

# Bioaktivni peptidi nastali proteolitičkom aktivnošću soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-32

---

Tarandek, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:862341>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2023.

Ana Tarandek

**BIOAKTIVNI PEPTIDI NASTALI  
PROTEOLITIČKOM  
AKTIVNOŠĆU SOJA *Lactococcus*  
*lactis* ZGBP5-32**

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

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

*Prvenstveno se zahvaljujem prof. dr. sc. Blaženki Kos na poticajnom mentorstvu, motivaciji i pristupačnosti u svakom trenutku tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, a posebno dr. sc. Katarini Butorac na pomoći pri provođenju eksperimentalnog dijela te na strpljenju i razumijevanju.*

*Neizmjereno sam zahvalna dr. sc. Ani Butorac, v. znan. sur. na stručnom vodstvu, trudu i nesebičnom prenošenju znanja. Također, hvala i svim ostalim djelatnicima Biocentra na toploj i poticajnoj radnoj sredini.*

*Od srca zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i ljubavi.*

*Hvala mojim prijateljima na motivaciji i svakom trenutku ispunjenim smijehom.*

*Veliko hvala mom Ivanu na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i vjeri u mene. ♥*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

Bioaktivni peptidi nastali proteolitičkom aktivnošću soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-32

Ana Tarandek, univ. bacc. ing. biotechn. 0058213639

**Sažetak:** Cilj ovog diplomskog rada bio je identificirati i kvantificirati peptide s potencijalnim bioaktivnim djelovanjem koji nastaju razgradnjom kazeina u mlijeku pomoću proteolitičkog sustava bakterije *Lactococcus lactis* ZGBP5-32. Identifikacija i kvantifikacija peptida provedena je spregnutim tehnikama tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Kako bi se pratila proteolitička aktivnost tijekom fermentacije od 24 i 48 sati, analiziran je proteinski profil u uzorcima kromatografijom isključivanja prema veličini. Nakon 24 sata fermentacije u uzorcima je identificiran peptid KYIPIQYVLS kojem se pripisuje antioksidativno djelovanje, a nakon 48 sati fermentacije identificirani su bioaktivni peptidi KYIPIQYVLS, YQEPVLGPVRGPFPIIV, QEPVLGPVRGPFPIIV, VYPPFGPIPN, HQPHQPLPPT, RDMPIQAF i TKVIPYVRYL. U znanstvenoj literaturi za navedene peptide utvrđeno je i opisano antioksidativno, imunomodulatorno, antitrobinsko, antimikrobno i ACE-inhibitorno djelovanje (*Angiotensin-I-converting enzyme, ACE*). Analizom proteinskog profila kromatografijom isključivanja prema veličini dokazano je da nakon 48 h inkubacije dolazi do znatnije proteolize proteina, a kvantitativnom analizom peptida dokazano je da nakon 48 h inkubacije statistički nastaje više bioaktivnih peptida nego nakon 24 h inkubacije što je rezultat produljenog vremena cijepanja peptidnih veza u kazeinskoj strukturi.

**Ključne riječi:** bioaktivni peptidi, *Lactococcus lactis* ZGBP5-32, kazein, proteolitička aktivnost

**Rad sadrži:** 47 stranica, 16 slika, 15 tablica, 39 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Komentor:** dr. sc. Ana Butorac, viši znan. sur., BIOCentar

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Katarina Butorac

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Blaženka Kos (mentor)
3. dr. sc. Ana Butorac, v. znan. sur., BIOCentar (član)
4. prof. dr. sc. Anita Slavica (zamjenski član)

**Datum obrane:** 30. ožujka 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

Bioactive peptides made by proteolytic activity of *Lactococcus lactis* ZGBP5-32

Ana Tarandek, univ. bacc. ing. biotechn. 0058213639

**Abstract:** The aim of this thesis was to identify and quantify peptides with potential bioactive effects that are produced by the degradation of casein in milk using the proteolytic system of the bacterium *Lactococcus lactis* ZGBP5-32. Peptide identification and quantification was carried out by combined techniques of liquid chromatography and mass spectrometry. In order to monitor the dynamics of the proteolytic activity during fermentation for 24 and 48 hours, the protein profile was analyzed by size exclusion chromatography. After 24 hours of fermentation, the peptide KYIPIQYVLS attributed to antioxidant activity was identified, and after 48 hours of fermentation, the bioactive peptides KYIPIQYVLS, YQEPVLGPVRGPFPIIV, QEPVLGPVRGPPFPIIV, VYPFPGPIP, HQPHQPLPPT, RDMPIQAF and TKVIPYVRYL were identified. Antioxidant, immunomodulatory, antithrombin, antimicrobial and ACE-inhibitory effects have been determined and described in the scientific literature for the mentioned peptides. Analysis of the protein profile by size exclusion chromatography proved that after 48 h of incubation, more protein proteolysis occurs, and quantitative analysis proved that after 48 h of incubation, statistically more bioactive peptides are formed, which is the result of prolonged cleavage of peptide bonds in the casein structure.

**Keywords:** bioactive peptides, *Lactococcus lactis* ZGBP5-32, casein, proteolytic activity

**Thesis contains:** 47 pages, 16 figures, 15 tables, 39 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Blaženka Kos, PhD, Full professor

**Co-mentor:** Ana Butorac, PhD, Senior Research Associate, BIOCentar

**Technical support and assistance:** Katarina Butorac, PhD

### Reviewers:

1. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (president)
2. Blaženka Kos, PhD, Full professor (mentor)
3. Ana Butorac, PhD, Senior Research Associate, BIOCentar (member)
4. Anita Slavica, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** March 30<sup>th</sup>, 2023



<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Pozitivni učinci metabolita bakterija mliječne kiseline u fermentiranoj hrani .....	2
<b>2.2. PROTEOLITIČKI SUSTAVI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Izvanstanične proteinaze .....	5
2.2.2. Transportni sustavi peptida .....	6
2.2.3. Unutarstanične peptidaze .....	6
<b>2.3. BIOAKTIVNI SASTOJCI MLIJEKA.....</b>	<b>8</b>
2.3.1. Kazein .....	9
2.3.1.1. Razgradnja kazeina.....	10
<b>2.4. BIOAKTIVNI PEPTIDI.....</b>	<b>11</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. MATERIJALI .....</b>	<b>14</b>
3.1.1. Radni mikroorganizmi .....	14
3.1.2. Hranjiva podloga.....	15
3.1.3. Kemikalije .....	16
3.1.4. Pufer .....	17
3.1.5. Aparatura i pribor.....	17
3.1.6. Programi i baze podataka .....	18
<b>3.2. METODE.....</b>	<b>18</b>
3.2.1. Održavanje i čuvanje radnih mikroorganizama .....	18
3.2.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline.....	18
3.2.3. Priprema uzorka za određivanje bioaktivnih peptida.....	19
3.2.4. Određivanje broja stanica odabranog soja <i>Lactococcus lactis</i> ZGBP5-32 te utvrđivanje acidifikacijskog kapaciteta.....	19
3.2.4.1. Određivanje broja stanica .....	19
3.2.4.2. Određivanje pH vrijednosti i stupnja kiselosti.....	19
3.2.5. Neciljana analiza proteina .....	20
3.2.5.1. Priprema uzoraka .....	20
3.2.5.2. Razdvajanje peptida te skupljanje frakcija .....	20
3.2.5.3. Analiza peptida spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF .....	21
3.2.6. Ciljana analiza peptida-relativna kvantifikacija i karakterizacija bioaktivnih peptida LC-MRM-MS metodom .....	23
3.2.7. Određivanje mase peptida tekućinskom kromatografijom isključivanja po veličini .....	23

3.2.7.1. Priprema standarda .....	24
3.2.7.2. Priprema uzoraka .....	24
3.2.8. Statistička obrada .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST .....</b>	<b>26</b>
4.1.1 Acidifikacijski kapacitet i broj stanica <i>Lactococcus lactis</i> ZGBP5-32.....	28
<b>4.2. NECILJANA ANALIZA PEPTIDA .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3. CILJANA ANALIZA BIOAKTIVNIH PEPTIDA .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4. KROMATOGRAFIJA ISKLJUČIVANJA PREMA VELIČINI.....</b>	<b>40</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>43</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>44</b>

# 1. UVOD

Bioaktivni peptidi predmet su mnogih znanstvenih istraživanja povezanih s funkcionalnom hranom i poželjnim učincima na zdravlje. U većini slučajeva, pronađeni su u fermentiranim prehrambenim proizvodima (npr. soja, krastavci, kimchi, kupus) dok su najbrojniji u mlijeku i fermentiranim mliječnim proizvodima (Castellone i sur., 2021).

Mlijeko je vitalna tekućina, koja zadovoljava sve nutritivne potrebe novorođenčadi te je njezin sastav evolucijski usavršen u svrhu preživljena sisavaca. Mliječna industrija predstavlja jednu od najraznovrsnijih i najrazvijenijih industrija prehrambenog sektora, čiji su brojni i inovativni proizvodi detaljno formulirani kako bi zadovoljili nutritivne potrebe različitih grupa potrošača. Mlijeko i mliječni proizvodi potvrđeni su izvori aminokiselina, proteina, masti, vitamina topljivih u vodi, kalcija, esencijalnih masnih kiselina i ostalih bioaktivnih komponenti s raznim biokemijskim i fiziološkim funkcijama. Primarni protein mlijeka je kazein iz kojeg razgradnjom pomoću proteolitičkog sustava bakterija mliječne kiseline nastaju bioaktivni peptidi (Punia i sur., 2020).

Bakterije mliječne kiseline velika su grupa raznovrsnih bakterijskih vrsta široko rasprostranjenih u okolišu čiji je glavni metabolički produkt mliječna kiselina. Bioaktivni peptidi građeni su od kratkih sekvenci aminokiselina koji *in vivo* nastaju proteolitičkim djelovanjem bakterija mliječne kiseline ili enzimskom razgradnjom u gastrointestinalnom traktu. Velik broj ovih peptida pokazuje pozitivne učinke na kardiovaskularni, neurološki, endokrini, probavni i imunološki sustav, čime predstavljaju mogući dodatni pristup u terapiji različitih bolesti uz već postojeće farmaceutske lijekove. Zbog svih navedenih pozitivnih učinka bioaktivnih peptida na zdravlje, proteomika može pružiti značajan alat u proučavanju bioaktivnih peptida primjenom analitičkih metoda kao što su kromatografija i spektrometrija masa te uz bioinformatička rješenja koja omogućavaju brzu i detaljnu kvantifikaciju/kvalifikaciju peptida (Punia i sur., 2020).

Cilj ovog istraživanja bio je identificirati peptide, spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa MALDI-TOF/TOF, nastale razgradnjom kazeina u mlijeku pomoću proteolitičkog sustava bakterije *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 te istražiti njihovo potencijalno bioaktivno djelovanje. Relativna kvantifikacija peptida s bioaktivnim svojstvima provedena je LC-MS/MS metodom višestrukog praćenja reakcije (engl. *multiple reaction monitoring, MRM*). Također, određivanje proteinskog profila uzoraka i raspona molekulskih masa proteinskih lizata provedeno je kromatografijom isključivanja prema veličini kako bi se pratila dinamika proteolize kroz vrijeme.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) sveprisutne su i široko rasprostranjene u okolišu te su izolirane iz raznih izvora kao što su kompost, fermentirana hrana, gastrointestinalni i vaginalni trakt, biljne površine i silaže. Većina bakterija mliječne kiseline pripadaju koljenu Firmicutes, razredu Bacilli, redu Lactobacillales. Red Lactobacillales sadrži 6 porodica unutar kojih se nalazi 36 vrsta, a neke od najpoznatiji su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. To su nesporelirajuće, acido- i aerotolerantne, katalaza-negativne, Gram-pozitivne bakterije koje se najčešće na osnovi morfoloških svojstava identificiraju kao kuglaste (lat. *coccus*) ili štapičaste bakterije (lat. *bacillus*) (Mora-Villalobos i sur., 2020).

U prosjeku sadrže oko 2000 gena. Evolucijom su izgubile oko 1000 gena koji su kodirali za sporulaciju, kofaktore, hem citokrome i katalazu. No, duplikacijom i horizontalnim prijenosom gena, bakterije mliječne kiseline, stekle su oko 86 novih gena te osigurale nekoliko prednosti: biosinteza mureina i vitamina B12, otpornost na antibiotike te razvijeni obrambeni mehanizam zaštite od bakteriofaga. Otpornost na antibiotike te obrambeni mehanizam zaštite od bakteriofaga, kao i proizvodnja bakteriocina, fermentacija ugljikohidrata i aktivnost proteinaze povezani su s postojanjem kružnih i linearnih plazmida u njihovom genomu (König i Fröhlich, 2017).

Karakterizira ih proizvodnja mliječne kiseline kao glavnog krajnjeg metaboličkog produkta razgradnje ugljikohidrata. Osim sintetiziranja glavnog metabolita, mliječne kiseline, BMK imaju sposobnost sintetiziranja širokog spektra korisnih metabolita koji se intenzivno koriste u biotehnologiji, proizvodnji hrane i terapijskih proizvoda. Brojne vrste BMK kao i derivati njihovih metabolita prepoznati su kao sigurni za konzumaciju, odnosno sadrže GRAS (engl. *Generally Recognized as Safe*) status (Mora-Villalobos i sur., 2020).

Važno fiziološko svojstvo određenih BMK je proteolitička aktivnost koja doprinosi organoleptičkim svojstvima fermentiranih mliječnih proizvoda, a također pokazuju potencijal u proizvodnji bioaktivnih peptida (Novak i sur., 2022).

#### 2.1.1. Pozitivni učinci metabolita bakterija mliječne kiseline u fermentiranoj hrani

Prema Mathur i sur. (2020) fermentirana hrana je hrana koja sadrži mikroorganizme koji se smatraju sigurnim za konzumaciju te obično proizvode razne korisne metabolite kao što su

antimikrobni peptidi, organske kiseline, etanol, masne kiseline, CO<sub>2</sub>. Metabolički put fermentacije mliječne kiseline jedan je od najvažnijih metaboličkih puteva u smislu proizvodnje fermentirane hrane. Temelj je proizvodnje fermentiranih mliječnih proizvoda, a ujedno i fermentiranih proizvoda na bazi različitih biljnih i životinjskih sirovina. BMK mogu se ovisno o vrsti fermentacije podijeliti na homofermentativne (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*), heterofermentativne (*Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Leuconostoc* spp.) te na fakultativne (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactilactobacillus curvatus*). Homofermentacijom iz jednog mola glukoze nastaju dva mola laktata dok heterofermentacijom iz jednog mola glukoze nastaju etanol, CO<sub>2</sub> i laktat. Fakultativni fermentori ovisno o uvjetima i dostupnosti supstrata fermentaciju mogu provesti homogenim ili heterogenim putem (Leeuwendaal i sur., 2022).

Proizvodi metabolizma bakterija mliječne kiseline, nastali tijekom fermentacije, često nose bioaktivna i ljekovita svojstva: zaštita od infekcija, poticanje rada imunskog sustava, antialergijsko djelovanje, povećanje bioraspoloživosti vitamina i minerala, antioksidacijska svojstva te smanjenje faktora pretilosti. Različita istraživanja potvrdila su pozitivna djelovanja fermentiranih proizvoda. Dokazano je kako svakodnevna konzumacija jogurta i ostalih mliječnih proizvoda smanjuje rizik od razvijanja kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa 2. Također, konzumacija fermentiranog mlijeka poboljšava metabolizam glukoze što rezultira njezinim boljem iskorištenjem u procesu regeneracija mišićnog tkiva. Fermentirana hrana može pozitivno stimulirati mikrobiotu crijeva tako da omogućuje proliferaciju poželjnih mikroorganizama ili obogaćuje mikrobiom novim bakterijskim vrstama te time pozitivno djeluje na ublažavanje simptoma upalnih bolesti crijeva. Istraživanja su pokazala da bakterije iz roda *Bifidobacterium* i BMK pokazuju pozitivne učinke na smanjene simptome intolerancije na laktozu produkcijom mliječne kiseline i omogućavanjem lakše probave laktoze. Također, bakterije roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* fermentiranu hranu potencijalno obogaćuju vitamin B kompleksom. Pankreasna lipaza (PL) je enzim koji hidrolizira masti u monogliceride i slobodne masne kiseline te omogućava apsorpciju masti u crijevima. Dokazano je da određeni fermentori iz grupe BMK imaju mogućnost redukcije aktivnosti PL i do 50 % te tako smanjuju apsorpciju masti u crijevima. Također, određeni sojevi *Lactobacillus helveticus* potiču sintezu glukagonu sličnih peptida 1 (GLP-1) koji povećavaju osjećaj sitosti (Mathur i sur., 2020).

