

GRAŻYNA CICHOSZ, MARIUSZ KORNACKI, MARTA GICZEWSKA,  
ANETA KONOPKA

## **AKTYWNOŚĆ PEPTYDAZOWA WYBRANYCH SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS***

### **Streszczenie**

W degradacji parakazeiny do niskocząsteczkowych związków azotowych oraz w generowaniu smaku i zapachu sera Gouda bardziej istotne od peptydaz, uwalnianych po autolizie kultur zakwasu, okazały się nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe. Zastosowanie w technologii serowarskiej wyselekcjonowanych szczepów pałeczek mlekowych ogranicza wzrost pałeczek nie pochodzących z zakwasu, a jednocześnie umożliwia intensyfikację i modyfikację cech sensorycznych sera. Warunkiem niezbędnym stosowania pałeczek *Lactobacillus* w technologii serów dojrzewających jest poznanie ich aktywności peptydazowej.

Celem podjętych badań była ocena aktywności amino- oraz dipeptydaz wybranych szczepów *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*).

Będąc przedmiotem badań szczepy *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy hydrolizujące preferencyjnie podobne substraty. Dominującą grupą peptydaz, w przypadku wszystkich szczepów, były aminopeptydazy. Aminopeptydazy syntetyzowane przez poszczególne szczepy pałeczek mlekowych hydrolizowały wszystkie zastosowane w doświadczeniu substraty. Jednak każdy szczep charakteryzował się różnym poziomem aktywności poszczególnych aminopeptydaz (od 3,00 do 13,75 JA). Porównując aktywność dipeptydaz syntetyzowanych przez badane szczepy *Lactobacillus* stwierdzono, że większość zastosowanych w doświadczeniu substratów, typowych dla bakterii fermentacji mlekowej, była hydrolizowana – jednak w różnym stopniu (od 1,08 do 7,25 JA).

Najwyższą aktywnością, zarówno amino- jak też dipeptydaz, charakteryzował się szczep *L. casei*. Oceniany szczep *L. acidophilus* syntetyzował aminopeptydazy o prawie 2-krotnie mniejszej aktywności w porównaniu z pozostałymi szczepami oraz dipeptydazy o aktywności mniejszej niż w przypadku *L. casei*, ale porównywalnej z *L. casei* ssp. *rhamnosus*.

Wysoka aktywność peptydazowa badanych szczepów *Lactobacillus* świadczy o ich potencjalnej przydatności w technologii serów dojrzewających.

**Słowa kluczowe:** aminopeptydazy, dipeptydazy, *Lactobacillus*

### **Wstęp**

Dominującą mikroflorą serów dojrzewających są pałeczki *Lactobacillus* [2, 19]. Aktywność peptydaz syntetyzowanych przez nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe w większym stopniu niż aktywność wewnątrzkomórkowych peptydaz, uwalnianych po autolizie kultur zakwasu, determinuje cechy sensoryczne serów [18]. Znaczenie pałeczek *Lactobacillus* w generowaniu smaku i zapachu jest szczególnie istotne w serach otrzymywanych z mleka poddanego kilkukrotnej obróbce cieplnej [21].

Aktywność proteolityczna pałeczek jest większa niż mezofilnych paciorkowców mlekowych [11, 17]. Niezależnie od zakresu peptydolyzy istotna jest również specyficzność substratowa peptydaz. Niskocząsteczkowe peptydy i wolne aminokwasy w zależności od masy cząsteczkowej i hydrofobowości mogą być przyczyną goryczki serów [13]. Wybrane szczepy pałeczek *Lactobacillus* mogą być przydatne do maskowania goryczki serów dojrzewających [7, 10], a także intensyfikacji smaku i zapachu serów o obniżonej zawartości tłuszczu [1, 3].

W degradacji parakazeiny do niskocząsteczkowych związków azotowych, a także w generowaniu smaku i zapachu sera Gouda, bardziej istotne od peptydaz uwalnianych po autolizie kultur zakwasu okazały się nie pochodzące z zakwasu pałeczki mlekowe [5, 6].

