

PROTEOLITIČKA AKTIVNOST STREPTOKOKA GRUPE N*

Dr D. OBRADOVIĆ, Poljoprivredni fakultet Beograd
Katedra za mikrobiologiju

Sažetak

U radu je dat pregled dosadašnjih saznanja vezanih za proteinaznu aktivnost mlečnih streptokoka. I pored toga što svi aspekti navedene aktivnosti nisu u celosti objašnjeni, neosporna je uloga proteolitičkog enzimskog sistema spomenutih bakterija kako u obavljanju vitalnih funkcija ćelije tako i u toku zrenja sireva.

Uvod

Streptokoke grupe N, koje ulaze u sastav startera za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda, dodaju se mleku radi ubrzanog stvaranja mlečne kiseline i smatra se da spadaju u neproteolitičke mikroorganizme. Međutim, za njihovo razviće i intenzivnu biohemijsku aktivnost neophodno je prisustvo peptida manjih molekulskih težina i aminokiselina kojih u mleku nema dovoljno. Iz tog razloga neophodna je određena razgradnja proteina mleka kako bi se ubrzala sinteza ćelijskih proteina, povećala koncentracija ćelija u mleku i time omogućilo intenzivnije stvaranje mlečne kiseline. Prema tome proteolitički enzimski sistem je neophodan za svaku ćeliju streptokoka i istovremeno ima ne malu ulogu u zrenju pojedinih proizvoda mleka. Imajući u vidu da je u zadnjoj deceniji učinjen ogroman napredak u objašnjenju proteolitičke aktivnosti mlečnih streptokoka, u ovom radu je dat pregled dosadašnjih rezultata u ovoj oblasti i izneti su pravci budućih istraživanja kao i njihov praktičan značaj za mlekarsku industriju.

Proteolitički enzimski sistem mlečnih streptokoka

Proteolitički enzimski sistem mlečnih streptokoka predmet je interesovanja mnogih istraživača (Thomas et al., 1974.; Exterkate, 1975.; Law 1977.; Desmazeaud i Zevaco, 1979.; Thomas i Mills, 1981.; Law i Kolstad, 1983.) i svuda se podvlači njegova ogromna uloga u snabdevanju kultura odgovarajućim azotnim materijalima, čime se stvaraju osnovni uslovi za normalan rast i brzu fermentaciju mleka. Kada su u pitanju navedeni enzimi, ovde je potrebno naglasiti da se nazivi proteinaze i peptidaze upotrebljavaju radi preciznijeg objašnjenja prirode supstrata, tako da samo enzimi koji se nalaze na površini ćelija ili blizu nje imaju pristup višemolekulskim proteinima dok su peptidi uglavnom dostupni membranskim i intraćelijskim enzimima. U stvarnosti, međutim, najvažniji faktor koji određuje aktivnost nije veličina molekula supstrata, već priroda aminokiselinskih bočnih lanaca, kao i drugih grupa koje se nalaze u blizini peptidne veze koja podleže hidrolizi. Iz tog ra-

* Referat održan na XXIII seminaru za mlekarsku industriju, Zagreb 1985.

zloga vrlo je verovatno da su proteinaze u stanju da hidrolizuju relativno male peptide odgovarajuće hemijske strukture.

Jedan od glavnih razloga što se postojeća saznanja o enzimskom sistemu streptokoka mogu smatrati još nepotpunim leži u neujednačenosti eksperimentalnih metoda, što veoma često dovodi do pogrešnih zaključaka o mogućoj ćelijskoj lokaciji navedenih enzima, koja je opet primarna za razumevanje njihove uloge za vreme razvića kultura u mleku. Thomas et al. (1974.) su prvi dokazali da je egzogeno korišćenje proteina u mleku od strane *S. lactis* vezano za proteinaze locirane u ćelijskom zidu. Ovo svoje tvrđenje su zasnovali na činjenici da netretirane ćelije poseduju proteinaznu aktivnost u odnosu na višemolekulske supstrate kao i da se veliki deo aktivnosti, vezane za ćelijski zid, oslobađa prilikom formiranja sferoplasta, i to pod uslovima koji omogućavaju izdvajanje 1% intracelularnih enzima.

