

Identifikacija i kvantifikacija bioaktivnih peptida proizvedenih s pomoću soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51

Rušanac, Anamarija

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:159:495075>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Anamarija Rušanac

**IDENTIFIKACIJA I
KVANTIFIKACIJA BIOAKTIVNIH
PEPTIDA PROIZVEDENIH S
POMOĆU SOJA *Lactococcus lactis*
ZGBP5-51**

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

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.

Ovim se putem želim zahvaliti prof. dr. sc. Blaženki Kos za sav uloženi trud, preneseno znanje i pristupačnost tijekom cijelog procesa studiranja. Veliko hvala na pruženoj prilici i poticajnom mentorstvu kroz cijelu izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na svojoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Neizmjerne sam zahvalna dr. sc. Ani Butorac na nesebičnom prenošenju znanja u području proteomike, stručnom vodstvu i prijateljskom pristupu tijekom provođenja eksperimenta. Veliko hvala na uloženom vremenu i trudu te pristupačnosti i strpljenju tijekom cijele izrade ovog diplomskog rada. Velike zahvale cijelom timu BIOCentra na toploj atmosferi, pristupačnosti i dodijeljenim savjetima.

Hvala mojoj obitelji na poticaju i podršci koje mi pružaju kroz život te koje su mi pružili tijekom cijelog studiranja. Zahvaljujem se i na svom strpljenju koje ste imali ovih pet godina mog studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika,
enzima, probiotika i starter kultura

Diplomski rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA BIOAKTIVNIH PEPTIDA PROIZVEDENIH S POMOĆU SOJA *Lactococcus lactis* ZGBP5-51

Anamarija Rušanac, univ. bacc. ing. biotechn., 0058213553

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada bio je identificirati i kvantificirati bioaktivne peptide nastale u uzorcima mlijeka tijekom fermentacije proteolitičkom aktivnošću radnog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Identifikacija bioaktivnih peptida provedena je spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije i spektrometrije masa LC-MALDI-TOF/TOF, a relativna kvantifikacija identificiranih bioaktivnih peptida spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije, višestrukog praćenja reakcije i spektrometrije masa LC-MRM-MS. Ne-ciljanom analizom identificirani su bioaktivni peptidi TKVIPYVRYL, VYFPFGPIP, ARHPHLSFM, KYIPIQYVL, QEPVLGPVRGPFPIIV, IQPKTKVIPYVRYL i YQEPVLGPVRGPFPIIV, dok su ciljanom analizom identificirana još tri bioaktivna peptida: RDMPIQAF, SQSKVLPVPQKAVPYPQ i LYQEPVLGPVRGPFPIIV. U znanstvenoj literaturi za navedene peptide utvrđeno je i opisano ACE-inhibitorno (antihipertenzivno), antitrombotično, antioksidativno, antimikrobno i imunomodulatorno djelovanje. Ciljanom analizom uspješno je kvantificirano osam prethodno identificiranih bioaktivnih peptida. Konačno, statistički značajan porast koncentracije, nakon 48 sati fermentacije, dokazan je za šest peptida: RDMPIQAF, VYFPFGPIP, QEPVLGPVRGPFPIIV, SQSKVLPVPQKAVPYPQ, YQEPVLGPVRGPFPIIV i ARHPHLSFM.

Ključne riječi: bioaktivni peptidi, *Lactococcus lactis* ZGBP5-51, proteolitički sustav, kazein

Rad sadrži: 59 stranica, 13 slika, 18 tablica, 88 literaturnih navoda, 1 prilog

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, viša znan. sur., BICRO BIOCentar d.o.o.

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac, Nina Čuljak, mag. ing. biotechn., Željka Stanečić, mag. ing.

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: 14. srpnja, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic
and Starter Culture Technologies

Graduate Thesis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF BIOACTIVE PEPTIDES PRODUCED BY *Lactococcus lactis* ZGBP5-51

Anamarija Rušanac, univ. bacc. ing. biotechn., 0058213553

Abstract: The aim of this thesis was to identify and quantify bioactive peptides produced during milk fermentation by proteolytic activity of the strain *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Identification of bioactive peptides was performed using the liquid chromatography and mass spectrometry LC-MALDI-TOF/TOF technique, while relative quantification of identified bioactive peptides was performed using the liquid chromatography, multiple reaction monitoring and mass spectrometry LC-MRM-MS technique. The non-targeted analysis identified bioactive peptides TKVIPYVRYL, VYFPFGPIPN, ARHPHPLSFM, KYIPIQYVL, QEPVLGPVRGPFPIIV, IQPKTKVIPYVRYL, and YQEPVLGPVRGPFPIIV, while the targeted analysis identified three additional bioactive peptides: RDMPIQAF, SQSKVLPVPQKAVPYPQ, and LYQEPVLGPVRGPFPIIV. ACE-inhibitory (antihypertensive), antithrombotic, antioxidant, antimicrobial, and immunomodulatory effects have been determined and described in the scientific literature for the aforementioned peptides. Through targeted analyses, eight previously identified bioactive peptides were successfully quantified. Finally, statistically significant increase in concentration, after 48 hours of fermentation, was detected for six previously identified bioactive peptides: RDMPIQAF, VYFPFGPIPN, QEPVLGPVRGPFPIIV, SQSKVLPVPQKAVPYPQ, YQEPVLGPVRGPFPIIV and ARHPHPLSFM.

Keywords: bioactive peptides, *Lactococcus lactis* ZGBP5-51, proteolytic system, casein

Thesis contains: 59 pages, 13 figures, 18 tables, 88 references, 1 supplement

Original in: Croatian

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

Mentor: *Blaženka Kos, PhD, Full professor*

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

Technical support and assistance: *Katarina Butorac, PhD, Nina Čuljak, mag. ing., Željka Stanečić, mag. ing.*

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: 14th July, 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BIOAKTIVNE KOMPONENTE MLIJEKA	2
2.2.1. Kazein.....	3
2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI PORIJEKLOM IZ MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA	4
2.2.1. Vrste i fiziološke funkcije bioaktivnih peptida.....	5
2.2.2. Bioaktivni peptidi kao potencijalni bioterapeutici.....	8
2.3. ULOGA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI BIOAKTIVNIH PEPTIDA	9
2.3.1. Mikrobna fermentacija bakterijama mliječne kiseline	9
2.3.2. Proteolitički sustav vrste <i>Lactococcus lactis</i>	11
2.3.2.1. <i>Proteinaze stanične ovojnice</i>	12
2.3.2.2. <i>Transportni sustav</i>	13
2.3.2.3. <i>Intracelularne peptidaze</i>	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Radni mikroorganizam	16
3.1.2. Hranjive podloge	16
3.1.3. Uzorci za analizu	17
3.1.4. Laboratorijski uređaji	17
3.1.5. Laboratorijski pribor.....	18
3.1.6. Kemikalije	19
3.1.7. Otopine	19
3.1.8. Programi i baze podataka	20
3.2. METODE RADA	21

3.2.1. Održavanje i čuvanje radnog mikroorganizma.....	21
3.2.2. Uzgoj radnog mikroorganizma i priprema uzoraka za analizu.....	21
3.2.3. Određivanje pH vrijednosti	21
3.2.4. Određivanje sadržaja ukupnog udjela (%) mliječne kiseline	22
3.2.5. Indirektna metoda određivanja broja živih stanica.....	22
3.2.6. Liofilizacija uzoraka za analizu	23
3.2.7. Ne-ciljana analiza peptida iz uzoraka mlijeka Veronika	23
3.2.7.1. Priprema uzoraka za nano-LC	24
3.2.7.2. Priprema MALDI pločice	24
3.2.7.3. Priprema CHCA matrice za MALDI – TOF/TOF MS.....	24
3.2.7.4. Pročišćavanje i separacija peptida te sakupljanje frakcija.....	26
3.2.7.5. Analiza peptida spektrometrom masa MALDI – TOF/TOF	28
3.2.7.6. Identifikacija peptida	30
3.2.8. Ciljana analiza peptida iz uzoraka mlijeka Veronika	31
3.2.8.1. Priprema uzoraka za MRM metodu.....	31
3.2.8.2. Parametri za separaciju peptida.....	32
3.2.8.3. Parametri ionskog izvora.....	33
3.2.8.4. MRM tranzicije	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. UZGOJ <i>L. lactis</i> ZGBP5-51 I ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA INDIREKTNOM METODOM.....	34
4.1.2. Utjecaj rasta <i>L. lactis</i> ZGBP5-51 na postotak (%) mliječne kiseline u uzorku te promjenu pH vrijednosti.....	35
4.2. NE-CILJANA ANALIZA PEPTIDA IZ UZORAKA MLIJEKA VERONIKA ...	37
4.2.1. ACE-inhibitorni peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka.....	41
4.2.2. Antitrombotični peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka	42
4.2.3. Antioksidativni peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka	43
4.2.4. Antimikrobni peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka	44

4.2.5. Imunomodulatorni peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka.....	44
4.3. CILJANA ANALIZA PEPTIDA IZ UZORAKA MLIJEKA VERONIKA.....	45
5. ZAKLJUČCI.....	49
6. LITERATURA	50
7. PRILOZI	

1. UVOD

Hidrolizati proteina (engl. *protein hydrolysate*) bogati su izvor bioaktivnih peptida koji posjeduju brojna svojstva s pozitivnim učinkom na zdravlje ljudi (Abeer i sur., 2021). Veliki broj znanstvenih istraživanja pokazao je da su mlijeko i fermentirani mliječni proizvodi najbolji izvor bioaktivnih peptida (Sánchez i Vázquez, 2017; Mohanty i sur., 2016). Pri tome se većina bioaktivnih peptida oslobađa razgradnjom kazeina i nešto manje razgradnjom proteina sirutke.

Bioaktivni peptidi su specifični fragmenti proteina koji, osim nutritivne vrijednosti, imaju i pozitivna fiziološka svojstva (Dietrich i sur., 2013). Oslobađaju se degradacijom proteina koja se provodi na tri načina: (1) *in vitro* hidrolizom djelovanjem probavnih enzima, (2) mikrobnom fermentacijom s proteolitičkim starter kulturama i (3) hidrolizom enzimima izvedenim iz mikroorganizama i biljaka (Korhonen i Pihlanto, 2006). Bioaktivni peptidi, oslobođeni iz mliječnih proteina, pokazuju brojne fiziološke funkcije na gastrointestinalni, kardiovaskularni, imunološki, endokrini i živčani sustav. Ova svojstva peptida uključuju antihipertenzivne, antimikrobne, antioksidativne, antitrombotičke, opioidne, antiapetizirajuće i imunomodulatorne aktivnosti te sposobnost vezanja minerala (Park i Nam, 2015).

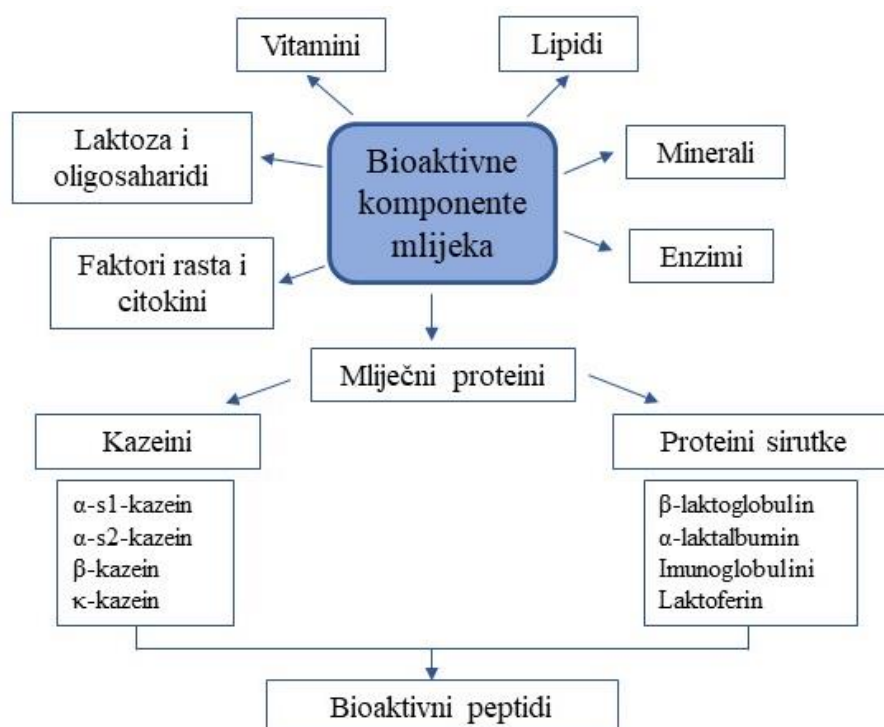
Bakterije mliječne kiseline (BMK) ubrajaju se u probiotičke bakterije te posjeduju GRAS status (engl. *Generally Regarded As Safe*). Osim što su sigurne za ljudsku upotrebu u hrani i terapeutcima, zbog dobrih karakteristika BMK se koriste i za proizvodnju spojeva koji imaju poželjna svojstva. U ovom radu proučavalo se oslobađanje bioaktivnih peptida iz mliječnih proteina djelovanjem proteolitičkog sustava radnog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Poznato je da vrsta *L. lactis* ima dobro razvijen proteolitički sustav zbog čega je očekivana značajna razgradnja mliječnih proteina, a time i oslobađanje velikog broja bioaktivnih peptida.

Cilj ovog diplomskog rada bio je identificirati i kvantificirati bioaktivne peptide nastale u uzorcima mlijeka Veronika nakon fermentacije provedene djelovanjem radnog soja *L. lactis* ZGBP5-51. Identifikacija bioaktivnih peptida provedena je spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije i tandem spektrometrije masa nano-LC-MS/MS uz korištenje računalnog programa ProteinScape (verzija 3.0) s ugrađenom SwissProt bazom podataka. Relativna kvantifikacija identificiranih bioaktivnih peptida provedena je spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije, višestrukog praćenja reakcije i spektrometrije masa LC-MRM-MS uz primjenu MassHunter Workstation softvera, verzija B.08.00. Statistička analiza rezultata provedena je pomoću JASP programa, verzija 0.17.1.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOAKTIVNE KOMPONENTE MLIJEKA

Mlijeko se zbog dobrog sastava makro- i mikronutrijenata smatra najkompletnijom prirodnom namirnicom. Poznato je da mlijeko sadrži brojne bioaktivne komponente koje štite ljude od bolesti i patogena; kao što su imunoglobulini, antimikrobni proteini i peptidi, oligosaharidi, lipidi te mnoge druge komponente sa značajnim doprinosom na zdravlje ljudi (Park, 2009; slika 1). Među bioaktivnim komponentama mlijeka, proteini imaju ključnu ulogu kao hranjive tvari i kao izvor bioaktivnih peptida za koje se pokazalo da imaju brojne fiziološke funkcije s pozitivnim učinkom na zdravlje. Većina tih peptida potječe iz α -s1-kazeina, zatim iz β -kazeina i α -s2-kazeina te nešto manje peptida potječe iz κ -kazeina i proteina sirutke (Baum i sur., 2013).



Slika 1. Shematski prikaz glavnih bioaktivnih komponenata mlijeka (prema Lucarini, 2017)

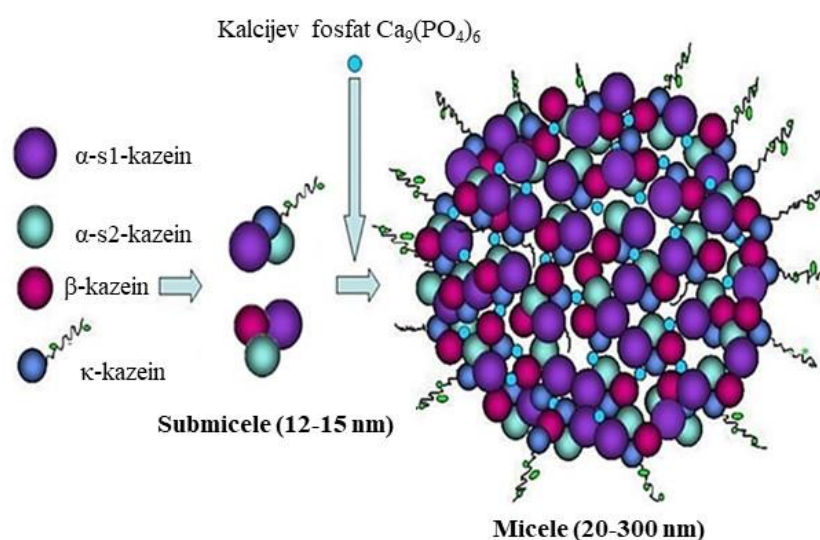
U kravljem mlijeku, oko 80 % prisutnih proteina čine kazeini, dok 20 % čine proteini sirutke. Osim već poznate vrijednosti proteina kao izvora esencijalnih aminokiselina, dokazano je i njihovo fiziološko djelovanje u organizmu preko bioaktivnih peptida. Peptidi su unutar molekule proteina u latentnom ili inaktivnom obliku, ali se iz strukture proteina mogu

osloboditi enzimskom razgradnjom. Tako oslobođeni peptidi posjeduju određena bioaktivna svojstva, a u pravilu su duljine od 3 do 20 aminokiselina (Korhonen i Pihlanto-Leppälä, 2004). Zbog već poznatih pozitivnih svojstava mlijeka i mliječnih proizvoda, zadnjih nekoliko desetljeća značajno raste interes za istraživanjima u ovom području, a osobit značaj pridaje se istraživanju funkcija bioaktivnih peptida.

2.2.1. Kazein

Kazein (lat. *caseus*; sir) predstavlja skupinu fosfoproteina i čini oko 80 % proteina u kravljem mlijeku. Složene je strukture i heterogenog sastava, a prvenstveno je izgrađen od α -s1- i α -s2-kazeina, β -kazeina te κ -kazeina. Kazeine karakterizira neuobičajeno visok udio prolina (~16 % aminokiselina) i izrazito nizak udio cisteina. Ovakav sastav proteina onemogućava stvaranje disulfidnih mostova i formiranje α -uzvojnice, koji su karakteristični za većinu proteina. Nadalje, fosfoproteini imaju visok afinitet za vezanje kalcija i hidrofobni su, što ih čini netopljivima u vodi (Bhat i sur., 2016).

U sirovom mlijeku, kazein se nalazi u obliku malih koloidnih čestica koje se nazivaju micela kazeina, a svrha takve strukture kazeina je zadržavanje topljivosti u vodi (Slika 2). Micela kazeina sastoji se od središnje hidrofobne jezgre koju čine α -s1-, α -s2- i β -kazeini te vanjskog hidrofilnog sloja kojeg gradi κ -kazein (Horne, 2006; Wal, 2001). Zbog prethodno spomenutog visokog udjela prolina, micela kazeina su otvorene strukture i kao takve su vrlo podložne proteolizi (Tratnik i Božanić, 2012).



Slika 2. Shematski prikaz strukture submicela i micela kazeina međusobno povezanih kalcijevim fosfatom (prema Rebouillat i Ortega-Requena, 2015)

Osim navedenih svojstava micela, poznato je da su kazeini dobar izvor bioaktivnih peptida. Brojnim znanstvenim istraživanjima, *in vitro* i *in vivo*, pokazano je da peptidi porijeklom iz različitih vrsta kazeina pokazuju jedno ili više bioaktivnih svojstava s pozitivnim učincima na zdravlje ljudi. Primjerice, bioaktivni peptidi iz kazeina imaju zabilježeno antikancerogeno, imunomodulatorno, antimikrobno, antiviralno i antihipertenzivno djelovanje (Davoodi i sur., 2016).