Konzumacijom hrane s antioksidativnim djelovanjem, točnije hrane s visokom koncentracijom vitamina C, E, polifenola i karotenoida, pojačava se prirodno prisutan mehanizam obrane od oksidativnog stresa. Novija su istraživanja dokazala kako mliječni peptidi, nastali hidrolizom

kazeina, i proteini sirutke djeluju antioksidativno, na način da privlače i neutraliziraju radikale superoksida (Marcone i sur., 2016).

Prema Peighambaroust i sur. (2021) sojino mlijeko i fermentirani proizvodi na bazi soje zanimljivi su izvori bioaktivnih peptida. Navode kako kefir proizveden iz sojinog mlijeka pokazuje značajna antimutagena i antioksidativna svojstva. Također, hidrolizom sojinih peptida pomoću mikrobnih proteaza nastaju bioaktivni peptidi izraženog antioksidativnog djelovanja.

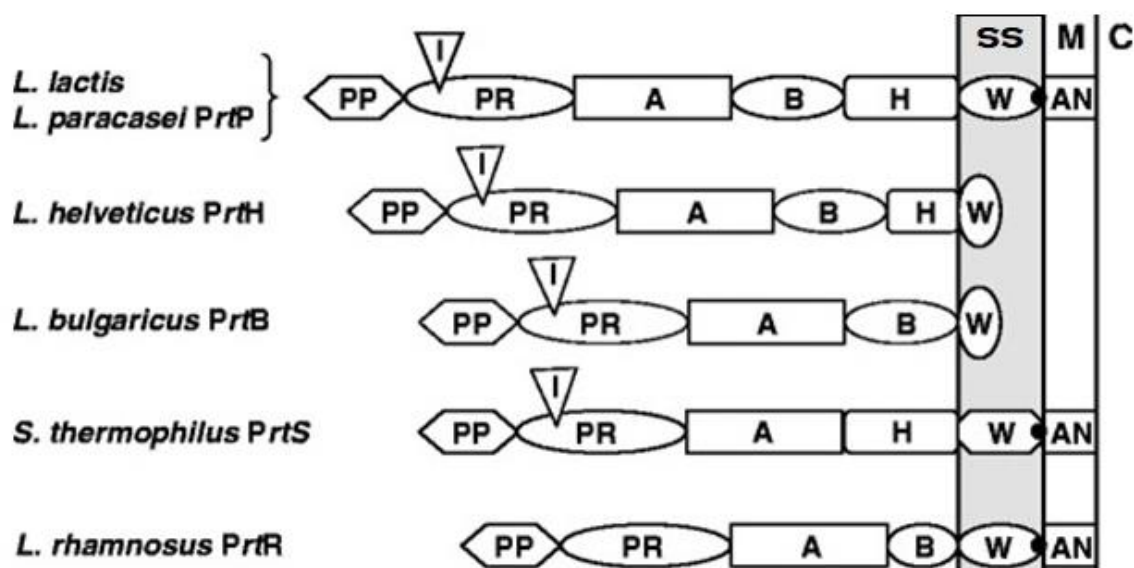
## 2.2. PROTEOLITIČKI SUSTAVI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Autohtone vrste BMK često obitavaju u ekstremnom okolišu koji karakteriziraju varijacije temperature, pH vrijednosti i dostupnosti nutrijenata zbog čega su razvile specifičan metabolizam koji im omogućuje kompetitivnu prednost nad drugim mikroorganizmima. Ova prednost manifestira se kroz razvijeni specifični proteolitički sustav i proizvodnju bakteriocina. Bakteriocini se definiraju kao peptidi koji inhibiraju rast bakterijskih vrsta koje nisu nužno srodne soju koji ih proizvodi. Proteolitički sustav hidrolizira složene proteine, čime se omogućava rast i proces fermentacije u BMK. Produkti hidrolize su aminokiseline i jednostavni peptidi s raznolikim fiziološkim ulogama: sinteza proteina, intracelularna regulacija pH, rezistencija na stresne uvjete te generiranje metaboličke energije (Venegas-Ortega i sur., 2019). Većina BMK izoliranih iz fermentiranih mliječnih proizvoda su auksotrofi za nekoliko aminokiselina te njihov rast u mediju bogatom proteinima ovisi o ekspresiji kompleksnog proteolitičkog sustava. Proteolitički sustav najbolje je proučen i opisan kod *Lactococcus lactis* (Beganović i sur., 2013). Zbog niske koncentracije slobodnih aminokiselina u okolišu, hidrolitički enzimi ovog sustava imaju važnu ulogu u opskrbi stanica spojevima s dušikom koji su esencijaleni za njihov rast. Prema Kieliszek i sur. (2021) proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline sastoji se od proteinaza, peptidaza i specifičnih transportnih proteina. Izvanstanične proteinaze cijepaju proteine na peptide koji se pomoću transportnog sustava prenose unutar stanice gdje ih intracelularne peptidaze cijepaju na manje peptide i aminokiseline. Optimalna pH vrijednost za rast i razvoj proteolitičkih bakterija iznosi 7–7,5 dok velike temperaturne varijacije negativno utječu na aktivnost proteolitičkih enzima. BMK pokazuju raznoliku proteolitičku aktivnost ovisno o vrsti, podvrsti ili soju. *Lactococcus salivarius* subsp. *thermophilus* i *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* smatraju se najaktivnijim vrstama kuglastih BMK, dok je najviša proteolitička aktivnost među štapićastim BMK zabilježena kod *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus acidophilus*.

### 2.2.1. Izvanstanične proteinaze

Izvanstanične proteinaze sintetiziraju se u obliku proproteina dužine oko 2000 aminokiselinskih ostataka. Smještene su na površini stanica gdje su kovalentnim vezama vezane za staničnu stijenkku bakterija te sadrže nekoliko funkcionalnih regija (Yukalo i Krupa, 2017).

Prva funkcionalna regija od N-terminalnog kraja enzima je PP (pre- i pro- sekvence) koja se sastoji presekvenca dužine oko 40 aminokiselinskih ostataka i prosekvenca dužine oko 150 aminokiselinskih ostataka. PrtM protein (lipoprotein) nalazi se unutar stanice te je odgovaran za autoproteolizu prosekvenca (154 aminokiselinskih ostataka) novosintetiziranog proproteina. Druga funkcionalna regija (engl. *catalytic serine protease domain, PR*), koja je ujedno i aktivni centar enzima, građena je od asparaginske kiseline, histidina i serina te je dužine oko 500 aminokiselinskih ostataka. Treća funkcionalna regija je insercijska regija (I) dužine oko 150 aminokiselinskih ostataka te je zaslužna za afinitet prema supstratu. Nakon regije I, nalaze se domene A i B, čije funkcije nisu dovoljno istražene, no smatra se da sudjeluju u stabilnosti aktivnosti proteinaza. Sljedeća regija je H regija, građena od  $\alpha$ -uzvojnice dužine 200 aminokiselinskih ostataka te je s jedne strane povezana s regijom B, a s druge sa staničnom stijenkku bakterije. Regija H prisutna je u nekoliko proteinaza, tj. u PrtP, PrtS i PrtH. Posljednja regija je hidrofilna regija W, koja sadrži sekvencu bogatu Pro-Gly i Ser-Thr nalik na staničnu stijenkku Gram-pozitivnih bakterija. Proteinaze PrtP (izolirana iz *Lactococcus lactis*), PrtS i PrtR sadrže nakon regije W (regija stanične stijenke) regiju AN (regija pričvršćivanja), koja direktno sudjeluje u povezivanju proteinaza i stanične stijenke (Kieliszek i sur., 2021). Na slici 1 shematski su prikazane proteinaze vezane na staničnu stijenkku raznih sojeva BMK.



**Slika 1.** Shematski prikaz proteinaza vezanih na staničnu stijenku (SS) raznih sojeva BMK (prema Savijoki i sur., 2006)

PP označava pre- i prosekvenca, PR proteaznu domenu, I insercijsku domenu, A A domenu, B B domenu, H heliks domenu, W domenu stanične stijenke te AN regiju pričvršćivanja

### 2.2.2. Transportni sustavi peptida

Peptidi nastali degradacijom kazeina, transportiraju se u unutrašnjost bakterijske stanice pomoću tri proteinska sustava: Opp, DtpT i Dpp. Opp proteini pripadaju ABC transporterima te se sastoje od dvije molekule za vezanje nukleotida (OppD, OppF), dva proteina integrirana u staničnu membranu (OppB, OppC) te proteina koji veže oligopeptide (OppA). Za djelovanja Opp transportnog sustava potrebna je energija u obliku ATP-a, kako bi se u stanicu unijeli peptidi od četiri do osam aminokiselinskih ostataka. Specifično, Opp sustav u *Lactococcus lactis* transportira kompleksne peptide koji su duljine od pet do dvadeset aminokiselinskih ostataka. Transport kraćih peptida, tj. dipeptida i tripeptida vrši se sustavom DtpT i Dpp. Sustav Dpp transportira di-, tri- i tetrapeptide uz utrošak ATP-a, koji pretežito sadrže hidrofobne aminokiselinske ostatke te najveći afinitet pokazuje prema tripeptidima. Sustav DtpT transportira hidrofilnije di- i tripeptide (Kieliszek i sur., 2021; Beganović i sur., 2013).

### 2.2.3. Unutarstanične peptidaze

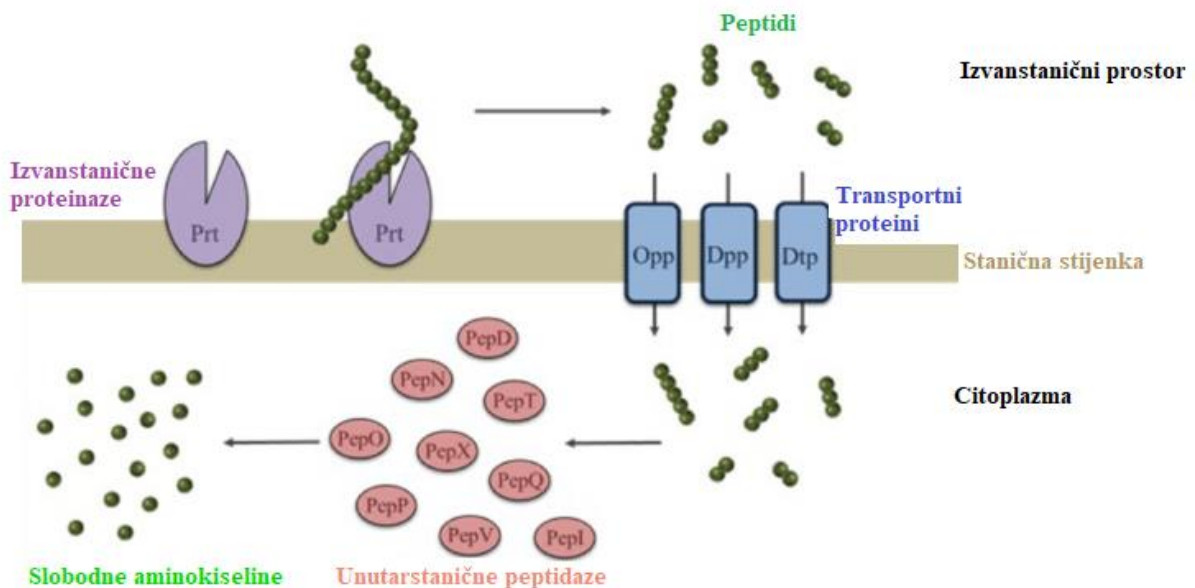
Skupina ovih enzima može se klasificirati u dvije grupe: endopeptidaze (oligopeptidaze) i aminopeptidaze. Endopeptidaze djeluju na intracelularne veze u peptidima, dok aminopeptidaze odstranjuju aminokiseline s N- i C-terminalnih krajeva peptida. Velik broj ovih enzima izolirano je iz BMK rodova *Lactococcus* i *Lactocaseibacillus* te okarakterizirano kao metaloenzimi (Kieliszek i sur., 2021).



Nakon uspješnog transporta oligopeptida u unutrašnjost bakterijske stanice, zapažena je primarno aktivnost aminopeptidaze PepN i PepC te X-prolil dipeptidil amino-peptidaza (PepX). Produkti prije nabrojanih enzima supstrati su raznih di- i tripeptidaza, čija aktivnost varira od soja do soja BMK. Dipeptidaze PepV i PepD te tripeptidaza PepT stupaju u interakcije s peptidima koji pretežito sadržavaju hidrofobne aminokiselinske ostatke (leucin, metionin, fenilalanin, glicin), dok ostatak ovih enzima pokazuje veću specifičnost prema svojim supstratima. PepA odstranjuje od tri do devet aminokiselinskih ostataka s N-terminalnog kraja peptida, PepP kao supstrat koristi tripeptide s prolinom na središnjem položaju, PepR i PepI stupaju u interakcije s dipeptidima u kojima je prolin na prvoj poziciji, PepQ s dipeptidima u kojima je prolin na drugoj poziciji, dok PepS koristi peptide s dvije do pet aminokiselina od kojih je barem jedna arginin ili peptide koji sadržavaju aromatski aminokiselinski ostatak na N-terminalnom kraju (Yukalo i Krupa, 2017).

Produkti unutarstaničnih hidroliza su slobodne aminokiseline, koje BMK služe za rast i sintezu proteina, čime se značajno smanjuje potrebna energija za sintezu novih aminokiselina (*de novo* sinteza aminokiselina) (Kieliszek i sur., 2021).

Na slici 2 shematski su prikazani proteolitički sustavi BMK.



**Slika 2.** Shematski prikaz proteolitičkih sustava BMK (prema Raveschot i sur., 2018)

### 2.3. BIOAKTIVNI SASTOJCI MLIJEKA

Mlijeko je koloidna tekućina, složenog sastava, koju pomoću mliječnih žlijezda luče ženke svih vrsta sisavaca kako bi zadovoljile nutritivne potrebe novorođenčadi (Fox, 2008).

Sastav mlijeka rezultat je evolucije preživljavanja najosjetljivijih pripadnika svake vrste sisavaca. Izvor je laktoze, lipida, proteina, vitamina, minerala, oligosaharida, faktora imuniteta, imunoglobulina, hormona, enzima i neonatalnih faktora rasta. Ove komponente izravno sudjeluju u razvoju raznih tjelesnih funkcija kao što su kardiovaskularni sustav, imunomodulacija, metabolički i živčani razvitak te utvrđivanje i implementacija mikrobioma crijeva (Punia i sur., 2020).

Specifični proteini mlijeka uključeni su u rani razvoj novorođenčadi, odnosno razvoj imunološkog sustava dok drugi sudjeluju u neimunološkoj obrani (npr. laktoferin). Prosječni uzorak jedne litre mlijeka sadrži 33 g lipida, koje čine u postotku od 95 % triacilgliceroli s različitim duljinama masnih kiselina i zasićenosti (Haug i sur., 2007).

Sastavni dio fosfolipida mliječne masti je kolin koji sudjeluje u oksidaciji masti u jetri te na taj način održava ravnotežnu koncentraciju kolesterola. Najveći udio šećera u mlijeku čini laktoza koja osim što je važan izvor energije, pozitivno stimulira djelovanje probavnog sustava te povećava apsorpciju fosfora i kalcija u organizmu. Mlijeko i mliječni proizvodi bogati su makro- i mikronutrijentima, a značajan su izvor kalcija, vitamina D, kalija, magnezija, vitamina A te konjugirane linolenske kiseline koja pokazuje protukancerogeno i imunostimulirajuće djelovanje (Ćurin i Cetinić, 2007).

Najvažniji antioksidansi u mlijeku su selen, vitamin E i vitamin A, čija je funkcija sprječavanje oksidacije mlijeka i zaštita stanica producenta. Također, antioksidacijski potencijal mlijeka povećava i prisutnost aminokiselina sa sumporom, kao što su metionin i cistein, karotenoidi i antioksidativni enzimi (superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza) (Punia i sur., 2020).

