

Enzymy proteolityczne szczepionek serowarskich

Józefa Chrzanowska¹

Maria Wojtatowicz²

¹Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Akademia Rolnicza

Wrocław

1. Wstęp

Mikroflora szczepionek wykorzystywanych do produkcji serów obejmuje różnorodne grupy mikroorganizmów, które mają za zadanie inicjowanie i prowadzenie określonych procesów fermentacyjnych, a także wykształcenie swoistych cech organoleptycznych tych produktów (1,2). Mikroflora ta obejmuje zarówno mezofilne (*Lactococcus*, *Leuconostoc*) jak i termofilne (*Streptococcus*, *Lactobacillus*) bakterie fermentacji kwasu mlekowego. Obok tych bakterii, ważną rolę w dojrzewaniu niektórych gatunków serów odgrywają inne drobnoustroje (*Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Penicillium*). Są one wprowadzane również w formie kultur starterowych do mleka, ale w odróżnieniu od pierwotnej mikroflory, obejmującej bakterie fermentacji mlekowej, określa się je mianem mikroflory wtórnej. Jednym z najważniejszych procesów biochemicznych zachodzących podczas dojrzewania serów jest proteoliza. Poza podpuszczką (chymozyną) i rodzimymi enzymami mleka, aktywny udział biorą w niej proteazy obecnej w serze mikroflory (2-4).

2. Enzymy proteolityczne pierwotnej mikroflory starterowej

Enzymy proteolityczne bakterii fermentacji mlekowej pełnią ważną rolę w dostarczaniu komórkom niezbędnych dla wzrostu związków azotowych. Ich wymagania pokarmowe w tym zakresie są bardzo wysokie. Bakterie, np. z rodzaju *Lactococcus* wymagają co najmniej sześciu aminokwasów: kwasu glutaminowego, waliny, metioniny, leucyny, izoleucyny i histydyny, niektóre gatunki dodatkowo jeszcze fenyloalaniny, tyrozyny, lizyny i alaniny (1). Natomiast zawartość wolnych aminokwasów i niskocząsteczkowych peptydów

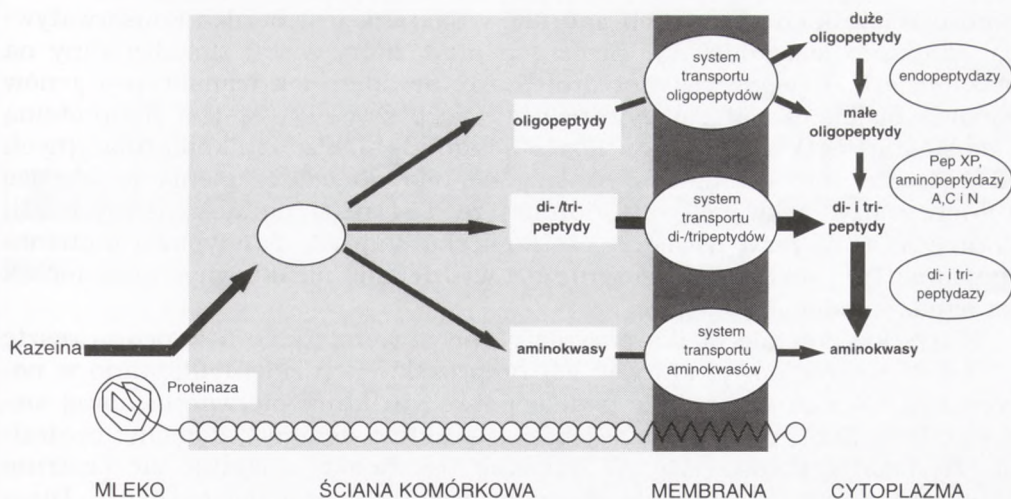
w mleku zapewnia wzrost komórek (gęstość kom./ml) na poziomie 8-16% w stosunku do tego, jaki stwierdza się w mleku skoagulowanym (5). Dla zdobycia potrzebnych składników bakterie te muszą degradować białka mleka, głównie kazeinę. Proteolityczny rozkład tego białka jest stąd bardzo ważny w procesie fermentacji mleka, jak również odgrywa zasadniczą rolę w kształtowaniu profilu smakowo-zapachowego mlecznych produktów fermentowanych, głównie serów.

System proteolityczny bakterii mlekowych jest bardzo złożony. Najlepiej został on poznany u bakterii z rodzaju *Lactococcus* (3-6). Model jego funkcjonowania przedstawiono na rysunku 1. Obejmuje kazeinolityczne proteiny związane ze ścianą komórkową (Prt P) oraz proteiny i peptydazy występujące wewnątrz komórki (3,7). Jest on ściśle powiązany z systemem transportu peptydów i aminokwasów przez błonę cytoplazmatyczną do wnętrza komórki, który jest bardzo swoisty dla poszczególnych gatunków (7). Bakterie te mają wykształcony oddzielny system transportu oligopeptydów; di-/tri-peptydów i aminokwasów (8-12).