2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI PORIJEKLOM IZ MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA

Bioaktivni peptidi definiraju se kao specifični fragmenti proteina koji, osim nutritivne vrijednosti, imaju i pozitivne fiziološke učinke na zdravlje ljudi (Dietrich i sur., 2013). Svrstavaju se u dvije glavne skupine: endogeni i egzogeni peptidi. Endogeni peptidi proizvode se u različitim vrstama stanica, primjerice živčanim stanicama (analgetici i opioidni peptidi) ili imunološkim stanicama (protuupalni i antimikrobni peptidi), te u raznim žlijezdama u cijelom organizmu (hipofiza i nadbubrežne žlijezde). Egzogeni peptidi u organizam mogu biti uneseni iz različitih izvora, poput hrane, dodataka prehrani i lijekova (Lorenzo i sur., 2018).

Proteini iz hrane, biljnog ili životinjskog porijekla, dobar su izvor bioaktivnih peptida. Pri tome se mliječni proteini, kazeini i proteini sirutke, smatraju najboljim izvorom bioaktivnih peptida. Zbog pozitivnih fizioloških svojstava, bioaktivni peptidi porijeklom iz mlijeka i mliječnih proizvoda imaju potencijal za primjenu u hrani ili farmaceutskim proizvodima, a u današnje vrijeme se sve više usmjeravaju na kronične bolesti povezane s prehranom, osobito na bolesti kardiovaskularnog sustava, pretilost i dijabetes (Mohanty i sur., 2016).

Većina bioaktivnih peptida je unutar sekvence mliječnih proteina u inaktivnom ili latentnom obliku, a potpuna aktivnost ostvaruje se nakon proteolitičke razgradnje i oslobađanja bioaktivnog peptida iz strukture izvornog proteina (Park i Nam, 2015). Postoje različiti mehanizmi razgradnje proteina kojima se bioaktivni peptidi oslobađaju iz proteinskog prekursora: (1) *in vivo* gastrointestinalnom probavom pomoću probavnih enzima ili enzima crijevne mikroflore; (2) mikrobnom fermentacijom proteolitičkim starter kulturama i (3) hidrolizom enzimima izvedenim iz mikroorganizama i biljaka (Korhonen i Pihlanto, 2006).

Tako oslobođeni bioaktivni peptidi, iz strukture izvornog proteina, pokazuju jedno ili više funkcionalnih svojstava kojima pozitivno utječu na organizam ljudi. Pri tome, prvenstveno pokazuju učinak na gastrointestinalni, kardiovaskularni, imunološki, endokrini i živčani sustav. Radi pozitivnih učinka peptida dobivenih iz mlijeka te isplativosti korištenja mlijeka kao izvora biološki aktivnih peptida, raste interes za istraživanjem funkcionalnih svojstava bioaktivnih peptida te mogućnosti njihove primjene kao bioterapeutika.

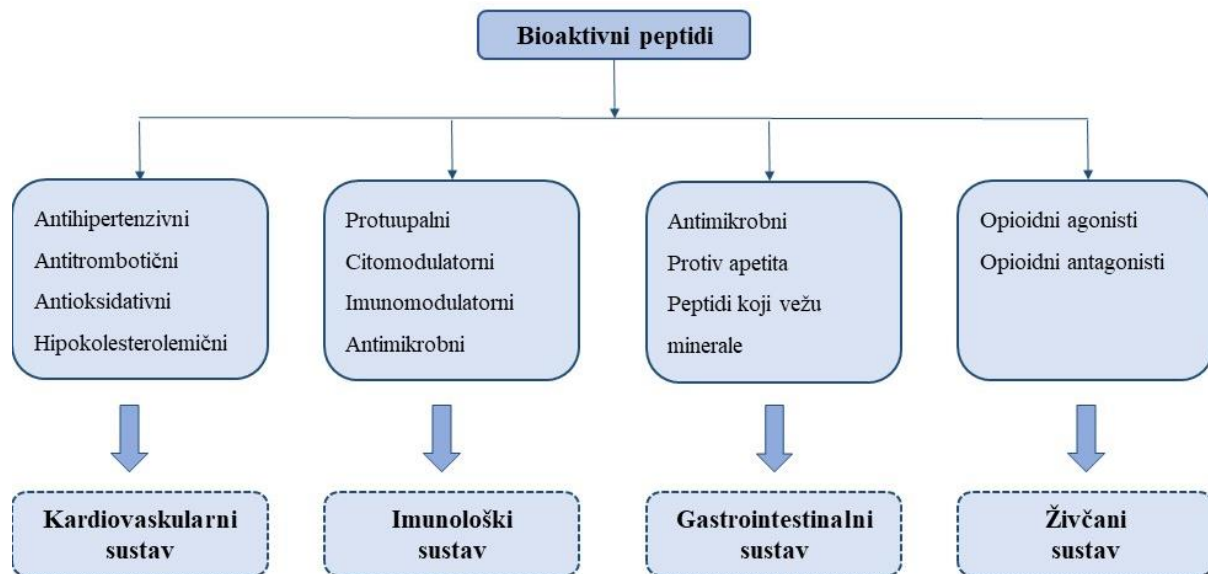
2.2.1. Vrste i fiziološke funkcije bioaktivnih peptida

Bioaktivni peptidi u pravilu su izgrađeni od 3 do 20 aminokiselina po molekuli (Korhonen i Pihlanto-Leppälä, 2004). Smatra se da aktivnost bioaktivnih peptida proizlazi iz sastava i slijeda aminokiselina koje grade taj peptid, a pokazalo se da peptidi koji posjeduju istu aktivnost imaju slična strukturna svojstva. U tablici 1 prikazani su glavni bioaktivni peptidi i strukturne karakteristike svake skupine navedenih peptida.

Tablica 1. Glavni bioaktivni peptidi, njihova funkcija i strukturne karakteristike (prema Pihlanto, 2011)

Aktivnost	Strukturne karakteristike
Opioidna	Tyr na N-terminalnom kraju, povezan s drugim aromatskim ostatkom (Phe ili Tyr) na 3. ili 4. poziciji
ACE inhibitorna (antihipertenzivna)	Hidrofobna aminokiselina ili pozitivan naboj Lys ili Arg na C-terminalom kraju
Antitrombotična	Ile ¹⁰⁸ , Lys ¹¹² i Asp ¹¹⁵ ostaci kazoplatina (peptida iz κ-kazeina)
Antioksidativna	Visok udio His i hidrofobnih aminokiselina
Hipokolesteromična	Nizak udio Met-Gly i Lys-Arg u proteinu; visok udio hidrofobnih aminokiselina
Antimikrobna	Pozitivno nabijeni aminokiselinski ostaci i hidrofobna regija koja sadrži Trp

Bioaktivni peptidi izolirani iz mlijeka i fermentiranih mliječnih proizvoda pokazuju jedno ili više različitih fizioloških svojstava kojima pozitivno utječu na organizam ljudi, uključujući antihipertenzivne, antimikrobne, antioksidativne, antitrombotičke, opioidne, antiapetizirajuće i imunomodulatorne aktivnosti te sposobnost vezanja minerala (Park i Nam, 2015). Na slici 3 shematski su prikazane vrste bioaktivnih peptida i njihovi fiziološki učinci na organizam ljudi.



Slika 3. Fiziološki učinci bioaktivnih peptida porijeklom iz mlijeka i mliječnih proizvoda (prema Rafiq i sur., 2020)

Najbolje istražena skupina bioaktivnih peptida koja ima ulogu u regulaciji krvnog tlaka te prevenciji bolesti kardiovaskularnog sustava su ACE inhibitorni, odnosno antihipertenzivni peptidi. ACE (engl. *Angiotensin converting enzyme*) je multifunkcionalni enzim koji igra ključnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka putem renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava i sustava bradikina. ACE inhibitorni peptidi blokiraju djelovanje ACE čime sprječavaju konverziju angiotenzina I u angiotenzin II (potencijalni vazokonstriktor) i degradaciju bradikina, a time utječu na snižavanje krvnog tlaka (Marccone i sur., 2017; Mohanty i sur., 2016). Ostale skupine bioaktivnih peptida koje utječu na kardiovaskularni sustav su antitrombotični i antioksidativni peptidi. Antitrombotični peptidi djeluju na način da inhibiraju vezanje fibrinogena i trombocita čime onemogućavaju stvaranje tromba, dok antioksidativni peptidi štite stanice od oksidativnog stresa, djelujući na način da sprječavaju stvaranje i/ili aktivnost reaktivnih vrsta kisika (engl. *Reactive oxygen species*; ROS) (Rafiq i sur., 2020; Marccone i sur., 2017).

Na imunološki sustav djeluju imunomodulatorni, citomodulatorni, protuupalni i antimikrobni peptidi. Nekoliko imunomodulatornih peptida, izoliranih iz goveđeg mlijeka, pokazuju učinke na specifične stanice imunološkog sustava. Pokazalo se da brojne komponente mlijeka, kao što su α -, β -, κ -kazein, proteini sirutke i laktoferin, moduliraju proliferaciju limfocita. Osim toga, β -kazein fermentiran s bakterijama mliječne kiseline pokazao je imunomodulatorno djelovanje na mononuklearne stanice i T-pomoćne stanice, posebno Th1-stanice (Marcone i sur., 2017). Nadalje, u istraživanju Meisel i Fitzgerald (2003) pokazalo se da određeni citomodulatorni peptidi, porijeklom iz kazeina, mogu inhibirati rast tumorskih stanica stimulacijom aktivnosti stanica imunološkog sustava. Tripeptid VPP, za kojega je prethodno dokazano ACE inhibitorno djelovanje, također pokazuje protuupalne učinke smanjujući adheziju monocita na endotelne stanice u *in vitro* uvjetima, što se može pripisati inhibiciji signalnog puta MAP kinaze. Osim toga, hidrolizati kazeina pokazali su protuupalne učinke na makrofagima dok su hidrolizati dobiveni iz proteina sirutke pokazali slične učinke na respiratorne i crijevne epitelne stanice (Marcone i sur., 2017). Štoviše, kravlji kazeino-makropeptid (CMP) aktivira makrofage i potiče diferencijaciju regulatornih T stanica čime ublažava upalne procese u crijevima (de Medina i sur., 2010).

Antimikrobni peptidi imaju sposobnost stvaranja pora u staničnoj stijenci, odnosno membrani bakterija, čime narušavaju permeabilnost (López-Expósito i sur., 2008). Pri tome utječu na imunološki, ali i gastrointestinalni sustav. U radu Mohanty i sur. (2014) zabilježeno je da antimikrobni peptidi porijeklom iz mlijeka inhibiraju mnoge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije (*Escherichia coli* MTCC82, *Aeromonas hydrophila* ATCC7966, *Salmonella typhi* MTCC3216, *Bacillus cereus* ATCC10702, *Salmonella* Typhimurium SB300, *S. enteritidis* 125109 i *Staphylococcus aureus* MTCC96) te kontroliraju brojne infekcije uzrokovane mikroorganizmima. Očekuje se da ukupan antibakterijski učinak peptida bude veći od zbroja pojedinačnih učinaka, što se pripisuje sinergističkom djelovanju prirodno prisutnih proteina i peptida (Gobbeti i sur., 2004). Osim antimikrobnih peptida, na gastrointestinalni sustav utječu i peptidi koji imaju sposobnost vezanja metala. To su kazeino-fosfopeptidi (CPP) koji mogu vezati kalcij i time djelovati zaštitno protiv toksičnog učinka uzrokovanog nakupljanjem prevelike količine kalcija u diferencijalnim stanicama crijevnog epitela (Perego i sur., 2013). Nadalje, CPP djeluju protiv intestinalnih tumorskih stanica (HT-29 i AZ-97) inhibirajući proliferaciju i inducirajući programiranu staničnu smrt (apoptozu) putem naponom-reguliranih kalcijevih kanala (Perego i sur., 2012).

Opioidni peptidi su ligandi opioidnih receptora (μ -, κ - i δ -receptori) koji utječu na živčani sustav i gastrointestinalni funkcije pri čemu iskazuju učinke slične opijatima ili morfiju. Interakcija opioidnih peptida i receptora povezuje se s emocionalnim ponašanjem, regulacijom peristaltike crijeva te osjećajem sitosti (Mora i sur., 2016). Dva su različita načina djelovanja opioidnih peptida, a uključuju opioidne agoniste (vezanje na opioidne receptore) i opioidne antagoniste (blokiranje djelovanja agonista). Obje vrste opioidnih peptida pronađene su u mliječnim proteinima, u α -s1-, α -s2-, β -, κ -kazeinima (kazomorfini) te u proteinima sirutke (laktorfini). Međutim, glavni opioidni peptidi su fragmenti β -kazeina, zvani β -kazomorfini (Clare i Swaisgood, 2000), dok se fragmenti κ -kazeina, poznati kao kazoksini, ponašaju kao opioidni antagonisti (Severin i Wenshui, 2005).

2.2.2. Bioaktivni peptidi kao potencijalni bioterapeutici

Zadnjih nekoliko desetljeća, kronične bolesti postale su veliki problem javnog zdravstva diljem svijeta. Pokazalo se da su bolesti kardiovaskularnog sustava, karcinomi, kronične bolesti respiratornog sustava te dijabetes uzrok prerane smrti u 71 % slučajeva diljem svijeta (Beaglehole i sur., 2007). Iako su danas dostupni brojni sintetski lijekovi za navedene bolesti, sve više tih lijekova povezuje se s neželjenim nuspojavama. Navedena činjenica potaknula je istraživanja prirodnih alternativa liječenja i alternativa dobivenih iz hrane, uključujući bioaktivne peptide i hidrolizate proteina, za prevenciju razvoja i ublažavanje simptoma kroničnih bolesti (Duffuler i sur., 2022).

U terapijskom smislu, peptidi imaju brojne prednosti koje ih čine boljim izborom u odnosu na tradicionalne lijekove. Primjerice, bioaktivni peptidi djeluju vrlo specifično na ciljno tkivo i stoga imaju male ili nikakve toksične učinke, a pri tome su učinkoviti čak i pri niskim koncentracijama što je vrlo važno u liječenju kroničnih bolesti (Akbarian i sur., 2022). Suprotno sintetskim lijekovima, koji imaju kumulativan učinak na organizam, bioaktivni peptidi se ne nakupljaju u organizmu te se jednostavno degradiraju i lako izlučuju. Prvotno se ovo svojstvo peptida smatralo negativnim, ali radi štetnih posljedica koje nastaju zbog toksičnosti sintetskih lijekova uslijed predugog zadržavanja u organizmu, danas se smatra pozitivnom karakteristikom (Akbarian, 2021). Ključno pitanje koje se postavlja kod korištenja bioaktivnih peptida u terapijske svrhe jest sigurnost njihove primjene za ljude. Trenutno je opće prihvaćena predodžba koja sugerira da su hidrolizati proteina iz hrane pripravljeni primjenom enzima iz hrane, općenito sigurni za prehranu ljudi (Schaafsma, 2009). Dok je za

odobrenje zahtjeva za primjenu pročišćenih bioaktivnih peptida, svaka zemlja razvila vlastitu regulativu (Duffuler i sur., 2022).

U *in vivo* uvjetima, bioaktivni peptidi mogu ostvariti svoje učinke samo ukoliko, nakon oralne ingestije i tijekom GI probave i apsorpcije, stignu do ciljnog mjesta djelovanja u netaknutom obliku. Time se podrazumijeva otpornost bioaktivnih peptida na enzimsku hidrolizu želučanim i crijevnim proteazama i peptidazama. Jednom kada se apsorbiraju, kratki peptidi (pretežito di- i tripeptidi) transportiraju se kroz crijevne enterocite putem specifičnog transportnog sustava peptida (PepT1), dok se veći peptidi vjerojatno apsorbiraju transcelularnim ili paracelularnim mehanizmima ili putem endocitoze (Xu i sur., 2019; Udenigwe i Fogliano, 2017). Danas je poznato samo nekoliko bioaktivnih peptida koji ne podliježu degradaciji te su pronađeni u krvi ispitanika. Iz tog razloga se buduća istraživanja trebaju usredotočiti na biodostupnost i način transporta bioaktivnih peptida do ciljnog mjesta djelovanja kako bi ostvarili učinke na organizam te kako bi se u konačnici mogli primjenjivati kao terapeutici (Duffuler i sur., 2022).

Unatoč svim do sada opisanim pozitivnim karakteristikama bioaktivnih peptida, potrebna su daljnja preklinička i klinička istraživanja kako bi se utvrdila doza pri kojoj su korisni za zdravlje (odnos doza – odgovor), biodostupnost, farmakokinetika te mogu li se konzumirati s hranom (Zaky i sur., 2022). Osim toga, potrebno je istaknuti važnost pravilne prehrane na zdravlje. S obzirom na istaknuta svojstva bioaktivnih peptida porijeklom iz hrane, posebno iz mlijeka i mliječnih proizvoda, dolazi se do zaključka da se konzumacijom navedenih proizvoda može utjecati na zdravlje i preventivno djelovati na razvoj kroničnih bolesti.

2.3. ULOGA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI BIOAKTIVNIH PEPTIDA

2.3.1. Mikrobna fermentacija bakterijama mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline čine skupinu srodnih Gram-pozitivnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili anaerobnim uvjetima. BMK su nesporulirajuće, katalaza-negativne bakterije koje nemaju citokrom, a karakterizira ih GRAS status. Rastu isključivo na kompleksnim hranjivim podlogama, a dio su i authtone mikroflore gastrointestinalnog trakta sisavaca (Kos, 2001).

BMK energiju osiguravaju fermentacijom ugljikohidrata, a glavni proizvod metabolizma je mliječna kiselina. Metabolički put razgradnje glukoze može biti homofermentativan (konačni produkt metabolizma je isključivo mliječna kiselina), no kod pojedinih sojeva može biti i heterofermentativan pri čemu uz mliječnu kiselinu, nastaju i drugi produkti metabolizma (etanol i ugljikov dioksid). Usljed proizvodnje mliječne i drugih organskih kiselina, dolazi do snižavanja pH vrijednosti okolnog medija, što ima vrlo važnu ulogu u inhibiciji patogena (Šušković i sur., 2010).

Osim što fermentacijom poboljšavaju senzorska svojstva i kvalitetu proizvoda, BMK proizvode ogromne količine bioaktivnih spojeva. S obzirom da im je stanište hrana, posebice mlijeko, u fermentiranim proizvodima često se nalaze različite bioaktivne molekule koje pokazuju određene korisne učinke na organizam ljudi. Među bioaktivnim spojevima, molekule koje sadrže dušik, kao što su aminokiseline, derivati aminokiselina i oligopeptidi dobivaju veliku pozornost znanstvenika budući da mogu utjecati na ljudsku fiziologiju na više različitih načina (Pessione i Cirrincione, 2016).

Bakterije mliječne kiseline imaju izrazito dobro razvijen proteolitički sustav kojim mogu razgrađivati proteine i tako osiguravati esencijalne aminokiseline iz okolnog medija u kojemu se nalaze (Liu i sur., 2010). Osim navedenog, proteolitički sustav vrlo je učinkovit u oslobađanju peptida iz strukture proteina prisutnih u hrani, primjerice iz α - i β -kazeina, albumina te globulina iz mlijeka i mliječnih proizvoda. Prema znanstvenoj literaturi, ovi peptidi pokazuju utjecaj na prehranu (apsorpcija minerala i zaštita od oksidativnog stresa), metabolizam (snižavanje razine glukoze i kolesterola u krvi), kardiovaskularne funkcije (antitrombotičko i hipotenzivno djelovanje), crijevo-mozak os (opioidi i antiopioidi koji kontroliraju raspoloženje i unos hrane) te na razvoj infekcija u organizmu (mikrobna inhibicija i imunomodulacija) (Pessione i Cirrincione, 2016).

Proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline dobro je istražen s obzirom na ulogu u proizvodnji bioaktivnih peptida u fermentiranom mlijeku, a osobito zbog sposobnosti hidrolitičke razgradnje kazeina. Glavne komponente sustava su proteinaze stanične ovojnice (engl. *cell-envelope proteinase*; CEP), enzimi odgovorni za ekstracelularnu hidrolizu mliječnih proteina tijekom fermentacije. Specifičnost ovih enzima razlikuje se ovisno o vrsti BMK, a zajedno s uvjetima fermentacije, utječe na raznolikost bioaktivnih peptida pronađenih u fermentiranim proizvodima (Tagliazucchi i sur., 2019; Rojas-Ronquillo i sur., 2012; Liu i sur., 2010). Često istraživani proteolitički sustavi su oni iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*.

Proteolitički sustav ovih BMK sastoji se od tri glavne komponente: (1) proteinaze vezane za staničnu stijenkiju koja pokreće razgradnju izvanstaničnog kazeina u oligopeptide, (2) transportni proteini koji prenose peptide u stanicu i (3) razne intracelularne peptidaze koje razgrađuju peptide u kraće peptide i aminokiseline (Hansen i Marcatili, 2020; Liu i sur., 2010; Savijoki i sur., 2006).

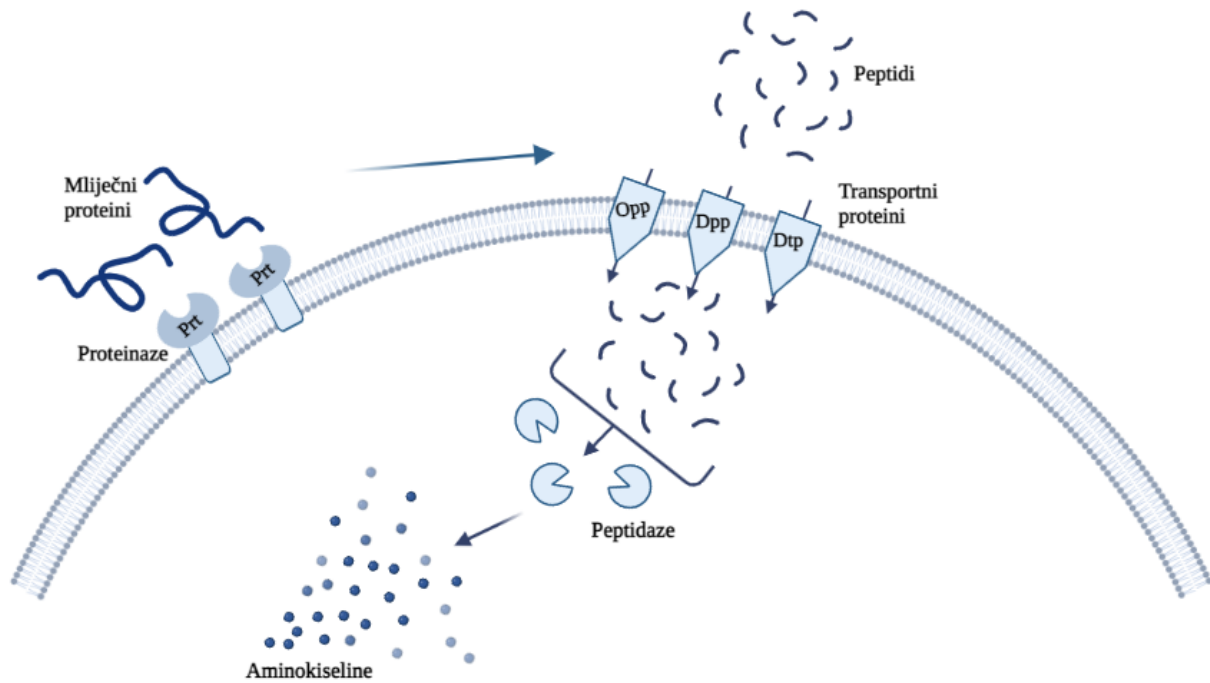
2.3.2. Proteolitički sustav vrste *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis pripada u skupinu mezofilnih, Gram-pozitivnih, katalaza-negativnih, fakultativno anaerobnih i nesporogenih bakterija. Vrstu karakterizira sposobnost pretvaranja šećera (pretežito glukoze i laktoze) gotovo isključivo u mliječnu kiselinu čime utječe na snižavanje ekstracelularne pH vrijednosti te djeluje inhibitory na rast patogenih bakterija. *L. lactis* raste pri optimalnim pH vrijednostima u rasponu od 6,3 do 6,9, no donja granica rasta je u rasponu od 4,0 do 5,0 ovisno o soju i sastavu medija (Mills i sur., 2011; Andersen i sur., 2009; Sánchez i sur., 2008).

Specifična karakteristika vrste *L. lactis* je posjedovanje plazmida koji nose gene za svojstva kao što su katabolizam laktoze i sinteza proteinaza. Daljnjim istraživanjima dokazalo se da plazmidi posjeduju i brojne druge funkcije. Stoga je danas poznato da postoje plazmidni geni koji su uključeni u: (1) kontrolu metabolizma saharoze, galaktoze, manoze, ksiloze i glukoze, (2) korištenje citrata, (3) otpornost na fage, (4) restrikciju i modifikaciju DNA, (5) agregaciju stanica, (6) sintezu bakteriocina, (7) mukoidnost i (8) otpornost na anorganske ione. Veličina plazmida koji nose gene za katabolizam laktoze i sintezu proteinaza varira od 17 do 50 kbp te se smatra relativno velikim plazmidom (Samaržija i sur., 2001). Plazmidi se repliciraju neovisno o bakterijskom kromosomu pa tako određena mutacija može dovesti do gubitka jednog ili više plazmida u stanicama kćeri. Bitno je spomenuti da takve mutacije nisu letalne s obzirom da plazmidi ne nose gene nužne za preživljavanje stanica nego su to geni koji daju određenu selektivnu prednost bakterijskim stanicama koje ih posjeduju.

Prema jednom od prethodnih navoda, BMK imaju složeni proteolitički sustav koji može hidrolizirati mliječne proteine, a kao rezultat hidrolize dolazi do otpuštanja oligopeptida, tripeptida i dipeptida te slobodnih aminokiselina. Najviše je istražen proteolitički sustav *Lactococcus lactis*, a uključuje tri glavne komponente: proteinazu stanične ovojnice, transportne sustave za kratke peptide i aminokiseline te veliki broj unutarstaničnih peptidaza (slika 4). Mliječni proteini se inicijalno hidroliziraju u oligopeptide pomoću CEP-a. Nakon

toga, oslobođeni peptidi se transportiraju unutar stanica pomoću specifičnih transpornih proteina uključujući oligopeptidne transportere (Opp) i di-/tri-peptidne transportere (Dpp, DtpP i DtpT). Konačno, peptidaze razgrađuju te peptide do slobodnih aminokiselina, koje su nužne za rast BMK (Tagliazucchi i sur., 2019).



Prt – proteinaza; Opp – oligopeptidaza; Dpp – dipeptidni transporter; Dtp – di-/tri-peptidni transporteri

Slika 4. Pojednostavljeni prikaz proteolitičkog sustava *Lactococcus lactis* (prilagođeno prema Tagliazucchi i sur., 2019, Napravljeno pomoću BioRender.com)

2.3.2.1. Proteinaze stanične ovojnice

Proteinaze stanične ovojnice su serinske proteinaze koje pripadaju u obitelj subtilizina, a kataliziraju razgradnju kazeina u oligopeptide. Na temelju specifičnosti supstrata, CEP-ovi se klasificiraju u tri tipa: (1) PI-tip koji prvenstveno hidroliziraju β -kazein, (2) PIII-tip koji mogu razgraditi sve kazeine uključujući α -s1-, κ - i β -kazein te (3) PI/PII-tip koji hidroliziraju β -kazein te, u manjoj mjeri, α -s1-kazein. Općenito, BMK sintetiziraju CEP u obliku pre-proteina od ~2000 aminokiselinskih ostataka, dok u svom konačnom obliku, sadrže sedam funkcionalnih domena (od amino- do karboksilnog kraja): S, PP, PR, A, B, H i W. PP je pre-pro domena koja sadrži tipičnu signalnu sekvencu potrebnu za transport proteinaze izvan stanice. Domena PR sadrži malu unutarnju (I) domenu koja može modificirati *prt*-specifičnost, a ima katalitičku ulogu. Domena A ima nepoznatu funkciju, domena B ima stabilizirajuću

ulogu, domena H je helikalna razmaknica (engl. *spacer*) i domena W predstavlja hidrofilnu razmaknicu stanične stijenke, odnosno vezujuću domenu (Tagliazucchi i sur., 2019). Kod bakterija mliječne kiseline postoji pet različitih tipova proteinaza, koje su okarakterizirane kao: (1) PrtP iz *L. lactis*, *L. casei*, *L. paracasei*, (2) PrtH i PrtH2 iz *L. helveticus*, (3) PrtR iz *L. rhamnosus*, (4) PrtS iz *S. thermophilus* i (5) PrtB iz *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Gen *prtP* je kod laktokoka kodiran na plazmidu, dok su geni svih ostalih proteinaza karakterističnih za laktobacile, uključujući i *prtP* gen, kodirani na kromosomu (Butorac, 2022).

Fenotip Fmc⁺ (engl. *fast milk coagulating*) povezuje se s prisutnošću proteinaza u *L. lactis*. U istraživanju Novak i sur. (2022a) pokazana je kazeinolitička aktivnost sojeva *Lactobacillus* i *Lactococcus* vrsta kod kojih je ustanovljen fenotip Fmc⁺. Pri tome, djelomično pročišćene proteinaze sojeva *L. lactis* ZGBP5-32 i ZGZA7-10 i u vrlo niskim koncentracijama pokazuju kazeinolitičku aktivnost. Spontane mutacije mogu dovesti do promjene fenotipa Fmc⁺ u fenotip Fmc⁻, čime soj gubi sposobnost brze koagulacije mlijeka, povezane s gubitkom aktivnosti proteinaze PrtP ili enzima uključenih u metabolizam laktoze. Pretpostavlja se da je uzrok tomu gubitak plazmida koji sadrži gene koji kodiraju navedene enzime (Novak i sur., 2022a).

2.3.2.2. Transportni sustav

Peptidi oslobođeni hidrolitičkim djelovanjem CEP-a unose se putem transportnih sustava u stanicu, gdje se potom dalje cijepaju unutarstaničnim peptidazama pri čemu se oslobađaju aminokiseline. Nekoliko različitih transportnih sustava je uključeno u transport peptida unutar bakterijske stanice: sustav oligopeptidne permeaze (Opp), sustav dipeptidne permeaze (Dpp) i transporteri di-/tri-peptida (DtpT) (Tagliazucchi i sur., 2019).

Sustav Opp pripada nadporodici ABC transportnih proteina (engl. *ATP-binding cassette*), a može prenesti oligopeptide veličine od 4 do 35 aminokiselina. Biokemijskom i genetičkom karakterizacijom Opp sustava u *L. lactis* otkriveno je da se sastoji od pet različitih proteina: protein OppA odgovoran za vezanje oligopeptida, integralnih membranskih proteina OppB i OppC, i proteina OppD i OppF koji vežu nukleotide (Doeven i sur., 2004; Tynkkynen i sur., 1993). Osim navedenih činjenica, Opp sustav drugih BMK nije značajnije istražen.

Transportni sustav DtpT pripada porodici PTR (engl. *proton motive force-driven peptide transport system*). DtpT, prvotno identificiran u *L. lactis*, je transmembranski protein od 12

aminokiselinskih ostataka s C- i N- terminalnim krajem okrenutim prema citoplazmi. Gen *dtpT* smješten je nakon gena *pepN* koji kodira aminopeptidazu PepN. Ovaj sustav pokazuje veći afinitet za hidrofilne i nabijene di- i tripeptide (Hagting i sur., 1994). Osim u *L. lactis* ovaj sustav je identificiran i kod drugih BMK, primjerice kod *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei* i *L. rhamnosus* (Tagliazucchi i sur., 2019).

Foucaud i sur. (1995) su po prvi put u *L. lactis* identificirali treći transportni sustav (Dpp) koji pripada u nadporodicu ABC transportnih proteina, a pretežito prenosi di- i tripeptide koji sadrže hidrofobne razgranate lance aminokiselina. Dpp sustav organiziran je kao i Opp sustav samo što umjeto podjedinice OppA sadrži podjedinicu DppA, odgovornu za vezanje di- i tripeptida. U oba sustava, podjedinice koje vežu peptide (DppA i OppA) su ugrađene u membranu putem modificiranog cisteinskog ostatka na N-terminalnom kraju i dostavljaju peptide njihovim srodnim membranskim kompleksima (Tagliazucchi i sur., 2019).

2.3.2.3. Intracelularne peptidaze

Nakon transporta u bakterijsku stanicu, brojne citoplazmatske peptidaze nastavljaju razgradnju peptida prethodno oslobođenih iz kazeina. S obzirom na specifičnost, intracelularne peptidaze bakterija mliječne kiseline mogu se podijeliti u tri skupine: (1) endopeptidaze (PepE, PepG, PepF, PepO), (2) aminopeptidaze (PepN, PepC, PepA, PepM, PepP, PepX) i (3) di-/tri-peptidaze (PepI, PepL, PepQ, PepR, PepD, PepV, and PepT) (Savijoki i sur., 2006).

Endopeptidaze su prvi enzimi uključeni u razgradnju peptida transportiranih u stanicu, dok aminopeptidaze i di-/tri-peptidaze nastavljaju daljnju razgradnju. Aminopeptidaze PepN, PepC, PepA, PepM, PepP i PepX identificirane su u nekoliko vrsta BMK, među kojima je i *L. lactis*. Metalopeptidaze PepA i PepM imaju vrlo veliku specifičnost prema supstratu i mogu cijepati aminokiseline s N-terminalnog kraja. Suprotno tome, metalopeptidaza PepN i cistein-peptidaza PepC imaju vrlo široku specifičnost prema supstratima. Metalopeptidaza PepP djeluje na oligopeptide duljine od 3 do 9 aminokiselinskih ostataka, a karakterizira ju sposobnost hidrolize aminokiselinskih ostataka s N-terminalnog kraja kada se na drugom mjestu nalazi (P). Prolil-dipeptidil aminopeptidaza PepX može osloboditi X-P dipeptid s N-terminalnog kraja oligopeptida duljine od 3 do 7 aminokiselinskih ostataka (Tagliazucchi i sur., 2019).

Nadalje, di- i tripeptidi nastali djelovanjem endopeptidaza i aminopeptidaza se dalje cijepaju do zasebnih aminokiselina pomoću di-/tri-peptidaza. Tri-peptidaza PepT i di-peptidaze PepD i PepV identificirane su nekoliko BMK, među kojima je i *L. lactis*. Karakterizira ih širok raspon specifičnosti prema supstratima s davanjem prednosti peptidima koji su građeni od hidrofobnih aminokiselina. Preostale di-/tri-peptidaze (PepL, PepI, i PepR) specifične su za laktobacile, ali nisu pronađene kod laktokoka niti kod streptokoka (Liu i sur., 2010). PepL cijepa leucin (L), dok PepI i PepR cijepaju prolin (P) s N-terminalog kraja di-/tripeptida. PepQ je karboksipeptidaza koja cijepa P s C-terminalog kraja dipeptida, a prisutna je u genomima svih BMK, najčešće kao jedan gen po genomu (Tagliazucchi i sur., 2019; Liu i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom poglavlju diplomskog rada prikazani su svi materijali potrebni za pripremu uzoraka te za provedbu postupaka nužnih za identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih peptida nastalih nakon fermentacije mlijeka. U nastavku je naveden radni mikroorganizam i uvjeti čuvanja radnog mikroorganizma te sve korištene kemikalije, laboratorijski uređaji i laboratorijski pribor, kao i svi korišteni programi i baze podataka.

3.1.1. Radni mikroorganizam

Za provedbu eksperimenata, u ovom diplomskom radu kao radni mikroorganizam korišten je bakterijski soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-51. Ovaj probiotički soj dio je Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu – ZBMK.

3.1.2. Hranjive podloge

U ovom eksperimentu korištena je **M17** hranjiva podloga za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline roda *Lactococcus*. Sastav **M17 agara** (kruta hranjiva podloga) prikazan je u tablici 2. **M17 bujon** (tekuća hranjiva podloga) istog je sastava kao i M17 agar, ali bez dodatka agara. pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 min.

Tablica 2. Sastav M17 agara

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

3.1.3. Uzorci za analizu

U tablici 3 prikazani su uzorci koji su korišteni za izolaciju peptida te za identifikaciju, karakterizaciju i kvantifikaciju bioaktivnih peptida dobivenih hidrolizom proteina iz mlijeka djelovanjem korištenog radnog mikroorganizma.