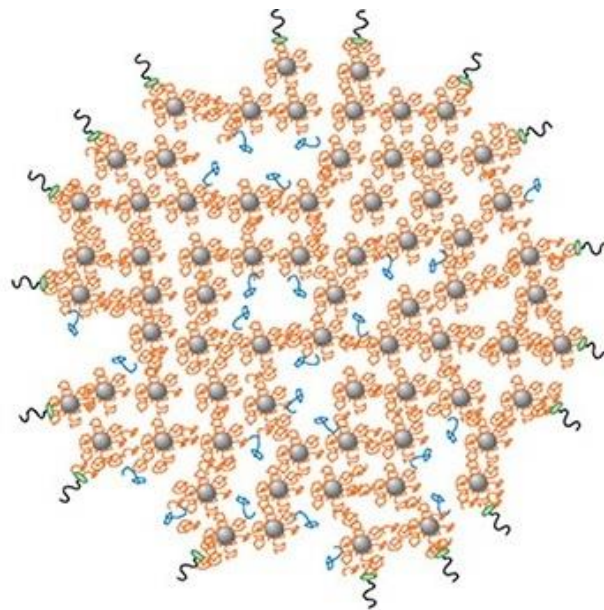
Od prisutnih minerala, najveću frakciju čini kalcij, čija je koncentracija 1 g/L mlijeka. Kalcij posjeduje velik broj benefita za ljudsko zdravlje, od pravilne sinteze i funkcionalnosti koštanog tkiva do prevencije hipertenzije, raka debelog crijeva i dojke, te stvaranja bubrežnih kamenaca. Kravlje mlijeko sadrži u prosjeku 32 g proteina/L, koji predstavljaju izvor esencijalnih aminokiselina. Najveću frakciju proteina u mlijeku čine kazein (80 %) i proteini sirutke. Proteini sirutke (engl. *whey proteins*) globularne su strukture te su za razliku od kazeina bolje topljivi u vodenom mediju. Sastoje se od nekolicine frakcija:  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin, albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, *BSA*) i imunoglobulini. Benefiti

konzumacije ovih proteina poznati su stoljećima, te se u današnjici koriste u proizvodnji sira i kao aditivi u raznim prehrambenim proizvodima (Haug i sur., 2007).

### 2.3.1. Kazein

Primarni protein mlijeka, kazein, sastoji se od četiri frakcije:  $\alpha_{S1}$ -,  $\alpha_{S2}$ -,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazein (slika 3). Svaka frakcija sadrži značajan broj prolina, što sprječava stvaranja sekundarne proteinske strukture ( $\alpha$ -uzvojnice i  $\beta$ -nabrane ploče) te omogućava nasumično smatanje polipeptidnih lanaca (Kieliszek i sur., 2021).

Kazein se u mlijeku nalazi u obliku micelijskih čestica koje su stabilne i visoko hidratirane, a sastoje se od kazeina i anorganskog kalcijevog fosfata. U kravljem mlijeku, kazeinske micelle u prosjeku su veličine oko 200 nm u promjeru. Kazeinske micelle izgrađene su od oko 20 000 individualnih proteinskih molekula koje ne formiraju tipičnu micelijsku strukturu, već nastaju agregacijom  $\alpha_S$ - i  $\beta$ -kazeina uz pomoć kalcijeva fosfata, dok  $\kappa$ -kazein sudjeluje u površinskoj stabilizaciji same strukture (Dalglish, 2011).



**Slika 3.** Shematski prikaz predložene strukture kazeinske micelle (prema Raveschot i sur., 2018)

$\alpha_S$ - i  $\beta$ -kazein (narančasto) stupaju u elektrostatske interakcije s kalcijevim fosfatom (sivo) kako bi stabilizirali strukturu micela. Pojedini  $\beta$ -kazeini stupaju u hidrofobne interakcije s ostalim frakcijama kazeina (plavo).  $\kappa$ -kazein (zeleno) smješten na površini micelle s hidrofilnim dijelom molekule (crno) okrenute prema van stabilizira vanjsku strukturu kazeinske micelle

Biološka funkcija kazeina je prijenos kalcija i fosfata te poboljšanje rada probavnog sustava, dok se njegovom razgradnjom generiraju potencijalni efektori raznih procesa u ljudskom organizmu. Iz tog se razloga nekolicina njih proizvodi na industrijskoj skali te koriste u formulaciji funkcionalne hrane i farmaceutskih pripravaka (Haug i sur., 2007).

Brojna istraživanja sugeriraju kako je kazein odličan prekursor za nastanak širokog spektra bioaktivnih peptida s antimikrobnim, imunomodularnim, antikoagulacijskim i ACE-inhibitorskim djelovanjem (Fan i sur., 2019).

#### *2.3.1.1. Razgradnja kazeina*

BMK karakterizira brz unutarstanični metabolizam te je potreba za ugljikohidratima i proteinima kod ove skupine bakterija veoma izražena. Kako količina slobodnih aminokiselina u mlijeku ne zadovoljava njihove potrebe, BMK razgrađuju mliječne proteine (primarno kazein) te time osiguravaju potrebne nutrijente (Kieliszek i sur., 2021).

U prvom koraku proteolize, izvanstanični protelitički enzimi razgrađuju lanac kazeina na manje jedinice. *Lactococcus lactis* posjeduje dva izvanstanična enzima: laktocepin I (PI-) i laktocepin III (PIII-) te su klasificirani po specifičnosti prema individualnim frakcijama kazeina. Laktocepin I primarno stupa u interakcije s  $\beta$ -kazeinom koji sadržava velik udio hidrofobnih aminokiselinskih ostataka i velik broj prolina na C-terminalnom kraju polipeptidnog lanca.  $\beta$ -kazein razgrađen je na više od 100 različitih oligopeptida koji sadržavaju od četiri do trideset aminokiselinskih ostataka, dok najveći udio nastalih oligopeptida sadrže od četiri do deset aminokiselinskih ostataka.  $\kappa$ -kazein razgrađen je do još manjih jedinica, također djelovanjem istih enzima (PI i PIII). Laktocepin III (PIII-) podjednako uspješno razgrađuje  $\alpha$ S1-,  $\beta$ - i  $\kappa$ -kazein, što sugerira kako ove proteinaze cijepaju veći broj peptidnih veza u usporedbi s laktocepin I proteinazama (Yukalo i Krupa, 2017).

Peptidi nastali djelovanjem proteinaza vezanih za staničnu membranu transportiraju se u bakterijsku stanicu pomoću transportnih sustava Opp, Dpp i DtpT. Daljnja degradacija vrši se uz pomoć unutarstaničnih peptidaza. Unutarstanične peptidaze nisu u mogućnosti hidrolizirati native frakcije kazeina, već samo unutarnje veze kazeinskih derivata (Kieliszek i sur., 2021).

## 2.4. BIOAKTIVNI PEPTIDI

Bioaktivni peptidi definiraju se kao specifični proteinski fragmenti, nastali u većini slučajeva djelovanjem enzima iz većih proteina. Sekvence ovih proteina nalaze se unutar sekvenci mliječnih proteina te bez njihovog enzimskog oslobođenja ostaju neaktivni, što se može postići fermentacijom mlijeka pomoću starter kulture (BMK) ili enzimskom hidrolizom pomoću gastrointestinalnog sustava. Djelovanje samog bioaktivnog peptida ovisi primarno o sastavu aminokiselinskih ostataka i njihovom redoslijedu. Potvrđeno je kako je prosječna duljina od 2 do 20 aminokiselinskih ostataka, s nekolicinom hidrofobnih aminokiselinskih ostataka uz prolin, lizin i arginin. Najvažnija funkcionalna svojstva za karakterizaciju bioaktivnih peptida prema Peighamardoust i sur. (2022) su: topljivost, sposobnost stabilizacije emulzija, sposobnost pjenjenja, kapacitet zadržavanja vode i hidrofobnost. Topljivost bioaktivnih peptida ovisi primarno o molekulskoj masi i aminokiselinskom sastavu. Generalno, topljivost peptida se povećava sa smanjenjem molekulske mase te većim udjelom polarnih aminokiselinskih ostataka, čime se formiraju vodikove veze, u odnosu na hidrofobne ostatke. Sposobnost stabilizacije emulzije bazira se na interakciji peptida i uljnih kapljica tijekom homogenizacije, čime se stvara sloj odbijanja i sprječava sjedinjenje uljne faze. Ova sposobnost ovisi primarno o dužini samih peptida te duži peptidi bolje stabiliziraju emulzije, zbog mogućnosti reorijentacije prema uljnoj i vodenoj fazi. Sposobnost pjenjenja, slično kao i sposobnost stabilizacije emulzija, bazira se primarno na molekulskoj masi peptida. Peptidi s većom molekulskom masom pozitivno utječu na stabilnost pjene. S druge strane, denaturirani i hidrolizirani proteini mogu stvarati pjene zahvaljujući njihovim strukturnim promjenama, zbog čega olakšano migriraju kroz sustav voda-zrak i vrše reorijentaciju. Kapacitet zadržavanja vode ključan je parametar za korištenje peptida u prehrambenoj industriji te opisuje mehanička svojstva (elastičnost, plastičnost) prehrambenih proizvoda. Ovaj parametar ovisi o koncentraciji peptida, pH i vrsti korištenih enzima tijekom dobivanja samih peptida. Također, ovaj parametar ovisi i o molekulskoj masi i udjelu hidrofilnih aminokiselinskih ostataka, te hidrofilni peptidi s nižim molekulskim masama pokazuju bolji kapacitet zadržavanja vode. Hidrofobnost je svojstvo o kojem ovisi fizička interakcija između peptida i bioloških molekula, što direktno utječe na njihovo djelovanje. Djeluje na mogućnost povezivanja proteina i staničnih membrana stanica, interakcije između proteina i formiranje kompleksnih struktura s raznim biološkim molekulama. Hidrolizom proteina, hidrofobni aminokiselinski ostaci, prethodno smješteni u unutrašnjosti native proteinske strukture, izlaze na površinu čime se povećava površinska hidrofobnost i povećava mogućnost prije opisanih interakcija.

Faktori kao što su proteinski sastav, prehrana i genetika sisavca proizvođača, okolišni uvjeti, stupanj laktacije i fiziološko stanje samog sisavca, mogu direktno utjecati na sastav proteina u mlijeku, a time i na sastav bioaktivnih peptida i njihovo djelovanje. Do sada je u bazi podataka „Biopep“ zabilježeno 1500 različitih bioaktivnih peptida s raznolikim pozitivnim djelovanjem na ljudsko zdravlje (Punia i sur., 2020; Sánchez i Vázquez, 2017). Fokus su mnogih istraživanja zbog svog visokog afiniteta za tkiva, specifičnosti i efikasnosti u održavanju zdravlja (Daliri i sur., 2017). Također, bioaktivni peptidi smatraju se novom generacijom biološki aktivnih regulatora, čije je djelovanje raznoliko: sprječavanje oksidacije i mikrobiološke degradacije hrane; liječenje raznih medicinskih stanja. Iako su bioaktivni peptidi identificirani i izolirani iz mnogo prirodnih sirovina, kravlje mlijeko, sir i mliječni proizvodi smatraju se sirovinama najbogatijim bioaktivnim proteinima, a stoga i bioaktivnim peptidima. Također, od životinjskih izvora pronađeni su i u kravljjoj krvi, želatini, mesu, jajima te ribama (tuna, sardina, haringa, losos). S druge strane, biljne sirovine kao što su pšenica, kukuruz, soja, riža, gljive, bundeva, kineska šećerna trska i amarant također sadrže bioaktivne peptide u svom sastavu (Sánchez i Vázquez, 2017).

Mliječni proteini bogat su izvor bioaktivnih peptida koji nastaju enzimskom hidrolizom ili mikrobiološkom fermentacijom. Kako je navedeno prije, hidroliza se može provesti *in vivo* tijekom probavnog procesa uz pomoć probavnih enzima (npr. tripsin) ili uz pomoć enzima mikrobiote crijeva, procesiranjem i fermentacijom hrane ili *in vitro* hidrolizom uz izolirane enzime. Tijekom probave, bioaktivni peptidi mogu biti apsorbirani iz crijeva u krvotok te djelovati lokalno na probavni sustav ili ispoljavati općenitije benefite za cijeli organizam (Marcone i sur., 2016).

Jedan od primarnih problema vezano uz bioaktivne peptide je njihova bioraspoloživost nakon konzumacije (Rojas-Ronquillo i sur., 2012).

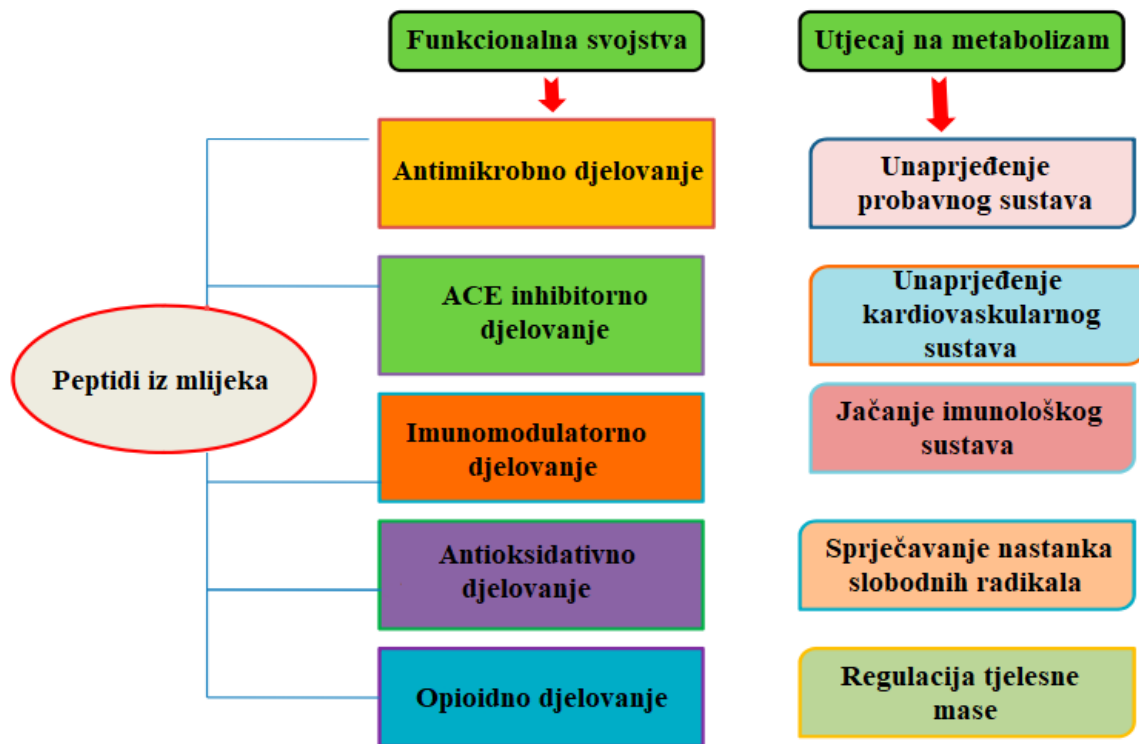
Fermentacija mlijeka pomoću BMK smatra se najboljim pristupom za dobivanje bioaktivnih peptida zbog svoje cijene, ali i jednostavnosti samog procesa (Sánchez i Vázquez, 2017).

Razvitak znanosti o peptidima omogućuje korištenje raznih alata kao što su kromatografija, masena spektrometrija te bioinformatika brzo i precizno proučavanje heterogenih peptida. Kombinacijom kapilarne elektroforeze, tekućinske kromatografije, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, masene spektrometrije i tekućinske kromatografije temeljene na hidrofilnim interakcijama dokazane su sekvence bioaktivnih peptida u homogeniziranom mlijeku i ljudskim uzorcima kao što je krvi serum, urin i ostalih tekućina iz gastrointestinalnog sustava (Punia i sur., 2020).