Jednak warunkiem niezbędnym stosowania wybranych szczepów pałeczek mlekowych w technologii serów dojrzewających jest poznanie specyficzności substratowej peptydaz przez nie syntetyzowanych. Podjęte badania miały na celu ocenę specyficzności substratowej amino- oraz dipeptydaz syntetyzowanych przez szczepy *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus*.

### **Materiał i metody badań**

Głęboko mrożone koncentraty bakterii *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus* (prod. Danisco Ingredients) poddano dezintegracji mechaniczno-ciśnieniowej (dezintegrator Biotex X-25, Sweden). W ekstrakcie enzymatycznym (otrzymanym po rozpuszczeniu zdeintegrowanej biomasy w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0 w stosunku 1:4 i odwirowanym przy 5500 g/15 min) oznaczano:

- aktywność specyficzną aminopeptydaz metodą Requena i wsp. [20] wobec substratów:  $\delta$ -Glu-p-Na, Arg-p-NA, Leu-p-NA, Ala-p-NA, Glu-p-NA, Lys-p-NA, Pro-p-NA i Gly-p-NA;
- aktywność specyficzną dipeptydaz wg zmodyfikowanej metody Cd-ninhydrinowej [20, 12] wobec substratów: Ala-Ala, Ala-Pro, Leu-Leu, Pro-Ala, Gly-Tyr, Leu-Gly, Tyr-Phe, Ala-Phe, Phe-Ala, Tyr-Leu;
- Zawartość białka metodą Lowry'ego [15].

Jednostkę aktywności specyficznej definiowano jako zmianę ekstynkcji o 0,1 w czasie 1 min reakcji w temp. 30°C, w przeliczeniu na 1 mg białka enzymatycznego, przy długości fali 410 nm (aminopeptydazy) lub 570 nm (dipeptydazy).

Obliczano średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń, a także średnią aktywność amino- i dipeptydaz syntetyzowanych przez badane szczepy *Lactobacillus*.

Aktywność względną peptydaz [%] wyliczano w stosunku do najbardziej aktywnego enzymu syntetyzowanego przez badany szczep *Lactobacillus*.

### **Wyniki i dyskusja**

Badając aktywność aminopeptydaz syntetyzowanych przez *L. acidophilus* stwierdzono, że żaden enzym nie wykazał średniej aktywności powyżej 10 J.A (rys. 1). Trzy enzymy charakteryzowały się średnią aktywnością mniejszą niż 5 J.A., pozostałe hydrolizowały odpowiednie substraty w zakresie: od 5,1 J.A. do 8,65 J.A. W największym stopniu hydrolizowany był Leu-p-Na oraz Glu-p-Na. Najmniejszą (ok.

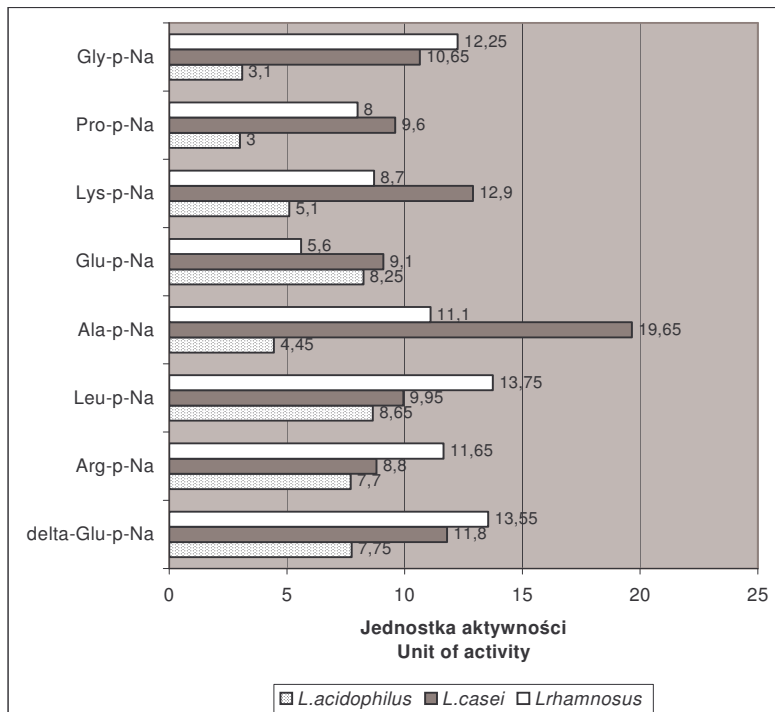
35% aktywności względnej) aktywność wykazały enzymy hydrolizujące Pro-p-Na i Gly-p-Na (tab. 1).