System transportu oligopeptydów pozwala na wykorzystanie produktów złożonych najczęściej z 4-6 reszt aminokwasowych (10). Jakkolwiek w nowszych badaniach wskazuje się na możliwość przyswajania przez te bakterie dłuższych peptydów, co zależy bardziej od ich składu niż od ilości zawartych w nich reszt (11,13). Transport oligopeptydów powiązany jest z hydrolizą ATP. Uczestniczy w nim wiele białek będących produktami genów zoorganizowanych w jeden operon (8). Są to dwa białka wiążące ATP: OppD i OppF; dwa nośnikowe białka membranowe: OppB i OppC oraz białko wiążące peptyd OppA. Wykazano, że obecność genów *OppDFBCA* jest niezbędna dla wzrostu laktokoków w mleku.

Ich wzrost w podłożu zawierającym kazeinę uwarunkowany jest również obecnością systemu transportu di-/tripeptydów. Transport peptydów o charakterze hydrofilowym, jak np. Ala-Glu, Ala-Ala i Glu-Glu, odbywa się u tych bakterii przy udziale genetycznie kodowanego białka transmembranowego i powiązany jest z symportem protonów. Przyswojenie bardziej hydrofobowych peptydów wymaga najprawdopodobniej innego mechanizmu transportu (11). Większość aminokwasów jest pobieranych ze środowiska na zasadzie transportu wtórnego powiązanego z gradientem protonowym. Transport Glu, Glx, Asp i Pro wymaga dostarczenia energii w wyniku hydrolizy ATP. Tylko arginina pobierana jest przez komórki na zasadzie wymiany stechiometrycznej 1:1 z ornityną (9).

U bakterii fermentacji mlekowej proces degradacji kazeiny rozpoczynają proteiny zlokalizowane na powierzchni komórki (3). Są one związane ze strukturą ściany komórkowej. Ważną rolę w stabilizacji tych enzymów odgrywają jony wapnia (3,12). Wielokrotne przemywanie komórek roztworem buforowym wolnym od tych jonów lub potraktowanie ich lizozymem, czy też lizyną fagową powoduje uwolnienie proteinaz.



Rys. 1. System proteolityczny bakterii fermentacji mlekowej. Możliwe sposoby degradacji kazeiny do wolnych aminokwasów niezbędnych dla wzrostu bakterii.

Usunięcie wapnia w czasie ekstrakcji enzymu powoduje zmianę jego konformacji, co prowadzi do autoproteolizy i odłączenia aktywnego N-końcowego fragmentu białka, podczas gdy jego C-koniec pozostaje związany dalej ze ścianą komórkową (3). Zastosowanie lizozymu do wydzielania proteinazy ze struktur ściany komórkowej pozwala z reguły na uzyskanie bardziej stabilnego enzymu i o wyższej masie cząsteczkowej.

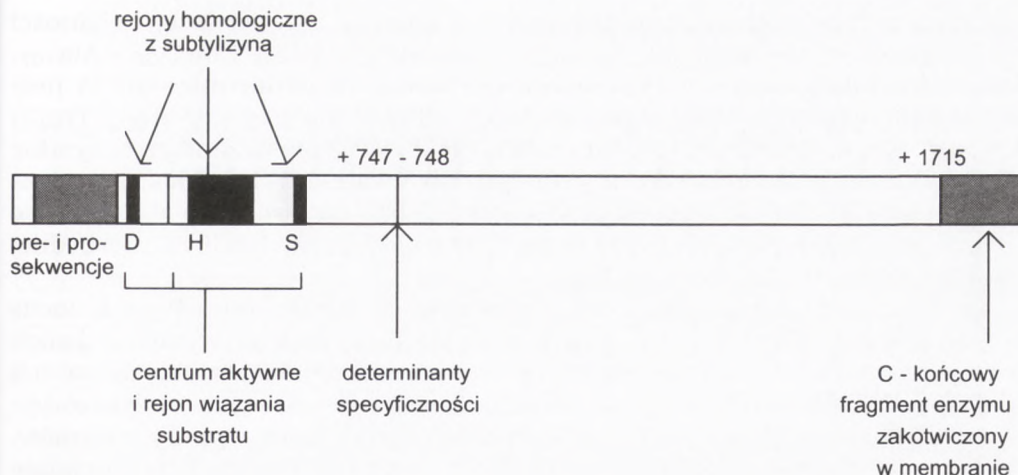
Proteinazy bakterii fermentacji mlekowej są to wysokocząsteczkowe białka o masie ok. 140 kDa, wykazujące pI w zakresie 4,4 – 4,5 (2-4). Ich aktywność jest hamowana przez typowe inhibitory proteinaz serynowych: DFP i PMSF. Ulegają natomiast aktywacji w obecności 1 mM Ca^{2+} . Optymalnie działają wobec kazeiny w pH 5,5-6,5. Proteinazy te są syntetyzowane w komórkach bakterii mlekowych jako preproenzymy o masie cząsteczkowej ok. 200 kDa (3). Ich informacja genetyczna jest zakodowana w plazmidowym DNA. Mutanty, tzw. Prt⁻ pozbawione tych plazmidów nie syntetyzują proteinaz związanych ze ścianą komórkową (3). Dotychczas ustalono strukturę pierwszorzędową już wielu proteinaz na podstawie sekwencji nukleotydów kodujących je genów m.in. z *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 763 (15) i z dwóch szczepów *L. lactis* subsp. *cremoris*: Wg2 (14) i SK11 (16).

