monnet V., Rul F. (2000) Streptococcus thermophilus cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4772–4778.
13. Foschi C., Laghi L., Parolin C., Giordani B., Compri M., Cevenini R. (2017) Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration

- of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and ¹H-NMR. *PLoS ONE* 12(2): e0172483.
14. Fox P. F. (1989) The milk protein system. U: Fox P (ed) Developments in dairy chemistry, vol. 4. Elsevier Applied Science, London, pp 1–53.
 15. Fox P. F., Wallace J. M., Morgan S., Lynch C. M., Niland E. J., Tobin J. (1996) Acceleration of cheese ripening. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 271–297.
 16. Gagnaire V., Piot M., Camier B., Vissers J. P., Jan G., Leonil J. (2004) Survey of bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *Int J Food Microbiol* **94**: 185–201.
 17. Garault P., Le Bars D., Besset C., Monnet V. (2002) Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem* **277**: 32–39.
 18. Hagting A., Kunji E., Leenhouts K., Poolman B., Konings W. (1994) The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J Biol Chem* **269**: 11391–11399.
 19. Haider S. R., Helen J. R., Sharp B. L. (2012) Tricine-SDS-PAGE, U: Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, (Kurien, B.T., Scofield, R.H., ured.), Springer Science+Business Media, str. 81-91.
 20. Havranek J., Kalit S., Antunac N., Samaržija D. (2014) Sirarstvo. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
 21. Hebert E. M., Raya R. R., De Giori G. S. (2000) Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5316–5321.
 22. Huppertz T., Fox P. F., Kelly A. L. (2018) 3 - The caseins: Structure, stability, and functionality, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Proteins in Food Processing (Second Edition), (ured.: Yada R. Y.), Woodhead Publishing, str. 49-92.
 23. Hurley W. L. (2010) Milk Composition & Synthesis. Lactation Biology website < <http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/>>. Pristupljeno 29. ožujka 2018.
 24. Klaenhammer T. R., Barrangou R., Buck B. L., Azcarate-Peril M. A., Altermann E. (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 393–409.

25. Kok J., de Vos W. M. (1994) The proteolytic system of lactic acid bacteria. In: Gasson M, De Vos W (ured.) Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, Glasgow, pp 169–210.
26. Kok J., Leenhouts K. J., Haandrikman A. J., Ledebøer A. M., Venema G. (1988) Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl Environ Microbiol* **54**: 231–238.
27. König H., Fröhlich J. (2017) Lactic Acid Bacteria. U: König H., Uden G., Fröhlich J. (ured.) Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Cham.
28. Kos B. (2001) Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
29. Kunji E., Hagting A., De Vries C., Juillard V., Haandrikman A., Poolman B., Konings W. N. (1995) Transport of β -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **270**: 1569–1574.
30. McSweeney P. L. H., Fox P. F., Ciocia F. (2017) Chapter 16 - Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate, Academic Press 2017, str. 411-421.
31. Metchnikoff E. (1907): The Prolongation of Life. Optimic Studies, Heinemann, London.
32. Peltoniemi K., Vesanto E., Palva A. (2002) Genetic characterization of an oligopeptide transport system from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Arch Microbiol* **177**: 457–467.
33. Periti P., Tonelli F. (2002) Biotherapeutics and biotherapy of surgical enteropathies. *Digest Liver Dis* **34**: S87-S97.
34. Sanders M. E. i Huis in't Veld J. (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issued. U: Proceedings of the 6 th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, str. 293-316.
35. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006) Proteolytic system of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) **71**: 394–406.
36. Smit G., Smit B. A., Engels W. J. M. (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 591–610.
37. Smukowski M., Wendorff W. L., Ping Y., Rao R. D. (2003) Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J Dairy Sci* **86**: 364.

38. Sridhar V. R., Hughes J. E., Welker D. L., Broadbent J. R., Steele J. L. (2005) Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3025–3032.
39. Stefanitsi D., Sakellaris G., Garel J. R. (1995) The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *FEMS Microbiol Lett* **128**: 53–58.
40. Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.
41. Šušković J. (2009) Probiotici kao živi lijekovi, predavanje iz kolegija "Probiotici i starter kulture", Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
42. Terzić-Vidojević A., Tonković K., Leboš Pavunc A., Beganović J., Strahinić I., Kojić M., Veljović K., Golić N., Kos B., Čadež N., Gregurek L.J., Šušković J., Raspor P., Topisirović L.J. (2015) Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT - Food Sci Technol* **63**: 298-306.
43. Tratnik Lj. (1998) Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
44. Vásquez A., Forsgren E., Fries I., Paxton R. J., Flaberg E., Szekely L. (2012) Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS ONE* **7**(3): e33188.
45. Wegmann U, Klein R, Drumm I, Kuipers OP, Henrich B (1999) Introduction of peptidase genes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* into *Lactococcus lactis* and controlled expression. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4729–4733.
46. Zannini E., Waters D. M., Coffey A. (2016) *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 1121.

Izjava o izvornosti

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

Bigita Herout

ime i prezime studenta