Tabela 1

Aktywność względna aminopeptydaz [%].  
Relative activity of aminopeptidases [%].

Substrat Substrate	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>rhammosus</i>
Gly-p-Na	35,84	54,20	89,09
Pro-p-Na	34,68	48,85	58,18
Lys-p-Na	58,96	65,65	63,27
Glu-p-Na	95,37	46,31	40,73
Ala-p-Na	51,44	<b>100</b>	80,73
Leu-p-Na	<b>100</b>	50,64	<b>100</b>
Arg-p-Na	89,02	44,78	84,73
$\delta$ -Glu-p-Na	89,59	60,05	98,54

Aminopeptydazy syntetyzowane przez *L. casei* charakteryzowały się zdecydowanie większą aktywnością niż enzymy *L. acidophilus* (rys. 1). W przypadku peptydazy hydrolizującej: Ala-p-Na różnica była ponad czterokrotna, a w przypadku Gly-p-Na i Pro-p-Na około trzykrotna. Większą aktywność wykazały także aminopeptydazy hydrolizujące Leu-p-Na,  $\delta$ -Glu-p-Na oraz Lys-p-Na, a zbliżoną Glu-p-Na oraz Arg-p-Na. W największym stopniu hydrolizowany był substrat Ala-p-Na (100% aktywności względnej). W przypadku Lys-p-Na oraz  $\delta$ -Glu-p-Na stwierdzono aktywność względną powyżej 60%, w przypadku Gly-p-Na i Leu-p-Na powyżej 50%. Aktywność względna wobec pozostałych substratów była również wysoka – ok. 40% (tab. 1).



Rys. 1. Aktywność aminopeptydaz syntetyzowanych przez kultury *Lactobacillus*.

Fig. 1. Activity of aminopeptidases synthesised by *Lactobacillus* cultures.

Między aktywnością aminopeptydaz syntetyzowanych przez *L. casei* ssp. *rhamnosus* oraz *L. casei* różnicowanie było zdecydowanie mniejsze niż między *L. casei* i *L. acidophilus*. Największą aktywność w przypadku *L. casei* ssp. *rhamnosus* stwierdzono w przypadku enzymu hydrolizującego Leu-p-Na i  $\delta$ -Glu-p-Na (rys. 1). Aktywność pozostałych aminopeptydaz była dość wysoka, ponad 80% w przypadku Arg-p-Na, Ala-p-Na i Gly-p-Na oraz 40 – 60% wobec pozostałych substratów (tab. 1).

Aminopeptydazy syntetyzowane przez badane szczepy pałeczek mlekowych hydrolizowały wszystkie zastosowane w doświadczeniu substraty. Jednakże każdy z badanych szczepów charakteryzował się zróżnicowaną aktywnością poszczególnych peptydaz. Największą aktywność (od 8,8 do 19,65 J.A.) stwierdzono w przypadku aminopeptydaz szczepu *L. casei*, natomiast najmniejszą (od 3,0 do 8,65 J.A.) w przypadku *L. acidophilus*. (rys. 1). Średnie aktywności aminopeptydaz syntetyzowanych przez *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus* wynosiły: 6,00; 11,56 i 10,57 J.A.

Aktywność dipeptydaz *L. acidophilus* zawierała się w zakresie od 2,5 (Leu-Leu) do 4,42 J.A. (Leu-Gly) (rys. 2). Konsekwencją tego było również niewielkie różnicowanie aktywności względnej. W stosunku do stopnia hydrolizy Leu-Gly (100% aktywności względnej) cztery enzymy wykazały aktywność względną powyżej 70%, trzy enzymy powyżej 60% i jeden powyżej 50%. Badany szczep *L. acidophilus* nie syntetyzował dipeptydazy hydrolizującej Ala-Ala (tab. 2).