U saglasnosti sa napred navedenim podacima su i naši rezultati (Obradović, 1933.) zasnovani na ultrazvučnoj dezintegraciji ćelija tri soja vrste *S. lactis*, dobijeni na bazi povećane koncentracije jedinjenja koja su rastvorljiva u TCA (trihlorsirćetna kiselina), a koji su pokazali da je veći deo proteolitičke aktivnosti streptokoka koncentrisan u frakciji koja je obuhvatala ćelijski zid. Na sl. 1. dat je elektroforetski raspored frakcija kazeina kome su dodani intraćelijski ekstrakti ispitivanih kultura, jednog soja mikrokoka i himozina koji su poslužili za poređenje. Na osnovu intenziteta boja traka β -kazeina proizilazi da je ova frakcija promenjena u većem stepenu nego α_{s1} -kazein i κ -kazein. S druge strane, kao što se vidi, himozin je delovao na sve tri glavne frakcije, ali je njegova aktivnost manja od očekivane, što se može objasniti činjenicom da su ogledi vršeni u sredini koje je pH viši u odnosu na optimum aktivnosti navedenog enzima. Razgradnja kazeina preparatima ćelijskih zidova spomenutih sojeva bila je izraženija i to naročito u oblasti β i κ -kazeina (sl. 2).

Ako se pođe od činjenice da je razgradnja proteina u mleku, od strane mlečnih streptokoka, vanćelijska, logično je očekivati da će apsorbovani peptidi biti intraćelijski hidrolizovani od aminokiselina. Mou et al. (1975.) iznose da se radi o aminopeptidazama širokog spektra, tripeptidazama i dipeptidazama koje oslobađaju većinu aminokiselina esencijalnih za rast. Na mogućnost citoplazmatskog porekla peptidaza ukazuju Schmidt et al. (1977.) i ističu da bi navedeni enzimi mogli biti povezani sa ribosomima. To ni u kom slučaju ne isključuje mogućnost postojanja membranskog peptidaznog sistema što ga poseduje *S. cremoris* HP (Exterkate, 1975.), koji je uključen u razgradnju oligopeptida oslobođenih u mleku u toku razgradnje kazeina, pod utjecajem proteinaza ćelijskog zida. S tim u vezi, interesantna je hipoteza Law-a (1977.) da *S. lactis* nije u potpunosti zavisna od peptidnog transporta, već da poseduje peptidaze koje se nalaze u ćelijskom zidu. Međutim, ostaje činjenica da je veći deo peptidazne aktivnosti citoplazmatski lociran, što su potvrdili Sørrhaug i Kolstad (1981.) elektroforetskim ispitivanjem zimograma intraćelijskih ekstrakta ćelija tri vrste streptokoka grupe N, za koje utvrđeno da poseduju 4—9 peptidaza.

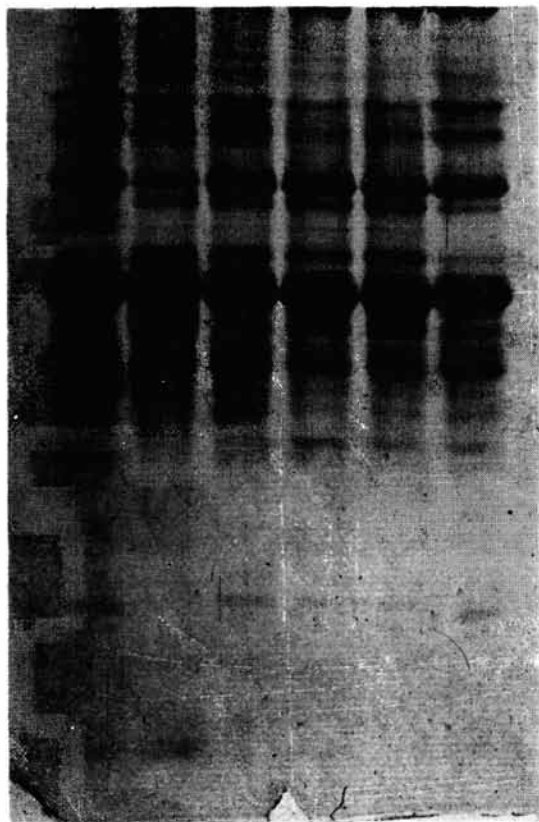


Sl. 1. Poliakrilamid gel elektroforegrami razgradnje kazeina ćelijskim ekstraktima sojeva i himozinom. 1—6: Kazein (kontrola), MICROCOCCUS M-104, S. LACTIS AK-60, S. LACTIS 509, S. LACTIS 763 i himozin.

Photo 1. Polyacrylamid gel elektroforegrams of the casein proteolysis with cell extracts and hyimosin. 1—6 Casein, Micrococcus M 104, S. lactis AK 60, S. lactis 509, S. lactis 763 and hyimosin.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da je većina peptidaza imenovana prema supstratu na koji deluju, pri čemu je veoma mali broj prečišćen i detaljno definisan (Desmazeaud i Zevaco, 1979.; Kolstad i Sørhaug, 1982.; Hwang et al., 1981.), pa je očigledno da se ne mogu smatrati kompletnim. Između navedenih fermentata postoji očigledna razlika u temperaturnom i pH optimumu, ali im je zajednička pripadnost EDTA (etilendiaminotetraacetat) osetljivim metaloenzimima, što je i karakteristično za većinu peptidaza mikrobiološkog porekla.