Bioaktivni peptidi iz mlijeka mogu djelovati na rizične faktore razvijanja kardiovaskularnih

bolesti, što uključujući hipertenziju, trombozu, razne upalne procese i narušavanje lipidnog metabolizma, što korisnicima daje alternativu za sintetske farmaceutske pripravke (Marcone i sur., 2016). Na slici 4 prikazana su do sada ustanovljena funkcionalna svojstva bioaktivnih peptida, odnosno njihov utjecaj na metabolizam.

Bioaktivni peptidi, kao što su fosfopeptidi koriste se u proizvodnji funkcionalne hrane te služe kao dodatci prehrane ili u medicinske svrhe. Dodatak bioaktivnih peptida u hranu može potencijalno popraviti zdravlje samih potrošača, primarno zbog svojih antimikrobnih svojstava, čime se mogu kontrolirati infekcije te prevenirati razne bolesti (Punia i sur., 2020).



**Slika 4.** Funkcionalna svojstva bioaktivnih peptida iz mlijeka i njihov utjecaj na metabolizam čovjeka (prema Punia i sur., 2020)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu provedena je detekcija proteolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Enterococcus* rodova. U tablici 1 prikazani su sojevi BMK, izolirani iz različitih ekostaništa, koji su korišteni u *in vitro* eksperimentima detekcije aktivnosti proteinaza. Sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Tablica 1.** Autohtoni sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz različitih tradicionalno proizvedenih fermentiranih proizvoda, korišteni u detekciji proteolitičke aktivnosti, i uvjeti njihovog čuvanja

Naziv i oznaka soja	Ekostanište	Uvjeti čuvanja
<i>Lactobacillus helveticus</i> M92	Silaža	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i> D6	Dimljeni sir	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i> ZG1-K7	Svježi sir	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i> SF9B	Kiseli kupus	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i> SF15B	Kiseli kupus	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i> SF9C	Kiseli kupus	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i> SF15C	Kiseli kupus	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i> D13	Dimljeni sir	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus fermentum</i> D12	Dimljeni sir	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i> ZGZA7- 10	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGPR1-51	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGPR2-4	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGPR2-11	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGBP4-1	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGBP4-2	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno



**Tablica 1.** Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u detekciji proteolitičke aktivnosti, ekostanište i uvjeti čuvanja - *nastavak*

Naziv i oznaka soja	Ekostanište	Uvjeti čuvanja
<i>Lactococcus lactis</i> ZGBP5-32	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGBP5-51	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGBP6-51	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGZA7-6	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGZA9-2	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> ZGZA9-11	Svježi sir	M17, 37 °C, aerobno

### 3.1.2. Hranjiva podloga

- a) Hranjiva podloga za rast *Lactobacillus* i *Enterococcus* sojeva

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

Sastojak	g/L destilirane vode
Pepton	10
Mesni ekstrakt	10
Kvašćev ekstrakt	5
Glukoza	20
Tween 80	1
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,1
MnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,05
Natrijev acetat	5
Agar	20

pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min. MRS tekuća hranjiva podloga istog je sastava kao MRS agar podloga, ali bez dodatka agara.

b) Hranjiva podloga za rast *Lactococcus* sojeva

**Tablica 3.** Sastav M17 krute hranjive podloge

<b>Sastojak</b>	<b>g/L destilirane vode</b>
<b>Tripsinski hidrolizat kazeina</b>	2,5
<b>Pepton</b>	2,5
<b>Sojin pepton</b>	5
<b>Kvašćev ekstrakt</b>	2,5
<b>Mesni ekstrakt</b>	5
<b>Laktoza</b>	5
<b>Natrijev glicerofosfat</b>	19
<b>Magnezijev sulfat</b>	0,25
<b>Askorbinska kiselina</b>	0,5
<b>Agar</b>	20

pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min. M17 tekuća podloga je istog sastava kao podloga M17 agar, ali bez dodatka agara.

### 3.1.3. Kemikalije

- Acetonitril (ACN), VWR Chemicals, SAD
- Agar, Biolife, Italija
- Amonijev dihidrogenfosfat, Merck, Njemačka
- Fenolftalein, Kemika, Hrvatska
- Fosfatna kiselina, Merck, Njemačka
- HCCA ( $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina) stock otopina matrice, Sigma, SAD
- Izopropanol, Merck, Njemačka
- Kalibrant za MALDI/TOF-TOF, Sigma, SAD
- Natrijev hidroksid, Kemika, Hrvatska
- Obrano mlijeko u prahu, Sigma-Aldrich, Švicarska
- Trifluoroctena kiselina (TFA), Merck, Njemačka
- Ultračista voda, 18 M  $\Omega$  cm<sup>-1</sup>

#### 3.1.4. Pufer

- Pufer za kromatografiju isključivanja: 150 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

#### 3.1.5. Aparatura i pribor

- Analitička vaga, Sartorius, Njemačka
- Automatske pipete, Eppendorf, SAD
- Centrifuga Centric, Tehnica, Slovenija
- Centrifuga s hlađenjem 5804R, Eppendorf, SAD
- Eppendorf kivete, Eppendorf, SAD
- Epruvete, Scherf Präzision Europe GmbH, Njemačka
- Erlenmayer tikvice, Gram-mol, Hrvatska
- Filter veličina pora 0,4 µm, Sigma-Aldrich, SAD
- Filter veličine pora 0,2 µm, Sigma-Aldrich, SAD
- HPLC 1260 Infinity sa sakupljačem frakcija, Agilent Technologies, SAD
- HPLC 1290 Infinity LC System, Agilent Technologies, SAD
- HPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC nano sustav uz UV/VIS detektor, Thermo Fischer Scientific, SAD
- Kivete za centrifugiranje Falcon, neoLab, Njemačka
- LC/MS 6460 TripleQuad, Agilent Technologies, SAD
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka
- Magnetska miješalica IKA WERKE, Njemačka
- MALDI pločica, MTP Anchor Chip 384 BC, Bruker, Njemačka
- MALDI-TOF/TOF, Bruker, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, Golias, Slovenija
- pH metar, Metrohm, Švicarska
- Proteineer fcII sakupljač frakcija, Bruker, Njemačka
- Stalci za Eppendorf kivete, neoLab, Njemačka
- Stalci za epruvete, neoLab, Njemačka
- Standardi peptida, Thermo Fischer Scientific, SAD
- Termostat, Instrumentarija, Hrvatska
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H, Elma, Njemačka
- Uređaj za pročišćavanje vode, Synergy UV ultrapure Water (type 1), Sigma, Njemačka

- Vaga, Tehnica, Slovenija
- Viale, Agilent Technologies, SAD
- Vortex V1 plus, Biosan, Latvija
- Zamrzivač (-80 °C), Eppendorf, Njemačka
- Kolone:
  - Acclaim PepMap 100 C<sub>18</sub>, 3 μm, 100 Å, 75 μm i.d. × 15 cm, Thermo Scientific, SAD
  - Agilent, Bio SEC-3, 3 μm, 100 Å, 4,6 x 300 mm
  - ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 μm, 2,1×50 mm, Waters, SAD

### 3.1.6. Programi i baze podataka

- MassHunterWorkstation - program za identifikaciju pikova i analizu spektra, Agilent Technologies, SAD
- Milk Bioactive Peptides Database- baza podataka, pristupljeno 11.04.2022.
- ProteinScape, verzija 3.0 - program za pretragu baze podataka s integriranim MASCOT algoritmom za pretraživanje baze podataka, Bruker, Njemačka
- Skyline, verzija 4.2.0. - program za kreiranje metoda za ciljanu analizu proteina, MacCoss Lab Software, SAD
- SwissProt - baza podataka, pristupljeno 11.04.2022.
- WARP-LC, verzija 1.3 - program za automatizirano snimanje MS i MS/MS spektara, Bruker, Njemačka

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje radnih mikroorganizama

Sojevi BMK čuvani su pri -80 °C u tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % v/v glicerola kao krioprotektivnog sredstva. 24 sata prije provođenja eksperimenta sojevi su inokulirani u optimalni hranjivi medij (MRS ili M17, poglavlje 3.1.2.), odnosno obrano mlijeko te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 1.

### 3.2.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline

Proteolitička aktivnost prekonoćnih kultura određena je kvalitativnom metodom difuzije u podlogu koja sadrži obrano mlijeko uz dodatak agara. Pripremljena sterilna kruta podloga s

obranim mlijekom (10 %) uz dodatak 1 % (m/V) agara ohlađena je i izlivena u Petrijeve zdjelice. Nakon skrtnjivanja podloge, pomoću laboratorijskog bušaća promjera 7 mm izbušene su „rupe“ u agaru te je ukapano po 50 µL biomase stanica i supernatanta kulture stanica odabranih sojeva (tablica 1). Pripremljene Petrijeve zdjelice inkubirane su na sobnoj temperaturi te su zone razgradnje kazeina, koje potencijalno upućuju na proteolitičku aktivnost, mjerene nakon 24 sata. Nakon mjerenja zona inhibicija odabran je soj s najboljom proteolitičkom aktivnosti (*Lactococcus lactis* ZGBP5-32) u svrhu određivanja bioaktivnih peptida.

### 3.2.3. Priprema uzorka za određivanje bioaktivnih peptida

Dan prije izvođenja eksperimenta, soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 inokuliran je u M17 tekuću hranjivu podlogu i preko noći aerobno inkubiran na 37 °C. Porasle kulture stanica centrifugirane su pomoću centrifuge (Centric, Tehtnica, Slovenija) te je biomasa stanica resuspendirana u mlijeku „Veronika“. Uzorci mlijeka „Veronika“ s precijepljenom kulturom *L. lactis* ZGBP5-32 inkubirani su 24 i 48 sata na 37 °C u 3 paralele. Uzorci mlijeka s precijepljenom kulturom i kontrola (mlijeko „Veronika“) u 3 paralele liofilizirani su u Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka).

### 3.2.4. Određivanje broja stanica odabranog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 te utvrđivanje acidifikacijskog kapaciteta

#### 3.2.4.1. Određivanje broja stanica

Početni broj bakterijskih stanica te broj bakterijskih stanica nakon inkubacije od 24 h i 48 h u mlijeku „Veronika“ određen je indirektnom metodom, odnosno priređivanjem odgovarajućih razrjeđenja u fiziološkoj otopini i nacijepljivanjem na M17 agar uz aerobnu inkubaciju pri 37 °C. Ukupan broj stanica određen je prema navedenoj formuli:

$$\text{CFU} = (a/b) \times c$$

a = broj poraslih kolonija

b = nacijepljen volumen uzorka

c = recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja

#### 3.2.4.2. Određivanje pH vrijednosti i stupnja kiselosti

U supernatantu kulture pomoću pH metra (Metrohm, Švicarska) izmjerena je pH vrijednost kontrole i uzoraka. Stupanj kiselosti određen je iz 1 mL uzorka supernatanta razrijeđenog s 19

mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici. Razrijeđeni uzorci titrirani su s 0,1 M NaOH (Kemika, Hrvatska) uz fenolftalein kao indikator do pojave ružičaste boje. Kiselost u stupnjevima Soxhlet-Henkela ( $^{\circ}SH$ ), odnosno postotak proizvedene mliječne kiseline (% mliječne kiseline) određen je prema navedenim formulama:

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

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

a = volumen 0,1 M NaOH (mL)

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

(1  $^{\circ}SH \sim 0,0225$  g mliječne kiseline (%))

### 3.2.5 Neciljana analiza proteina

#### 3.2.5.1. Priprema uzoraka

Liofilizirani uzorci otopljeni su u vodenoj otopini 0,1 % trifloroctene kiseline (TFA, Sigma-Aldrich, SAD) u konačnoj koncentraciji 1 mg/mL te filtrirani kroz filter veličine pora 0,2  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, SAD).

#### 3.2.5.2. Razdvajanje peptida te skupljanje frakcija

Razdvajanje peptida provedeno je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) pomoću Dionex Ultimate 3000 RSLCnano System instrumenta (Thermo Fischer Scientific, SAD) koji je direktno povezan sa skupljačem frakcija PROTEINEER fcII (Bruker, Njemačka). Razdvajanje je provedeno na koloni Acclaim PepMap 100 C<sub>18</sub>, 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 75  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  15 cm (Thermo Scientific, SAD) prema parametrima navedenim u tablici 4. Sakupljene su ukupno 192 frakcije koje su automatski sakupljene na MALDI (engl. *Matrix-assisted laser desorption*) pločicu (MTP Anchor Chip 384 BC, Bruker, Njemačka) prema parametrima navedenim u tablici 5.

**Tablica 4.** Parametri razdavanja proteina

<b>Pokretna faza A</b>	vodena otopina 0,1 % TFA (v/v)		
<b>Pokretna faza B</b>	TFA u acetonitrilu (ACN, v/v)		
<b>Temperatura kolone</b>	40 °C		
<b>Protok</b>	0,3 µL/min		
<b>Ispiranje kolone</b>	Gradijentalno		
	<b>Retencijsko vrijeme</b>	<b>B (%)</b>	<b>Protok (µL/min)</b>
	0	2,0	0,3
	10	2,0	0,3
	58	40,0	0,3
	59	90,0	0,3
	69	90,0	0,3
	70	2,0	0,3
75	2,0	0,3	
<b>Detektor</b>	UV/VIS detektor, valna duljina od 214 nm		

**Tablica 5.** Parametri sakupljanja frakcija peptida

<b>Protok matrice</b>	100 µL/h
<b>Vrijeme skupljanja frakcija</b>	15-63 min
<b>Vrijeme sakupljanja frakcija/frakcija</b>	15 s
<b>Ukupan broj sakupljanja frakcija</b>	192

### 3.2.5.3. Analiza peptida spektrometrijom masa MALDI-TOF/TOF

Analiza peptida nakon separacije provedena je pomoću spektrometra masa Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF (engl. *Time Of Flight, TOF*) (Bruker, Njemačka). Vanjska kalibracija spektra napravljena je pomoću algoritma krivulje četvrtog reda uz snimanje minimalno 6 signala peptida poznatih masa. Parametri snimanja MS i MS/MS spektara navedeni su u tablicama 6 i 7.

**Tablica 6.** Parametri snimanja MS spektara

<b>Tip analize</b>	MS pozitiv
<b>Detekcija iona</b>	pozitivna
<b>Ionsko zrcalo</b>	reflektron
<b>Raspon masa</b>	700 - 4 000 Da
<b>Kalibracija MS spektara</b>	algoritam krivulje četvrtog reda uz signale dobivene snimanjem standardnih peptida poznatih masa, minimalno 6 signala
<b>Tolerancija mase pri kalibraciji</b>	50 ppm
<b>Vrsta fragmentacije</b>	inducirana laserom

**Tablica 7.** Parametri snimanja MS/MS spektara nakon LC separacije

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

Podaci dobiveni snimanjem spektara MS i MS/MS korišteni su za pretragu SwissProt baze podataka. Pretraga baze podataka provedena je primjenom ProteinScape, verzija 3.0 (Bruker, Njemačka) s parametrima navedenim u tablici 8.



**Tablica 8.** Parametri pretrage baze podataka

<b>Taksonomija</b>	<i>Bos taurus</i>
<b>Enzim</b>	Nespecifično cijepanje
<b>Varijabilne modifikacije</b>	Oksidacija metionina, deaminacija asparagina i glutamina
<b>Tolerancija mase prekursora</b>	100 ppm

Dobivene proteinske sekvence peptida pretražene su pomoću baze podataka za bioaktivne peptide izolirane iz mlijeka (engl. *Milk Bioactive Peptide Database, MBPD*).

### 3.2.6. Ciljana analiza peptida-relativna kvantifikacija i karakterizacija bioaktivnih peptida LC-MRM-MS metodom

Kako bi se kvantificirali peptidi s bioaktivnim svojstvima odabrana je LC-MS/MS metoda višestrukog praćenja reakcije (engl. *multiple reaction monitoring, MRM*). Nakon identifikacije bioaktivnih peptida za optimizaciju metode MRM korištena je verzija softvera Skyline 21.1.0.278. Razvoj metode i analiza uzorka provedena je pomoću 6460 TripleQuad LC/MS sustava opremljenog s elektrosprej ionizacijskom tehnikom. Za razvoj metode korišteni su standardi peptida (Thermo Fisher Scientific, SAD). Parametri analize postavljeni su kao što je opisano u Novak i sur. (2022) te su navedeni u tablici 9. Za kromatografsko razdvajanje korištena je ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 1,7 µm, 2,1×50 mm (Waters, SAD) kolona. Analiza spektara provedena je pomoću MassHunterWorkstation softwera (Agilent Technologies, SAD).