Tabela 2

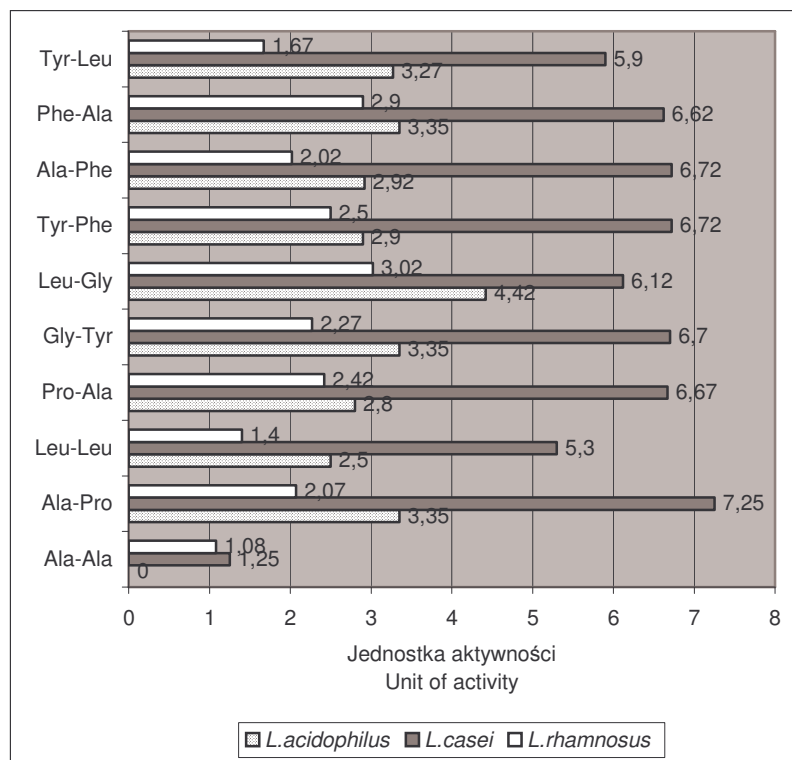
Aktywność względna dipeptydaz [%].  
Relative activity of dipeptidases [%].

Substrat Substrate	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>
Tyr-Leu	73,98	81,38	55,30
Phe-Ala	75,79	91,31	96,03
Ala-Phe	66,06	92,69	66,88
Tyr-Phe	65,61	92,69	82,78
Leu-Gly	<b>100</b>	84,41	<b>100</b>
Gly-Tyr	75,79	92,41	75,16
Pro-Ala	63,35	92,00	80,13
Leu-Leu	56,56	73,10	46,36
Ala-Pro	75,79	<b>100</b>	68,54
Ala-Ala	0,00	17,24	35,76

Aktywność dipeptydaz *L. casei* (z wyjątkiem peptydazy hydrolizującej Ala-Ala) zawierała się w przedziale od 5,3 do 7,25 J.A. (rys. 2). W związku z tym także aktywność względna peptydaz różniła się nieznacznie (tab. 2).

Najmniejszą aktywnością dipeptydaz (średnio 2,13 J.A.) charakteryzował się szczep *L. casei* ssp. *rhamnosus*. Zróżnicowanie aktywności względnej dipeptydaz w przypadku *L. casei* ssp. *rhamnosus* było większe niż pozostałych szczepów *Lactobacillus* i wynosiło od 35,76% (Ala-Ala) do 96,03% (Phe-Ala). Większość peptydaz charakteryzowała się wysoką aktywnością względną: cztery enzymy powyżej 70% i dwa enzymy powyżej 60% (tab. 2).

Porównując aktywność dipeptydaz syntetyzowanych przez badane szczepy pałeczek mlekowych stwierdzono, że większość zastosowanych w doświadczeniu substratów, typowych dla bakterii fermentacji mlekowej, była hydrolizowana, jednak w różnym stopniu. Poszczególne enzymy syntetyzowane przez różne szczepy *Lactobacillus* charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością specyficzną. Najwyższą średnią aktywnością charakteryzowały się dipeptydazy syntetyzowane przez *L. casei*, najniższą natomiast dipeptydazy *L. casei* ssp. *rhamnosus*. Średnie aktywności dipeptydaz syntetyzowanych przez *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei* ssp. *rhamnosus* wynosiły: 3,21; 5,92 i 2,13 J.A.

