

Antioksidativna aktivnost odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline

Novak, Jelena

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:159:955599>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Jelena Novak

7150/PT

**ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ODABRANIH
SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: Prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Antioksidativna aktivnost odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline

Jelena Novak, 0058207421

Sažetak: Antioksidativna aktivnost jedan je od važnih parametara prilikom karakterizacije bakterija mliječne kiseline (BMK) kao probiotika. Bakterijske stanice mogu producirati određene molekule koje im služe kao obrana od oksidativnog stresa. Primjenom takvih bakterija u prehrani ljudi, posebice BMK, pozitivni učinci prenose se na korisnika i smanjuju oksidacijska oštećenja u gastrointestinalnom sustavu. Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativni kapacitet odabranih sojeva BMK koji su u postupku probiotičke karakterizacije. Ispitana su tri glavna parametra antioksidativnog kapaciteta: aktivnost enzima superoksid dismutaze, mogućnost uklanjanja DPPH radikala i mjerenje koncentracije ukupnog glutaciona. Na osnovu navedenih parametara odabrani sojevi su rangirani prema antioksidativnom potencijalu.

Ključne riječi: antioksidant, bakterije mliječne kiseline, DPPH, glutation, superoksid dismutaza

Rad sadrži: 25 stranica, 9 slika, 0 tablica, 27 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: Deni Kostelac, mag.ing.biotechn.

Datum obrane: rujan, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientificfield: Food Technology

Antioxidant activity of selected strains of lactic acid bacteria

Jelena Novak, 0058207421

Abstract: Antioxidant activity is important parameter when characterizing lactic acid bacteria (LAB) as potential probiotics. Bacterial cells can produce certain molecules that serve them as a defense against oxidative stress. By applying such bacteria to the diet of humans, especially LAB, positive effects are transferred to the user and reduce oxidative damage in the gastrointestinal system. The aim of this study was to examine the antioxidant capacity of the selected strains of LAB that are in the process of probiotic characterization. Three main parameters of antioxidant capacity were investigated: the enzyme activity of superoxide dismutase, DPPH free radical scavenging and concentration of total intracellular glutathione. Based on the mentioned parameters, the selected strains are ranked according to their antioxidant potential.

Keywords: antioxidant, DPPH, glutathione, lactic acid bacteria, superoxide dismutase

Thesiscontains: 25 pages, 9 figures, 0 tables, 27 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Ph.D. Ksenija Markov, Full professor

Technical support and assistance: Deni Kostelac, M.Sc

Defence date: September, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Antioksidansi	2
2.1.1. Superoksid dismutaza	2
2.1.2. Glutacion.....	3
2.2. DPPH radikal	5
2.3. Bakterije mliječne kiseline	6
2.3.1. <i>Lactobacillus brevis</i>	7
2.3.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	8
2.3.3. <i>Lactococcus lactis</i>	8
2.3.4. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1.1. Mikroorganizam.....	10
3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizma	10
3.1.3. Aparatura i pribor	11
3.1.4. Kemikalije.....	11
3.2. Metode rada	11
3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije	11
3.2.2. Određivanje broja BMK u suspenziji	12
3.2.3. Razbijanje stanica BMK	13
3.2.4. DPPH metoda.....	13
3.2.5. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze	14
3.2.6. Mjerenje koncentracije glutaciona	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
5. ZAKLJUČAK.....	22
6. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Oksidativni stres je stanje u stanici koje najčešće nastaje u uvjetima kada dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih molekula kisika (ROS - Reactive Oxygen Species), a koje stanični antioksidativni sustav nije u stanju učinkovito ukloniti. ROS nastaju kao nusprodukt enzimskih reakcija ili kao rezultat okolišnog djelovanja poput ionizacijskog zračenja, UV svjetla, porasta koncentracije CO₂ u zraku ili kemijskog zagađenja. Problem nastaje kada je njihova koncentracija u stanicama znatno viša od fiziološke, što za posljedicu ima oksidativna oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina te stanica ulazi u stanje oksidativnog stresa (Lushchak, 2012; Breitenbach i sur., 2015). Iako niska koncentracija ROS ima fiziološki pozitivne funkcije za stanicu, ipak se ROS vrlo često u brojnim izvorima prije svega spominju štetnima po stanicu jer nadvladaju mehanizme antioksidativne zaštite stanice.

Stanična antioksidativna obrana uključuje antioksidanse kao što su glutation, askorbinska kiselina i vitamin E, proteine poput glutaredoksina i tioredoksina, antioksidativne enzime superoksid dismutazu (SOD), glutation peroksidazu (GPx) i katalazu (CAT), reduktivnu snagu stanice (koenzim NADPH) i enzime zadužene za održavanje reduciranog stanja u stanici poput glukoza-6-fosfat dehidrogenaze i glutation-reduktaze (Lushchak, 2012; Vilamena, 2013).

Bakterije mliječne kiseline (BMK) mogu biti prirodan izvor antioksidansa, a njihovi određeni spojevi poput peroksiredoksin peptida i eksopolisaharida imaju antioksidativnu aktivnost. Također, hrana fermentirana pomoću BMK sadrži derivate peptida iz enzimske hidrolize i fermentacije koji imaju antioksidativno djelovanje. Protein mlijeka bogat je aktivnim peptidima pa fermentacija mlijeka pomoću BMK proizvodi peptide i aminokiseline s različitim funkcionalnim prednostima (Hasim i sur., 2017).

U ovom je radu istražen antioksidativni potencijal odabranih bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* JM, *Lactobacillus plantarum* K1, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG 1363, *Leuconostoc mesenteroides* JM i *Lactobacillus plantarum* B. Antioksidativni potencijal odabranih sojeva određen je mjerenjem tri osnovna antioksidativna parametra: unutarstanične aktivnosti enzima superoksid dismutaze, mogućnosti uklanjanja DPPH radikala i mjerenjem koncentracije ukupnog glutationa.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Antioksidansi

Antioksidansi predstavljaju molekule koje mogu neutralizirati lančane reakcije slobodnih radikala, sprječavaju nastanak bolesti koje su posljedica oksidacijskog stresa i štite organizam od štetnog djelovanja prooksidansa. Živi organizmi mogu proizvoditi antioksidanse da bi smanjili štetu nastalu oksidacijskim stresom. Postoje različiti antioksidansi poput NADH, NADPH, glutationa i mokraćne kiseline, a proteini i peptidi također imaju antioksidativnu aktivnost. Najveći izvor prirodnih antioksidansa su tokoferoli, askorbinska kiselina, karotenoidi i različiti fenolni spojevi te ih je potrebno unositi putem hrane, no molekule antioksidansa mogu nastati i u stanici. Osnovna funkcija im je uništavanje u organizmu već stvorenih radikala ili popravak oštećenih stanica. Tipični predstavnici antioksidansa topljivih u vodi i lipidima su askorbat i R-tokoferol. Mali broj antioksidansa su kofaktori za antioksidacijske enzime, ali većina inhibira oksidaciju redukcijom.

Antioksidansi se klasificiraju na primarne, sekundarne i tercijarne. Primarni antioksidansi sprječavaju nastanak slobodnih radikala, sekundarni uklanjaju nastale slobodne radikale (enzimi, flavonoidi, karotenoidi, askorbinska kiselina), dok tercijarni antioksidansi popravljaju nastala oštećenja ili uklanjaju biomolekule oštećene radikalima (Berdahl i sur., 2010).

2.1.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) je antioksidativni enzim važan za obrambeni mehanizam stanica izloženih kisiku i odgovoran je za degradaciju toksičnih superoksida. Raspadanje suvišnih superoksida pomoću superoksid dismutaze važan je fiziološki antioksidativni obrambeni mehanizam kod aerobnih organizama.