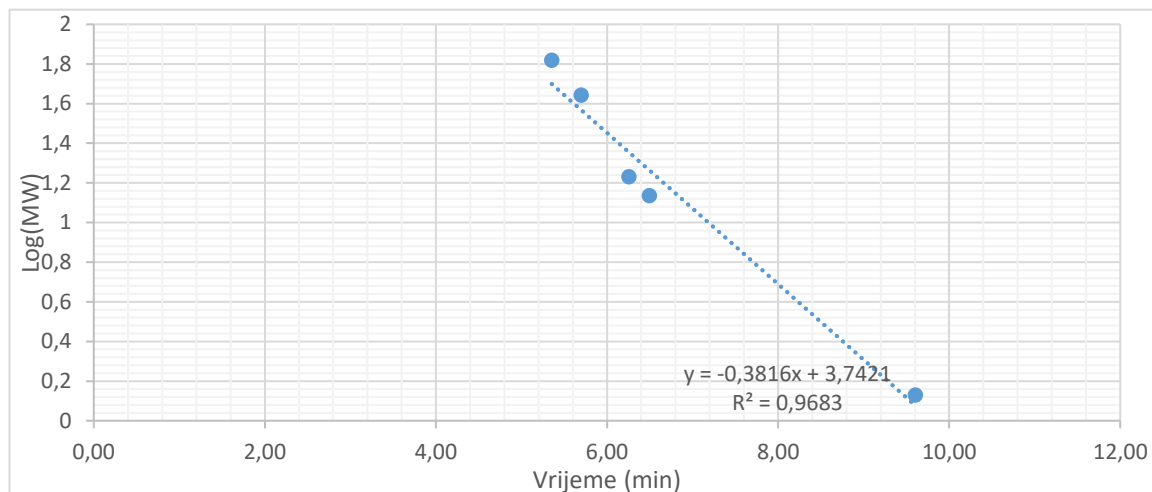
**Tablica 9.** Parametri kromatografskog razdvajanja peptida LC-MRM-MS metodom

<b>Mobilna faza A</b>	0,1 % vodena otopina mravlje kiseline (v/v)
<b>Mobilna faza B</b>	Acetonitril
<b>Temperatura</b>	40 °C
<b>Protok</b>	0,3 mL/min
<b>Ispiranje kolone</b>	Gradijentalno
<b>Detekcija</b>	MS, metoda MRM
<b>Detekcija iona</b>	Pozitivna

### 3.2.7. Određivanje mase peptida tekućinskom kromatografijom isključivanja po veličini

Kako bi se odredio raspon masa nastalih peptida te pratila dinamika proteolize u uzorcima provedena je kromatografija isključivanja po veličini (engl. *Size-Exclusion Chromatography, SEC*) pomoću 1260 Infinity binarnog HPLC sustava s UV/VIS detektorom (Agilent Technologies, SAD) na Bio SEC-3, 3 µm, 100 Å, 4,6 x 300 mm koloni (Agilent Technologies,

SAD). Kalibracijska krivulja koja prikazuje ovisnost logaritamske vrijednosti molekulske mase ( $\log(MW)$ ) o vremenu zadržavanja analita na koloni izrađena je koristeći molekule poznate molekulske mase (slika 5). Na temelju dobivene kalibracijske krivulje izračunate su molekulske mase molekula prisutnih u uzorcima nakon proteolize.



**Slika 5.** Kalibracijska krivulja ovisnosti logaritamske vrijednosti molekulske mase standarda o vremenu zadržavanja na koloni

### 3.2.7.1. Priprema standarda

Po 10  $\mu\text{L}$  svakog standarda poznatih koncentracija odmjeren je u vialu: vitamin B12 (2,5 mg/mL), BSA (25 mg/mL), RNaza H (12,5 mg/mL) i inzulin (2 mg/mL).

### 3.2.7.2. Priprema uzoraka

Liofilizirani uzorci otopljeni su u 150 mM natrij hidrogenfosfatnom puferu (pH 7,0) u konačnoj koncentraciji od 1 mg/mL te centrifugirani pri 10 000 x g 5 minuta u ohlađenoj centrifugi (Eppendorf, SAD) na 4 °C. Dobiveni supernatant filtriran je kroz filter veličina pora 0,4  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich, SAD). Tako pripremljeni uzorci separirani su kromatografijom isključivanja prema parametrima navedenim u tablici 10.

**Tablica 10.** Parametri analize kromatografije isključivanja po veličini

<b>Protok</b>	0,3 mL/min
<b>Volumen injektiranja</b>	10 µL
<b>Temperatura autosemplera</b>	7 °C
<b>Temperatura kolone</b>	40 °C
<b>Valna duljina</b>	214 nm
<b>Ispiranje</b>	Izokratno
<b>Raspon masa</b>	100-100 000 Da

### 3.2.8. Statistička obrada

Ekperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri nezavisna uzorka ± standardna devijacija. Srednja vrijednost i standardna devijacija izračunate su pomoću MS Excel (Microsoft corporation, 2010) pomoću integriranih funkcija (AVERAGE i STDEV).

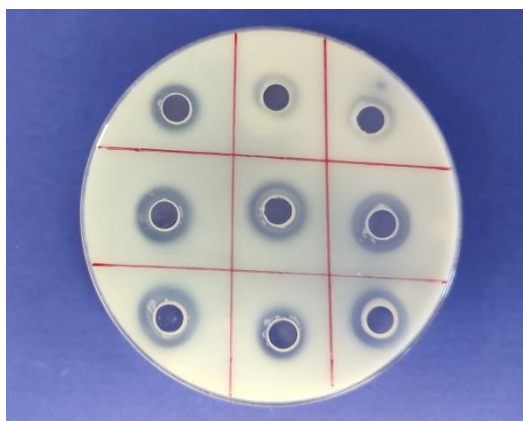
Statistička analiza rezultata ciljane analize peptida napravljena je korištenjem JASP 0.17.1 programa. Rezultati su statistički obrađeni koristeći Kruskal-Wallis test. Dunnov test je korišten kao Post Hoc test uz Turkey korekciju. Signifikantne razlike između uzoraka smatrane su pri  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja proteolitičke aktivnosti autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline, izoliranih iz različitih tradicionalno proizvedenih fermentiranih proizvoda, i odabir soja s najboljom proteolitičkom aktivnošću. Spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa provedena je neciljana identifikacija peptida u 6 uzoraka necijepljenih sojem *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 i 3 uzoraka kontrole. Relativna kvantifikacija peptida s bioaktivnim svojstvima provedena je ciljanom analizom peptida pomoću LC-MS/MS sustava metodom MRM. Kako bi se odredio proteinski profil u uzorcima i raspon masa nastalih peptida provedena je kromatografija isključivanja po veličini.

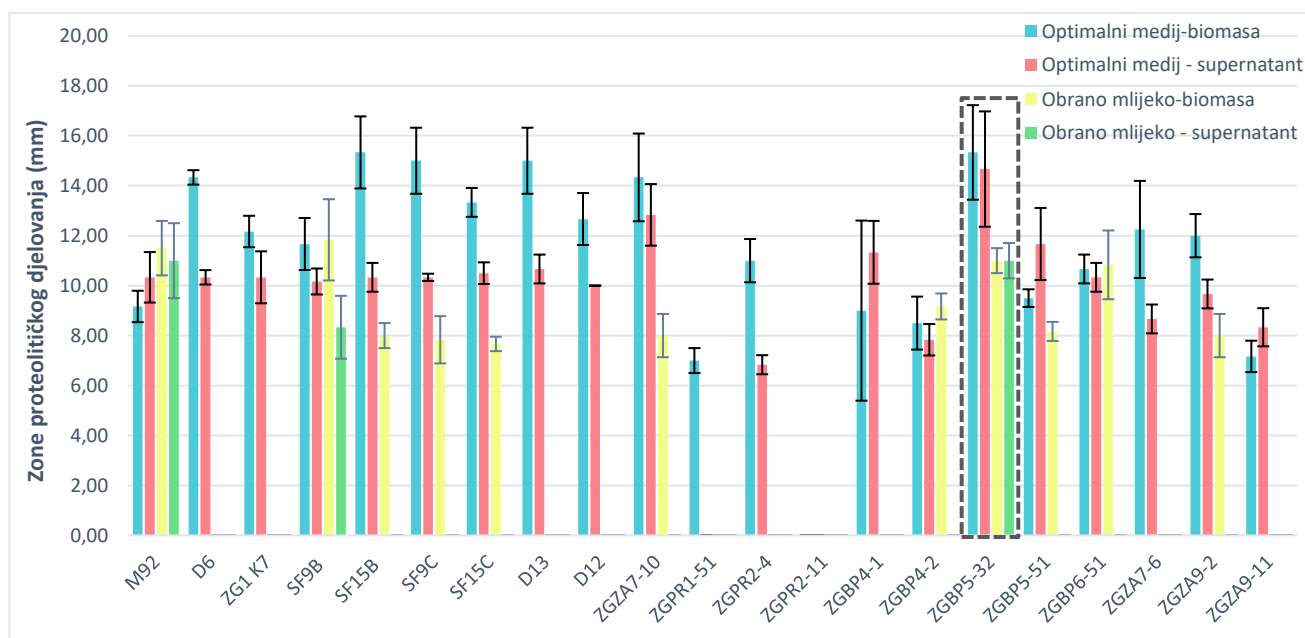
### 4.1. PROTEOLITIČKA AKTIVNOST

Osnovne građevne jedinice, a samim time i esencijalne komponente živih organizama su aminokiseline. Bakterije mliječne kiseline posjeduju kompleksan i dobro posložen proteolitički sustav kojim iz proteina hidrolizom nastaju peptidi i slobodne aminokiseline (Lim i sur., 2019). U ovom radu ispitan je potencijal BMK za razgradnju kazeina iz obranog mlijeka prema metodi opisanoj u Poglavlju 3.2.2. kako bi se odabrao soj s najboljom proteolitičkom aktivnošću. Analizirani sojevi pripadaju rodovima *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Enterococcus* čija potencijalna proteolitička aktivnost upućuje na akumulaciju biopeptida (Novak i sur., 2022). Potencijalna proteolitička aktivnost ispitivana je u prisutnosti koncentrirane biomase stanica kako bi se detektirala aktivnost proteinaze vezane za staničnu stijenk, odnosno u supernatantu kulture ako se radi o izvanstaničnoj proteinazi. Primjer rezultata kvalitativne metode difuzije u podlogu koja sadrži obrano mlijeko prikazan je na slici 6.



**Slika 6.** Primjer rezultata preteolitičkih zona nastalih nakon inkubacije odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u obranom mlijeku

Sumirani rezultati hidrolize kazeina iz obranog mlijeka prikazani su na slici 7.



**Slika 7.** Zone proteolitičkog djelovanja ispitivanih supernatanata i biomase odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline dobivene nakon njihovog uzgoja u optimalnom mediju i u obranom mlijeku

Isprekidanim okvirom označen je soj s najznačajnijom proteolitičkom aktivnošću

Iz priloženog grafičkog prikaza vidljivo je da većina ispitanih sojeva pokazuje proteolitičku aktivnost. Sojevi SF15B, SF9C, D13 pokazuju izraženo proteolitičko djelovanje nakon uzgoja u optimalnom mediju primjenom biomase dok soj ZGBP5-32 pokazuje značajno proteolitičko djelovanje nakon uzgoja u optimalnom mediju primjenom biomase i supernatanta te nakon uzgoja u obranom mlijeku. Prema dobivenim rezultatima za soj ZGBP5-32 može se pretpostaviti da posjeduje proteinaze vezane za staničnu membranu te proteinaze u izvanstaničnom prostoru. Prema rezultatima, sojevi roda *Lactobacillus* i soj *Enterococcus*,

nakon uzgoja u optimalnom mediju, pokazuju vidljiviju mogućnost hidrolize kazeina u usporedbi sa sojevima iz roda *Lactococcus*. Novak i sur. (2021) ispitivali su proteolitičku aktivnost istih odabranih sojeva te je i u njihovom slučaju najveća proteolitička aktivnost zabilježena kod sojeva uzgojenih u optimalnom mediju uz korištenje biomase. Sojevi SF15B, SF9C, SF15C, ZGZA7-10, ZGBP4-2, ZGBP5-51, ZGBP6-51, ZGZA9-2 pokazuju kazeinolitičku aktivnost nakon uzgoja u obranom mlijeku isključivo primjenom biomase što sugerira da ovi sojevi ne posjeduju izvanstanične proteinaze već hidrolaznu aktivnost provode proteinaze vezane na staničnu stijenku.

Nakon rasta u limitirajućoj hranjivoj podlozi (obrano mlijeko) s kazeinom kao primarnim izvorom dušika, ispitani sojevi BMK nisu pokazali značajnu indukciju aktivnosti proteinaza u usporedbi s rastom u optimalnoj hranjivoj podlozi.

Soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 je odabran za daljnje analize identifikacije i karakterizacije potencijalnih bioaktivnih peptida proizvedenih kao rezultat njegove proteolitičke aktivnosti tijekom 24 i 48 h inkubacije u mlijeku jer je i njegova biomasa i supernatant kulture pokazao proteolitičku aktivnost.

#### 4.1.1 Acidifikacijski kapacitet i broj stanica *Lactococcus lactis* ZGBP5-32

Tijekom fermentacije u BMK izvori ugljika poput laktoze metaboliziraju do mliječne kiseline, što rezultira snižavanjem pH vrijednosti okolnog medija te povećanjem postotka (%) proizvedene mliječne kiseline u supernatantu. Upravo se praćenjem ovih parametara može očitati uspješan rast bakterija mliječne kiseline (Novak i sur., 2021).

Rast odabranog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 praćen je mjerenjem pH vrijednosti i postotka (%) proizvedene mliječne kiseline nakon inkubacije od 24 i 48 sati u mlijeku, te su dobivene vrijednosti uspoređene s kontrolom (tablica 11). Dobiveni rezultati potvrđuju uspješan rast soja ZGBP5-32. Nakon inkubacije od 24 i 48 sati vidljivo je smanjenje pH vrijednosti medija za približno 2 jedinice, a u skladu s time i povećanje postotka (%) proizvedene mliječne kiseline. Novak i sur. (2021) također su u svom istraživanju pratili navedene parametre za soj ZGBP5-32 te su rezultati usporedivi s podacima dobivenim u ovom radu. pH vrijednost medija nakon inkubacije od 24 sati iznosila je  $4,71 \pm 0,13$  dok je postotak (%) mliječne kiseline iznosio  $0,42 \pm 0,052$ .

Dodatni praćeni parametar CFU/mL (engl. *colony forming units*) pokazuje da je broj stanica nakon inkubacije od 24 i 48 sati smanjen u odnosu na početni. Broj stanica do 10 sati inkubacije eksponencijalno raste, nakon čega stanice prelaze u stacionarnu fazu te je nakon 48 sati vidljivo odumiranje stanica.

**Tablica 11.** pH vrijednosti, postotak (%) mliječne kiseline i broj živih bakterijskih stanica (CFU/mL) nakon fermentacije mlijeka

Soj	<i>Lactococcus lactis</i> ZGBP5-32		
Vrijeme	0 h	24 h	48 h
pH vrijednost	6,59 ± 0,036	4,40 ± 0,006	4,40 ± 0,049
% mliječne kiseline	0,15 ± 0,003	0,42 ± 0,104	0,6 ± 0,104
CFU/mL	(1,68 ± 1,31) x 10 <sup>9</sup>	(1,62 ± 1,19) x 10 <sup>9</sup>	(8,15 ± 6,43) x 10 <sup>8</sup>

#### 4.2. NECILJANA ANALIZA PEPTIDA

Spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa provedena je analiza liofiliziranih uzoraka, nakon čega je pretražena SwissProt baza podataka. U uzorcima mlijeka s inokuliranom kulturom *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 dokazana je prisutnost peptida nakon inkubacije od 24 i 48 sati te je iz tablice 13 vidljivo da prvenstveno potječu iz β-kazeina. Sve peptidne sekvence uspoređene su sa sekvencama pohranjenim u bazi podataka za bioaktivne peptide izolirane iz mlijeka kako bi se potvrdilo postojanje opisanih bioaktivnih svojstva u znanstvenoj literaturi. Rezultati pretraživanja i potencijalno bioaktivno djelovanje identificiranih peptida prikazani su u tablicama 12 i 13 dok u uzorcima kontrole nije detektiran niti jedan peptid.