Tablica 3. Uzorci za analizu

Naziv uzorka	Sastav	Liofilizacija
K	Mlijeko	Nakon 0 h
24	Mlijeko + <i>L. lactis</i> ZGBP5-51	Nakon 24 h
48	Mlijeko + <i>L. lactis</i> ZGBP5-51	Nakon 48 h

3.1.4. Laboratorijski uređaji

- pH metar, Metrohm, Švicarska
- Termostat, Instrumentarija, Hrvatska
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka
- Centrifuga Centric, Tehnica, Slovenija
- Centrifuga s hlađenjem 5804R, Eppendorf, SAD
- Analitička vaga, Mettler Toledo, XPE205, SAD
- Centrifuga, Digitor21R, OrtoAlerisa, Španjolska
- FVL-2400N Combi-Spin mini-centrifuga/vortex, Biosan, Latvija
- Magnetna mješalica, Thermo Scientific, SAD
- Ultrazvučna kupelj, FALC Instruments, Italija
- Kabinet s laminarnim strujanjem zraka, Grga i Melita, Hrvatska
- HPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC nano sustav, Thermo scientific, SAD
- Sakupljač frakcija, PROTEINEER fcII, Bruker, Njemačka
- Autoflex speed MALDI – TOF/TOF, Bruker, Njemačka
- 1290 Infinity HPLC sustav, Agilent Technologies, SAD
- Agilent 6460 Triple Quad spektrometar masa opremljen s elektrosprej ionizacijskim izvorom (Model K6460), Agilent Technologies, SAD

- Uređaj za pročišćavanje vode – Synergy UV ultrapure Water (Type 1), Sigma, Njemačka

3.1.5. Laboratorijski pribor

- Epruvete, Scherf Präzision Europe GmbH, Njemačka
- Eppendorf epruvete (1,5 mL; 2 mL; 5 mL), Eppendorf, SAD
- Epruveta za centrifugu tipa Falcon (50 mL), neoLab, Njemačka
- Stalci za kivete/epruvete, neoLab, Njemačka
- Stalci za Eppendorf epruvete, neoLab, Njemačka
- Staklene pipete (25 mL), Sigma-Aldrich, SAD
- Bireta (50 mL), Sigma-Aldrich, SAD
- Automatske pipete (0,1 – 5000 μ L), Eppendorf, SAD
- Nastavci za automatske pipete (0,1 – 5000 μ L), Eppendorf, SAD
- Erlenmeyer tikvice (50 mL; 100 mL), Gram-mol, Hrvatska
- Laboratorijske staklene boce sa čepom, Simax, Češka
- Plastične sterilne Petrijeve zdjelice, Golias, Slovenija
- Špatula, Fisher Scientific, SAD
- NANOSEP filteri za centrifugiranje s porama 0,2 μ m, Pall Corporation, SAD
- Viale, Agilent Technologies, SAD
- MALDI pločica, MTP Anchor Chip 384 BC, Bruker, Njemačka
- Iгла injekcijska, Bruker, Njemačka
- Staničevina, Medicpro, Hrvatska
- Predkolona:
 - Acclaim PepMap 100 C18, 5 μ m, 100 Å, 300 μ m i.d. x 5 mm, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Kolone:
 - Acclaim PepMap 100 C18, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m i.d. x 15 cm, Thermo Fisher Scientific, SAD
 - ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1.7 μ m, 2.1 mm x 50 mm, 1/pk, Waters Chromatography Ireland Ltd, Irska

3.1.6. Kemikalije

- TFA (triflouroctena kiselina), Uvasol, Francuska
- ACN (acetonitril), VWR Chemicals, Francuska
- IPA (izopropanol), VWR Chemicals, Francuska
- Ultračista voda, $18\text{ M } \Omega\text{ cm}^{-1}$
- Peptidni kalibranti za MALDI – TOF/TOF, Bruker Daltonik GmbH, Njemačka
- CHCA (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina) stock otopina matrice, Bruker LabScape – Daltonics, SAD
- FA (engl. *formic acid*), Sigma-Aldrich, SAD
- Metanol, Sigma-Aldrich, SAD
- Somatostatin, Sigma-Aldrich, SAD
- Amonijev dihidrogenfosfat, Sigma-Aldrich, SAD
- Natrijeva lužina, Kemika, Hrvatska
- Feonlftalein, Kemika, Hrvatska
- Sterilna demineralizirana voda
- Peptidni standard (ARHPPHLSFM), Thermo Fisher Scientific, SAD

3.1.7. Otopine

- 0,1 M NaOH
- 95/5 0,1 % TFA u vodi/ ACN [v/v]
- TA95 (95/5 [v/v] ACN / 0,1 % TFA)
- TA30 (30/70 [v/v] ACN / 0,1 % TFA)
- 0,1 % TFA
- 10 % TFA
- 100 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- 95/5 0,1 % FA u vodi/ACN [v/v]
- Otopine za nano-LC:
 - Mobilna faza A: 98 % voda, 2 % ACN, 0,1 % TFA
 - Mobilna faza B: 98 % ACN, 2 % voda, 0,1 % TFA
- Otopine za HPLC:
 - Mobilna faza A: 100 % voda, 0,1 % FA
 - Mobilna faza B: 100 % ACN, 0,1 % FA

3.1.8. Programi i baze podataka

- WARP-LC, verzija 1.3 – software za automatizirano snimanje MS i MS/MS spektara, Bruker, Njemačka
- ProteinScape, verzija 3.0 – program za pretragu baze podataka, Bruker, Njemačka s integriranim MASCOT 2.5.0 algoritmom za pretraživanje baze podataka
- SwissProt baza podataka (pristupljeno 12. listopada 2022.)
- Milk Bioactive Peptides baza podataka, verzija 3.7.17. (pristupljeno 11. siječnja 2023.)
- BIOPEP-UWM™ baza podataka bioaktivnih peptida (pristupljeno 13. siječnja 2023.)
- Skyline program, verzija 21.1.0.278 – softver za izradu ciljanih proteomskih metoda i kvantitativnu analizu podataka
- MassHunter Workstation software, verzija B.08.00. – softver za kvantitativnu analizu podataka
- JASP, verzija 0.17.1 – program za statističku analizu podataka

3.2. METODE RADA

U ovom poglavlju opisani su svi provedeni postupci nužni za identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih peptida prisutnih u uzorcima fermentiranog mlijeka Veronika. U sljedećim potpoglavljima opisani su svi koraci, od pripreme uzoraka za analizu do statističke obrade podataka.

3.2.1. Održavanje i čuvanje radnog mikroorganizma

Soj *L. lactis* ZGBP5-51 čuvan je pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u M17 tekućoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije početka provedbe eksperimenata soj je inokuliran u četiri paralele po 5 mL M17 hranjivog bujona te je postavljen na aerobnu inkubaciju preko noći pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. Uzgoj radnog mikroorganizma i priprema uzoraka za analizu

Prekonoćne kulture *L. lactis* ZGBP5-51 vorteksirane su i prebačene u kivetu za centrifugu tipa Falcon (50 mL) te su centrifugirane tijekom 5 min pri 4200 o/min. Nakon provedenog centrifugiranja supernatant je uklonjen, a talog je resuspendiran u 5 mL destilirane vode. Uzorci su ponovno centrifugirani pri istim uvjetima (5 min, 4200 o/min). Uklonjen je supernatant, a preostali talog resuspendiran je u 12 mL mlijeka Veronika.

Volumen od po 2 mL pripremljene suspenzije odmjeren je u šest Erlenmeyer tikvica (100 mL) koje su sadržavale 48 mL mlijeka Veronika. Ovako pripremljeni uzorci (24 h i 48 h) postavljeni su u termostat na aerobnu inkubaciju tijekom 24 odnosno 48 sati pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

U tri Erlenmeyerove tikvice (100 mL) otpipetirano je 50 mL mlijeka Veronika. Te su tikvice predstavljale kontrolne uzorke, odnosno kontrolu (K). Ovi su uzorci korišteni za određivanje pH vrijednosti, % mliječne kiseline i indirektnu metodu određivanja broja živih stanica te su nakon toga liofilizirani.

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti

U šest bočica za liofilizaciju otpipetirano je po 2 mL svakog uzorka. Potom je pH metrom (Metrohm, Švicarska) izmjerena je vrijednost pH u svim uzorcima. Isti postupak proveden je s uzorcima prije početka fermentacije te s uzorcima nakon 24 h i 48 h fermentacije.

3.2.4. Određivanje sadržaja ukupnog udjela (%) mliječne kiseline

U šest Eppendorf epruveta odmjereno je po 2 mL svakog uzorka. Potom su uzorci centrifugirani tijekom 5 min pri 4200 o/min. Uzet je 1 mL supernatanta te je razrijeđen s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyer tikvici (100 mL). Razrijeđeni uzorak titriran je s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator do ružičastog obojenja. Identičan postupak proveden je nakon 24 h i 48 h uzgoja radnog mikroorganizma te je na temelju dobivenih rezultata izračunat sadržaj ukupnog udjela (%) mliječne kiseline u uzorcima.

Sadržaj ukupnog udjela proizvedene mliječne kiseline izračunat je prema slijedećoj formuli:

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

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

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

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

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

3.2.5. Indirektna metoda određivanja broja živih stanica

U Eppendorf epruvetama volumena 1,5 mL pripravljena su razrjeđenja do 10^{-8} – 100 μL svake paralele uzorka resuspendirano je u 900 μL sterilne destilirane vode. Potom je na M17 agar naciepljeno po 10 μL svakog razrjeđenja u dvije paralele. Podloge su postavljene na inkubaciju tijekom 48 h pri 37 °C. Nakon provedene inkubacije, na svakoj su podlozi prebrojane porasle kolonije te je na temelju dobivenog rezultata određen ukupan broj živih stanica prije početka uzgoja, nakon uzgoja tijekom 24 h te nakon uzgoja tijekom 48 h.

Ukupni broj živih stanica izračunat je prema slijedećoj formuli:

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

a – broj poraslih kolonija

b – volumen upotrijebljenog uzorka

c – recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja

3.2.6. Liofilizacija uzoraka za analizu

Uzorci su zamrznuti pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega je provedena liofilizacija u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka). Tri paralele kontrole, odnosno obično mlijeko, postavljene su na liofilizaciju odmah nakon pripreme uzoraka. Druge tri paralele liofilizirane su nakon fermentacije tijekom 24 sata, a posljednje tri paralele nakon fermentacije tijekom 48 sati. Ovi su uzorci korišteni za izolaciju, identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih peptida (slika 5).



Slika 5. Primjer liofiliziranog uzorka fermentiranog mlijeka (vlastita fotografija)

3.2.7. Ne-ciljana analiza peptida iz uzoraka mlijeka Veronika

Kako bi se identificirali peptidi u liofiliziranim uzorcima fermentiranog mlijeka korištene su spregnute tehnike tekućinske kromatografije obrnutih faza (nano-LC) i spektrometrije masa (MS i MS/MS). U nastavku su opisani svi postupci potrebni za provedbu ne-ciljane analize – od pripreme uzoraka do postavljanja parametara nužnih za provođenje analize peptida.

3.2.7.1. Priprema uzoraka za nano-LC

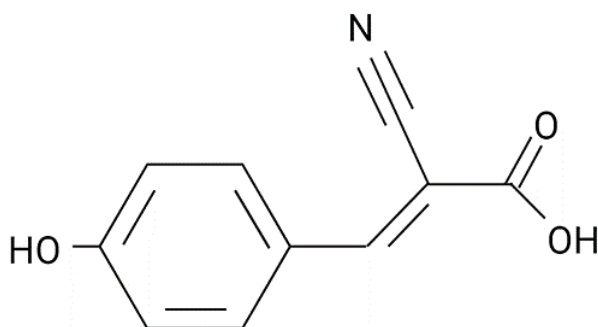
Masa od 3 do 5 mg liofiliziranih uzoraka odvagana je u Eppendorf epruvete volumena 5 mL te su uzorci otopljeni u 95/5 0,1 % TFA/ACN do konačne koncentracije od 1 mg/mL. Uzorci su vorteksirani i potom postavljeni na sonifikaciju u ultrazvučnu kupelj pri sobnoj temperaturi tijekom 30 min kako bi se otopile krute čestice. 500 μ L svakog uzorka filtrirano je kroz filter Nanosep MF s wwPTFE membranom, veličina pora 0,2 μ m. Filtriranje je provedeno centrifugiranjem tijekom 5 min pri 10 000 o/min na sobnoj temperaturi. Konačno, 100 μ L filtrata otpipetirano je u vijale za tekućinsku kromatografiju. Postupak je identičan za sve paralele svih uzoraka.

3.2.7.2. Priprema MALDI pločice

Gornja površina MALDI pločice isprana je izopropanolom te je obrisana maramicom. Postupak je ponovljen s demineraliziranom vodom. Nakon toga, MALDI pločica je uronjena u kadu s izopropanolom te je postavljena u ultrazvučnu kupelj na sonifikaciju tijekom 10 min na sobnoj temperaturi. Prethodni korak je ponavljen, ali s otopinom TA30 umjesto izopropanola. Na kraju, MALDI pločica je osušena propuhivanjem komprimiranim zrakom. Gornja površina ovako očišćene pločice se ne smije brisati (Protokol pripreme MALDI uzoraka, Bruker).

3.2.7.3. Priprema CHCA matrice za MALDI – TOF/TOF MS

Matrica CHCA (engl. *α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid*) korištena je za ionizaciju peptida prilikom ionizacije MALDI – TOF/TOF spektrometrom masa (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight / time of flight*) (slika 6).



Slika 6. Kemijska struktura CHCA (engl. *4-chloro- α -cyanocinnamic acid*) (Napravljeno pomoću BioRender.com)

Pripremljene su dvije različite koncentracije CHCA matrice, jedna za kalibrante i jedna za uzorke. CHCA matrica za kalibrante pripremljena je do konačne koncentracije od 1,4 mg/mL prema podacima navedenim u tablici 4, a radna otopina peptidnih kalibranta je pripremljena prema podacima navedenim u tablici 5. Pripremljeno je ukupno 800 μ L CHCA matrice za uzorke (engl. *spotting*) prema podacima navedenim u tablici 6.

Tablica 4. Sastav CHCA matrice za kalibrante

	Za 200 μ L
10 mg/mL CHCA	20 μ L
ACN	142 μ L
100 mM NH₄H₂PO₄	2 μ L
0,1 % TFA	28 μ L

Tablica 5. Radna otopina kalibranta

1,4 % CHCA matrica	200 μ L
Kalibranti	2 μ L
Somatostatin (4 μg/mL)	0,5 μ L

Tablica 6. Sastav CHCA matrice za uzorke (Protokol pripreme MALDI uzoraka, Bruker)

TA95	748 μ L
CHCA stock solution (CHCA otopljena u TA90)	36 μ L
10 % TFA u vodi	8 μ L
100 mM NH₄H₂PO₄ otopljeno u vodi	8 μ L

3.2.7.4. Pročišćavanje i separacija peptida te sakupljanje frakcija

Separacija peptida provedena je tekućinskom kromatografijom s mogućnosti separacije pri niskim protocima (do $0,3 \mu\text{L min}^{-1}$). Uzorci su separirani koristeći Dionex Ultimate 3000 RSLC nano sustav uz UV/VIS detektor koji je direktno spregnut sa sakupljačem frakcija PROTEINEER fcII.

U ovom eksperimentu korištena je kolona za pročišćavanje peptida te kolona za separaciju peptida. Metoda pročišćavanja peptida provedena je na pretkoloni Acclaim PepMap 100 C18, $5 \mu\text{m}$, 100 \AA , $300 \mu\text{m i.d.} \times 5 \text{ mm}$ (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema parametrima navedenim u tablici 7. Metoda separacije peptida provedena je na koloni Acclaim PepMap 100 C18, $3 \mu\text{m}$, 100 \AA , $75 \mu\text{m i.d.} \times 15 \text{ cm}$ (Thermo Fisher Scientific, SAD) prema parametrima navedenim u tablici 8. Separirane frakcije peptida potom su sakupljene uz pomoć PROTEINEER fcII sakupljača frakcija koji direktno sakuplja frakcije na MALDI pločicu (Bruker, Njemačka) prema parametrima navedenim u tablici 9.

Tablica 7. Parametri pročišćavanja peptida

Mobilna faza A	Otopina voda/ACN/TFA (98/2/0,1) [v/v/v]
Mobilna faza B	Otopina ACN/voda/TFA (98/2/0,1) [v/v/v]
Pretkolona	Acclaim PepMap 100 C18, $5 \mu\text{m}$, 100 \AA , $300 \mu\text{m i.d.} \times 5 \text{ mm}$
Temperatura kolone	$40 \text{ }^\circ\text{C}$
Protok	$10 \mu\text{L/min}$
Ispiranje kolone	Izokratno, A/B = 98/2 [v/v], 5 min

Tablica 8. Parametri separacije peptida

Mobilna faza A	Otopina voda/ACN/TFA (98/2/0,1) [v/v/v]		
Mobilna faza B	Otopina ACN/voda/TFA (98/2/0,1) [v/v/v]		
Kolona	Acclaim PepMap 100 C18, 3 μm , 100 \AA , 75 μm i.d. x 15 cm		
Temperatura kolone	40 $^{\circ}\text{C}$		
Protok	0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$		
	Gradijentno		
Ispiranje kolone	Retencijsko vrijeme (min)	A (%)	B (%)
	0	98,0	2,0
	10	98,0	2,0
	58	60,0	40,0
	59	10,0	90,0
	69	10,0	90,0
	70	98,0	2,0
	75	98,0	2,0
Detektor	UV/VIS detektor, valna duljina od 215 nm		

Tablica 9. Parametri sakupljanja peptidnih frakcija

Matrica	CHCA matrica za „spotting“
Protok matrice	100 $\mu\text{L h}^{-1}$
Vrijeme sakupljanja frakcija	15 – 63 min
Vrijeme sakupljanje / frakcija	15 s
Ukupan broj sakupljanja frakcija	192

3.2.7.5. Analiza peptida spektrometrom masa MALDI – TOF/TOF

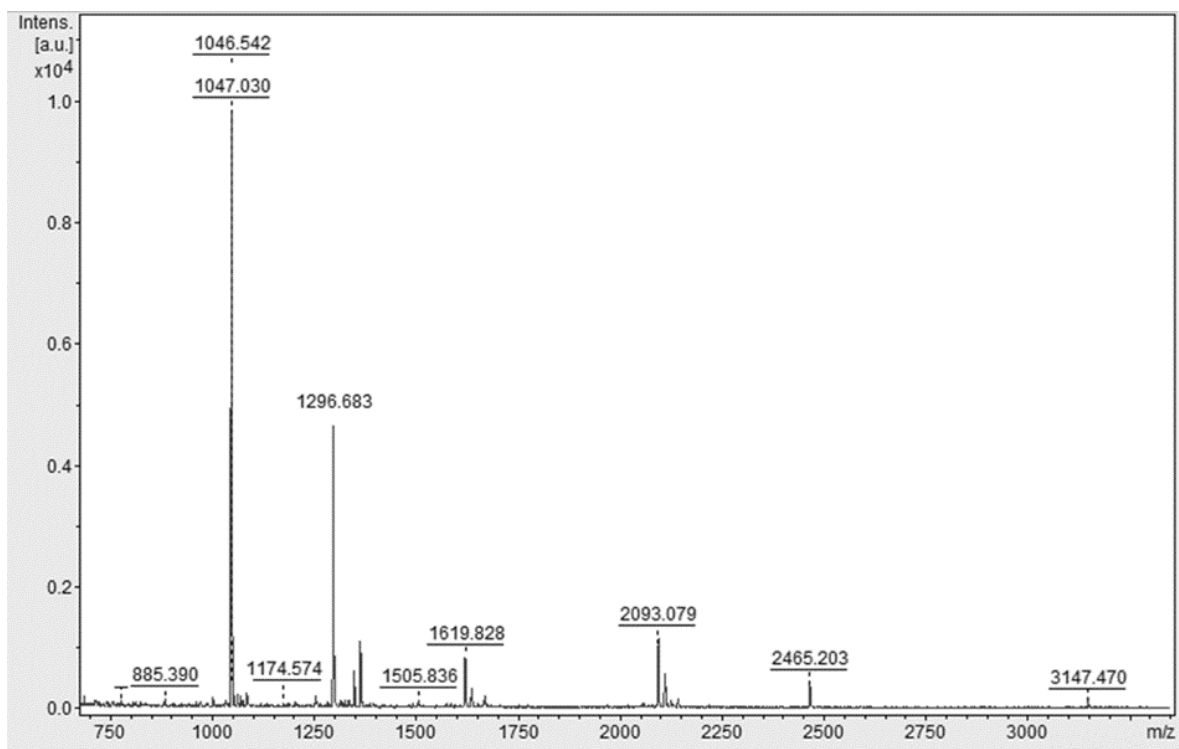
Analiza peptida provedena je primjenom spektrometra masa Autoflex speed MALDI – TOF/TOF (Bruker, Njemačka). Prije provođenja analize peptida u sakupljenim frakcijama podešen je optimalan intenzitet lasera kako bi se osigurala odgovarajuća osjetljivost ionizacije te je provedena kalibracija. Vanjska kalibracija spektara (engl. *External Calibration*) provedena je koristeći algoritam krivulje četvrtog reda (engl. *Cubic Enhanced*) uz signale dobivene analizom standardnih peptida poznatih masa (slika 7). Parametri za provođenje MS i MS/MS metoda podešeni su primjenom WARP – LC softver, verzija 1,3 (Bruker, Njemačka), a prikazani su u tablici 10 i 11.

Tablica 10. Parametri za snimanje MS spektara nakon provedene nano – LC separacije

Tip analize	MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Vrsta lasera	Smartbeam-II laser
Ionsko zrcalo	Reflektron
Broj snimaka/spektar	1000
Raspon masa	~ 1000 – 3500 Da
Kalibracija MS spektara	Algoritam krivulje četvrtog reda uz signale dobivene snimanjem standardnih peptida poznatih masa (minimalno 6)
Tolerancija mase pri kalibraciji	100 ppm

Tablica 11. Parametri za snimanje MS/MS spektara nakon provedene nano – LC separacije

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



Slika 7. Primjer tipičnog MALDI – TOF spektra masa peptidnih kalibracijski standarda

3.2.7.6. Identifikacija peptida

Nakon snimanja MS i MS/MS spektara dobiveni podaci korišteni su za pretragu baze podataka. U ovom radu korišten je Mascot 2.5.0 server (Matrix Science, UK) s ugrađenom bazom podataka Swiss Prot (Swiss Institute of Bioinformatics, Švicarska) te proteomska softverska platforma ProteinScape 3.0 (Bruker Daltonik, Njemačka). Parametri za pretraživanje baze podataka navedeni su u tablici 12.