SOD katalizira dismutaciju superoksidnog radikala u jednu molekulu kisika i vodikov peroksid (H_2O_2). Kod sisavaca postoje tri vrste superoksid dismutaze, ovisno o metalnom ionu koji sadrže. U lizosomima, citoplazmi i jezgrinim odjeljcima stanica sisavaca nalazi se Cu/Zn-SOD (SOD1) oblik superoksid dismutaze, a to je homodimer sastavljen od Zn i Cu podjedinice. U matriksu mitohondrija nalazi se Mn-SOD (SOD2), po građi heterodimer sastavljen od jedne Mn podjedinice s aktivnim središtem. Također, u izvanstaničnim tekućinama poput limfe i plazme nalazi se ekstracelularni (EC)-SOD (SOD) koji je građen od Zn i Cu podjedinice i

sadrži domenu s visokim afinitetom za heparin, što doprinosi njegovoj lokalizaciji u izvanstaničnim tekućinama (Miyamoto i sur. 2010).

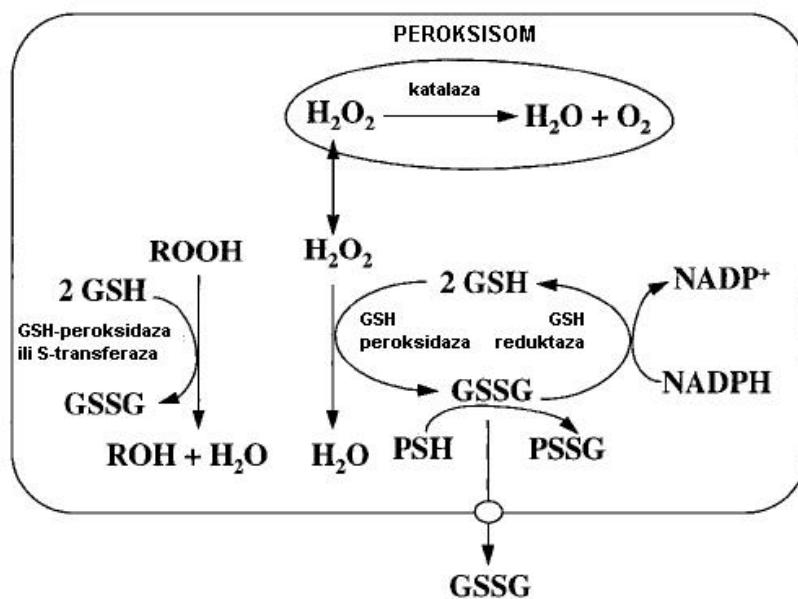
Istraživanja su pokazala da aerobni organizmi pokazuju veliku aktivnost superoksid dismutaze, dok anaerobni organizmi ili pokazuju minimalnu aktivnost ovog enzima ili je uopće nemaju. Također, gram-negativne bakterije pokazuju višu razinu SOD od gram-pozitivnih bakterija.

2.1.2. Glutation

Glutation je tripeptid glutamata, cisteina i glicina, a nalazi se u svim tkivima u organizmu i to u jednom od dva osnovna oblika, reduciranom i oksidiranom obliku. Reducirani oblik poznat je i pod nazivom monomerni glutacion, odnosno GSH, dok se oksidirani oblik naziva i dimerni oblik, odnosno glutacion disulfid ili GSSG. Omjer GSSG/GSH je pokazatelj oksidacijskog stresa. Glutation se može sintetizirati u gotovo svakoj stanici, no glavno mjesto sinteze je jetra gdje se odvijaju glavne reakcije detoksikacije ksenobiotika nastajanjem GSH konjugata (Yuan i Kaplowitz, 2009). Sinteza i razgradnja glutaciona odvija se u okviru tzv. γ -glutamil ciklusa. Zbog svoje topljivosti u vodi, nalazi se u citosolu stanice i drugim vodenim medijima živih sustava. Neobična γ -peptidna veza između glutamata i cisteina omogućuje glutacionu unutarstaničnu stabilnost jer ga većina peptidaza ne može hidrolizirati, već se može metabolizirati samo izvan stanice. Glutation štiti bitne stanične komponente od slobodnih radikala i peroksida te je jedna od najvažnijih molekula u antioksidativnoj zaštiti. Osim antioksidacijskog djelovanja čiji je mehanizam prikazan na slici 1, glutacion ima i detoksikacijsko djelovanje, a u može sudjelovati izravno i neizravno kao kofaktor enzimskih antioksidansa u hvatanju ili gašenju slobodnih radikala. Glutation je esencijalni kofaktor antioksidacijskih enzima (glutacion peroksidaza) koji razgrađuju vodikov peroksid i druge perokside u vodenoj fazi te je neophodan za održavanje života stanice. Određivanje koncentracije GSH i GSSG i njihova omjera u krvi predstavlja važan pokazatelj ukupnog tjelesnog statusa glutaciona te se na taj način smatra pokazateljem rizika bolesti u čovjeka. Glutation kao reducens, antioksidans i detoksicirajući spoj ima važnu ulogu u održavanju zdravlja, a sudjeluje u sintezi proteina, sintezi i popravku DNA, sintezi RNA, transmembranskom transportu, aktivaciji i regulaciji enzimske aktivnosti, aktivnosti receptora, a potreban je i za neke kompleksne stupnjeve odgovarajućeg imunološkog odgovora.

Smanjena aktivnost enzima koji sudjeluju u sintezi glutationa ili različiti poremećaji homeostaze glutationa rezultiraju različitim poremećajima, tj. uzrok su bolesti ili pospješuju progresiju osnovne bolesti (Rahman i Macnee, 2000). Koncentracija glutationa smanjuje se izlaganjem egzogenim „stresorima“ poput jakog fizičkog napora, pušenja, farmaceutskih proizvoda i halogeniranih hidrokarbona (Beckman i Ames, 1998). Ukoliko postoji smanjena koncentracija glutationa, moguća je patogeneza različitih bolesti jetre, pluća, neurodegenerativnih bolesti, starenja, autoimunih bolesti, virusnih infekcija, upalnih bolesti gušterače, karcinoma i drugih bolesti (Jones, 2011).

Glutation je prisutan u svim eukariotskim stanicama u velikoj koncentraciji, dok se u prokariotskim stanicama nalazi u manjoj količini i to prvenstveno u gram-negativnim bakterijama. Ipak, gram-pozitivne bakterije mogu ga sintetizirati ili konzumirati iz medija u kojem rastu. Fakultativni anaerobni i aerobni prokarioti koje karakterizira odsutnost glutationa mogu proizvoditi trole male molekulske mase koji mogu zamijeniti funkcije glutationa.



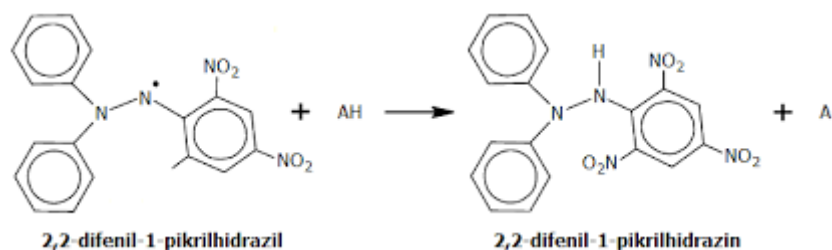
Slika 1. Antioksidativno djelovanje GSH (Shelly, 1999)

2.2. DPPH radikal

DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) organski je dušikov radikal ljubičaste boje. To je stabilni radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule i zbog toga ne dimerizira kao ostali slobodni radikali. U reakciji s antioksidansima, DPPH se reducira u blijedo žuti hidrazinski oblik pri čemu antioksidans donira vodik dušiku koji sadrži jedan nespareni elektron odgovarajućeg hidrazina. Ta reakcija je lako mjerljiva pa smanjenje DPPH radikala odgovara antioksidativnom kapacitetu nekog mjenenog uzorka.

DPPH metoda koristi se za ispitivanje antioksidativne aktivnosti i sposobnosti komponenata da se ponašaju kao „hvatači“ radikala ili donori vodika. To je jednostavna i brza metoda kojom se mogu ispitati i kruti i tekući uzorci. Primjenjiva je za određivanje cjelokupnog antioksidativnog kapaciteta ispitivanog uzorka i nije specifična za određenu vrstu antioksidativnog spoja kao pojedine metode. Slika 2 prikazuje strukturu DPPH radikala.