**Tablica 12.** Svojstva peptida identificiranog u uzorku mlijeka nakon 24 h inkubacije *Lactococcus lactis* ZGBP5-32

	Sekvenca peptida	Protein	Molekulska masa (Da)	Bioaktivno djelovanje	Referenca
1	KYIPIQYVLS	κ-kazein	1136,68	Antioksidativno	Tonolo i sur. (2020)

**Tablica 13.** Svojstva peptida identificiranih u uzorku mlijeka nakon 48 h inkubacije *Lactococcus lactis* ZGBP5-32

	Sekvenca peptida	Protein	Molekulska masa (Da)	Bioaktivno djelovanje	Referenca
1	KYIPIQYVLS	$\kappa$ -kazein	1136,68	Antioksidativno	Tonolo i sur. (2020)
2	YQEPVLGPVRGPFPIIV	$\beta$ -kazein	1881,08	Imunomodulatorno	Sandre' i sur. (2001)
3	YQEPVLGPVRGPFPIIV			Antitrombinsko	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)
4	YQEPVLGPVRGPFPIIV			Antimikrobno	Birkemo i sur. (2009)
5	YQEPVLGPVRGPFPIIV			ACE-inhibitorno	Yamamoto i sur. (1994)
6	QEPVLGPVRGPFPIIV			ACE-inhibitorno	Lu i sur. (2015)
7	VYPFPGPIP		1100,58	Antioksidativno	Eisele i sur. (2013), Tonolo i sur. (2020)
8	VYPFPGPIP			ACE-inhibitorno	Eisele i sur. (2013)
9	HQP HQPLPPT		1151,60	ACE-inhibitorno	Adams i sur. (2020)

- Antioksidativno djelovanje

Oksidativni stres jedan je od temeljnih uzročnika nastanka velikog spektra bolesti, a posebno je značajan od nastanka i razvitka kardiovaskularnih oboljenja. Karakterizira ga nastanak reaktivnih vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*, ROS), slobodnih radikala superoksida, hidroksilnih radikala te ne-radikalnog vodikovog peroksida, koji izravno djeluju na stanične makromolekule, uključujući DNA, RNA, proteini i lipide (Marcone i sur., 2016).

Antioksidativno djelovanje bioaktivnih peptida ovisi o aminokiselinskom sastavu i položaju samih aminokiselinskih ostataka unutar peptidne sekvence. Osim direktnog uklanjanja štetnih radikala, njihovo antioksidativno djelovanje očituje se i u aktivaciji određenih staničnih puteva. Tonolo i sur. (2020) u svom su istraživanju dokazali pozitivno djelovanje bioaktivnih peptida iz fermentiranih mliječnih proizvoda na stanični odgovor na stres preko Keap1/Nrf2 (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1 / nuclear factor erythroid factor 2*) puta. Tijekom prisutnosti slobodnih radikala u stanici, transkripcijski faktor Nrf2 disocira s Keap1 i prelazi iz citosola u jezgru stanice, gdje stupa u interakciju s promotorskom regijom ARE (engl. *antioxidant response element*). Transkripcijom gena pod ARE povećava se koncentracija antioksidativnih enzima, čime se umanjuje štetno djelovanje slobodnih radikala. *In vitro* i staničnim modelima dokazano je kako stanice tretirane peptidom KYIPIQYVLS (identificiran i u ovom radu) sadržavaju povećanu koncentraciju faktora Nrf2 u jezgrama u usporedbi s



kontrolom, što dokazuje antioksidativno djelovanje ovog bioaktivnog peptida.

- Imunomodulatorno djelovanje

Neispravno djelovanje imunološkog sustava organizma liječi se imunomodulacijom pomoću raznih lijekova čije su nuspojave često nezanemarive. Stoga, imunomodulacija pomoću bioaktivnih peptida pruža potencijalnu alternativu. Imunomodulatorno djelovanje peptida može se definirati kao stimulacije ili inhibicije određenih funkcija imunološkog sustava, koje ovise o dozi, eksperimentalnim uvjetima i biodostupnosti peptida (Reyes-Díaz i sur., 2017).

Dokazano je kako komponente mlijeka,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -kazein, proteini sirutke i laktoferin djeluju pozitivno na proliferaciju limfocita, dok peptidni produkti nastali fermentacijom  $\beta$ -kazeina imunomodulatorno djeluju na mononuklearne stanice i Th stanice. Specifičnije, peptidi Tyr-Gly i Tyr-Gly-Gly te beta kazomorfin 7 i beta kazomorfin 10 značajno pojačavaju proliferaciju limfocita (Marcone i sur., 2016).

Također, dokazano je kako peptidi nastali hidrolizom kazeina stimuliraju fagocitoznu aktivnost makrofaga (Park i Nam, 2015).

Peptid Gly-Leu-Phe značajno je povećao fagocitoznu aktivnost u miševa te spriječio letalnu infekciju *Klebsiella pneumoniae*, te se pozitivno djelovanje ovog peptida uspješno prenijelo i na ljudski model (Reyes-Díaz, 2017).

- Antitrombinsko djelovanje

Peptidi antitrombinskog djelovanja sprječavaju pretvorbu humanog fibrinogena u fibrin na način da inhibiraju aktivnost trombina čime se onemogućava stabilnost tromba, odnosno omogućuje normalna cirkulacija krvotoka bez povećanja pritiska na stijenke vena ili arterija (Pérez-Escalante i sur., 2018).

Prema Marcone i sur. (2016) najvažniji peptid antitrombinskog djelovanja je MAIPPKKNQDK, dobiven iz  $\kappa$ -kazeina. Svojim djelovanjem inhibira ADP-induciran fibrinogen vezajući se na receptor trombocita, što onemogućuje agregaciju i stvaranje tromba. Rendon-Rosales i sur. (2019) svojim su istraživanjem dokazali antitrombinsko djelovanje peptida iz mlijeka fermentiranog uz specifične sojeve *Lactococcus lactis*, što je u korelaciji s rezultatima dobivenim u ovom radu. Rojas-Ronquillo i sur. (2012) provodili su fermentaciju kazeina uz *Lactobacillus casei* Shirota te evaluirali nastale peptide. Najveće antitrombinsko djelovanje zabilježeno je u 27. satu fermentacije te je iznosilo 80,7 %. Pročišćavanjem je dobiveno sedam peptida, od kojih je peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV (identificiran i u ovom radu) bio najaktivniji s antitrombinskim djelovanjem od 4,6 % / koncentracija peptida (mg/mL).

Kazoplatelin (MAIPPKKNQDDK) i KRDS peptidi, nastali iz mliječnih proteina, također su okarakterizirani kao peptidi antitrombinskog djelovanja. Kazoplatelin je peptid čija se sekvence nalazi unutar sekvence  $\kappa$ -kazeina između 106. i 116. aminokiseline te inhibira agregaciju trombocita i povezivanje fibrinogenih vlakna. Sekvenca KRDS peptida nalazi se unutar sekvence ljudskog laktoferina, između 39. i 42. aminokiseline te pokazuje jednako djelovanje (Rojas-Ronquillo i sur., 2012).

- Antimikrobno djelovanje

Antimikrobni peptidi ubijaju ili inhibiraju rast bakterija pomoću raznih mehanizama: razaranje membrane, promjena metabolizma, interakcija s komponentama citoplazme. Ovi mehanizmi predstavljaju novi pristup u razvoju farmaceutskih pripravaka protiv rezistentnih bakterija. Zbog različite kemijske strukture i organizacije stanica, ovi su peptidi selektivno toksični za bakterije te mogu biti korišteni u medicini kao bakteriocini (Esmaeilpour i sur., 2016).

Birkemo i sur. (2009) istraživali su antimikrobnu aktivnost peptida iz goveđeg kolostruma. Identificirana su dva aktivna peptida, kasecidin 17 (YQEPVLGPVRGPFPIV) i kasecidin 15 (YQEPVLGPVRGPFPI), sa sekvencama prisutnim u sekvenci goveđeg  $\beta$ -kazeina. Oba peptida pokazala su jednaku minimalnu inhibitornu koncentraciju protiv bakterije *Escherichia coli* DPC6053 koja je iznosila 0,4 mg/mL. Peptid sa sekvencom jednakom kasecidinu 17 identificiran je i u ovom radu.

Esmaeilpour i sur. (2016) tretirali su kozje mlijeko enzimima tripsinom i ficinom te evaluirali dobivene peptide i njihovo antimikrobno djelovanje. Dobiveni peptidi pokazali su pojačano antimikrobno djelovanje protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Najveće antimikrobno djelovanje protiv *E. coli* i *Bacillus cereus* zabilježeno je kod uzorka mlijeka tretiranim ficinom, s peptidima molekularne mase manjom od 3 kDa. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju kako se peptidi dobiveni razgradnjom kozjeg kazeina ficinom mogu potencijalno koristiti kao antimikrobni agensi u farmaceutskoj industriji. Alboory i sur. (2021) koristili su *Lactobacillus plantarum* IS10 za fermentaciju devinog mlijeka kako bi dokazali antimikrobno djelovanje nastalih peptida na *E. coli* i *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Novoidentificirani peptidi s antimikrobnim djelovanjem pokazuju sličnost u sekvencama s bakteriocinima i peptidima iz baze podataka antimikrobnih peptida (engl. *Antimicrobial Peptides Data base, APD*).

- Inhibicija angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE)

Angiotenzin konvertirajući enzim 1 je peptidildipeptid hidrolaza koja ima ključnu ulogu u regulaciji povišenog krvnog tlaka (hipertenzije). Njegova aktivnost povisuje krvni tlak na način da konvertira angiotenzin I u angiotenzin II, koji je vazokonstriktor, dok razgrađuje bradikinin koji djeluje kao vazodilatator. Iz ovog razloga, ako određena molekula inhibira rad angiotenzin konvertirajućeg enzima (engl. *Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors, ACE-inhibitors*) direktno djeluje i na rad krvožilnog sustava. Peptidi s ACE-inhibitorskim djelovanjem identificirani su u fermentiranim mliječnim proizvodima, uključujući kiselo mlijeko i sir. Iz mlijeka fermentiranog s više sojeva *Lactobacillus helveticus* izolirana su dva tripeptida IPP i VPP, te je njihovo ACE-inhibitorsko djelovanje dokazano kod snižavanja sistoličkog krvnog tlaka ljudi s blagom hipertenzijom. Velik broj peptida s ACE-inhibitorskim djelovanjem (IPP, VPP, VRYL, FFVAP, EKDERF i YPFPGIPN) identificirano i izolirano je iz nekolicine različitih sireva, dok se koncentracija povećava s vremenom sazrijevanja do određene razine (Lu i sur., 2015).

Adams i sur. (2020) u svom su istraživanju identificirali peptide dobivene fermentacijom mlijeka pomoću dva soja BMK. Bioaktivni peptidi pokazali su slično ACE-inhibitorsko djelovanje kao i već poznati VPP i IPP peptidi te pokazuju potencijal korištenja u proizvodnji funkcionalne hrane i probiotika. Jedan od identificiranih i izoliranih peptida je peptid sekvence HQPHQLPPT, koji je također identificiran i u ovom diplomskom radu.

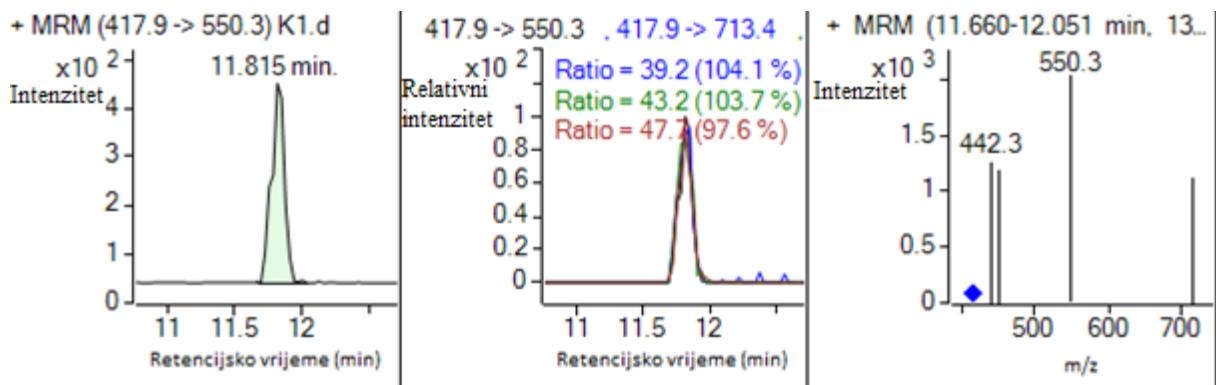
Eisele i sur. (2013) koristili su alkalnu peptidazu izoliranu iz *Bacillus lentus* (BLAP) za hidrolizu kazeina te evaluirali dobivene peptide. Dobivene peptidne frakcije pokazale su ACE-inhibitorsko i antioksidativno djelovanje, dok su najaktivniji izolirani peptidi sekvenca VYPFPGIPN (ACE-inhibitorsko djelovanje) i YQEPVLGPVRGPFPIIV (antioksidativno djelovanje), a koji je identificiran i u ovom radu.

Yamamoto i sur. (1994) tretirali su  $\alpha$ S1- i  $\beta$ -kazein proteinazom izoliranom iz *Lactobacillus helveticus* CP790 te su dobivene peptide testirali na ACE-inhibitorsko djelovanje na sam enzim te u miševima s hipertenzijom. Peptidi iz  $\alpha$ S1- i  $\beta$ -kazeina inhibirali su 50 % djelovanja angiotenzin konvertirajućeg enzima u koncentraciji 4  $\mu$ M, dok je u miševa oralna doza iznosila 15 mg/kg tjelesna masa. Također, ACE-inhibitorsko djelovanje uočeno je i kod mlijeka fermentiranog sa sojem *Lactobacillus helveticus* CP790 te je potrebna doza kod miševa s hipertenzijom iznosila 5 mL/kg tjelesne mase.

### 4.3. CILJANA ANALIZA BIOAKTIVNIH PEPTIDA

Na temelju rezultata neciljane analize uzoraka, za ciljnu analizu, odnosno relativnu kvatifikaciju peptida odabrani su sljedeći peptidi: KYIPIQYVLS, YQEPVLGPVVRGPFPIIV, QEPVLGPVVRGPFPIIV, VYFPFGPIPN, HQPHQPLPPT koji su analizirani MRM metodom opisanom u Poglavlju 3.2.6. Cilj ove analize bio je identificirati te utvrditi zastupljenost peptida sadržanih u uzorcima mlijeka s nacijepljenim sojem ZGBP5-32 nakon inkubacije od 24 i 48 sati.

Reprezentativni primjer rezultata nakon MRM analize peptida TKVIPYVRYL,  $m/z=417,9$  prikazan je na slici 8 koja prikazuje kromatogram MRM, kromatogram fragmentnih iona praćenih tijekom MRM analize te spektar fragmentnih iona nakon fragmentacije ciljanog iona  $m/z=417,9$ .