Tablica 12. Parametri za pretragu baze podataka

Baza podataka	Swiss-Prot
Taksonomija	<i>Bos taurus</i>
Enzim	Nespecifično cijepanje
Varijabilne modifikacije	/
Tolerancija mase prekursora	100 ppm
Tolerancija mase fragmentiranih iona	0,5 Da

3.2.8. Ciljana analiza peptida iz uzoraka mlijeka Veronika

Ciljana analiza peptida provedena je radi relativne kvantifikacije prethodno identificiranih bioaktivnih peptida u uzorcima mlijeka Veronika nakon fermentacije provedene s *L. lactis* ZGBP5-51. Kako bi se provela kvantifikacija peptida korištena je spregnuta tehnika RP – HPLC (engl. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) i QQQ – MS (engl. *Triple Quadrupole Mass Spectrometry*). Razvoj metode i analiza uzoraka proveden je na 1290 Infinity UHPLC sustavu (Agilent Technologies, SAD) povezanom na Agilent 6460 Triple Quad spektrometar masa s ugrađenim elektrosprej ionizacijskim izvorom (Agilent Technologies, SAD). Ionizacija je provedena u pozitivnom načinu rada instrumenta. Radi optimizacije MRM metode (engl. *Multiple Reaction Monitoring Method*) korišten je Skyline software, verzija 21.1.0.278 (MacLean i sur., 2010). Identifikacija i kvantifikacija peptida provedene su pomoću softvera MassHunter Workstation, verzija B.08.00. (Agilent Technologies, SAD).

Razvoj i optimizacija MRM metode provedene su u nekoliko osnovnih koraka (*prema* Yang, 2014):

- Odabir m/z vrijednosti ciljnih peptida
- Optimizacija napona (V) na vrhu kapilare
- Odabir fragmentnih iona za svaki ciljni peptid
- Optimizacija kolizijske energije za svaki fragmentni ion
- Optimizacija uvjeta separacije tekućinske kromatografije te uvjeta ionskog izvora

3.2.8.1. Priprema uzoraka za MRM metodu

Masa od 3 do 5 mg liofiliziranih uzorka odvagana je u Eppendorf epruvete volumena 5 mL te su uzorci otopljeni u ACN/FA/voda (5/0,1/95) do konačne koncentracije od 1 mg/mL. Uzorci su prvo vorteksirani, a potom postavljeni u ultrazvučnu kupelj na sonifikaciju tijekom 30 min na sobnoj temperaturi. Potom je 500 μ L uzorka filtrirano kroz filter Nanosep MF s wwPTFE membranom (Pall Corporation, SAD), veličina pora 0,2 μ m. Filtriranje je provedeno centrifugiranjem tijekom 5 min pri 10 000 o/min na sobnoj temperaturi. Konačno, 100 μ L filtrata odmjeren je u vijale za tekućinsku kromatografiju. Postupak je identičan za sve paralele svih uzoraka.

3.2.8.2. Parametri za separaciju peptida

Postupak separacije peptida proveden je na 1290 Infinity HPLC sustavu (Agilent Technologies, SAD). Parametri prema kojima je proveden postupak navedeni su u tablici 13.

Tablica 13. Parametri za separaciju peptida i sakupljanje frakcija

Mobilna faza A	100 % voda, 0,1 % FA [v/v]		
Mobilna faza B	100 % ACN, 0,1 % FA [v/v]		
Kolona	ACQUITY UPLC BEH C18, 130Å, 1,7 µm, 2,1 mm X 50 mm, 1/pk		
Temperatura kolone	40 °C		
Protok	0,3 mL/min		
	Gradijentno		
Ispiranje kolone	Retencijsko vrijeme (min)	A (%)	B (%)
	2,0	95,0	5,0
	16,0	60,0	40,0
	25,0	20,0	80,0
	26,0	20,0	80,0
	26,5	95,0	5,0
	35,0	95,0	5,0

3.2.8.3. Parametri ionskog izvora

Ionizacija uzoraka provedena je pomoću ESI (engl. *Electrospray Ionisation*) ionskog izvora. Parametri ionskog izvora postavljeni su primjenom MassHunter WorkStation softvera, verzija B.08.00., a navedeni su u tablici 14 (prema Dekić Rozman i sur., 2021).

Tablica 14. Parametri ionskog izvora

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

3.2.8.4. MRM tranzicije

Prethodno razvijena MRM metoda korištena je za kvantifikaciju odabranih peptida s bioaktivnim svojstvima, a opisana je u radu Novak i sur. (2022b). Lista tranzicija postavljena je pomoću MassHunter WorkStation softvera, verzija B.08.00., a detalji metode navedeni su u Prilogu 1. Skyline softver, verzija 21.1.0.278, korišten je za razvoj i optimizaciju metode MRM za peptid ARHPPHLSFM (tablica 15).

Tablica 15. MRM tranzicije peptida ARHPPHLSFM

Protein / sekvenca peptida	Prekursor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)	Dwell	Napon fragmentora (V)	Energija sudara (V)	Napon akceleratora (V)	Polarnost
κ-kazein / ARHPPHLSFM	443,892624	517,275566	20	130	11,2	4	Pozitivna
	443,892624	473,759552	20	130	11,2	4	Pozitivna
	443,892624	417,21752	20	130	11,2	4	Pozitivna
	443,892624	590,809773	20	130	11,2	4	Pozitivna

4. REZULTATI I RASPRAVA

Glavni cilj ovog diplomskog rada bio je identificirati i kvantificirati bioaktivne peptide nastale u mlijeku Veronika nakon fermentacije provedene djelovanjem radnog soja *L. lactis* ZGBP5-51 tijekom 48 h. U ovom poglavlju prikazani su rezultati svih provedenih mjerenja i analiza. Indirektnom metodom određen je početni broj živih stanica te broj živih stanica nakon 24 h i 48 h uzgoja. Tijekom uzgoja *L. lactis* ZGBP5-51 praćene su promjene pH vrijednosti i % mliječne kiseline nastale kao primarni produkt metabolizma. Kako bi se identificirali bioaktivni peptidi prisutni u uzorcima, korištena je spregnuta metoda nano LC-MS/MS. Identificirani bioaktivni peptidi relativno su kvantificirani primjenom LC-MRM-MS metode. Statistička analiza provedena je pomoću JASP softvera, verzija 0.17.1 (JASP tim, 2023).

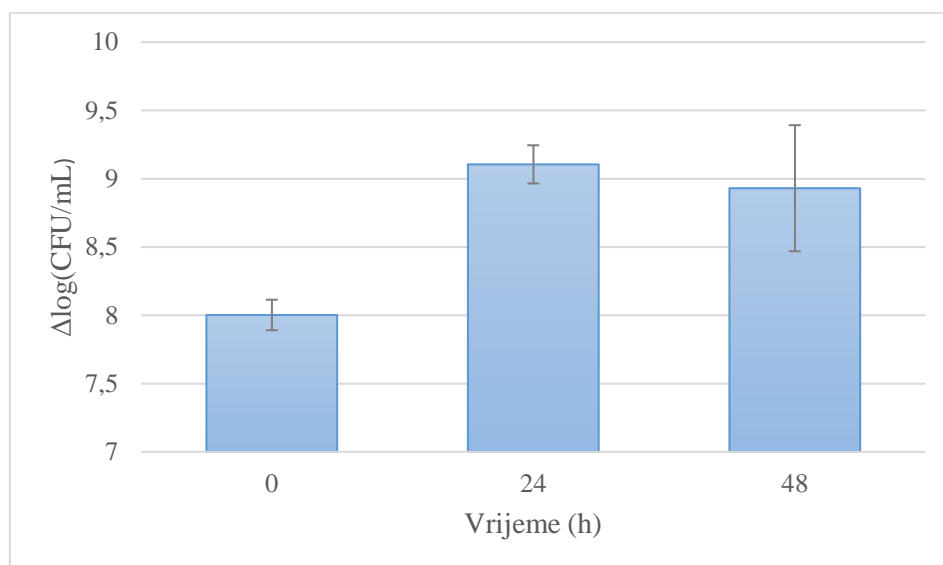
4.1. UZGOJ *L. lactis* ZGBP5-51 I ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA INDIREKTNOM METODOM

Općenito, bakterijske stanice tijekom uzgoja u hranjivom mediju prolaze nekoliko faza rasta: (1) lag faza koju karakterizira prilagođavanje bakterijskih stanica na novonastale uvjete pri čemu se stanice ne mogu replicirati, ali rastu u volumenu; (2) log (eksponencijalna) faza u kojoj se bakterije počinju dijeliti binarnom diobom te se postiže maksimalna stopa rasta i najznačajnija proizvodnja primarnih metabolita; (3) stacionarna faza u kojoj se broj poraslih stanica izjednačava s brojem mrtvih stanica zbog iscrpljenosti medija; (4) faza odumiranja u kojoj bakterije gube sposobnost diobe te broj mrtvih stanica premašuje broj živih stanica (Wang i sur., 2015).

Početni broj stanica radnog soja *L. lactis* ZGBP5-51 određen je iz prethodno pripremljenih uzoraka prije inkubacije. Prema prethodno opisanom postupku u potpoglavlju 3.2.5., pripremljena su odgovarajuća razrjeđenja koja su potom naciepljena na M17 agar u dvije paralele i inkubirana tijekom 48 h. Nakon 48 h inkubacije, prebrojane su kolonije porasle na M17 agaru te je ukupan broj živih stanica (CFU/mL) određen prema formuli navedenoj u potpoglavlju 3.2.5. Ukupan broj stanica poraslih nakon 24 i 48 sati uzgoja u mlijeku Veronika određen je na identičan način.

Radi jednostavnosti prikaza, izračunate vrijednosti CFU/mL izražene su kao logaritamske vrijednosti po bazi deset te su kao takve prikazane na slici 8. Početni broj stanica

iznosio je $1,027 \cdot 10^8$ CFU/mL ($\Delta\log(\text{CFU/mL}) = 8,002 \pm 0,112$). Vidljiv je porast broja stanica tijekom 24 h što je očekivano s obzirom da stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta (Wang i sur., 2015). Pri tome ukupan broj poraslih stanica nakon 24 h iznosio je $1,317 \cdot 10^9$ CFU/mL ($\Delta\log(\text{CFU/mL}) = 9,105 \pm 0,139$). Nakon 48 h uzgoja zabilježen je pad broja živih stanica što je očekivano s obzirom da stanice iz eksponencijalne faze rasta postepeno prelaze u stacionarnu fazu te ulaze u fazu odumiranja (Wang i sur., 2015). Ukupan broj živih stanica nakon 48 h uzgoja iznosio je $1,133 \cdot 10^9$ CFU/mL ($\Delta\log(\text{CFU/mL}) 8,930 \pm 0,462$).

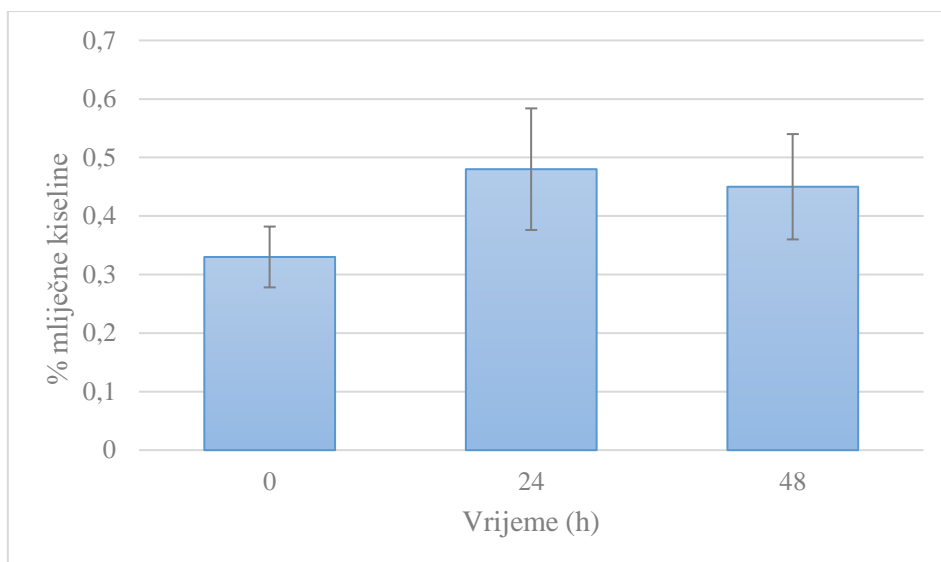


Slika 8. Broj živih stanica soja *L. lactis* ZGBP5-51 u uzorcima nakon inokulacije (0 h) te nakon 24 i 48 h uzgoja

4.1.2. Utjecaj rasta *L. lactis* ZGBP5-51 na postotak (%) mliječne kiseline u uzorku te promjenu pH vrijednosti

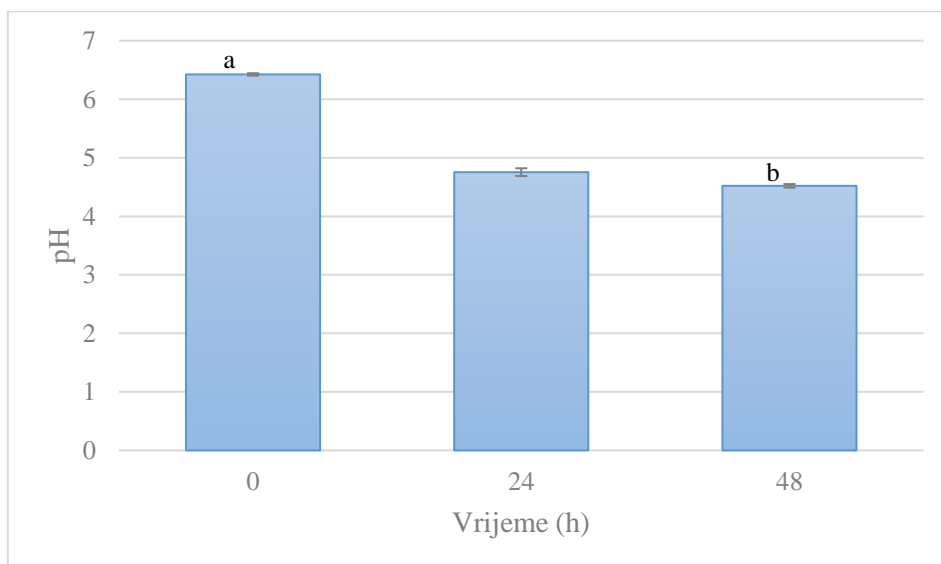
Tijekom 48 h uzgoja radnog soja *L. lactis* ZGBP5-51 praćene su promjene postotka (%) mliječne kiseline te vrijednosti pH u uzorcima.

Prisutnost mliječne kiseline u uzorcima određena je nakon inokulacije te nakon 24 h i 48 h uzgoja radnog soja *L. lactis* ZGBP5-51. Postotak (%) mliječne kiseline u uzorcima izračunat je prema formuli prethodno navedenoj u potpoglavlju 3.2.4. Početni postotak (%) mliječne kiseline iznosio je $0,33 \pm 0,05$ %. Na slici 9 vidljivo je kako tijekom uzgoja dolazi do porasta % mliječne kiseline koji je nakon 24 h iznosio $0,48 \pm 0,10$ %. Između 24 h i 48 h dolazi do statistički neznačajnog pada u % mliječne kiseline te je takav rezultat prihvatljiv i iznosio je $0,45 \pm 0,09$ %.



Slika 9. Promjena % mliječne kiseline u ovisnosti o vremenu uzgoja *L. lactis* ZGBP5-51

Vrijednosti pH uzoraka izmjerene su tijekom 48 h uzgoja radnog soja *L. lactis* ZGBP5-51. Početna vrijednost pH, izmjerena nakon inokulacije, iznosila je $6,42 \pm 0,02$. Na slici 10 vidljivo je kako pH vrijednost opada s vremenom uzgoja te je nakon 24 h iznosila $4,75 \pm 0,07$, a nakon 48 h $4,52 \pm 0,03$.



Različiti eksponenti (^{a,b}) ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$)

Slika 10. Promjena vrijednosti pH u ovisnosti o vremenu uzgoja *L. lactis* ZGBP5-51

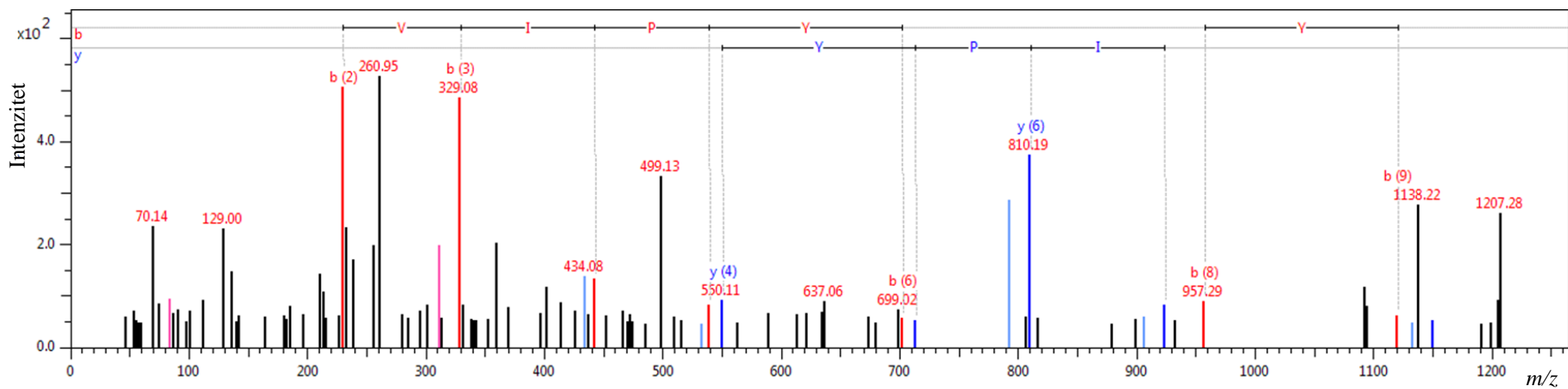
Primarni produkt metabolizma šećera vrste *L. lactis* je mliječna kiselina koja je odgovorna za snižavanje ekstracelularne pH vrijednosti (Andersen i sur., 2009; Sánchez i sur.,

2008). Rezultati dobiveni u ovom radu potvrđuju navedeni podatak i sukladni su očekivanjima. Nakon 24 h uzgoja došlo je do naglog porasta broja živih stanica što je karakteristično za eksponencijalnu fazu rasta (Wang i sur., 2015). Proporcionalno porastu broja živih stanica, nakon 24 h uzgoja, povećao se i ukupni postotak (%) mliječne kiseline nastale kao primarni produkt metabolizma te je sukladno tomu došlo do pada pH vrijednosti uzoraka. U razdoblju između 24 h i 48 h uzgoja broj živih stanica nije se statistički značajno promijenio, a što je karakteristika stacionarne faze rasta (Wang i sur., 2015). Sukladno tomu, nakon 48 h uzgoja nije zabilježen statistički značajan porast ukupnog postotka (%) mliječne kiseline, a posljedično nije zabilježen niti statistički značajan pad pH vrijednosti u odnosu prema 24 h. Sumarno, soj *L. lactis* ZGBP5-51 ima sposobnost acidifikacije mlijeka, a statistički značajan pad pH vrijednosti ($p < 0,05$) zabilježen je nakon 48 h fermentacije (slika 10).