Ukoliko se otopina s DPPH radikalom miješa s otopinom određenog antioksidansa, ljubičasta boja promijenit će se u svjetlo žutu odgovarajućeg hidrazina. Uspješnost provođenja reakcije ovisi o vrsti otapala jer je za neke antioksidanse potrebno koristiti polarna otapala (etanol i metanol), a za lipofilne ekstrakte etil-acetat ili kloroform. Također, pH uzorka utječe na uspješnost provođenja reakcije, a najbolji efekt postiže se dodatkom limunske kiseline pri čemu pH vrijednost iznosi 3,25. Redukcijska moć DPPH radikala mjeri se apsorbancijom na valnim duljinama od 515 do 528 nm (Pyrzynska i Pekal, 2013). Stupanj ekstrakcije isto utječe na uspješnost provođenja reakcije te je potrebno provesti barem dva kruga ekstrakcije s adekvatnim organskim otapalima različitih polarnosti da bi se omogućila ekstrakcija komponenata različitih kemijskih struktura.



Slika 2. Kemijska struktura DPPH radikala (Pyrzynska i Pekal, 2013)

2.3. Bakterije mliječne kiseline

BMK predstavljaju raznoliku skupinu živih organizama koji imaju blagotvoran učinak na zdravlje ljudi te široku primjenu u prehrambenoj industriji jer djeluju kao konzervansi i poboljšavaju okus i teksturu prerađevina, dok su neke od bakterija mliječne kiseline sastavni dio gastrointestinalnog trakta čovjeka (Šušković i sur., 1997). Osim duge povijesti upotrebe što dokazuje sigurno konzumiranje BMK, zabilježeni su i pozitivni učinci na zdravlje čovjeka što čini ove mikroorganizme poželjnim u proizvodnji mliječnih i ostalih prehrambenih proizvoda. Također, BMK su jedni od najvažnijih mikroorganizama koji se primjenjuju u biotehnološkoj proizvodnji hrane i drugih specifičnih proizvoda, a pojedini sojevi (posebice roda *Lactobacillus*) imaju dokazane pozitivne učinke na zdravlje ljudi i životinja pa su okarakterizirani kao probiotici. Zbog svoje duge upotrebe bez štetnih utjecaja na ljudsko zdravlje, BMK imaju GRAS (engl. Generally Regarded As Safe) status prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove, odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema regulativi Europske Unije (Frece i sur., 2010 a i b).

BMK podrazumijevaju gram-pozitivne, mezofilne i nesporogene mikroorganizme. One provode fermentaciju heksoza da bi u konačnici stvorile mliječnu kiselinu kao jedini ili glavni krajnji produkt metabolizma ugljikohidrata u procesu fermentacije, a imaju nizak sadržaj gvanina i citozina u molekuli DNA. Dobri su kandidati za biokonzervanse fermentirane hrane jer mogu imati i antibakterijska i antifungalna svojstva. Kemoorganotrofi su i rastu u aerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima na kompleksnim hranjivim podlogama. Također, dokazano je da *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* i *Bifidobacterium longum* mogu proizvoditi NADH-peroksidazu za razgradnju vodikovog peroksida. (Shimamura i sur., 1992).

Klasifikacijski dijele se na sojeve *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (skupina štapića), te *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc* i *Pediococcus* (skupina koka). Prema načinu razgradnje heksoza, metabolizam bakterija mliječne kiseline može se podijeliti u dvije grupe, heterofermentativni i homofermentativni metabolizam, pri čemu je kod homofermentativnog metabolizma primarni produkt mliječna kiselina i u njih ubrajamo rodove *Streptococcus* i *Pediococcus* te različite vrste roda *Lactobacillus*, dok se kod heterofermentativnog metabolizma heksoza razgrađuje do mliječne kiseline i naknadnih produkata poput acetata, etanola (i/ili octene kiseline), CO₂, fumarata i sukcinata i u tu grupu ubrajamo bakterije iz roda *Leuconostoc* i neke vrste roda *Lactobacillus* (Frece i Markov, 2016). BMK su prirodno prisutne u ljudskom i životinjskom gastrointestinalnom

sustavu te su uključene u njihov metabolizam, ali i na supstratima koji su bogati hranjivim tvarima poput jogurta, vrhnja, mesa, alkoholnih pića te fermentirane hrane, npr. kiselo tijesto (Corsetti i Settanni 2007; Pfeiler i Klaenhammer 2007).

BMK i njihovi antimikrobni metaboliti sprječavaju kvarenje hrane, čuvaju svjež okus hrane i produljuju rok trajanja. Na temelju brojnih istraživanja, utvrđeno je da je optimalna temperatura za rast ovih bakterija između 30 i 40 °C, no mogu rasti i pri temperaturama nižim od 5 °C te višim od 45 °C. Također, utvrđena je i optimalna pH vrijednost koja iznosi između 5,5 i 5,8, dok neke bakterije mogu rasti i ispod pH vrijednosti 5,0, a neutralni ili alkalni pH smanjuje ili potpuno zaustavlja njihov rast.

U prisutnosti kisika djelovanjem flavoproteinoksidaza ili NADH peroksidaza, BMK mogu proizvesti vodikov peroksid (H_2O_2), a koncentracija H_2O_2 može rasti do koncentracije koja djeluje antimikrobno zbog nedostatka katalazne aktivnosti. One mogu djelovati i antagonistički zbog sniženja pH uslijed nakupljanja organskih kiselina, proizvedenog H_2O_2 (u aerobnim uvjetima), proizvedenog diacetila i proizvedenih specifičnih inhibitornih spojeva poput bakteriocina (Šušković i Kos, 2000). BMK tijekom rasta i fermentacije proizvode veće količine organskih kiselina (mliječna i octena) koje djeluju inhibicijski na rast i razmnožavanje mikroorganizama.

Pojavom biotehnologije, primjena vrsta *Lactobacillus* proširila se na mnoga područja poput probiotičkih i kliničkih, medicinskih te industrije biogoriva. Osim njihove uloge kao biokonzervansa i probiotika, primjenjuju se kod poboljšanja systemske i respiratorne imunološke reakcije te protiv upala, pretilosti i kao antioksidativna sredstva. Također, imaju i važan doprinos aromi, teksturi i nutritivnim vrijednostima proizvoda.

2.3.1. *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis je štapičasta nepatogena bakterija. Pripada u skupinu BMK te u rod *Lactobacillus*, dok ju obzirom na metabolizam ubrajamo u heterofermentativne bakterije.

Prirodno stanište joj je ljudski intestinalni trakt i biljni materijali, a često se nalazi u okolini s drugim bakterijama mliječne kiseline (Mancini i sur., 2014). Primjenjuje se u fermentaciji vina i sireva. *L. brevis* također predstavlja jednog od najčešćih uzročnika kvarenja piva u pivarstvu, a određeni sojevi proizvode bakteriocine. Uz *L. plantarum*, *L. brevis* je starter kultura koja se najčešće koristi za fermentaciju sokova i povrća (Di Cagno i sur., 2009).

2.3.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum je štapičasta bakterija koja obzirom na metabolizam pripada u fakultativne heterofermentativne bakterije budući da može previrati šećere do laktata i na heterofermentativni i na homofermentativni način.

Razlikuje se u odnosu na ostale laktobacile po sposobnosti iskorištavanja kisika (aerotolerantna je), bez obzira što nema nikakav respiratorni sustav pa se konzumirani kisik nakuplja u obliku vodikovog peroksida koji se koristi za inhibiciju rasta kompetitivnih bakterija. Enzim manganaza omogućuje toleranciju na visoke količine vodikovog peroksida, dok kod ostalih mikroorganizama tu ulogu zaštite provodi superoksid dismutaza (Archibald i sur., 1981). Također, Meir i sur. (1995) potvrdili su prisutnost antioksidacijskih komponenata u izvanstaničnoj membrani soja *Lactobacillus*.

L. plantarum koristi se u industriji za konzerviranje namirnica, za silaže, proizvodnju mliječnih proizvoda i ostale fermentirane hrane te kao probiotik. Poznata je i po sposobnosti produkcije antioksidansa i vitamina, a budući da proizvodi antimikrobne spojeve (bakteriocine), ima i mogućnost opstanka u različitim mikrobnim zajednicama. Izrazita prilagodljivost različitim okolišnim uvjetima (zbog prisutnosti plazmida i velikog genetičkog materijala) razlog je širokoj rasprostranjenosti *L. plantarum* pa se ona nalazi i u gastrointestinalnom traktu životinja i ljudi, a prvenstveno je izolirana iz sline.