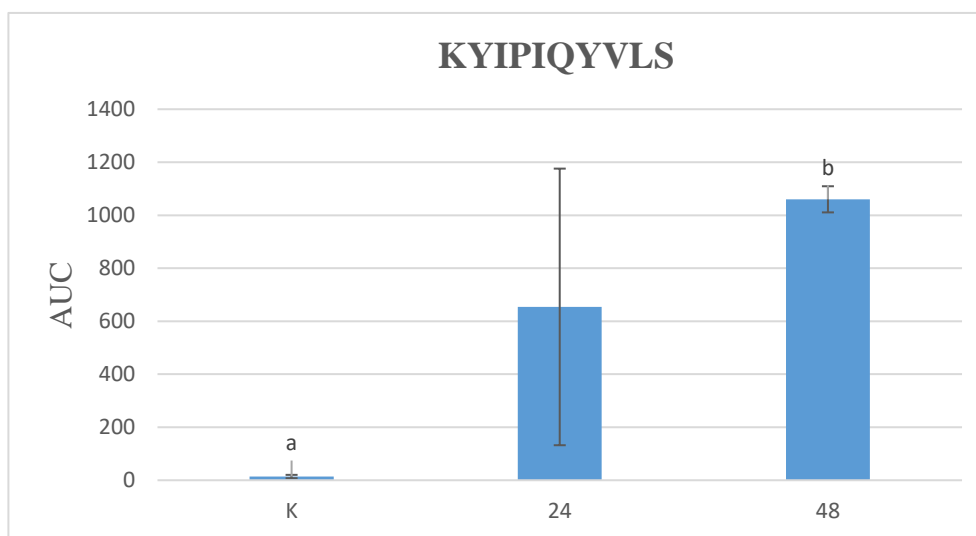
**Slika 8.** Reprezentativni kromatogram MRM, kromatogram fragmentnih iona praćenih tijekom MRM analize te spektar fragmentnih iona dobivenih fragmentacijom iona  $m/z=417,9$

Analizom uzorka provedenom pomoću 6460 TripleQuad LC/MS sustava detektirana su dodatna dva peptida koja neciljanom analizom uzoraka nisu bila identificirana. Sekvence navedenih peptida su: RDMPIQAF i TKVIPYVRYL. Peptidne sekvence uspoređene su sa sekvencama pohranjenim u MBPD bazi. Osim već spomenutog  $\beta$ -kazeina i  $\kappa$ -kazeina kao izvora peptida, u ovom je slučaju peptid TKVIPYVRYL dobiven iz  $\alpha_{S2}$ -kazeina. U tablici 14 prikazani su rezultati pretraživanja i bioaktivno djelovanje identificiranih peptida.

**Tablica 14.** Peptidi identificirani MRM metodom primjenom LC-MS/MS u uzorcima mlijeka nakon 24 i 48 h inkubacije soja ZGBP5-32 te njihovo bioaktivno djelovanje

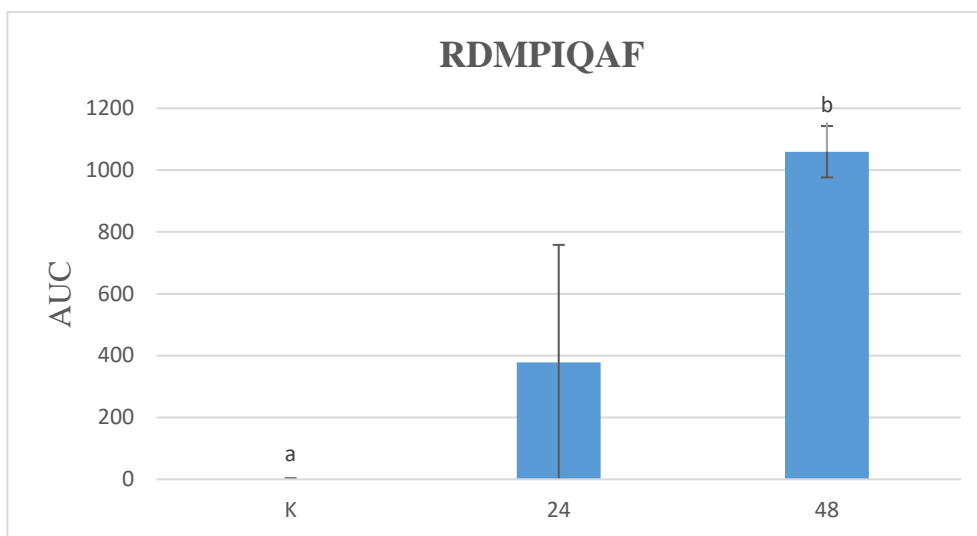
	Sekvenca peptida	Protein	Oznaka uzorka	Bioaktivno djelovanje	Referenca
1	RDMPIQAF	$\beta$ -kazein	24 h	ACE-inhibitorno	Yamamoto i sur. (1994)
			48 h		
2	TKVIPYVRYL	$\alpha_{S2}$ -kazein	K	Antimikrobno	Alvarez- Ordóñez i sur. (2013)
			24 h		
			48 h		

Bioaktivni peptidi KYIPIQYVLS, RDMPIQAF, VYFPFGPIP, HQPHQPLPPT nisu detektirani u uzorcima mlijeka „Veronika“, odnosno u kontrolama. Svi navedeni peptidi detektirani su u uzorcima mlijeka s *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 inkubiranom 24 sati (oznaka na grafu: 24) te 48 sati (oznaka na grafu: 48). Također, detektirana je veća količina peptida u uzorcima mlijeka s nacijepljenom kulturom ZGBP5-32 inkubiranom 48 sati. Navedeni rezultati vidljivi su slikama 9-12. Na grafičkim prikazima vrijednost površine (engl. *area under curve*, AUC) u korelaciji je s količinom detektiranih peptida.

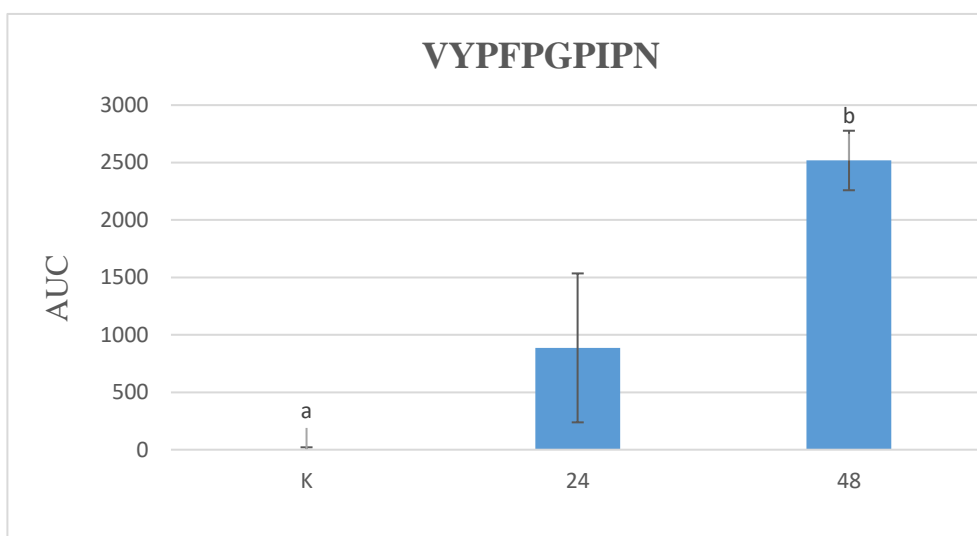


**Slika 9.** Usporedba zastupljenosti peptida KYIPIQYVLS u uzorcima mlijeka prije i nakon 24 i 48 h inkubacije sa sojem ZGBP5-32

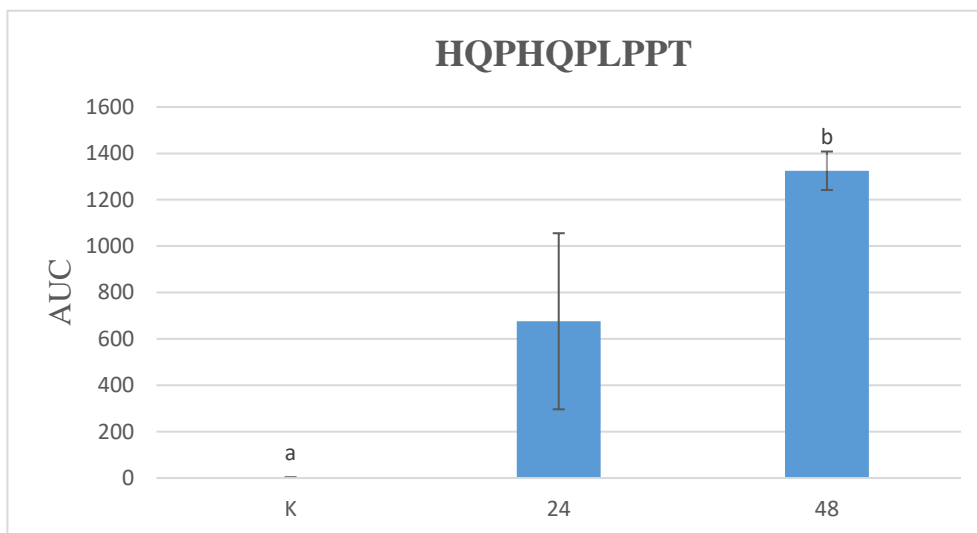
Slova a i b predstavljaju statističko značajnu vrijednost pri usporedbi različitih uzoraka



**Slika 10.** Usporedba zastupljenosti peptida RDMPIQAF u uzorcima mlijeka prije i nakon 24 i 48 h inkubacije sa sojem ZGBP5-32  
Slova a i b predstavljaju statističko značajnu vrijednost pri usporedbi različitih uzoraka



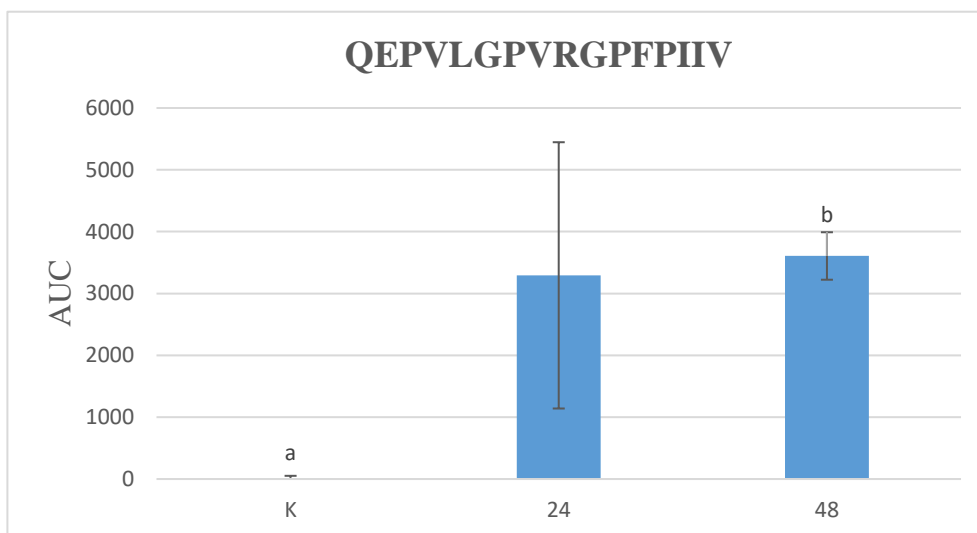
**Slika 11.** Zastupljenost VYFPFGPIP peptida u uzorcima mlijeka prije i nakon 24 i 48 h inkubacije soja ZGBP5-32  
Slova a i b predstavljaju statističko značajnu vrijednost pri usporedbi različitih uzoraka



**Slika 12.** Zastupljenost HQPHQLPPT peptida u uzorcima mlijeka prije i nakon 24 i 48 h inkubacije soja ZGBP5-32

Slova a i b predstavljaju statističko značajnu vrijednost pri usporedbi različitih uzoraka

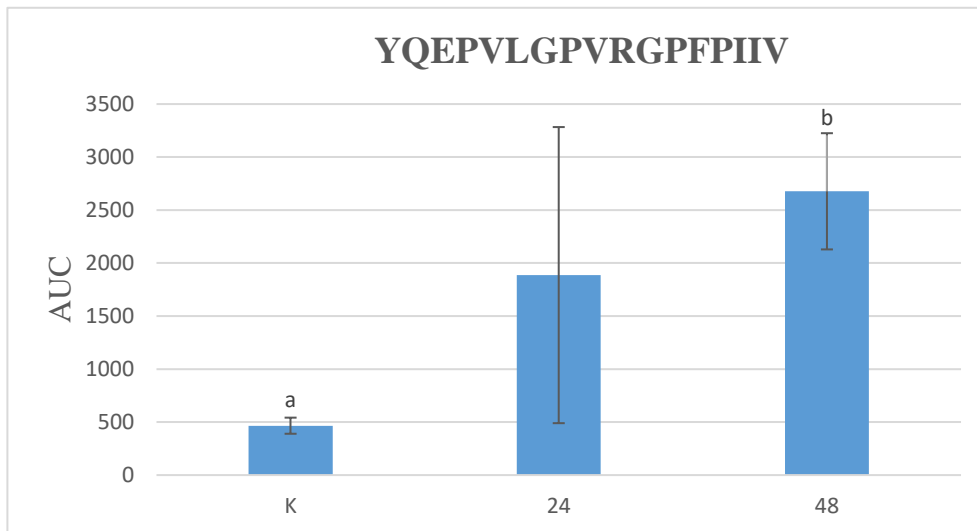
Bioaktivni peptid QEPVLGPVRGPFPIIV detektiran je u uzorcima 24 satne te 48 satne inkubacije u podjednakim količinama dok u samoj kontroli nije detektiran. Odnos zastupljenosti bioaktivnog peptida QEPVLGPVRGPFPIIV u pojedinom uzorku vidljiv je na slici 13.



**Slika 13.** Zastupljenost QEPVLGPVRGPFPIIV peptida u uzorcima mlijeka prije i nakon 24 i 48 h inkubacije soja ZGBP5-32

Slova a i b predstavljaju statističko značajnu vrijednost pri usporedbi različitih uzoraka

Bioaktivni peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV detektiran je u kontroli u malim količinama te je vidljiv porast količine peptida s vremenom inkubacije *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 u mlijeku. Odnos zastupljenosti bioaktivnog peptida YQEPVLGPVRGPFPIIV u pojedinom uzorku vidljiv je na slici 14.

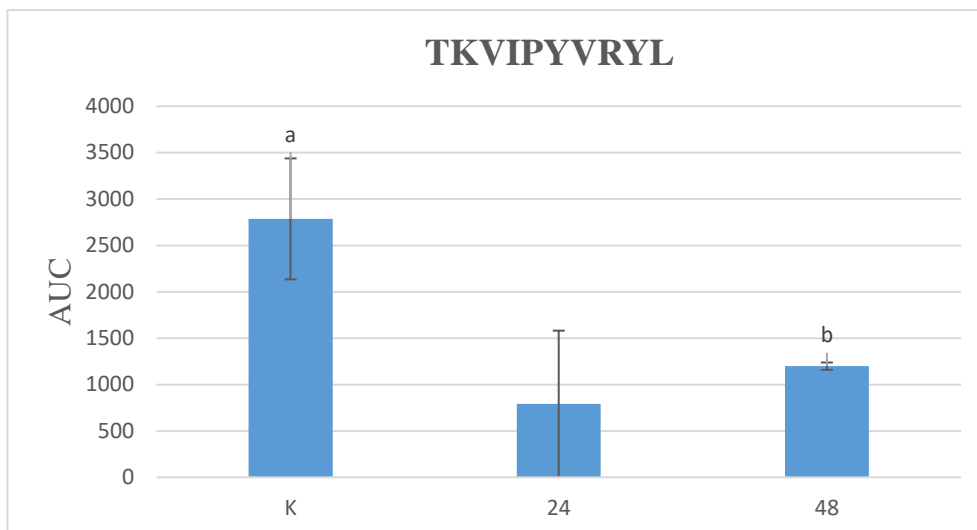


**Slika 14.** Zastupljenost YQEPVLGPVRGPFPIIV peptida u uzorcima mlijeka prije i nakon 24 i 48 h inkubacije soja ZGBP5-32

Slova a i b predstavljaju statističko značajnu vrijednost pri usporedbi različitih uzoraka

Zanimljivo, bioaktivni peptid TKVIPYVRYL detektiran je u kontroli u značajnim količinama s obzirom na uzorke od 24 i 48 satne inkubacije. Odnos zastupljenosti bioaktivnog peptida TKVIPYVRYL u pojedinom uzorku vidljiv je na slici 15.





**Slika 15.** Zastupljenost TKVIPYVRYL peptida u uzorcima mlijeka prije i nakon 24 i 48 h inkubacije soja ZGBP5-32

Slova a i b predstavljaju statistički značajnu vrijednost pri usporedbi različitih uzoraka

Povećanje količine peptida u uzorcima s 24 i 48 satnom inkubacijom sugerira da dolazi do razgradnje kazeina i oslobođenja peptida iz kazeinske strukture. Također, vidljivo je da dulja inkubacija rezultira statistički značajnijom količinom nastalih peptida što je rezultat produljene aktivnosti proteolitičkih enzima BMK.