Nešto više svetlosti u ovu problematiku sigurno će uneti ispitivanja vezana za funkcionalna svojstva plazmida mlečnih streptokoka (McKay, 1983.). Iz radova navedenog autora i njegovih saradnika vidi se da je proteinazna aktivnost *S. lactis* kodirana na plazmidnoj DNA. Ovo je još detaljnije potvrđeno u radu Gasson-a (1983.), koji je pokazao, da soj vrste *S. lactis* koji poseduje samo jedan plazmid, istovremeno sa gubitkom tog plazmida gubi i proteinaznu aktivnost. Prestankom navedene aktivnosti nestale su i 4 trake ranije navedene u zimogramima ćelijski vezanih proteinaza spomenutog soja. U tom smislu treba očekivati da će savremene tehnike prenosa gena omogućiti genetsku modifikaciju postojećih sojeva i time značajno unaprediti proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda.

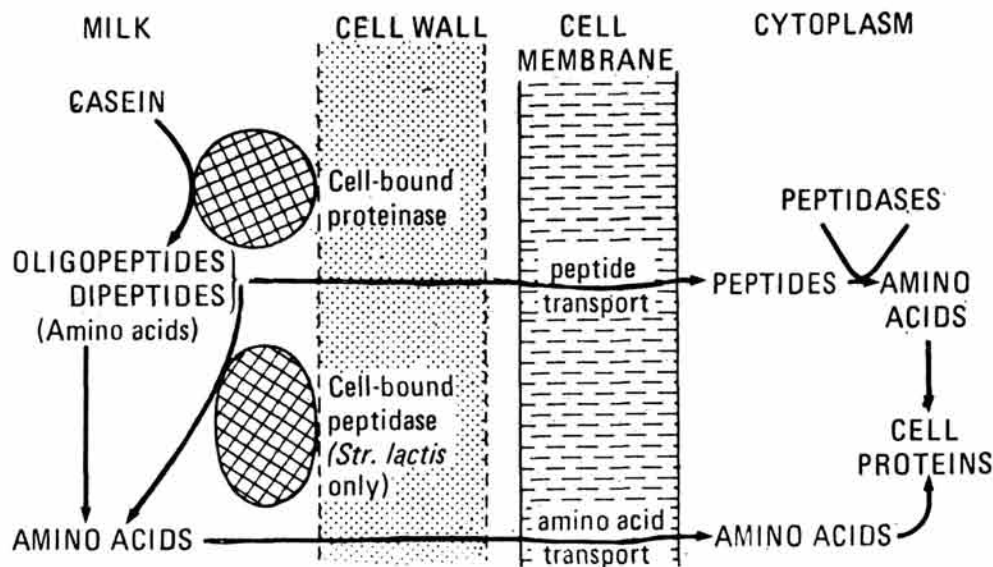


Sl. 2. Poliakrilamid gel elektroforegrami razgradnje kazeina ćelijskim zidovima sojeva. 1—6: kazein (kontrola), MICROCOCCUS M-104, S. LACTIS AK-60, S. LACTIS 509, S. LACTIS 763 i himozin.

Photo 2. Polyacrylamid gel electroforegrams of the casein proteolysis with cell walls of some strains. 1—6 casein (control), Micrococcus M 104, S. lactis AK 60, S. lactis 509, S. lactis 763 and hymosin.

Proteolitička aktivnost streptokoka u toku zrenja sireva

Zrenje sireva je složen proces u kome na organoleptičke i reološke promene bitno utječe razgradnja kazeina kao osnovnog proteina mleka. Od proteolitičkih enzima u siru su prisutne proteinaze mleka, starter kultura, sirila i prisutnih bakterija. Kada su u pitanju proteinaze i peptidaze startera prevladuje mišljenje da se njihova uloga ogleda u degradaciji većih peptida, koji su oslobođeni pod dejstvom himozina, pri čemu dolazi do nakupljanja manjih peptida i aminokiselina. Smatra se da su najizraženije promene na α_{S1} -kazeinu, a da se β -kazein razgrađuje tek u poznim fazama zrenja. Verovatno je da je efekat spomenutih enzima u ovakvoj sredini ograničen, obzirom da se ćelije u sirnom testu nalaze u sredini čiji je pH nedovoljno kontrolisan, pa je i njihova aktivnost manja u poređenju sa odgovarajućom u eksperimentalnim uslovima, gde je pH strogo kontrolisan. Međutim, ne sme se izgubiti iz vida da enzimi starter kultura ostaju aktivni u siru i kada je broj živih ćelija znatno smanjen, pa se povećanjem broja liziranih ćelija povećava i aktivnost, što dovodi do intenzivnijeg nakupljanja rastvorljivih azotnih materija, koje se smatraju jednom od osnovnih komponentata arome sireva.