2.3.3. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis je bakterija poznata kao prvi genetski modificirani organizam korišten za liječenje bolesti kod čovjeka. Izuzetno je značajna u proizvodnji fermentiranih prehrambenih proizvoda poput svježih i polutvrdih sireva, maslaca i kiselog mlijeka. Vrsta *L. lactis* obuhvaća dvije podvrste, *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris*, a te su podvrste pojedinačno ili u kombinaciji s drugim mikroorganizmima najčešće korištene kao starter kulture u odnosu na druge bakterije mliječne kiseline. Općenito, smatra se da mnogi sojevi roda *Lactococcus* ima iznimnu antioksidativnu aktivnost enzima SOD (Sanders i sur., 1995). Također, zbog velikog industrijskog značaja, *L. lactis* je najviše izučavana vrsta bakterija mliječne kiseline, a prvi sekvenciran genom BMK je *L. lactis* IL 1403.

2.3.4. *Leuconostoc mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides je nepokretna i nesporogena bakterija koja se pojavljuje pojedinačno, u parovima ili kratkim lancima, a okruglastog je oblika. Ukoliko raste na krutom mediju izgleda poput štapića jer joj je tada rast longitudinalan. Sojevi *L. mesenteroides* izolirani su iz mliječnih proizvoda, silaže i kiselog povrća, najčešće kiselog kupusa. Upravo pri inicijalnoj fazi fermentacije kupusa *L. mesenteroides* predstavlja dominantnu vrstu (Dellaglio i sur., 1995).

Za rast ove bakterije potrebna je kompleksna hranjiva podloga i dodatak glutaminske kiseline te L-valina. Metabolizam joj je heterofermentativan pa uz mliječnu kiselinu provodi i CO₂ i etanol, a također provodi i konverziju citrata do diacetila i acetoina.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu korišteni su ovi odabrani sojevi bakterija mliječne kiseline: *Lactobacillus brevis* JM, *Lactobacillus plantarum* K1, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG 1363, *Leuconostoc mesenteroides* JM i *Lactobacillus plantarum* B dobiveni iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizma

Za uzgoj bakterijskih kultura korištena je MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) tekuća hranjiva podloga koja se primjenjuje za bakterije iz roda *Lactobacillus*. Podloga je bogata nutrijentima i sadrži magnezij, mangan, polisorbit i acetat, a oni su poznati kao značajni faktori rasta kod laktobacila.

Sastav podloge (g/L destilirane vode):

- | | |
|-------------------------|------|
| • pepton | 10 |
| • mesni ekstrakt | 10 |
| • kvašćev ekstrakt | 5 |
| • glukoza | 20 |
| • Tween 80 | 1 |
| • $MgSO_4 \times 7H_2O$ | 0,1 |
| • $MnSO_4 \times 7H_2O$ | 0,05 |
| • natrijev-acetat | 5 |

pH vrijednost podloge iznosi 6,5. Uzgoj bakterijskih sojeva proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 37 °C tijekom 24 sata.

3.1.3. Aparatura i pribor

- vibromješač EV-102 (Tehtnica, Železniki)
- spektrofotometar (Unicam Helios ϵ)
- čitač pločica Wallac 1420 Victor Multilabel Counter (PerkinElmer, SAD)
- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- centrifuga Centric 150 (Tehtnica)
- staklene kuglice, promjer 0,40 - 0,60 mm (Sartorius)

3.1.4. Kemikalije

- etanolna otopina DPPH radikala (Sigma, SAD)
- komercijalni kit za određivanje katalitičke aktivnosti enzima SOD Cayman Chemical (Missouri, SAD)
- DTNB (Sigma, SAD)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije

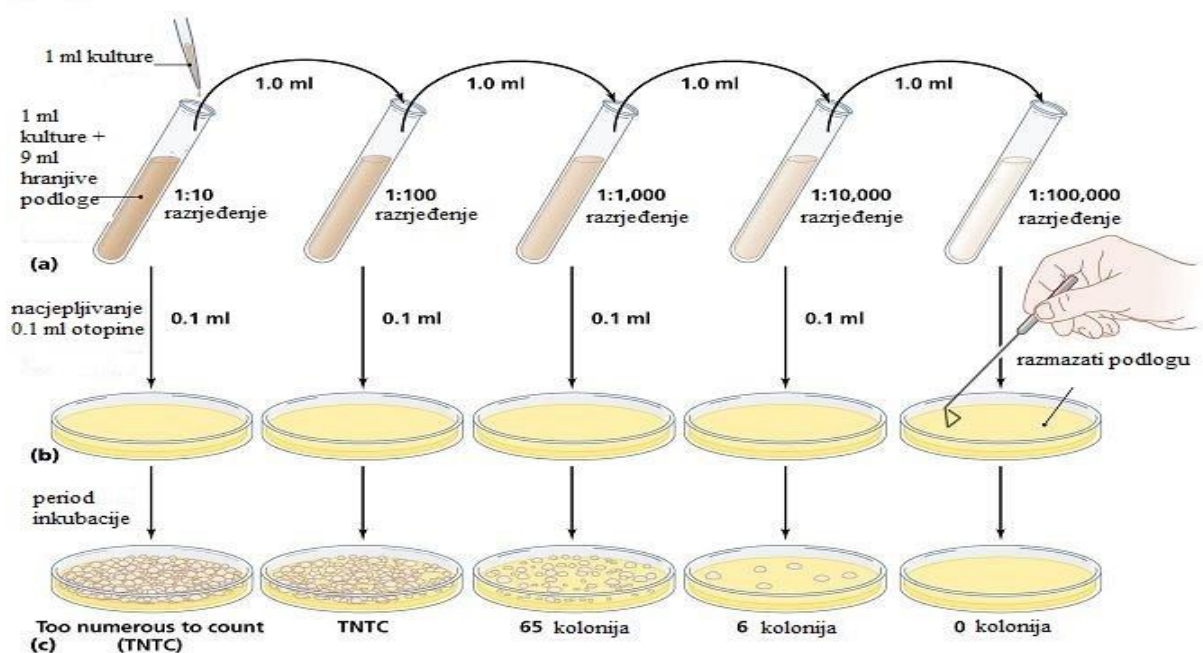
Prekonoćna bakterijska kultura uzgaja se na način da se u sterilnu epruvetu odmjeri 5 mL tekuće hranjive podloge za rast laktobacila (MRS). U podlogu se sterilno nacijepi odabrana kultura, dobro se izmiješa na vibromješaču te se uzgaja 24 sata u termostatu pri 37 °C. Pripremljene bakterijske suspenzije prvo se izmiješaju na vibromješaču i centrifugiraju 15 minuta na 6000 min^{-1} . Nakon centrifugiranja odlijeva se supernatant i potom dodaje sterilna fiziološka otopina, zatim slijedi homogenizacija na vibromješaču te ponovno centrifugiranje 15 minuta na 6000 min^{-1} . Tekući se dio ponovno odlijeva, a talog suspendira u 5 mL sterilne vode.

3.2.2. Određivanje broja BMK u suspenziji

Određivanje broja živih stanica BMK u suspenziji određen je neizravnom (posrednom) metodom. Napravljene su serije decimalnih razrjeđenja u omjeru 1:10, a po 100 µL suspenzije nacijepljeno je na MRS agar u Petrijevim zdjelicama, ravnomjerno razvučeno štapićem po Drygalskom te stavljeno na inkubaciju 24/48 h na 37 °C (slika 3). Svi pokusi su provedeni u paraleli.

Nakon inkubacije, kolonije BMK koje su porasle na čvrstoj hranjivoj podlozi, prebrojane su pomoću brojača kolonija i predstavljaju broj živih stanica BMK. Izbrojane kolonije izražene se kao CFU vrijednost (Colony Forming Units) (jednadžba 1) (Priručnik, 2016).