Peptidi YQEPVLGPVRGPFPIIV i TKVIPYVRYL zastupljeni u kontroli impliciraju da mlijeko “Veronika” i bez dodatka soja ZGBP5-32 sadrži određenu količinu bioaktivnih peptida što dodatno doprinosi funkcionalnosti početnog proizvoda, mlijeka. Vidljivo smanjenje u količini peptida TKVIPYVRYL tijekom inkubacije od 24 i 48 sati potencijalno ukazuje da dolazi do razgradnje ovog peptida u svrhu dobivanja slobodnih aminokiselina potrebnih za rast BMK.

#### 4.4. KROMATOGRAFIJA ISKLJUČIVANJA PREMA VELIČINI

Kako bi se dodatno okarakterizirali identificirani peptidi te utvrdio raspon masa nastalih peptida, provedena je kromatografija isključivanja po veličini. Korišteni su standardi poznatih molekulskih masa i bilježena su retencijska vremena pri kojima pojedini analiti eluiraju s kolone. Nakon dobivenih rezultata analize standarda (tablica 15) izrađena je kalibracijska krivulja ovisnosti logaritamske vrijednosti molekulske mase standarda ( $\log(MW)$ ) o vremenu zadržavanja (slika 5). Iz jednadžbe pravca kalibracijske krivulje izračunate su molekulske mase molekula nastalih proteolitičkim cijepanjem uslijed djelovanja soja ZGBP5-32.

**Tablica 15.** Standardi proteina poznatih molekulskih masa i njihovo vrijeme zadržavanja na kromatografskoj koloni

<b>Protein</b>	<b>Masa (kDa)</b>	<b>RT (min)</b>
<b>BSA</b>	66	5,35
<b>Ovalbumin</b>	44	5,70
<b>Mioglobin</b>	17	6,26
<b>RNAza A</b>	13,7	6,50
<b>Vitamin B12</b>	1,35	9,61

Usporedbom elucijskih profila prikazanih na slici 16 vidljiv je sličan profil u uzorcima mlijeka nakon fermentacije u trajanju od 24 i 48 sati, dok se profil uzorka kontrole razlikuje.

U uzorcima kontrole veći je udio molekula većih molekulskih masa od 26,2-71,2 kDa koji eluiraju s kromatografske kolone između 4,5-6 min te je vidljivo da signali analita koji eluiraju približno nakon 4,95 i 5,05 min nisu detektirani u uzorcima mlijeka nakon inkubacije od 24 i 48 sati.

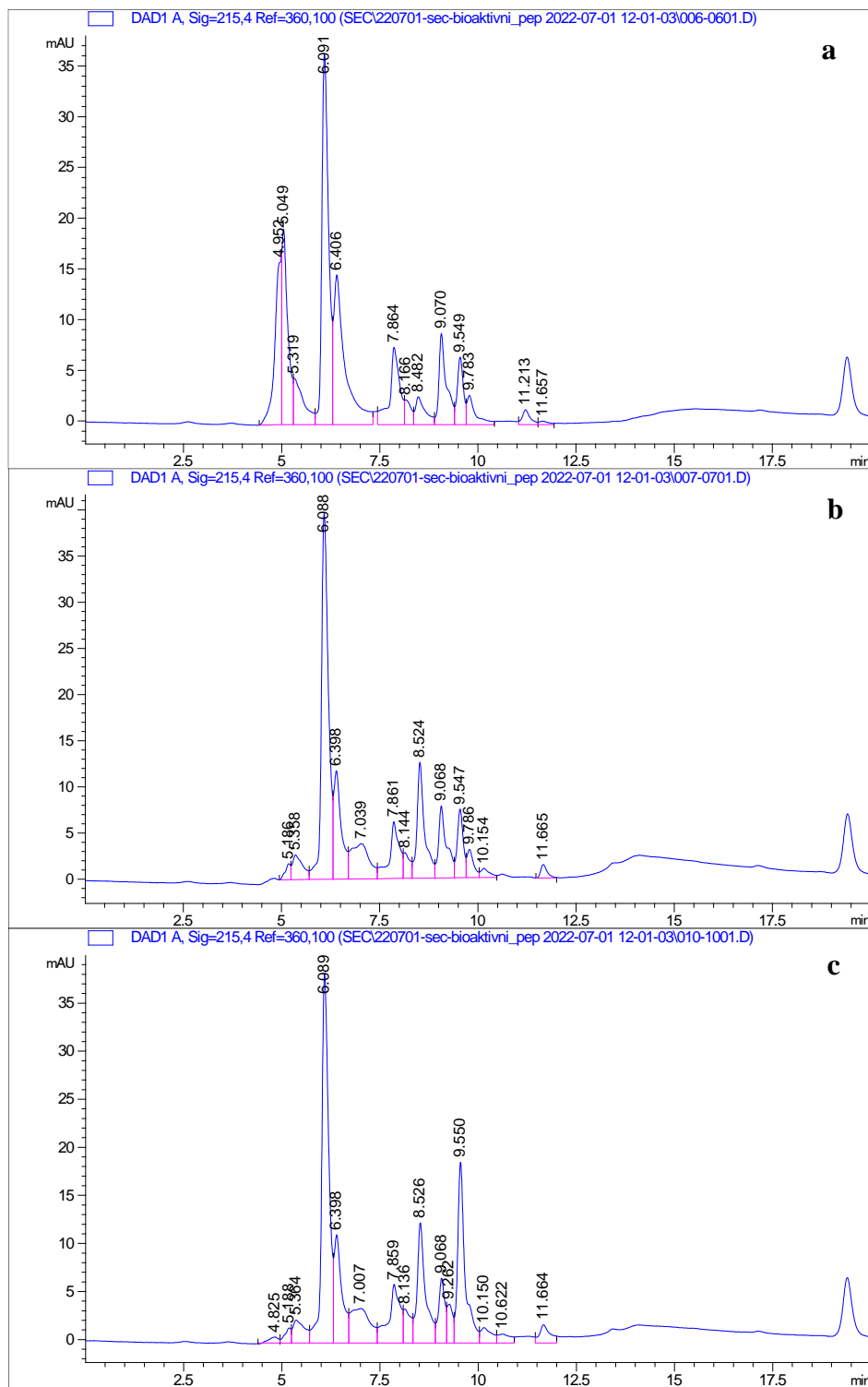
U uzorcima mlijeka nakon fermentacije od 24 i 48 sati u vremenu elucije između 5,1-7 min uočena su dva signala koja nisu vidljiva u kontroli te odgovaraju molekulskim masama u iznosu od otprilike 11 kDa i 58 kDa.

U vremenu eluiranja između 7,9-9,8 min vidljiv je gotovo identičan peptidni profil u svim uzorcima gdje s kromatografske kolone izlaze peptidi s odgovarajućim molekulskim masama u iznosu od 5kDa, 4kDa, 3kDa, 2kDa, 1,3kDa, 1kDa, no najveći intenzitet signala vidljiv je u uzorku 48h.

Tijekom 10,2 min eluiraju molekule koje odgovaraju molekulskoj masi od 0,7 kDa te se isti pojavljuje samo u uzorcima 24 h i 48 h. U vremenu elucije od 10,6 min uočen je signal u uzorku 48 h dok se u ostalim uzorcima nije detektiran. Također je vidljivo da se u uzorcima 24

i 48 sati inkubacije ne javlja pik, zabilježen u uzorku kontrole u vremenu elucije koje iznosi 11,2 min i čija molekulska masa iznosi 0,3 kDa.

Proteolitička aktivnost soja ZGBP5-32 očituje se u smanjenju intenziteta određenih signala prisutnih u rezultatima kontrolnog uzorka i pojavljivanju novih signala manjih molekulskih masa u uzorcima inkubacije od 24 i 48 sati. Stoga je iz dobivenih rezultata vidljivo da dolazi do razgradnje proteina iz mlijeka te do nastanka peptida s potencijalnim bioaktivnim djelovanjem što dodatno dokazuje proteolitičku aktivnost soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-32.



**Slika 16.** Usporedba elucijskih profila peptida dobivenih kromatografijom isključenjem prema veličini čestica, prije (a), i nakon 24 h (b) i 48 h (c) inkubacije soja ZGBP5-32 u mlijeku

## 5. ZAKLJUČCI

1. Najbolju proteolitičku aktivnost biomase i supernatanta kulture od svih ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline pokazao je soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-32, što je rezultat enzimske aktivnosti proteinaza vezanih za staničnu membranu i proteinaza prisutnih u izvanstaničnom prostoru.
2. Neciljanom analizom peptida identificirani su bioaktivni peptidi (KYIPIQYVLS, YQEPVLGPVRGPFPIIV, QEPVLGPVRGPFPIIV, VYPFPGPIP, HQPHQPLPPT) za koje je utvrđeno i u znanstvenoj literaturi opisano antioksidativno, imunomodulatorno, antitrombinsko, antimikrobno i ACE-inhibitorno djelovanje.
3. Ciljanom analizom peptida identificirana su dva dodatna peptida s bioaktivnim djelovanjem: RDMPIQAF i TKVIPYVRYL.
4. Ciljanom analizom peptida dokazano je da nakon 48 h inkubacije soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 u mlijeku nastaje statistički više bioaktivnih peptida nego nakon 24 h inkubacije, dok u kontroli nisu detektirani. Povećana količina bioaktivnih peptida rezultat je produljenog vremena cijepanja peptidnih veza unutar kazeinske strukture.
5. Smanjenje količine peptida TKVIPYVRYL s vremenom inkubacije sugerira da soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-32 provodi razgradnju peptida te dolazi do nastanka aminokiselina potrebnih za njegov rast.

## 6. LITERATURA

Adams C, Sawh F, Green-Johnson JM, Jones Taggart H, Strap JL (2020) Characterization of casein-derived peptide bioactivity: Differential effects on angiotensin-converting enzyme inhibition and cytokine and nitric oxide production. *J Dairy Sci* **103**, 5805–5815. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17976>

Algboory HL, Muhialdin BJ (2021) Novel peptides contribute to the antimicrobial activity of camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum* IS10. *Food Control* **126**, 108057. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108057>

Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Clifford T, Deasy T, Considine K, Hill C (2013) Structure-Activity Relationship of Synthetic Variants of the Milk-Derived Antimicrobial Peptide  $\alpha$ s2-Casein f(183–207). *Appl Environ Microb* **79**, 5179–5185. <https://doi.org/10.1128/aem.01394-13>

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. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.02.004>

Birkemo GA, O’Sullivan O, Ross RP, Hill C (2009) Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *J Appl Microbiol* **106**, 233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03996.x>

Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B (2021) Eating fermented: Health benefits of LAB-fermented foods. *Foods* **10**, 2639. <https://doi.org/10.3390/foods10112639>

Ćurin K, Cetinić E (2007) Zdravstvena ispravnost i važnost mlijeka i mliječnih proizvoda. *Med Jad* **37**, 15-28.

Dalgleish DG (2011) On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft matter* **7**, 2265-2272. <https://doi.org/10.1039/C0SM00806K>

Daliri EBM, Oh DH, Lee BH (2017) Bioactive peptides. *Foods* **6**, 32.

Eisele T, Stressler T, Kranz B, Fischer L (2013) Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using *Bacillus lentus* alkaline peptidase. *Eur Food Res Technol* **236**, 483–490. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1894-5>

Esmailpour M, Ehsani MR, Aminlari M, Shekarforoush S, Hoseini E (2016) Antimicrobial activity of peptides derived from enzymatic hydrolysis of goat milk caseins. *Comp Clin Pathol* **25**, 599–605. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2237-x>

Fan M, Guo T, Li W, Chen J, Li F, Wang C, i sur. (2019) Isolation and identification of novel casein-derived bioactive peptides and potential functions in fermented casein with *Lactobacillus helveticus*. *Food Sci Hum Wellness* **8**, 156–176. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.010>

Fox PF (2008) Milk proteins. U: Thompson A, Boland M, Singh H (ured.) Milk: an overview, 1 izd., Academic Press, Cambridge, str. 1-54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00001-5>

Haug A, Høstmark AT, Harstad OM (2007) Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids Health Dis* **6**, 1-16. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>

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

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. str. 3-41. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5_1)

Leeuwendaal NK, Stanton C, O'Toole PW, Beresford TP (2022) Fermented Foods, Health and the Gut Microbiome. *Nutrients* **14**, 1527. <https://doi.org/10.3390/nu14071527>

Lim YH, Foo HL, Loh TC, Mohamad R, Abdullah N (2019) Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *J Anim Sci Biotechnol* **10**. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0323-z>

Lu Y, Govindasamy-Lucey S, Lucey JA (2016) Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *J Dairy Sci* **99**, 41–52. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9569>

Marcone S, Belton O, Fitzgerald DJ (2016) Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol* **83**, 152–162. <https://doi.org/10.1111/bcp.13002>

Mathur H, Beresford TP, Cotter PD (2020) Health benefits of lactic acid bacteria (LAB) fermentates. *Nutrients* **12**, 1679. <https://doi.org/10.3390/nu12061679>

Microsoft Corporation (2010) Microsoft Office Excel (Version 365). <https://www.microsoft.com/hr-hr/microsoft-365/excel> Pristupljeno 21. ožujka 2022.

Mora-Villalobos JA, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano, i sur. (2020) Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation* **6**, 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>

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

Novak J, Leboš Pavunc A, Butorac K, Banić M, Čuljak N, Kos B, i sur. (2021) Caseinolytic proteases of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains isolated from fermented dairy products. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* **72**, 11-21.

Park YW, Nam MS (2015) Bioactive peptides in milk and dairy products: a review. *Korean J Food Sci Anim Resour* **35**, 831. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.6.831>

Peighambardoust SH, Karami Z, Pateiro M, Lorenzo JM (2021) A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. *Biomolecules* **11**, 631. <https://doi.org/10.3390/biom11050631>

Pérez-Escalante E, Jaimez-Ordaz J, Castañeda-Ovando A, Contreras-López E, Añorve-Morga J, González-Olivares LG (2018) Antithrombotic activity of milk protein hydrolysates by lactic acid bacteria isolated from commercial fermented milks. *Braz Arch Biol Technol* **61**. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018180132>

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

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

Rendon-Rosales MÁ, Torres-Llenez MJ, González-Córdova AF, Hernández-Mendoza A, Mazorra-Manzano MA, Vallejo-Cordoba B (2019) *In Vitro* Antithrombotic and Hypocholesterolemic Activities of Milk Fermented with Specific Strains of *Lactococcus lactis*. *Nutrients* **11**, 2150. <https://doi.org/10.3390/nu11092150>

Reyes-Díaz A, González-Córdova AF, Hernández-Mendoza A, Reyes-Díaz R, Vallejo-Cordoba B (2017) Immunomodulation by hydrolysates and peptides derived from milk proteins. *Int J Dairy Technol* **71**, 1–9. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12421>

Rojas-Ronquillo R, Cruz-Guerrero A, Flores-Nájera A, Rodríguez-Serrano G, Gómez-Ruiz L, Reyes-Grajeda JP, i sur. (2012) Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Intl Dairy J* **26**, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.05.002>

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

Sandré C, Gleizes A, Forestier F, Gorges-Kergot R, Chilmonczyk S, Léonil J i sur. (2001). A peptide derived from bovine  $\beta$ -casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germfree and human flora-associated mice. *J Nutr* **131**, 2936-2942. <https://doi.org/10.1093/jn/131.11.2936>

Tonolo F, Fiorese F, Moretto L, Folda A, Scalcon V, Grinzato A, i sur. (2020) Identification of New Peptides from Fermented Milk Showing Antioxidant Properties: Mechanism of Action. *Antioxidants* **9**, 117. <https://doi.org/10.3390/antiox9020117>



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

Yamamoto N, Akino A, Takano T (1994) Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* **77**, 917–922. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(94\)77026-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(94)77026-0)

Yukalo V, Krupa O (2017) Proteolytic systems of lactic acid microorganisms: a review. *Ukr Food J* **6**, 416-432.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ana Tarandek

Vlastoručni potpis