4.2. NE-CILJANA ANALIZA PEPTIDA IZ UZORAKA MLJEKA VERONIKA

Nakon provedene tekućinske kromatografije obrnutih faza (nano-LC) razdvojene peptidne frakcije sakupljene su na MALDI pločicu te je provedena spektrometrija masa (MS/MS) koristeći Autoflex speed MALDI-TOF/TOF instrument. Kako bi se provela obrada rezultata korišten je ProteinScape program (verzija 3.0). Pretražena je SwissProt baza podataka, taksonomija *Bos taurus*, koristeći MASCOT algoritam (verzija 2.5.0). Reprezentativan MS/MS spektar jednog od identificiranih peptida prikazan je na slici 11, a prikazuje asignirani spektar peptida TKVIPYVRYL (m/z 1251,75 Da) nakon fragmentacije tandemnom spektrometrijom masa (MS/MS).

U konačnici kao rezultat analize identificiran je veliki broj peptidnih sekvenci te su dobivene informacije o proteinima iz kojih potječu identificirane sekvence (tablica 16). Pokazalo se da identificirani peptidi potječu iz α -s1-kazeina, α -s2-kazeina, β -kazeina i κ -kazeina, cijepanih nespecifično na različitim mjestima unutar proteina. Sve identificirane sekvence peptida uspoređene su sa sekvencama peptida pohranjenim u bazi podataka MBPD (engl. *Milk Bioactive Peptide Database*) kako bi se utvrdilo postoje li prethodno opisana bioaktivna svojstva tih peptida u znanstvenim literaturnim podacima. Dodatno je korištena i BIOPEP-UWM™ baza podataka (Minkiewicz i sur., 2019). Primjenom navedenih baza podataka te pregledom znanstvene literature, definirani su peptidi za koje je prethodno ustanovljeno da posjeduju određena bioaktivna svojstva. Peptidi za koje su u znanstvenoj literaturi opisana bioaktivna svojstva navedeni su u tablici 17.



Slika 11. Reprezentativni MS/MS spektar peptida TKVIPYVRYL, m/z 1251,75 Da koji je identificiran u uzorku 24 h

Tablica 16. Peptidi detektirani u uzorcima fermentiranog mlijeka nakon provedene spregnute tehnike nano LC-MS/MS

Uzorak	Protein (ID)	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]
24 h	α -s2-kazein (P02663)	IQPCTKVIPYVRYL	209-222	1718,0384
		TKVIPYVRYL	213-222	1251,7490
	β -kazein (P02666)	VYFPFGPIP	74-83	1100,5941
		YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0741
		QEPVLGPVRGPFPIIV	209-224	1717,9923
	κ -kazein (P02668)	KYIPIQYVL	45-53	1136,6746
		YYQQKPVALINN	63-74	1450,7742
		YYQQKPVALINNQFLPYPYAKPA	63-86	2889,4919
		QFLPYPYAKPA	75-86	1457,7495
		AVRSPAQILQWQVL	87-100	1608,9284
48 h	α -s1-kazein (A0A3Q1MJE5)	VAPFPEVFGK	40-49	1090,6091
	β -kazein (P02666)	ELQDKIHPF	59-67	1126,5956
		DKIHPFAQTQ	62-71	1184,6218
		VYFPFGPIP	74-83	1100,6014
		NLHLPLPLLQ	147-156	1157,7234
		VLPVPQKAVPYPQ	185-197	1435,8273
		YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0830
		QEPVLGPVRGPFPIIV	209-224	1718,0238
		EPVLGPVRGPFPIIV	210-224	1589,9657
	κ -kazein (P02668)	KYIPIQY	45-51	924,5682
		KYIPIQYVL	45-53	1136,7007
		SRYPYGLN	54-62	1056,5280
		SRYPYGLNYY	54-64	1382,6501
		YYQQKPVALINN	63-74	1450,8006
		QKPVALINNQFLPYPYAKPA	66-86	2435,2810
		NQFLPYPYAKPA	74-86	1571,8291
		QFLPYPYAKPA	75-86	1457,7849
		AVRSPAQILQWQVL	87-100	1608,9330
ARHPHPLSF		117-126	1198,6360	
ARHPHPLSFM	117-127	1329,6736		

Tablica 17. Peptidi za koje je u znanstvenoj literaturi ustanovljeno da posjeduju bioaktivna svojstva

Uzorak	Protein (ID)	Sekvenca peptida	Interval AK	<i>m/z</i> [Da]	Bioaktivno svojstvo	Referenca			
24 h	α -s2-kazein (P02663)	IQPKTKVIPYVRYL	209-222	1718,0384	ACE-inhibitorno	Begunova i sur. (2020)			
					Antioksidativno	Tonolo i sur. (2020)			
		TKVIPYVRYL	213-222	1251,7490	Antimikrobno	Alvarez-Ordenez i sur. (2013)			
	β -kazein (P02666)	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0741	VYPPFGPIP	74-83	1100,5941	Antioksidativno	Eisele i sur. (2013), Tonolo i sur. (2020)
					ACE-inhibitorno	Eisele i sur. (2013)			
					Imunomodulatorno	Sandre i sur. (2001)			
					Antitrombotično	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)			
					Antimikrobno	Birkemo i sur. (2009)			
ACE-inhibitorno	Yamamoto i sur. (1994)								
QEPVLGPVRGPFPIIV	209-224	1717,9923	ACE-inhibitorno	Lu i sur. (2016)					
48 h	β -kazein (P02666)	YQEPVLGPVRGPFPIIV	208-224	1881,0830	VYPPFGPIP	74-83	1100,6014	Antioksidativno	Eisele i sur. (2013), Tonolo i sur. (2020)
					ACE-inhibitorno	Eisele i sur. (2013)			
					Imunomodulatorno	Sandre i sur. (2001)			
					Antitrombotično	Rojas-Ronquillo i sur. (2012)			
					Antimikrobno	Birkemo i sur. (2009)			
	ACE-inhibitorno	Yamamoto i sur. (1994)							
	QEPVLGPVRGPFPIIV	209-224	1718,0238	ACE-inhibitorno	Lu i sur. (2016)				
	κ -kazein (P02668)	ARHPHPLSFM	117-127	1329,6736	KYIPIQYVL	45-53	1136,7007	Antioksidativno	Abdel-Hamid i sur. (2019)
					Antioksidativno	Tonolo i sur. (2018)			
					ACE-inhibitorno	Ibrahim i sur. (2017)			

Usporedbom tablica 16 i 17 vidljivo je kako je pronađen veliki broj peptida, ali da samo neki od tih peptida posjeduju jedno ili više bioaktivnih svojstava. Djelovanjem proteolitičkog sustava radnog soja *L. lactis* ZGBP5-51 dolazi do nespecifičnog cijepanja proteina u mlijeku te pri tome nastaju peptidi različitih veličina. Uslijed nespecifičnog cijepanja proteina dolazi do gubitka jedne ili više aminokiselina što posljedično može dovesti do gubitka bioaktivnih svojstva takvih peptida.

4.2.1. ACE-inhibitorni peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka

Angiotenzin I-konvertirajući enzim (ACE) je karboksipeptidaza uključena u renin-angiotenzin-aldosteronski sustav (RAAS), koji regulira krvni tlak. ACE je poznat po dvostrukom djelovanju u pretvaranju inaktivnog angiotenzina I (Ang I) u aktivni angiotenzin II (Ang II) te po razgradnji aktivnog bradikinina (BK), od kojih oba imaju važnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka (Wong, 2016). ACE-inhibitorni peptidi djeluju kao kompetitivni inhibitori ACE, pri čemu sprječavaju pretvorbu Ang I u Ang II, kao i degradaciju BK, čime značajno mogu utjecati na snižavanje krvnog tlaka. Iako mehanizam djelovanja ACE-inhibitornih peptida nije još u potpunosti razjašnjen, poznato je da inhibicija aktivnosti ACE ovisi o strukturi peptida. Prethodno je pokazano su dobri ACE inhibitori oni peptidi koji u svojoj sekvenci na C-terminalnom položaju imaju aromatski aminokiselinski ostatak (Ong i Shah, 2008). Nadalje, alifatski, bazični i aromatski aminokiselinski ostaci na predzadnjem položaju, te prolinski, aromatski i alifatski aminokiselinski ostaci na zadnjem položaju u sekvenci, pojačavaju ACE-inhibitorno svojstvo takvih peptida (Pihlanto-Leppälä i sur., 2000).

Fermentirani mliječni proizvodi smatraju se dobrim izvorom ACE-inhibitornih peptida koji pripadaju u najveću skupinu bioaktivnih peptida porijeklom iz kazeina. Navedeni peptidi nazivaju se kazokinini, a u njihovoj tvorbi kao prekursor mogu poslužiti sve kazeinske frakcije (Yamamoto i sur., 1994). U analiziranim uzorcima fermentiranog mlijeka pronađeno je pet različitih bioaktivnih peptida za koje je utvrđeno i u literaturi opisano ACE-inhibitorno djelovanje (tablica 17). Begunova i sur. (2020) su u svojem istraživanju pokazali da peptid IQPKTKVIPYVRYL, porijeklom iz α -s2-kazeina, posjeduje ACE-inhibitorno djelovanje. Ovaj podatak je u skladu s prethodnim istraživanjima kojima se pokazalo da redosljed aminokiselina u peptidnoj sekvenci ima utjecaj na potencijalno ACE-inhibitorno djelovanje (Ong i Shah, 2008; Pihlanto-Leppälä i sur., 2000). Zanimljivo je kako peptid TKVIPYVRYL ne posjeduje ACE-inhibitorno djelovanje ili ono još nije istraženo, a razlikuje se u samo četiri

aminokiseline u odnosu na IQPKTKVIPYVRYL. Kako bi se potvrdila važnost slijeda aminokiselina ili moguće ACE-inhibitorno djelovanje TKVIPYVRYL, potrebna su daljnja istraživanja. Nadalje, u istraživanju Ibrahim i sur. (2017) dokazano je snažno ACE-inhibitorno djelovanje peptida ARHPHLSFM (fragment κ -kazeina) u usporedbi s Kaptoprilom (lijek s ACE-inhibitorskim djelovanjem) što otvara potencijalnu mogućnost korištenja ovog peptida kao terapeutika. Preostala tri peptida pronađena u uzorcima potiču iz β -kazeina. Peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV posjeduje nekoliko različitih bioaktivnih svojstava uključujući ACE-inhibitorno, imunomodulatorno, antimikrobno i antitrombotično djelovanje. Peptidi QEPVLGPVRGPFPIIV i VYPFPGPIP su u istraživanju Eisele i sur. (2013) okarakterizirani kako jaki antioksidativni peptidi i slabi ACE-inhibitori. Zanimljivo je istraživanje Caira i sur. (2016) u kojemu su ACE-inhibitorski peptidi YQEPVLGPVRGPFPIIV i QEPVLGPVRGPFPIIV detektirani u plazmi ljudi nakon uvođenja prehrane obogaćene sirom. Ovo istraživanje još jednom potvrđuje pozitivan učinak fermentiranih mliječnih proizvoda na zdravlje ljudi te potencijalnu mogućnost primjene bioaktivnih peptida kao bioterapeutika.

4.2.2. Antitrombotični peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka

Druga skupina bioaktivnih peptida koji imaju pozitivan učinak na kardiovaskularni sustav su antitrombotični peptidi. Ovi peptidi djeluju na način da inhibiraju vezanje fibrinogena i trombocita čime onemogućavaju stvaranje tromba. Antitrombotični peptidi, dobiveni iz hidrolizata mliječnih proteina i proteina iz drugih izvora, ne pokazuju gotovo nikakav toksični učinak te imaju veliki potencijal za primjenu u prevenciji i liječenju kardiovaskularnih bolesti (Yang i sur., 2007).

U istraživanju koje su proveli Rojas-Ronquillo i sur. (2012) ispitana je ACE-inhibitorska i antitrombotična aktivnost u mlijeku fermentiranom zasebno sojevima *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus casei Shirota*. U mlijeku fermentiranom sojem *Streptococcus thermophilus* nije zabilježena antitrombotična aktivnost, dok je iz mlijeka fermentiranog sojem *Lactobacillus casei Shirota* izoliran i identificiran peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV koji osim ranije utvrđene ACE-inhibitorske aktivnosti ima i potencijalnu antitrombotičnu aktivnost. Identičan peptid pronađen je u uzorcima mlijeka fermentiranog sojem *L. lactis* ZGBP5-51 koji je korišten u ovom eksperimentu te se za taj peptid može pretpostaviti antitrombotično djelovanje (tablica 17).

4.2.3. Antioksidativni peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka

Iako je oksidativni metabolizam nužan za preživljavanje stanica, kao produkti nastaju slobodni radikali i drugi reaktivni oblici kisika što dovodi do negativnih oksidativnih promjena. Kako bi se spriječio negativan utjecaj na organizam, važna je prisutnost antioksidansa. Antioksidansi djeluju na način da sprječavaju nastajanje radikala ili uklanjaju radikale i vodikov peroksid te druge reaktivne spojeve. Poznato je da peptidi nastali razgradnjom mliječnih proteina posjeduju antioksidativno djelovanje. Antioksidativni peptidi su u pravilu građeni od 5 do 11 aminokiselina uključujući hidrofobne aminokiseline, prolin, histidin, tirozin ili triptofan. Pretpostavlja se važnost strukture i aktivnosti peptida, ali mehanizam antioksidativnog djelovanja još nije u potpunosti razjašnjen (Pihlanto, 2006).

U ovom radu identificirana su četiri bioaktivna peptida za koje u znanstvenoj literaturi postoje informacije o antioksidativnoj aktivnosti (tablica 17). Prethodno je pokazano da peptid VYPPGPIPN, porijeklom iz β -kazeina, iskazuje antioksidativni učinak u *in vitro* uvjetima, ali je za daljnju potvrdu o stvarnom učinku na humani organizam potrebno provesti dodatna istraživanja u *in vivo* uvjetima na humanom modelu (Eisele i sur., 2013). U istraživanju Tonolo i sur. (2018) pokazano je da peptid ARHPHLSFM, porijeklom iz κ -kazeina, pridonosi preživljavanju kulture stanica Caco-2 u uvjetima oksidativnog stresa što je dovelo do pretpostavke da navedeni peptid ima antioksidativni učinak. Nadalje, u drugom istraživanju Tonolo i sur. (2020) dokazano je antioksidativno djelovanje peptida IQPKTKVIPYVRYL *in vitro* i u Caco-2 kulturi stanica. Abdel-Hamid i sur. (2019) su u svojem istraživanju iz mlijeka fermentiranog sojem *Lactobacillus casei* ATCC 393 uspješno izolirali brojne peptide za koje je poznato da posjeduju ACE-inhibitorno, antioksidativno, antikancerogeno i imunomodulatorno djelovanje. Od tih peptida, KYIPIQYVL, porijeklom iz κ -kazeina, posjeduje antioksidativno djelovanje. Svi spomenuti peptidi identificirani su u analiziranim uzorcima mlijeka fermentiranog sojem *L. lactis* ZGBP5-51 te se za njih može pretpostaviti antioksidativno djelovanje. Do sada su sva istraživanja provedena isključivo u *in vitro* uvjetima te se ne može sa sigurnošću potvrditi njihovo antioksidativno djelovanje u organizmu ljudi. Kako bi se navedeni peptidi mogli koristiti kao prirodni antioksidansi u funkcionalnoj hrani ili kao terapeutici, potrebno je provesti daljnja istraživanja na humanim modelima.

4.2.4. Antimikrobni peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka

Antimikrobni peptidi (AMP) su proteini niske molekulske mase koji pokazuju antimikrobno djelovanje protiv bakterija, funga, parazita i virusa (Li i sur., 2012). Zadnjih nekoliko desetljeća povećava se učestalost pojave antibiotske rezistencije te radi toga raste interes za istraživanjem ove skupine bioaktivnih peptida. Budući da brojni peptidi imaju različiti mehanizam antimikrobnog djelovanja u odnosu na poznate antibiotike, oni mogu nadopuniti djelovanje antibiotika ili ih u određenim slučajevima u potpunosti zamijeniti (Boman, 1995).

Poznato je kako su proteini iz hrane, a osobito mliječni proteini, dobar izvor AMP-a. Primjerice, Birkemo i sur. (2009) proveli su istraživanje u kojemu su prvi put izolirani i okarakterizirani peptidi iz svježeg goveđeg kolostruma koji imaju potencijalno antimikrobno djelovanje: YQEPVLGPVRGPFPIIV [β -CN f(193-209)], YQEPVLGPVRGPFPI [β -CN f(193-207)] i RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF [α S1-CN f(16-38)]. Nadalje, istraživanjem Alvarez-Ordóñez i sur. (2013) pokazala se važnost specifičnih aminokiselina α -s2-kazeina f(183-207) za njegovu antimikrobnu aktivnost protiv patogena *Listeria monocytogenes* i *Cronobacter sakazakii*. Iako precizan mehanizam djelovanja još uvijek nije razjašnjen, López-Expósito i sur. (2008) su pretpostavili da su početna mjesta vezanja peptida α -s2-kazeina lipoteihoična kiselina u Gram-pozitivnih bakterija i lipopolisaharidi u Gram-negativnih bakterija te da je peptid sposoban stvarati pore u vanjskoj membrani Gram-negativnih bakterija i staničnoj stijenci Gram-pozitivnih bakterija, uzrokujući time istjecanje unutarstaničnog sadržaja.

U analiziranim uzorcima fermentiranog mlijeka pronađena su dva bioaktivna peptida, YQEPVLGPVRGPFPIIV i TKVIPYVRYL, za koje u znanstvenoj literaturi postoje podaci o antimikrobnom djelovanju te se za iste može pretpostaviti da posjeduju antimikrobna svojstva (tablica 17). Kako bi se potvrdilo antimikrobno djelovanje, odnosno imaju li ovi peptidi sposobnost sprječavanja infekcija u ljudskom organizmu, potrebna su daljnja istraživanja.

4.2.5. Imunomodulatorni peptidi identificirani u uzorcima fermentiranog mlijeka

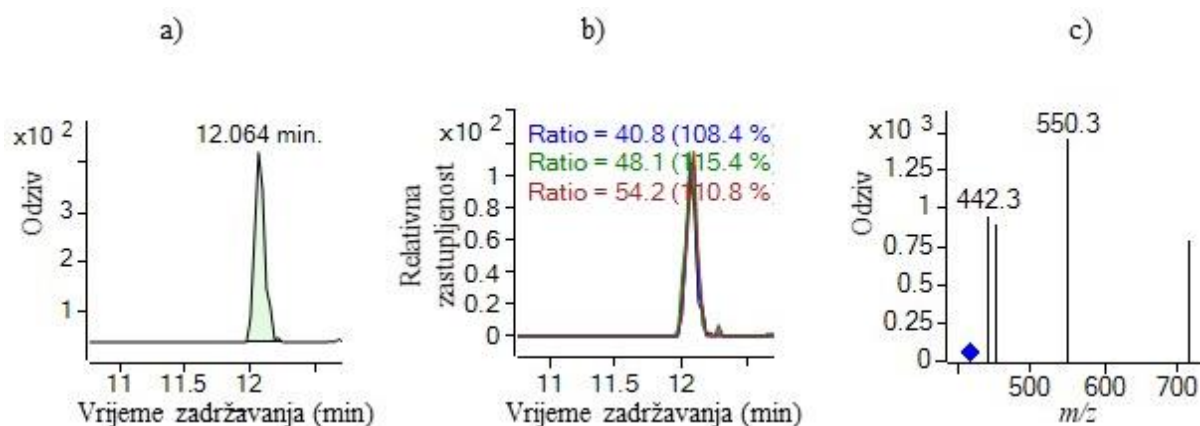
Zadnjih nekoliko desetljeća raste interes za proučavanje odnosa između prehrane i imuniteta zbog hipoteze da konzumacija određene hrane može smanjiti osjetljivost na nastanak i/ili progresiju bolesti imunološkog sustava. Osim nutritivne uloge, proteini u mlijeku su od

fiziološke važnosti kao potencijalni izvor biološki aktivnih peptida (Schlimme i Meisel, 1995). Mnogi imunomodulatorni peptidi potječu većinom iz kazeina, a odgovaraju uglavnom aminokiselinskim ostacima 106-169 goveđeg κ -kazeina (kazeinomakropeptidi) i ostacima 63-68, 191-193, 193-202 goveđeg β -kazeina. Pri tome su pronađeni i supresivni i stimulirajući učinci na komponente imunološkog sustava (Kayser i Meisel, 1996; Otani i Hata, 1995; Parker i sur., 1984).