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrijebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad [1]$$



Slika 3. Priprema serije decimalnih razrjeđenja (Anonymus 1, 2018)

3.2.3. Razbijanje stanica BMK

Kako bi se iz stanica BMK izdvojio unutarstanični sadržaj priređenu suspenziju biomase potrebno je homogenizirati na vibromješaču i nakon toga odvojiti 1 mL suspenzije uz dodatak staklenih kuglica u omjeru 1:1 koje služe za mehaničko razbijanje stanica. Uzorak se potom miješa 2 minute na vibromješaču, zatim hladi 2 minute na ledu te se postupak ponovi 2 puta. Razbijeni sadržaj se centrifugira 1 minutu na 9000 min⁻¹ da bi se odvojio od staklenih kuglica i tako odvojeni sadržaj se ponovno centrifugira 10 minuta na 9000 min⁻¹ nakon čega se otpipetira supernatant koji se koristi za daljnju provedbu pokusa.

3.2.4. DPPH metoda

Za određivanje smanjenja DPPH radikala koje odgovara antioksidativnom kapacitetu u 1 mL pripremljene suspenzije bakterijskih stanica (10⁹ – 10¹⁰ CFU/ml) dodaje se u 2 mL etanolne otopine DPPH radikala (0,07 mM). Otopina se dobro izmiješa i prebaci na inkubaciju 30 minuta u mraku. Uzorak se potom centrifugira 10 minuta, nakon čega se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 517 nm. Za mjerenje je potrebno napraviti slijepu probu koja sadrži samo etanol i suspenziju stanica, dok kontrole uključuju deioniziranu vodu i otopinu DPPH. Sposobnost uklanjanja DPPH radikala (%) računa se prema jednadžbi [2].

$$\text{uklanjanje DPPH radikala (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})/A_{\text{control}}] \times 100 \quad [2]$$

gdje je:

A_{sample} = apsorbancija uzorka

A_{blank} = apsorbancija slijepe probe

A_{control} = apsorbancija kontrolnog uzorka

3.2.5. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaze

Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze provedeno je pomoću komercijalno dostupnog kita proizvođača Cayman Chemical (Missouri, SAD). Test komplet koristi tetrazolijevu sol za detekciju superoksidnih radikala, a sadrži sljedeće otopine: pufer za probe (assay buffer, 5 mL), pufer za uzorke (sample buffer, 5 mL), detektor radikala (radical detector, 250 μ L), standard SOD (100 μ L) i ksantin oksidazu (150 μ L).

Najprije je potrebno pripremiti pufer za probe (assay buffer) na način da se 3 mL pufera za probe iz kita razrijedi s 27 mL vode da bi razrjeđenje bilo 10 puta. Konačna otopina ima pH 8,0 i sadrži 50 mM Tris-HCl, 0,1 mM dietilentriaminpentaoctenu kiselinu (DTPA) i 0,1 mM hipoksantina. Ovako pripremljen pufer za probe (10x) dalje se koristi za pripremu i razrjeđivanje otopine detektora.

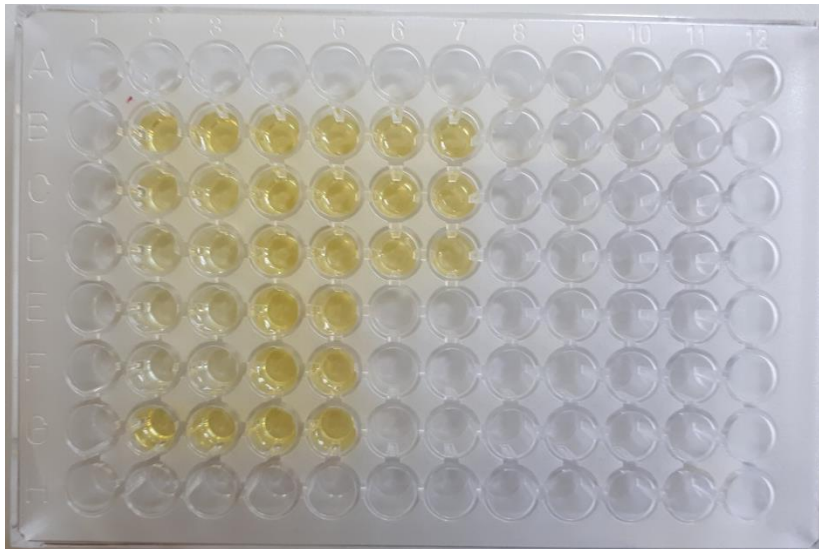
Pufer za uzorke (sample buffer) priprema se razrjeđivanjem dobivenog koncentrata pufera za uzorke 10 puta, odnosno u 2 mL koncentrata dodaje se 18 mL vode. Konačna otopina ima pH 8,0 i sadrži 50 mM Tris-HCl. Ovako pripremljena otopina pufera za uzorke (10x) koristi se za pripremu standarda SOD i za razrjeđivanje ksantin oksidaze i uzoraka.

Otopina detektora (tetrazolijeva sol) priprema se pomoću prethodno pripremljenog pufera za probe (10x) tako da se 50 μ L koncentrata doda u 19,95 mL pufera za probe te se time koncentrat tetrazolijeve soli razrijedi 400 puta.

Priprema ksantin oksidaze temelji se na razrjeđenju od 40 puta, tako da se 50 μ L dobivenog koncentrata doda u 1,95 mL prethodno pripremljenog pufera za uzorke (10x).

SOD standard priprema se pomoću prethodno pripremljenog pufera za uzorke (10x) te se 20 μ L koncentrata standarda SOD doda u 1,98 mL pufera za uzorke i time se koncentrat razrijedi 100 puta. Iz tako pripremljene matične otopine SOD aktivnosti 0,25 U/mL pripremljeni su standardi konačne aktivnosti 0,00, 0,01, 0,02, 0,03 i 0,05 U/mL.

Nakon pripreme svih otopina, u jažice na mikrotirarskoj pločici (slika 4) dodaje se 200 μ L pripremljenog detektora (tetrazolijeve soli), potom se dodaje 10 μ L uzorka ili standarda te se pokreće reakcija dodatkom 20 μ L ksantin oksidaze. Pločica se lagano promiješa i pokrije poklopcem za pločicu nakon čega slijedi inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi te se naposljetku izmjeri apsorbancija na 450 nm.



Slika 4. Mikrotitarska pločica s jažicama prilikom određivanja aktivnosti enzima SOD pomoću komercijalno dostupnog kita proizvođača Cayman Chemical (Missouri, SAD)

3.2.6. Mjerenje koncentracije glutationa

Za određivanje aktivnosti glutationa (GSH) koristi se DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), poznat pod nazivom Ellmanov reagens koji služi za kolorimetrijsko određivanje tiolnih skupina u biološkim uzorcima.

Najprije je potrebno pripremiti 10 mM otopinu DTNB-a tako da se odvaži 0,0396 g DTNB-a i pomiješa s 10 mL pufera te se otopina razrijedi još 10 puta. Također, potrebno je pripremiti 0,3 molarni Na – fosfatni pufer i to na način da se pomiješa 10,744 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ i 4,68 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ u 100 mL destilirane vode. Pufere je potrebno pomiješati tako da konačni pH otopine iznosi 4,7.