Rys. 2. Aktywność dipeptydaz syntetyzowanych przez kultury *Lactobacillus*.Fig. 2. Activity of dipeptidases synthesised by *Lactobacillus* cultures.

Spośród badanych szczepów pałeczek *Lactobacillus* największą aktywnością – zarówno amino- jak i dipeptydaz – charakteryzował się szczep *L. casei*. Średnia aktywność aminopeptydaz *L. casei* była ok. dwukrotnie większa od średniej aktywności aminopeptydaz *L. acidophilus* i porównywalna ze średnią aktywnością aminopeptydaz *L. casei* ssp. *rhamnosus* (tab. 1). Natomiast średnia aktywność dipeptydaz *L. casei* była większa od średniej aktywności dipeptydaz *L. acidophilus* (ok. 1,8-krotnie) oraz *L. casei* ssp. *rhamnosus* (2,8-krotnie) (tab. 2).

W odróżnieniu od mezofilnych paciorkowców mlekowych (stosowanych jako kultury starterowe) pałeczki mlekowe z rodzaju *Lactobacillus* charakteryzują się wysoką stabilnością biochemiczną. Podstawowe cechy tych kultur są kodowane w DNA chromosomalnym, a nie plazmidowym, jak w przypadku paciorkowców [14]. Dlatego też, stosując w wyrobie sera pałeczki *Lactobacillus*, których aktywność proteolityczna i peptydolityczna jest relatywnie wysoka, można spodziewać się intensyfikacji proteolizy [8, 9].

Należy jednak uwzględnić fakt, że oprócz kultur zakwasu i zastosowanych w procesie technologicznym szczepów *Lactobacillus*, w dojrzewającym serze są jednocześnie aktywne liczne szczepy tzw. mikroflory wtórnej (niepochodzące z zakwasu pałeczki *Lactobacillus*, enterokoki, bakterie propionowe), a także technologicznie szkodliwej (bakterie fermentacji masłowej oraz z grupy coli). Wprawdzie zastosowanie pałeczek *Lactobacillus*, oprócz kultur starterowych, ogranicza w pewnym stopniu wzrost mikroflory wtórnej, jednak nie eliminuje jej całkowicie [8, 10, 16].

Poza tym istotny w przebiegu peptydolizy jest zarówno dostęp do odpowiednich substratów, jak też stopień autolizy mikroflory obecnej w masie sera. Po autolizie, oprócz peptydaz zewnątrzkomórkowych i związanych z membraną cytoplazmatyczną, aktywne są również enzymy wewnątrzkomórkowe [4, 6, 11].

## Wnioski

Będące przedmiotem badań szczepy *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy o podobnej specyficzności substratowej, jednak o zróżnicowanej aktywności:

1. Dominującą grupą peptydaz, w przypadku wszystkich badanych szczepów *Lactobacillus*, były aminopeptydazy.
2. Najwyższą aktywnością zarówno amino- jak i dipeptydaz charakteryzował się szczep *L. casei*.
3. Oceniany szczep *L. acidophilus* syntetyzował aminopeptydazy o prawie dwukrotnie mniejszej aktywności w porównaniu z pozostałymi kulturami oraz dipeptydazy o aktywności mniejszej niż w przypadku *L. casei*, ale porównywalnej z *L. casei* ssp. *rhamnosus*.