Analizom uzoraka fermentiranog mlijeka u ovom radu pronađen je samo jedan bioaktivni peptid za kojega je prema znanstvenoj literaturi potvrđeno imunomodulatorno djelovanje (tablica 17). Osim imunomodulatornog djelovanja, za peptid YQEPVLPVVRGPFPIIV je već ranije opisano ACE-inhibitorno, antitrombotično i antimikrobno djelovanje. Istraživanje Sandre i sur. (2001) pokazalo je da peptid β -CN (193-209) pojačava ekspresiju antigena MHC II na makrofagima koji potječu iz koštane srži, povećava njihovu fagocitnu aktivnost i inducira otpuštanje citokina. Ovi rezultati sugeriraju da bi peptid β -CN (193-209) mogao pokazati anti-infektivnu imunostimulirajuću aktivnost bez proupalnih učinaka kroz modulaciju svojstava makrofaga. U analiziranim uzorcima fermentiranog mlijeka pronađena je identična aminokiselinska sekvenca porijeklom iz β -kazeina, ali je razlika u položaju te sekvence u proteinu. Zbog razlike u korištenim bazama podataka, sekvenca β -kazeina navedena u ovom radu posjeduje i signalnu sekvencu na početku lanca te se zbog toga položaj peptida YQEPVLPVVRGPFPIIV (208-224) razlikuje od položaja navedenog u literaturi (193-209).

4.3. CILJANA ANALIZA PEPTIDA IZ UZORAKA MLIJEKA VERONIKA

Kako bi se provela kvantifikacija bioaktivnih peptida, provedena je MRM metoda prema prethodno opisanim parametrima (Novak i sur., 2022b; Prilog 1). Analiza je provedena na 1290 Infinity HPLC sustavu povezanom na 6460 TripleQuad spektrometar masa s ugrađenim elektrosprej ionizacijskim izvorom (Agilent Technologies, SAD), a identifikacija peptida i analiza spektara napravljena je pomoću MassHunter Workstation softvera, verzija B.08.00. (Agilent Technologies, SAD). Na slici 12 prikazani su reprezentativni kromatogrami i MS spektar peptida TKVIPYVRYL (m/z 417,9 Da).



Slika 12. Reprezentativni MRM kromatogrami peptida TKVIPYVRYL (m/z 417,9 Da) snimljeni u uzorku fermentiranog mlijeka. a) MRM kromatogram fragmentnog iona korištenog za kvantifikaciju (tranzicija 417,9→550,3); b) Preklopljeni MRM kromatogrami svih fragmentnih iona; c) MS spektar svih fragmentnih iona

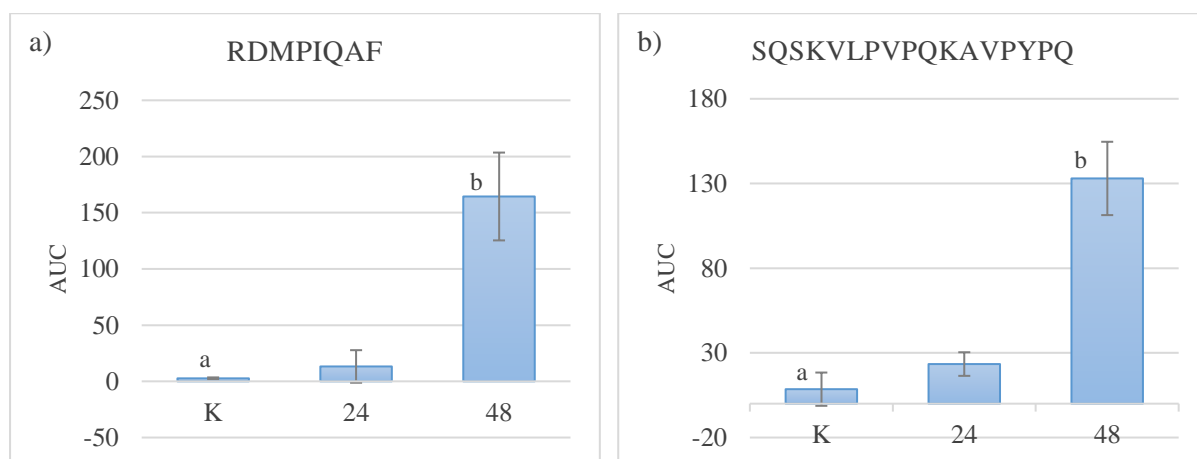
Ciljanom analizom pronađena su tri bioaktivna peptida više u odnosu na ne-ciljanu analizu. Takav je rezultat očekivan s obzirom da je analiza provedena na uređaju veće osjetljivosti. Sekvence tih bioaktivnih peptida korištene su za usporedbu s peptidnim sekvencama u bazama podataka MBPD (engl. *Milk Bioactive Peptide Database*) i BIOPEP-UWM™ (Minkiewicz i sur., 2019) kako bi se utvrdilo koja bioaktivna svojstva posjeduju. Prema podacima u znanstvenoj literaturi, pokazalo se da su sve tri sekvence porijeklom iz β -kazeina, a peptidi i bioaktivna svojstva prikazani su u tablici 18.

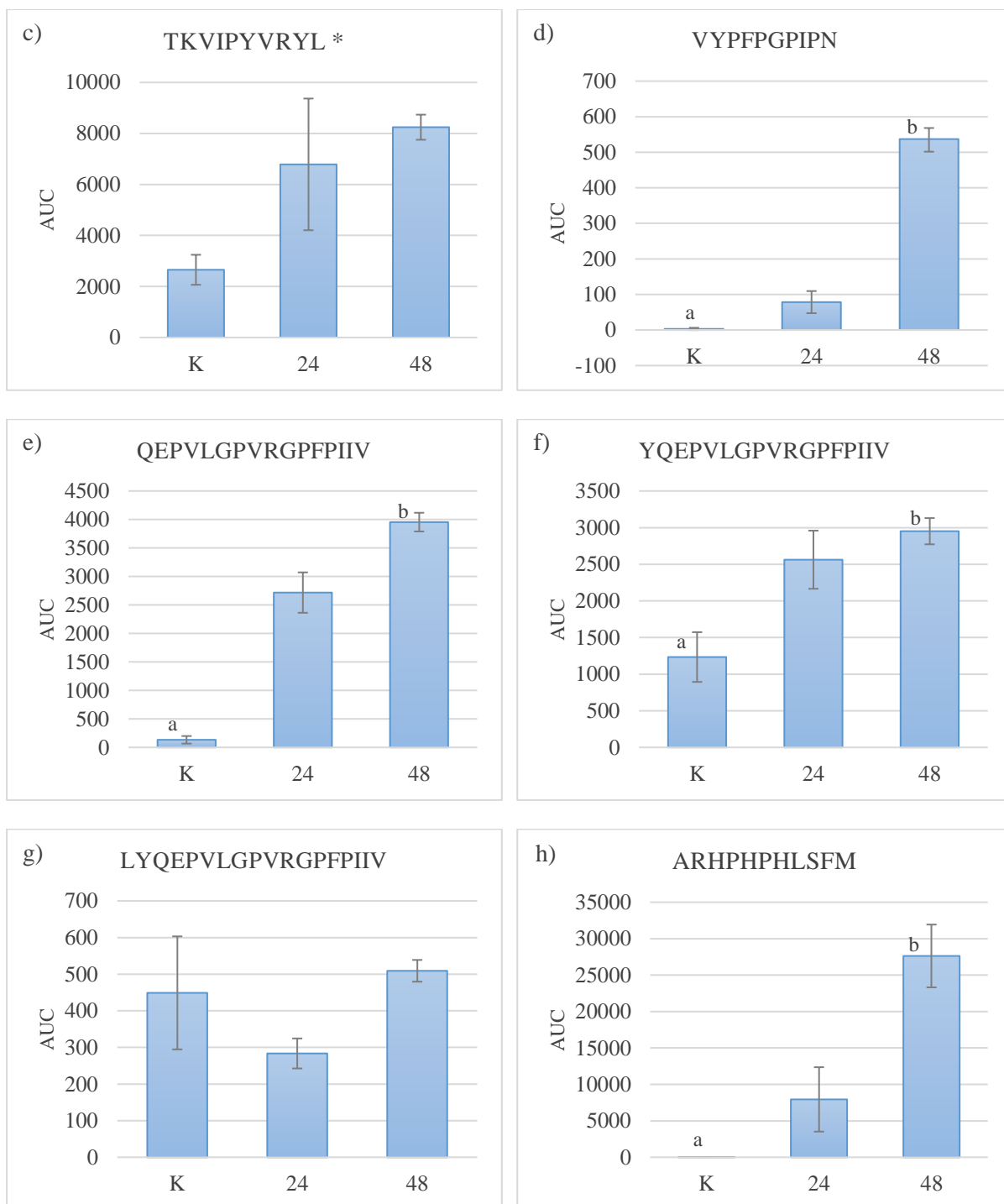
Tablica 18. Bioaktivni peptidi pronađeni u uzorcima fermentiranog mlijeka nakon provedene LC-MRM-MS analize

Protein (ID)	Sekvenca peptida	Interval AK	m/z [Da]	Funkcija	Autori
	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	181-197	1865,0378	Antioksidativno	Tonolo i sur. (2020)
β -kazein (P02666)	RDMPIQAF	198-205	977,5109	ACE-inhibitorno	Yamamoto i sur. (1994)
	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	207-224	1994,1832	Imunomodulatorno	Coste i sur. (1992)

Nadalje, koristeći JASP softver verzija 0.17.1 (JASP tim, 2023) provedena je statistička analiza rezultata dobivenih nakon provedene MRM metode te su isti prikazani grafički (slika 13). Na grafičkim prikazima vrijednost površine (engl. *area under curve*, AUC) u korelaciji je s količinom peptida detektiranih u uzorcima. Korišten je klasični ANOVA test te je primijenjen Dunn-Bonferroni „post-hoc“ test za usporedbu više parova srednjih vrijednosti u grupi podataka. Statističke razlike između skupina smatrane su značajnima kada su p vrijednosti bile manje od 0,05.

Statistički značajan porast količine peptida zabilježen je u 6 od ukupno 8 kvantificiranih uzoraka, uspoređujući kontrolu i uzorak nakon 48 h fermentacije provedene radnim sojem *L. lactis* ZGBP5-51 (slika 13a, 13b, 13d-f, 13h). Na slici 13c uočljiv je porast količine peptida TKVIPYVRYL tijekom 48 h fermentacije, ali se dobivena vrijednost nije pokazala statistički značajnom ($p > 0,05$). Vidljivo je kako rezultati analize peptida LYQEPVLGPVRGPFPIIV značajno odstupaju u odnosu na preostale uzorke (slika 13g). Uslijed skladištenja mlijeka vjerojatno je došlo do razgradnje mliječnih proteina što je posljedično dovelo do porasta količine peptida LYQEPVLGPVRGPFPIIV u kontrolnom uzorku. Nakon 24 h fermentacije provedene radnim sojem, došlo je do smanjenja količine navedenog peptida u uzorku što može značiti da je radni soj razgradio određenu količinu ovog peptida prisutnog u kontrolnom uzorku. Nakon 48 h fermentacije ponovno je zabilježen porast količine ovog peptida jer je radni soj nastavio razgradnju proteina u mlijeku čime su nastale nove molekule navedenog peptida.





Različiti eksponenti (^{a,b}) ukazuju na statistički značajne razlike među uzorcima ($p < 0,05$)

* Nije detektirana statistički značajna promjena koncentracije ($p > 0,05$)

Slika 13. Grafički prikaz kvantifikacije bioktivnih peptida. (a) peptid RDMPIQAF; (b) peptid SQSKVLPVPQKAVPYPQ; (c) peptid TKVIPYVRYL; (d) peptid VYFPFGPIP; (e) peptid QEPVLGPVRGPFPIIV; (f) peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV; (g) peptid LYQEPVLGPVRGPFPIIV; (h) peptid ARHPHPLSFM

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata provedenih istraživanja, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Korišteni radni soj *L. lactis* ZGBP5-51 proizvodi mliječnu kiselinu čime snižava pH vrijednost okolnog medija. Soj dobro podnosi pad pH vrijednosti s obzirom da ne dolazi do značajnog pada broja živih stanica tijekom 48 h fermentacije.
2. Djelovanjem proteolitičkog sustava *L. lactis* ZGBP5-51 iz mliječnih proteina (α -s1-, α -s2-, β - i κ -kazeina) oslobođeno je ukupno 23 različita peptida zbog čega se sustav može smatrati efikasnim.
3. Ne-ciljanom analizom identificirano je sedam bioaktivnih peptida (TKVIPYVRYL, VYPPFGPIPN, ARHPHPLSFM, KYIPIQYVL, QEPVLGPVRGPFPIIV, IQPKTKVIPYVRYL, YQEPVLGPVRGPFPIIV) za koje je utvrđeno i u znanstvenoj literaturi opisano ACE-inhibitorno, antitrombotično, antioksidativno, antimikrobno i imunomodulatorno djelovanje.
4. Ciljanom analizom identificirana su tri dodatna peptida za koje je poznato da posjeduju određena bioaktivna svojstva: RDMPIQAF, SQSKVLPVPQKAVPYPQ i LYQEPVLGPVRGPFPIIV.
5. Ciljanom analizom uspješno je kvantificirano osam prethodno identificiranih bioaktivnih peptida. Od toga se za ukupno šest peptida (RDMPIQAF, VYPPFGPIPN, QEPVLGPVRGPFPIIV, SQSKVLPVPQKAVPYPQ, YQEPVLGPVRGPFPIIV, ARHPHPLSFM) pokazao statistički značajan porast koncentracije u uzorcima nakon 48 h fermentacije provedene radnim sojem *L. lactis* ZGBP5-51.
6. Radni soj korišten u eksperimentu ima dobro razvijen proteolitički sustav što posljedično dovodi do nastanka većeg broja peptida od kojih neki peptidi prema znanstvenoj literaturi posjeduju određena bioaktivna svojstva, a postoji mogućnost i da se daljnjim istraživanjima otkriju novi, do sada neistraženi peptidi s bioaktivnim djelovanjem.

6. LITERETURA

Abdel-Hamid M, Romeih E, Gamba RR, Nagai E, Suzuki T, Koyanagi T., Enomoto T (2019) The biological activity of fermented milk produced by *Lactobacillus casei* ATCC 393 during cold storage. *In. Dairy J* **91**, 1–8. doi: 10.1016/j.idairyj.2018.12.007

Abeer MM, Trajkovic S, Brayden DJ (2021) Measuring the oral bioavailability of protein hydrolysates derived from food sources: A critical review of current bioassays. *Biomed Pharmacother* **144**,112275. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112275

Akbarian M (2021) Insulin therapy; a valuable legacy and its future perspective. *Int J Biol Macromol* **181**,1224–1230. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.052

Akbarian M, Khani A, Eghbalpour S, Uversky VN (2022) Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci* **23**,1445. doi: 10.3390/ijms23031445

Alvarez-Ordóñez A, Begley M, Clifford M, Deasy T, Considine K, Hill C (2013) Structure-Activity Relationship of Synthetic Variants of the Milk-Derived Antimicrobial Peptide α 2-Casein f(183–207). *Appl Environ Microbiol* **79**,5179-85. doi: 10.1128/AEM.01394-13

Andersen AZ, Carvalho AL, Neves AR, Santos H, Kummer U, Olsen LF (2009) The metabolic pH response in *Lactococcus lactis*: an integrative experimental and modelling approach. *Comput Biol Chem* **33**,71-83. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2008.08.001

Baum F, Fedorova M, Ebner J, Hoffmann R, Pischetsrieder M (2013) Analysis of the endogenous peptide profile of milk: identification of 248 mainly casein-derived peptides. *J Proteome Res* **12**,5447-62. doi: 10.1021/pr4003273

Beaglehole R, Ebrahim S, Reddy S, Voûte J, Leeder S (2007) Prevention of chronic diseases: a call to action. *Lancet* **370**,2152-7. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61700-0

Begunova AV, Savinova OS, Glazunova OA, Moiseenko KV, Rozhkova IV, Fedorova TV (2020) Development of Antioxidant and Antihypertensive Properties during Growth of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus reuteri* on Cow's Milk: Fermentation and Peptidomics Study. *Foods* **10**,17. doi: 10.3390/foods10010017

Bhat MY, Dar TA, Singh LR (2016) Casein proteins: structural and functional aspects. U: Milk Proteins – From Structure to Biological Properties and Health Aspects. (Gigli, I., ured.) London, UK: InTechOpen, str. 1–18.

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**,233-40. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03996.x

Boman HG (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **13**,61-92. doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.000425

Bruker (2015) Bruker Guide to MALDI Sample Preparation – Instructions for Use. [www.bruker.com/care] broj proizvoda: 8702557

Butorac K (2022) Funkcionalna uloga egzopolisaharida i bakteriocina u probiotičkoj aktivnosti autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Caira S, Pinto G, Vitaglione P, Dal Piaz F, Ferranti P, Addeo F (2016) Identification of casein peptides in plasma of subjects after a cheese-enriched diet. *Food Res Int* **84**, 108–112. doi: 10.1016/j.foodres.2016.03.023

Clare DA, Swaisgood HE (2000) Bioactive milk peptides: A prospectus. *J Dairy Sci* **83**, 1187-1195. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74983-6

Coste M, Rochet V, Léonil J, Mollé D, Bouhallab S, Tomé D (1992) Identification of C-terminal peptides of bovine beta-casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunol Lett* **33**,41-6. doi: 10.1016/0165-2478(92)90091-2

Davoodi SH, Shahbazi R, Esmaeili S, Sohrabvandi S, Mortazavian A, Jazayeri S, Taslimi A. (2016) Health-Related Aspects of Milk Proteins. *Iran J Pharm Res* **15**,573-591.

de Medina FS, Daddaoua A, Requena P, Capitán-Cañadas F, Zarzuelo A, Dolores Suárez M, Martínez-Augustin O (2010) New insights into the immunological effects of food bioactive peptides in animal models of intestinal inflammation. *Proc Nutr Soc* **69**:454-62. doi: 10.1017/S0029665110001783

Dekić Rozman S, Butorac A, Bertoša R, Hrenović J, Markeš M (2021) Loss of thermotolerance in antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Environ Health Res* **32**,1581-1593. doi: 10.1080/09603123.2021.1898550

Dietrich U, Dürr R, Koch J (2013) Peptides as drugs: from screening to application. *Curr Pharm Biotechnol* **14**,501–512. doi: 10.2174/13892010113149990205

Doeven MK, Abele R, Tampé R, Poolman B (2004) The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* **279**,32301-7. doi: 10.1074/jbc.M404343200

Duffuler P, Bhullar KS, de Campos Zani SC, Wu J (2022) Bioactive Peptides: From Basic Research to Clinical Trials and Commercialization. *J Agric Food Chem* **70**, 3585–3595. doi: 10.1021/acs.jafc.1c06289

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. doi: 10.1007/s00217-012-1894-5

Foucaud C, Kunji ER, Hagting A, Richard J, Konings WN, Desmazeaud M, Poolman B (1995) Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J Bacteriol* **177**:4652-7. doi: 10.1128/jb.177.16.4652-4657.1995

Gobbetti M, Minervini F, Rizzello CG (2004) Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int J Dairy Technol* **57**,173-188. doi: 10.1111/j.1471-0307.2004.00139.x

Hagting A, Kunji ER, Leenhouts KJ, Poolman B, Konings WN (1994) The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J Biol Chem* **269**,11391-9.