Supernatant je potrebno razrijediti 6 puta tako da se u 50 μL supernatanta dodaje 205 μL fosfatnog pufera. 2500 μL pripremljenog uzorka pomiješa se s 200 μL 10 mM DTNB-a te se odmah spektrofotometrijski mjeri optička gustoća uzorka na valnoj duljini od 412 nm prema slijepoj probi. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži 2500 μL vode. Na temelju apsorbancije indirektno se dobiva podatak o koncentraciji, koja se izračuna prema jednadžbi [3].

$$c = \frac{A}{\varepsilon}$$

[3]

gdje je:

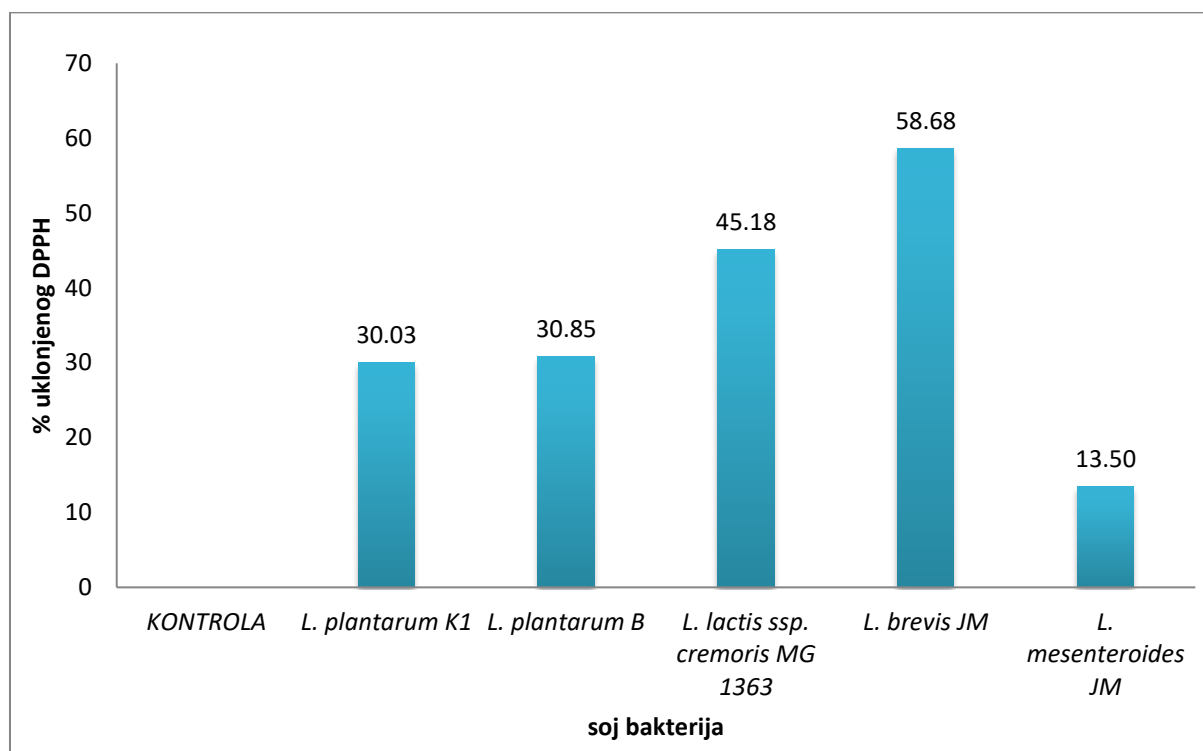
c = koncentracija GSH u uzorku

A = apsorbancija na 412 nm

$\varepsilon = 14,10 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu analizirana je antioksidativna aktivnost odabranih sojeva BMK. Izmjerena je mogućnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala, unutarstanična aktivnost enzima superoksid dismutaze i ukupna unutarstanična koncentracija glutationa. Svi rezultati dobiveni provedbom određivanja navedenih parametara prikazani su slikama 5-9.

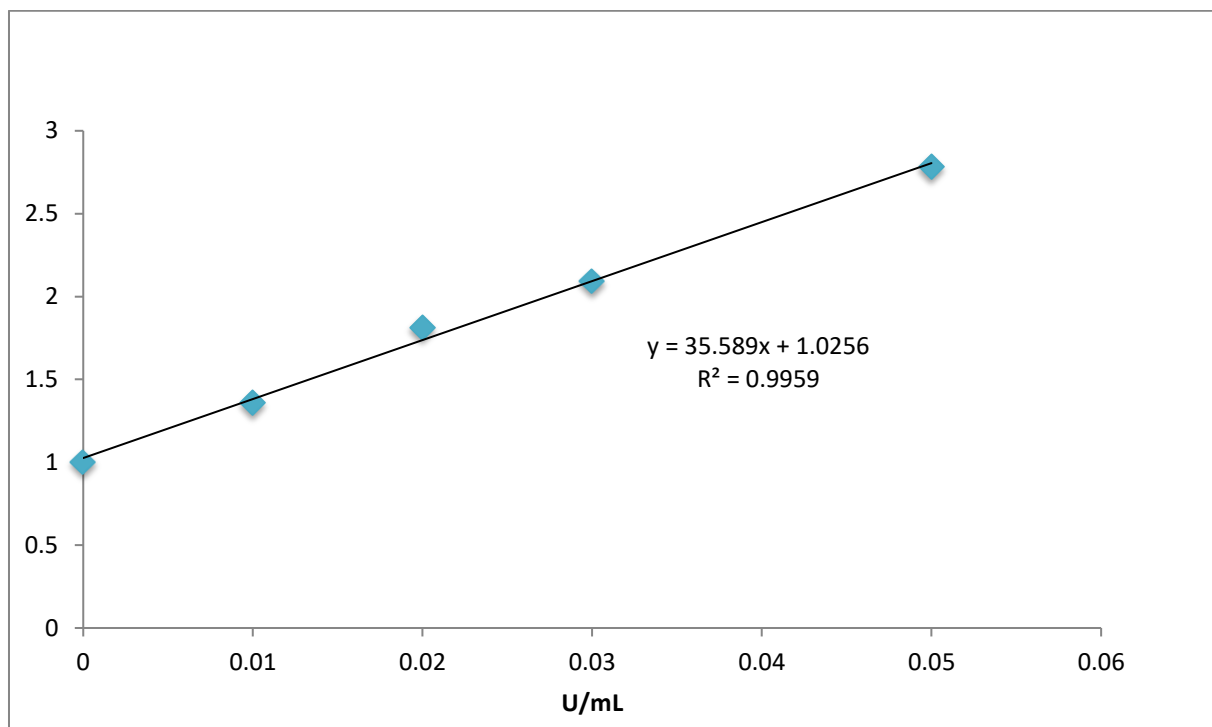


Slika 5. Izmjeren postotak uklonjenog DPPH radikala odabranim sojevima BMK

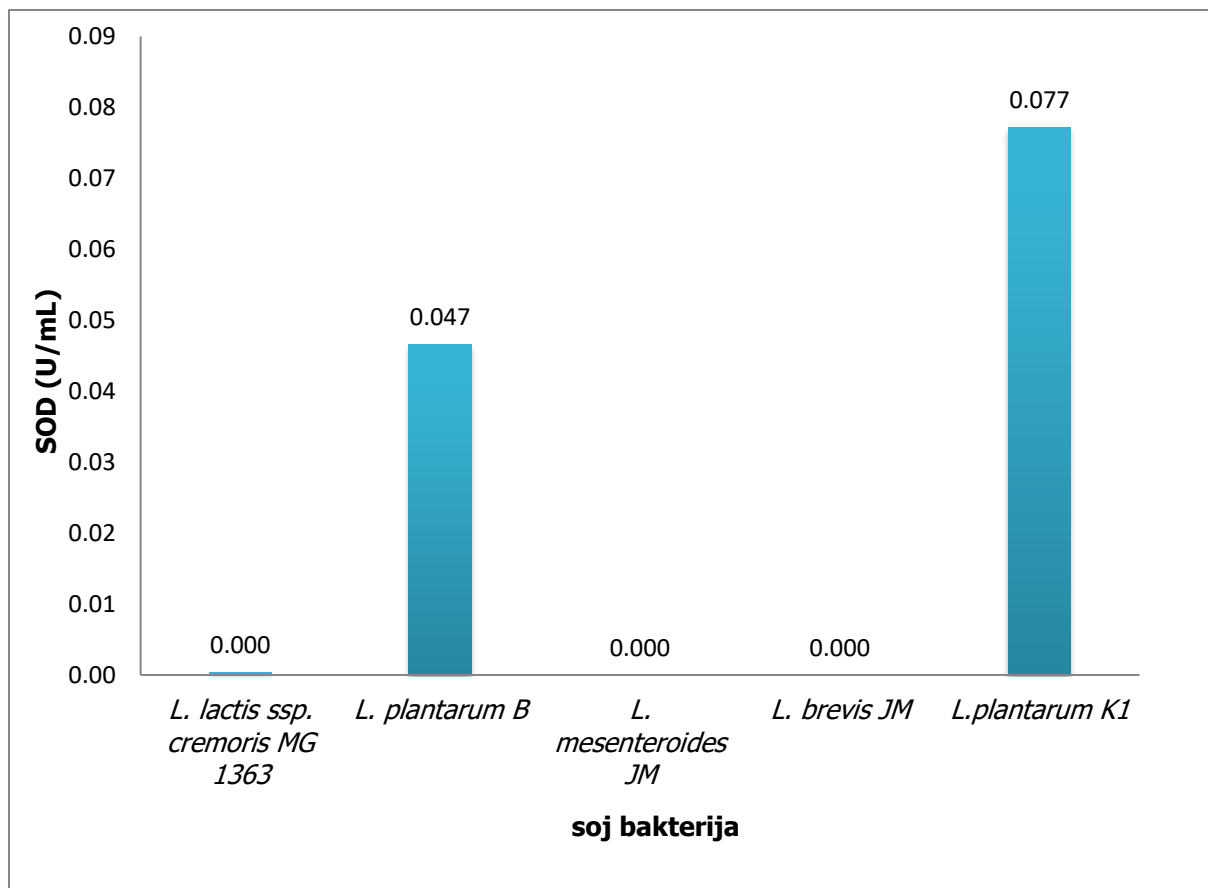
Prema dobivenim rezultatima uklanjanja DPPH slobodnih radikala prikazanih na slici 5, suspenzija bakterije *L. brevis* JM ima najveći postotak uklonjenih slobodnih radikala (58,68%), slijedi *L. lactis* ssp. *cremoris* MG 1363 s 45,18%, zatim *L. plantarum* B s 30,85%, potom *L. plantarum* K1 s 30,03%, te naposljetku *L. mesenteroides* JM s 13,50%.