Pracę zrealizowano w ramach grantu KBN 6PO6T01321

## Literatura

- [1] Arora G., Lee B.H.: Comparative studies on peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. J. Dairy Sci., 1990, **73**, 274-279.
- [2] Bockelman W.: The proteolytic system of starter and non-starter bacteria: components and their importance for cheese ripening. Int. Dairy J., 1995, (5), 977-994.
- [3] Beernink G., Northolt M.: Investigation of the proteolytic properties of *Lactobacilli* to obtain new cheese flavour. FEMS Microbiol., 1990, **B 19**.
- [4] Christensen J. E., Dudley E. G., Pederson J. A., Steele J. L.: Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, **76**, 217-246.
- [5] Cichosz G., Zalecka A., Kornacki M.: The effect of paracasein degradation on sensory properties of Gouda cheese. Nahrung/Food, 2003, (47), 383-387.
- [6] Cichosz G., Zalecka A., Lenkiewicz M.: The influence of streptococci and lactobacilli on proteolysis in Gouda cheese. Milchwiss., 2003, (58), 297-300.
- [7] El Abboudi M., El-Soda M., Pandian S., Barreau M., Trepanier G., Simard R.E.: Peptidase activities in debittering and nondebittering strains of *Lactobacilli*. Int. Dairy J., 1991, **1**, 55-64.
- [8] El-Soda M.: The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. FEMS Microbiol. Rev., 1993, **12**, 239-252.
- [9] El-Soda M., Ezzat N.: Peptidase and esterase activities from mutant strains of *Lactobacillus casei*. Nahrung/Food, 1993, **37**, 321-327.
- [10] Gomez M.J., Gaya P., Nunez M., Medina M.: Debittering activity of peptidases from selected lactobacilli strains in model cheeses. Milchwiss., 1996, **51**, 315-319.
- [11] Khalid N.M., Marth E.H.: *Lactobacilli* – Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: A review. J. Dairy Sci., 1990, **73**, 2669-2684.
- [12] Khalid N.M., El-Soda M., Marth E.H.: Peptide hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Dairy Sci., 1991, **74**, 29-45.
- [13] Lemieux L., Simard R.E.: Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification structure masking and inhibition. Le Lait., 1992, **72**, 335-382.



- [14] Libudzisz Z.: Genetyczne determinanty metabolizmu bakterii fermentacji mlekowej. *Biotechnol.*, 1992, (2), 66-79.
- [15] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-265.
- [16] Martínez-Cuesta M. C., Fernández de Palencia P., Requena T., Peláez C.: Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese. *Int. Dairy J.*, 2001, (11), 577-585.
- [17] Norman M., Khalid N., El-Soda M., Marth E.: Peptide hydrolases of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 29-45.
- [18] Olson N. F.: The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1990, **87**, 131-148.
- [19] Peterson S.D., Marshall R.T.: Nonstarter *Lactobacilli* in cheddar cheese a review. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 1395-1410.
- [20] Requena T., Peláez C., Fox P.F.: Peptidase and proteinase activity of *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1993, **193**, 351.-355.
- [21] Sasaki M., Bosman B.W., Tan P.S.T.: Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *J. Dairy Res.*, 1995, **62**, 601-610.

## PEPTIDASE ACTIVITY OF SOME *LACTOBACILLUS* STRAINS

### S u m m a r y

Non-starter lactic acid bacteria has been proved to be more potent in paracasein degradation into low molecular nitrogen compounds and in production of taste and aroma of Gouda cheese than peptidases liberated during autolysis of leaven cultures. In cheese technology application of selected strains of *Lactobacillus* leads to reduce non-starter lactic acid bacteria growth and, simultaneously, makes possible intensification and modification of sensorial features of cheese. The indispensable requirement to use the lactobacilli in ripening cheese production is to recognise their peptidase activity.

The aim of the paper was to evaluate activities of amino- and dipeptidases of some strains of *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei ssp. rhamnosus* ).

The *Lactobacillus* strains synthesised peptidases hydrolysing preferential similar substrates. Amino peptidases composed the dominant group for all the strains under the study. Amino peptidases that were synthesised by the individual lactobacilli strains hydrolysed all the substrates utilised during the experiment. However, each strain was characterised by different activity level of individual amino peptidases (from 3.00 to 13.75 JA). Comparing activity of dipeptidases synthesised by the *Lactobacillus* strains it has been found that majority of the substrates utilised in the experiment, typical for lactobacilli, were hydrolysed, though in various extent (from 1.08 to 7.25 JA).

The *L. casei* strain was characterised by highest activity of both: amino- and dipeptidase, activity. The *L. acidophilus* synthesised amino peptidases of about 2 times lower activity in comparison to the rest of the strains of lactobacilli and dipeptidases of lower activity than those synthesised by *L. casei*, but comparable to dipeptidases activity of *L. casei ssp rhamnosus*.

High peptidase activity of the examined *Lactobacillus* strains proved their potential usefulness in ripening cheese technology.

**Key words:** aminopeptidase, dipeptidase, *Lactobacillus* ☒