Shema 1. Utjecaj proteolitičkih fermentata na razviće streptokoka grupe N u mleku (Law i Sharpe, 1978.)

Sheme 1. Influence of the proteolytic enzymes on the growth of the streptococci groupe N in milk (Law and Sharpe, 1978.)

U toku zrenja sireva može da dođe i do formiranja tzv. gorkih peptida, koji, ako su prisutni u većim koncentracijama, dovode do nepoželjnih organoleptičkih osobina (Craford i Zwaginga, 1977.). Pojava gorkog okusa zavisi od odnosa intenziteta razlaganja kazeina, odnosno nakupljanja »gorkih peptida« i istovremeno dalje degradacije istih. Kako je sve povezano sa stepe-

nom proteolitičke aktivnosti kultura, shvatljivo je zašto se aktualna ispitivanja usmjeravaju u pravcu iznalaženja sojeva koji ne stvaraju navedene peptide. Sigurno je, da će primenom novih tehnoloških postupaka, kao što je na primer ultrafiltracija, gde je količina proteina za nekoliko puta povećana, ova istraživanja biti ubrzana i to u pravcu dobijanja modifikovanih startera čija bi aktivnost bila podešena prema izmenjenom sastavu supstrata.

Zaključak

Iz priloženog prikaza vidi se da streptokoke nisu u stanju da direktno koriste proteine, već da posedovanje površinski vezanih proteinaza omogućuje hidrolizu većih proteinskih molekula do peptida, koji su sada takvih veličina da mogu da difunduju kroz ćelijski zid (shema 1.). Neosporno je da ovakva lokacija ima određene prednosti, jer su proizvodi proteolize manje dostupni ostalim mikroorganizmima koji se nalaze u okolnoj sredini, tako da su oslobođeni peptidi i aminokiseline u neposrednoj blizini ćelija producenata enzima. Ovi peptidi se verovatno dalje razgrađuju u ćelijskom zidu ili eventualno na površini citoplazmatične membrane, koja je strogo selektivna i propušta peptide sa najviše 4—6 aminokiselina. Transport peptida kroz membranu odvija se preko specifičnih nosača, a intraćelijski fermenti kompletiraju hidrolizu peptida do aminokiselina, koje se sada mogu koristiti za sintezu ćelijskih proteina.

Iz priložene sheme se vidi da je objašnjenje proteolitičke aktivnosti mlečnih streptokoka dosta složeno. U tom cilju potrebno je preciznije odrediti lokaciju svih enzima koji su uključeni u proteolizu, njihovu supstratnu specifičnost i ostala važna svojstva, među kojima se posebno ističu putevi prenosa peptida. Ovo ni u kom slučaju nije jednostavan zadatak, ako se ima u vidu brojnost ispitivanih enzima, složenost njihovog izdvajanja, velike razlike u fizičko hemijskim osobinama supstrata i permanentno menjanje sredine za vreme fermentacionih procesa. Iz tog razloga bi ova saznanja bila od velikog značaja za objašnjenje uloge streptokoka grupe N u proizvodnji fermentisanih mlečnih napitaka i sireva.

Summary

A selective review is given of the recent findings relating to the proteolytic activity of lactic streptococci. Although the fundamental knowledge in some fields is still lacking, attempts have been made to describe their growth and proteolytic functions in milk and their unquestionable importance for the cheese ripening.

Literatura

- CRAFORD, I., i ZWAGINGA D. (1977.); IDF Document N^o 107.
DESMAZEAUD, M. i ZEVACO, C. (1979.); *Milchwissenschaft* **34**, 606—610.
EXTERKATE, F. A., (1975.); *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 303—318.
GASSON, M. J., (1983.); *J. Bacteriol.*, **154**, 1—9.
KOLSTAD, J. i SØRHAUG, T., (1982.); Proc. XXI Intern. Dairy Congr., Moscow, Brief Commun., Vol. 1. Book 2, 321—322.
LAW, B. A., (1977.); *J. Dairy Res.*, **44**, 309—317.
LAW, B. A. i SHARPE, M. E. (1978.); In *Streptococci*, (F. A. Skinner and L. B. Quesnel, eds.), Academic Press, New York i London, 263—278.