Određivanjem aktivnosti SOD najprije je izrađen baždarni pravac iz vrijednosti za standarde SOD prikazan na slici 6 s jednadžbom pravca koja iznosi $y=35,589x+1,0256$. Ti rezultati pokazuju da je metoda u ispitivanom području linearna. Katalitička aktivnost SOD u uzorcima svakog od odabranih sojeva BMK prikazana je u obliku dijagrama (slika 7) iz čega je vidljivo da najveću SOD aktivnost pokazuje *L. plantarum* K1 (0,077 U/mg), slijedi *L. plantarum* B

(0,047 U/mg), dok *L. lactis* ssp. *cremoris* MG 1363, *L. mesenteroides* JM i *L. brevis* JM ne pokazuju nikakvu aktivnost ili je nemjerljiva u zadanom području.

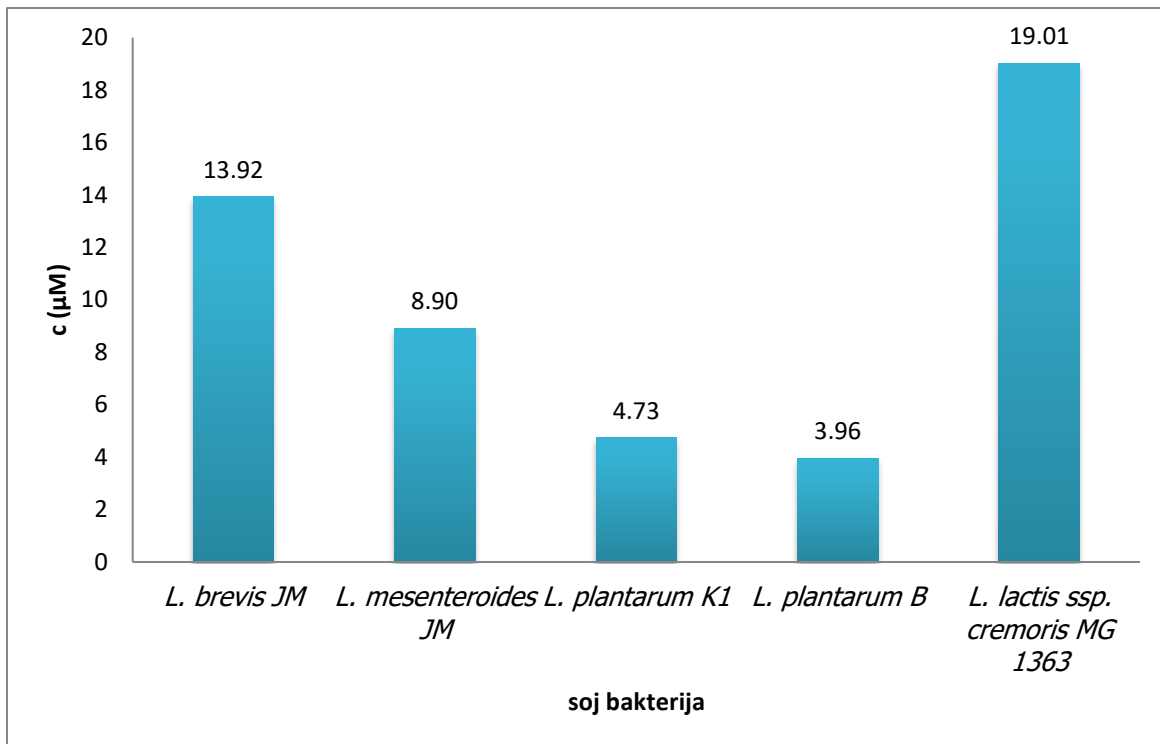


Slika 6. Baždarni pravac katalitičke aktivnosti enzima superoksid dismutaze

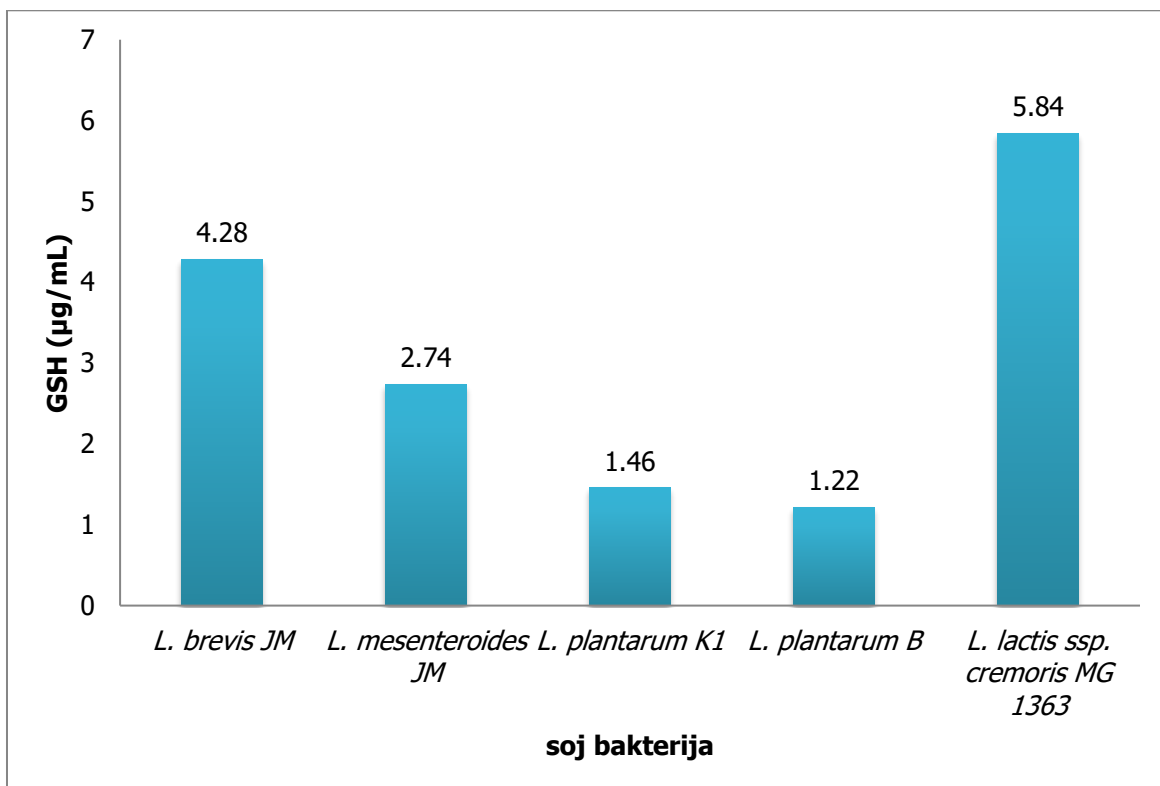


Slika 7. Izmjerena aktivnost enzima superoksid dismutaze odabranih sojeva BMK u U/mL

Ukupna unutarstanična koncentracija glutationa u odabranim sojevima prikazana je na slikama 8 i 9. Eksperiment je pokazao da *L. lactis ssp. cremoris* MG 1363 ima najveću koncentraciju unutarstaničnog glutationa (19,01 μM), slijedi *L. brevis* JM sa 13,92 μM , Značajno nižu koncentraciju imaju *L. mesenteroides* JM (8,90 μM), *L. plantarum* K1 (4,73 μM) i *L. plantarum* B (3,96 μM). Na slici 9 prikazana su ista mjerenja, ali izražena u $\mu\text{g/ml}$.