Hansen EB, Marcatili P (2020) Modeled Structure of the Cell Envelope Proteinase of *Lactococcus lactis*. *Front Bioeng Biotechnol* **8**, 613986. doi: 10.3389/fbioe.2020.613986

Horne DS (2006) Casein micelle structure: Models and muddles. *Curr Opin Coll Interf Sci*. **11**,148-153. doi:10.1016/j.cocis.2005.11.004

Ibrahim HR, Ahmed AS, Miyata T (2017) Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *J Adv Res* **8**,63-71. doi: 10.1016/j.jare.2016.12.002

JASP Team (2023). JASP (Version 0.17.1) [Computer software].

Kayser H, Meisel H (1996) Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett* **383**,18–20. doi: 10.1016/0014-5793(96)00207-4

Korhonen H, Pihlanto A (2006) Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J* **16**,945–960. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012

Korhonen H, Pihlanto-Leppälä A (2004) Milk-derived bioactive peptides: Formation and prospects for health promotion U: Handbook of functional dairy products, (Shortt, C., O'Brien, J., ured.), CRC Press, Florida, USA, str. 109-124.

Kos B (2001) Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**,207–215. doi: 10.1016/j.peptides.2012.07.001

Liu M, Bayjanov JR, Renckens B, Nauta A, Siezen RJ (2010) The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* **11**,36. doi: 10.1186/1471-2164-11-36

López-Expósito I, Amigo L, Recio I (2008) Identification of the initial binding sites of alphas2-casein f(183-207) and effect on bacterial membranes and cell morphology. *Biochim Biophys Acta* **1778**,2444-9. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.06.018

Lorenzo JM, Munekata PE, Gómez B, Barba FJ, Mora L, Pérez-Santaescolástica C, Toldrá F (2018) Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends Food Sci Technol* **79**,136–147. doi: 10.1016/j.tifs.2018.07.003

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. doi: 10.3168/jds.2015-9569

Lucarini M (2017) Bioactive Peptides in Milk: From Encrypted Sequences to Nutraceutical Aspects. *Beverages* **3**,41. doi: 10.3390/beverages3030041

MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, Kern R, Tabb DL, Liebler DC, MacCoss MJ (2010) Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966–968.

Marcone S, Belton O, Fitzgerald DJ (2017) Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol* **83**,152-162. doi: 10.1111/bcp.13002

Meisel H, FitzGerald RJ (2003) Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des* **9**,1289-95. doi: 10.2174/1381612033454847

Mills S, Ross RP, Coffey A (2011) Lactic Acid Bacteria / *Lactococcus lactis*. U: Encyclopedia of Dairy Sciences, 2. izd. (Fuquay, J.W., ured.), Academic Press, str. 132-137. doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00266-1

Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M (2019) BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *Int J Mol Sci* **20**, 5978, doi:10.3390/ijms20235978

Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS (2016) Milk derived bioactive peptides and their impact on human health - A review. *Saudi J Biol Sci* **23**,577-583. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.06.005

Mohanty DP, Tripathy P, Mohapatra S, Samantaray DP (2014) Bioactive potential assessment of antibacterial peptide produced by *Lactobacillus* isolated from milk and milk products. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **3**,72–80.

Mora L, Aristoy MC, Toldrá F (2016) Bioactive Peptides in Foods. In: Encyclopedia of Food and Health (Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F., ured.), Academic Press, str. 395–400. doi: 10.1016/b978-0-12-384947-2.00067-2

Novak J, Leboš Pavunc A, Butorac K, Banić M, Čuljak N, Rak H, Blažević M, Iveljić AM, Šušković J, Kos B (2022a) Caseinolytic proteases of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains isolated from fermented dairy products. *Mljekarstvo* **72**,11-21. doi: 10.15567/mljekarstvo.2022.0102

Novak J, Butorac K, Leboš Pavunc A, Banić M, Butorac A, Lepur A, Oršolić N, Tonković K, Bendelja K, Čuljak N (2022b) Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules* **27**,160. doi: 10.3390/molecules27010160

Ong L, Shah NP (2008) Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *LWT-Food Sci Technol*, **41**, 1555-1566. doi:10.1016/j.lwt.2007.11.026

Otani H, Hata I (1995) Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests. *J Dairy Res* **62**, 339–348. doi: 10.1017/s0022029900031034

Park YW (2009) Overview of bioactive components in milk and dairy products. U: Bioactive Components in Milk and Dairy Products, [online] (Park, Y.W., ured.), *Wiley-Blackwell Publishers*, Oxford, UK, str. 3–14. doi: 10.1002/9780813821504.ch1 (Pristupljeno 15. veljače 2023.)

Park YW, Nam MS (2015) Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: A Review. *Korean J Food Sci Anim Resour* **35**,831-40. doi: 10.5851/kosfa.2015.35.6.831

Parker F, Migliore-Samour D, Floc'h F, Zerial A, Werner GH, Jolles J, Casaretto M, Zahn H, Jolles P (1984) Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur J Biochem* **145**,677–682. doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08609.x

Perego S, Cosentino S, Fiorilli A, Tettamanti G, Ferraretto A (2012) Casein phosphopeptides modulate proliferation and apoptosis in HT-29 cell line through their interaction with voltage-operated L-type calcium channels. *J Nutr Biochem* **23**,808–816. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.04.004

Perego S, Zabeo A, Marasco E, Giussani P, Fiorilli A, Tettamanti G (2013) Casein phosphopeptides modulate calcium uptake and apoptosis in Caco2 cells through their interaction with the TRPV6 calcium channel. *J Funct Foods* **5**,847–857. doi: 10.1016/j.jff.2013.01.032

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

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

Pihlanto A (2011) Bioactive Peptides. U: Milk Proteins Products, (Fuquay, J., W., ured.), Academic Press, str. 879-886.

Pihlanto-Leppälä A, Koskinen P, Piilola K, Tupasela T, Korhonen H (2000) Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J Dairy Res* **67**,53-64. doi: 10.1017/s0022029999003982

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

Rebouillat S, Ortega-Requena S (2015) Potential Applications of Milk Fractions and Valorization of Dairy By-Products: A Review of the State-of-the-Art Available Data, Outlining the Innovation Potential from a Bigger Data Standpoint. *J biomater nanobiotechnol* **6**,176-203. doi: 10.4236/jbnb.2015.63018

Rojas-Ronquilloa R, Cruz-Guerreroa A, Flores-Nájeraa A, Rodríguez-Serranoa G, Gómez-Ruiza L, Reyes-Grajedab JP, Jiménez-Guzmána J, García-Garibay M (2012) Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int Dairy J* **26**,147-154. doi: 10.1016/j.idairyj.2012.05.002

Samaržija D, Antunac N, Lukač Havranek J (2001) Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo*. **51**, 35-48.

Sánchez C, Neves AR, Cavalheiro J, dos Santos MM, García-Quintáns N, López P, Santos H (2008) Contribution of citrate metabolism to the growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at low pH. *Appl Environ Microbiol* **74**,1136-44. doi: 10.1128/AEM.01061-07

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

Sandré C, Gleizes A, Forestier F, Gorges-Kergot R, Chilmonczyk S, Léonil J, Moreau MC, Labarre C (2001) A Peptide Derived from Bovine β -Casein Modulates Functional Properties of Bone Marrow-Derived Macrophages from Germfree and Human Flora-Associated Mice. *J Nutr* **131**, 2936-2942. doi: 10.1093/jn/131.11.2936

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

Schaafsma G (2009) Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. *Eur J Clin Nutr* **63**,1161–1168. doi: 10.1038/ejcn.2009.56

Schlimme E, Meisel H (1995) Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung* **39**,1-20. doi: 10.1002/food.19950390102

Séverin S, Wenshui X (2005) Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **45**,645-656. doi: 10.1080/10408690490911756

Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc A, Habjanič K, Matošić S (2010) Antimicrobial activity-The most important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol Biotechnol* **48**, 296-307.

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

Tonolo F, Sandre M, Ferro S, Folda A, Scalcon V, Scutari G, Feller E, Marin O, Bindoli O, Rigobello MP (2018) Milk-derived bioactive peptides protect against oxidative stress in a Caco-2 cell model. *Food Funct* **9**,1245-1253. doi: 10.1039/C7FO01646H

Tonolo F, Fiorese F, Moretto L, Folda A, Scalcon V, Grinzato A, Ferro S, Arrigoni G, Bindoli A, Feller E, Bellamio M, Marin O, Rigobello MP (2020) Identification of New Peptides from

Fermented Milk Showing Antioxidant Properties: Mechanism of Action. *Antioxidants (Basel)* **9**,117. doi: 10.3390/antiox9020117

Tratnik Lj, Božanić R (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mlijeckarska udruga, Zagreb, str. 23-69.

Tynkkynen S, Buist G, Kunji E, Kok J, Poolman B, Venema G, Haandrikman A (1993) Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **175**,7523-32. doi: 10.1128/jb.175.23.7523-7532.1993

Udenigwe CC, Fogliano V (2017) Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides: Two faces of the same coin? *J Funct Foods* **35**,9–12. doi: 10.1016/j.jff.2017.05.029

Wal JM (2001) Structure and function of milk allergens. *Allergy* **56**,35-38. PMID: 11298005

Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev EM (2015) Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Sci Rep* **5**, 15159. doi: 10.1038/srep15159

Wong MKS (2016) Angiotensin Converting Enzymes. *Handbook of Hormones*. 263–e29D-4. doi: 10.1016/B978-0-12-801028-0.00254-3

Xu Q, Hong H, Wu J, Yan X (2019) Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. *Trends Food Sci Technol* **86**,399–411. doi: 10.1016/j.tifs.2019.02.050

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**,917-22. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77026-0

Yang Y (2014) Targeted Protein and Peptide Quantitation Using Agilent LC/MS and Skyline Software. *Agilent Technologies*.

Yang WG, Wang Z, Xu SY (2007) A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chin Chem Lett* **18**,449-451. doi: 10.1016/j.ccllet.2007.02.014

Zaky AA, Simal-Gandara J, Eun JB, Shim JH, Abd El-Aty AM (2022) Bioactivities, Applications, Safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides From Food and By-Products: A Review. *Front Nutr* **8**,815640. doi: 10.3389/fnut.2021.815640

7. PRILOZI

Prilog 1. MRM tranzicije korištene za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju ciljnih peptida

Ciljni protein	Sekvenca ciljnog peptida	Prekursor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)	Dwell	Napon fragmentora (V)	Energija sudara (V)	Napon akceleratora (V)	Polarnost
α -s2-kazein	TKVIPYVRYL	417,92017	451,26634	20	130	10,2	4	Pozitivna
	TKVIPYVRYL	417,92017	550,33476	20	130	10,2	4	Pozitivna
	TKVIPYVRYL	417,92017	713,39809	20	130	10,2	4	Pozitivna
	TKVIPYVRYL	417,92017	442,3024	20	130	10,2	4	Pozitivna
α -s2-kazein	WIQPKTKVIPYVRYL	476,78437	451,26634	20	130	12,4	4	Pozitivna
	WIQPKTKVIPYVRYL	476,78437	550,33476	20	130	12,4	4	Pozitivna
	WIQPKTKVIPYVRYL	476,78437	713,39809	20	130	12,4	4	Pozitivna
	WIQPKTKVIPYVRYL	476,78437	810,45085	20	130	12,4	4	Pozitivna
β -kazein	RDMPIQAF	489,24729	403,17582	20	130	16,2	4	Pozitivna
	RDMPIQAF	489,24729	613,31264	20	130	16,2	4	Pozitivna
	RDMPIQAF	489,24729	741,37122	20	130	16,2	4	Pozitivna
	RDMPIQAF	489,24729	812,40833	20	130	16,2	4	Pozitivna
β -kazein	WMHQPHQPLPPT	490,24332	473,21105	20	130	12,8	4	Pozitivna
	WMHQPHQPLPPT	490,24332	521,73743	20	130	12,8	4	Pozitivna
	WMHQPHQPLPPT	490,24332	578,27946	20	130	12,8	4	Pozitivna
	WMHQPHQPLPPT	490,24332	626,80584	20	130	12,8	4	Pozitivna
β -kazein	SWMHQPHQPLPPT	519,254	516,72706	20	130	13,9	4	Pozitivna
	SWMHQPHQPLPPT	519,254	565,25344	20	130	13,9	4	Pozitivna
	SWMHQPHQPLPPT	519,254	621,79547	20	130	13,9	4	Pozitivna
	SWMHQPHQPLPPT	519,254	670,32186	20	130	13,9	4	Pozitivna
β -kazein	VLGPVRGPFPP	519,80838	385,22141	20	130	17,1	4	Pozitivna
	VLGPVRGPFPP	519,80838	413,73214	20	130	17,1	4	Pozitivna
	VLGPVRGPFPP	519,80838	462,27671	20	130	17,1	4	Pozitivna
	VLGPVRGPFPP	519,80838	470,27417	20	130	17,1	4	Pozitivna

Prilog 1. MRM tranzicije korištene za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju ciljnih peptida (nastavak)

Ciljni protein	Sekvenca ciljnog peptida	Prekursor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)	Dwell	Napon fragmentora (V)	Energija sudara (V)	Napon akceleratora (V)	Polarnost
β-kazein	VYFPFGPIP	550,79239	360,19178	20	130	18,1	4	Pozitivna
	VYFPFGPIP	550,79239	594,32459	20	130	18,1	4	Pozitivna
	VYFPFGPIP	550,79239	838,44577	20	130	18,1	4	Pozitivna
	VYFPFGPIP	550,79239	871,47125	20	130	18,1	4	Pozitivna
α-s1-kazein	FVAPFPEVFG	555,28694	548,27149	20	130	18,2	4	Pozitivna
	FVAPFPEVFG	555,28694	562,3024	20	130	18,2	4	Pozitivna
	FVAPFPEVFG	555,28694	788,39775	20	130	18,2	4	Pozitivna
	FVAPFPEVFG	555,28694	887,46617	20	130	18,2	4	Pozitivna
β-kazein	HQPHQLPPT	576,30145	217,11828	20	130	18,9	4	Pozitivna
	HQPHQLPPT	576,30145	266,12477	20	130	18,9	4	Pozitivna
	HQPHQLPPT	576,30145	314,17105	20	130	18,9	4	Pozitivna
	HQPHQLPPT	576,30145	838,43185	20	130	18,9	4	Pozitivna
β-kazein	YQEPVLPVR	579,31931	421,17178	20	130	19	4	Pozitivna
	YQEPVLPVR	579,31931	428,26159	20	130	19	4	Pozitivna
	YQEPVLPVR	579,31931	737,46684	20	130	19	4	Pozitivna
	YQEPVLPVR	579,31931	866,50943	20	130	19	4	Pozitivna
κ-kazein	KYIPIQYVLS	612,35536	106,04987	20	130	20	4	Pozitivna
	KYIPIQYVLS	612,35536	219,13393	20	130	20	4	Pozitivna
	KYIPIQYVLS	612,35536	405,24963	20	130	20	4	Pozitivna
	KYIPIQYVLS	612,35536	743,44504	20	130	20	4	Pozitivna
	KYIPIQYVLS	612,35536	906,50837	20	130	20	4	Pozitivna
β-kazein	HQPHQLPPTVMFPPQ	617,65053	616,83037	20	130	17,4	4	Pozitivna
	HQPHQLPPTVMFPPQ	617,65053	682,35061	20	130	17,4	4	Pozitivna
	HQPHQLPPTVMFPPQ	617,65053	755,88482	20	130	17,4	4	Pozitivna
	HQPHQLPPTVMFPPQ	617,65053	804,4112	20	130	17,4	4	Pozitivna
β-kazein	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	622,68764	370,7187	20	130	17,6	4	Pozitivna
	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	622,68764	514,28219	20	130	17,6	4	Pozitivna
	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	622,68764	681,90882	20	130	17,6	4	Pozitivna
	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	622,68764	811,96687	20	130	17,6	4	Pozitivna

Prilog 1. MRM tranzicije korištene za identifikaciju i relativnu kvantifikaciju ciljnih peptida (nastavak)

Ciljni protein	Sekvenca ciljnog peptida	Prekursor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)	Dwell	Napon fragmentora (V)	Energija sudara (V)	Napon akceleratora (V)	Polarnost
β -kazein	YQEPVLGPVRGPFPIIV	627,69261	720,88534	20	130	17,8	4	Pozitivna
	YQEPVLGPVRGPFPIIV	627,69261	769,41173	20	130	17,8	4	Pozitivna
	YQEPVLGPVRGPFPIIV	627,69261	825,95376	20	130	17,8	4	Pozitivna
	YQEPVLGPVRGPFPIIV	627,69261	882,49579	20	130	17,8	4	Pozitivna
β -kazein	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	665,3873	655,36679	20	130	19,2	4	Pozitivna
	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	665,3873	777,42738	20	130	19,2	4	Pozitivna
	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	665,3873	825,95376	20	130	19,2	4	Pozitivna
	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	665,3873	882,49579	20	130	19,2	4	Pozitivna
β -kazein	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	703,08199	390,23873	20	130	20,5	4	Pozitivna
	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	703,08199	518,29731	20	130	20,5	4	Pozitivna
	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	703,08199	647,3399	20	130	20,5	4	Pozitivna
	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	703,08199	843,46108	20	130	20,5	4	Pozitivna
β -kazein	LVYFPFGPIHNSLPQ	839,95122	530,28272	20	130	27	4	Pozitivna
	LVYFPFGPIHNSLPQ	839,95122	652,34331	20	130	27	4	Pozitivna
	LVYFPFGPIHNSLPQ	839,95122	733,87498	20	130	27	4	Pozitivna
β -kazein	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,50362	567,31369	20	130	27,6	4	Pozitivna
	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,50362	730,95303	20	130	27,6	4	Pozitivna
	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,50362	744,42209	20	130	27,6	4	Pozitivna
	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,50362	800,96413	20	130	27,6	4	Pozitivna
α -s1-kazein	APSFSDIPNPIGSENSE	880,90231	605,25657	20	130	28,3	4	Pozitivna
	APSFSDIPNPIGSENSE	880,90231	622,23148	20	130	28,3	4	Pozitivna
	APSFSDIPNPIGSENSE	880,90231	718,34063	20	130	28,3	4	Pozitivna
	APSFSDIPNPIGSENSE	880,90231	832,3683	20	130	28,3	4	Pozitivna
β -kazein	LVYFPFGPIHNSLPQN	896,97268	587,30419	20	130	28,8	4	Pozitivna
	LVYFPFGPIHNSLPQN	896,97268	709,36478	20	130	28,8	4	Pozitivna
	LVYFPFGPIHNSLPQN	896,97268	790,89644	20	130	28,8	4	Pozitivna

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Anamarija Rušanac izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A. Rušanac

Vlastoručni potpis