Slika 8. Izmjerena koncentracija ukupnog unutarstaničnog glutationa odabranih sojeva BMK izražena u μM



Slika 9. Izmjerena koncentracija ukupnog unutarstaničnog glutationa odabranih sojeva BMK izražena u $\mu\text{g/mL}$

Dobiveni rezultati ukazuju na antioksidativne obrambene mehanizme BMK. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da tri mjerena parametra u ovim uvjetima ne pokazuju izravnu međuovisnost. Poznato je da su se bakterije prilagodile raznim životnim uvjetima te da imaju razvijene mehanizme protiv oksidacijskih oštećenja. Kako su istraživani sojevi izolirani iz različitih izvora te obzirom na dobivene rezultate može se pretpostaviti da određeni uvjeti potiču razvijanje određenog obrambenog mehanizma. Najobuhvatniji opći antioksidativni parametar je uklanjanje DPPH radikala gdje prema prikazanim rezultatima najbolju aktivnost imaju *L. lactis* ssp. *cremoris* MG 1363 i *L. brevis* JM. Budući da ta dva soja imaju i najviše koncentracije glutaciona, može se zaključiti kako je glutation jedan od važnih mehanizama obrane od oksidativnog oštećenja kod tih dvaju sojeva. Također, vidljivo je i da razina SOD enzima kod tih dvaju sojeva nije detektirana, stoga se može zaključiti da SOD nije izražen zaštitni faktor obrane tih sojeva.

Nadalje, iz rezultata je vidljivo da *L. plantarum* K1 i *L. plantarum* B uklanjaju dio DPPH radikala, no pokazuju najniže koncentracije glutaciona među mjerenim sojevima dok imaju relativno visoke koncentracije enzima SOD. Iz toga se može zaključiti da je SOD važniji faktor obrane tih sojeva od oksidativnog oštećenja, dok glutation ima manji udio u obrani naspram dva prethodno spomenuta soja. *L. mesenteroides* JM ima malu sposobnost uklanjanja DPPH radikala. Dio te sposobnosti može se pripisati glutationu, dok SOD nije detektiran kod ovog soja.

Na osnovu navedenog *L. brevis* JM i *L. lactis* ssp. *cremoris* MG 1363 pokazuju najbolju antioksidativnu aktivnost, slijede ih *L. plantarum* K1 i *L. plantarum* B. Navedena četiri soja nose određeni antioksidativni potencijal koji bi mogao imati korisne učinke u proizvodnji funkcionalne hrane.

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Odabrani sojevi bakterija mliječne kiseline pokazali su antioksidativni učinak uklanjajući DPPH slobodne radikale.
2. U svim ispitivanim sojevima izmjerena je unutarstanična koncentracija glutaciona.
3. Unutarstanična aktivnost enzima superoksid dismutaze izmjerena je kod dva ispitivana soja: *L. plantarum* B i *L. plantarum* K1.

6. POPIS LITERATURE

1. Anonymus 1 (2017) Microbal Growth, decimal dilutions, <http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/4_growth/index.bak>. Pristupljeno 10. rujna 2018.
2. Archibald F. S., Fridovich I. (1981) Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* **145**: 442–451.
3. Beckman K.B., Ames B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* **78**: 547-581.
4. Berdahl D., Nahas R., Barren J., Decker E., Elias R., & McClements D. (2010) Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Volume 1: Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity, str. 272-320.
5. Breitenbach, M., Weber, M., Rinnenthaler, M., Karl, T., Koller-Breinenbach, L. (2015) Oxidative stress in fungi: its function in signal transduction, interaction with plant hosts, and lignocellulose degradation. *Biomolecules* **5**, 318-342.
6. Corsetti A., Settanni L. (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International* **40**: 539–558.
7. Dellaglio F., Dicks L. M. T., Torriani S. (1995) The genus of *Leuconostoc*. U: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, B. J. B. Wood i W. H. Holzapfel (ured.), Chapman and Hall, London, str. 235-269.
8. Di Cagno, R., Surico R.F., Paradiso A., De Angelis M., Salmon J.-C., Buchin S., De Gara L., Gobbetti M.(2009): Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on healthpromoting and sensory properties of tomato juices. *International Journal of Food Microbiology* **128**: 473–483.
9. Frece, J., Markov, K., Kovačević, D. (2010a) Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso* **12**: 92-98.
10. Frece, J., Čvek, D., Kovačević, D., Gobin, I. (2010b) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz „slavonskog kulena“, kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso* **12**: 208-214.

11. Frece J., Markov K. (2016) Autochthonous starter cultures U: Fermented Meat Products: Health Aspects, (Zdolec, N., ured.), In Book series: Food biology, R.C. Ray (Editor), CRC Taylor & Francis
12. Hasim, Mustopa A.Z., Andrianto N., Fatimah, Faridah D. N. (2017) Antioxidant Production Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Indonesian Traditional Fermented Buffalo Milk (Dadih). *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences* **12**: 76-82
13. Jones D.P. (2011) The Health Dividend of Glutathione. *Natural Medicine Journal* **3(2)**
14. Lushchak V. I. (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of Amino Acids* **2012**, 736837.
15. Mancini A., Franciosi E., Carafa, I., Fava F., Viola R., Tuohy K. (2014) Probiotic potential of a BSH positive, high GABA producing strain, *Lactobacillus brevis* FEM 1874, isolated from traditional "wild" Alpine cheese. U: Rowett INRA (Ured.) Gut Microbiology: from sequence to function, str. 113-125.
16. Meir S., Kanner J., Akiri B., & Hadas S. P. (1995) Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**: 1813–1817
17. Miyamoto S., Arai H., Terao J. (2010): Enzymatic Antioxidant Defenses. U: Aldini G., Yeum K.J., Niki E., Russell R.M. (ur.) Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Applications. Ames, Blackwell Publishing.
18. Pfeiler E.A., Klaenhammer T.R. (2007) The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* **15**: 546–553
19. Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Sveučilišni udžbenik, D. Hajsig i F. Delaš (ur.), Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, 2016. str. 54-55.
20. Pyrzynska K., Pekal A. (2013) Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods* **5**: 4288.
21. Rahman I., Macnee W. (2000) Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *European Respiratory Journal* **16**: 534-554.
22. Sanders J. W., Leehouts K. J., Haandrikam A. J., Venema G., Kok J. (1995) Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *Journal of Bacteriology* **177**: 5254-5260
23. Shelly C.L. (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversis. *FASEB Journal* **13**, 1169-1183.

24. Shimamura S., Abe F., Ishibashi N., Miyakawa H., Yaeshima T., Araya T., Tomita M. (1992) Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of Bifidobacterium species. *Journal of Dairy Science* **75**: 3296-3306.
25. Šušković J., Kos B. (2000) Interna skripta iz kolegija „Probiotici i starter kulture“, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
26. Šušković J., Brkić B., Matošić S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47 (1)**: 57-73.
27. Yuan L., Kaplowitz N. (2009) Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular Aspects of Medicine* **30**: 29–41.

Izjava o izvornosti

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

Jelena Navak
ime i prezime studenta