Na podstawie tych badań ustalono występowanie w ich strukturze rejonów o tych samych właściwościach funkcjonalnych. Stwierdzono też, że ich peptyd sygnałowy składa się z 33 reszt aminokwasowych o identycznej sekwencji (3,16). Po jego odłączeniu przez sygnałną peptydazę, pełna aktywacja nieaktywnych prekursorów enzymów (proenzymów) odbywa się przy udziale innego białka, tzw. białka dojrzewania Prt M, zlokalizowanego po zewnętrznej stronie membrany komórkowej. Jego struktura pierwszorzędowa, jak wyka-

ziano u wszystkich poznanych gatunków bakterii, jest bardzo konserwatywna. Białko to jest kodowane przez gen *prtM*, który został zlokalizowany na plazmidzie kodującym również proteinazę, ale kierunek transkrypcji genów obydwu białek okazał się dywergentnie rozbieżny. Prt M jest lipoproteiną o masie cząsteczkowej 33 kDa. Poprzez indukowanie zmian konformacyjnych w cząsteczce proenzymu, przyczynia się ona do odszczepienia na drodze autoproteolizy, sekwencji pro złożonej ze 154 reszt aminokwasowych (3). Usunięcie genu *prtM* powoduje, że komórka staje się fenotypowo proteina-zoujemna Prt⁻, jakkolwiek biosynteza i wydzielanie nieaktywnych cząsteczek proteiny nadal ma miejsce.

Wszystkie dojrzałe białka enzymatyczne zawierają jako N-kończącą resztę — kwas asparaginowy, który w ich preprosekwencji zidentyfikowano w pozycji 188. Wykazują też duże podobieństwo struktury pierwszorzędowej sięgające 98% (3,6). W strukturze ich cząsteczki występują 3 domeny: centralna, N- i C-terminalna (16). W domenie N-końcowej znajduje się centrum aktywne enzymu. Wokół reszt tworzących je i odpowiadającym Asp₃₂, His₆₄ i Ser₂₂₁ w subtylizynie zaznacza się wyraźna homologia z innymi proteinazami serynowymi z jej rodziny, jakkolwiek proteinyzazy laktokoków są znacznie większymi cząsteczkami o długiej C-końcowej domenie obejmującej blisko połowę całkowitej sekwencji enzymu (3,16). C-końcowa domena enzymu związana jest z komórką poprzez zakotwiczenie 18-20 aminokwasowego segmentu α -helikoidalnego łańcucha złożonego z silnie hydrofobowych reszt w membranie komórkowej. Jego krótki odcinek C-końcowy, obejmujący 3 zasadowe reszty aminokwasowe i 1-2 kwaśne, przejawia z kolei silnie hydrofilny charakter. Te 3 przedostatnie dodatnio naładowane reszty stanowią najprawdopodobniej sekwencję sygnałną blokującą transport białka na zewnątrz komórki poprzez interakcję z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi dwu-warstwy fosfolipidowej membrany cytoplazmatycznej. Funkcja domeny centralnej cząsteczki enzymu nie jest do końca znana, być może ułatwia ona jego kontakt z substratem.

Proteinyzazy bakterii fermentacji mlekowej, pomimo dużego podobieństwa strukturalnego, wykazują znaczne różnice w specyficzności substratowej. Przejawiają różne preferencje wobec poszczególnych frakcji kazeinowych, jak również inaczej degradują te białka. Niektóre z nich, jak proteinyzazy z *L. lactis* subsp. *cremoris* (szczyepy: HP, Wg 2), *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 763 zaliczane do typu P_I, atakują głównie frakcję β -kazeiny, a w następnej kolejności także χ -kazeinę. Drugi typ proteinaz określane symbolem P_{III}, który obejmuje proteinyzazy wydzielone m.in. z *L. lactis* subsp. *cremoris* AM1 i SK11 degraduje zarówno α_{s1} , χ - jak i β -kazeinę, przy czym tę ostatnią frakcję hydrolizuje inaczej niż proteinyzazy typu P_I (4,12,17). Wykazano, że różna specyficzność tych proteinaz zależy od podstawienia reszt aminokwasowych w ich cząsteczce, zarówno w rejonie centrum aktywnego, a szczególnie w obszarze obejmującym reszty 130-225, który jest homologiczny z rejonem wiązania substratu w subtylizynie, jak i w pozycjach 747 i 748, które nie mają odpowiednika w strukturze subtylizyn. U proteinaz typu P_I w tych dwu ostatnich miejscach występują odpowiednio treonina i glutamina, natomiast u P_{III} ar-



Rys. 2. Funkcjonalne rejony w strukturze proteinaz związanych ze ścianą komórkową bakterii fermentacji mlekowej określone na podstawie sekwencji nukleotydów w genie (12). D, H, S — lokalizacja reszt: kwasu asparaginowego, histydyny i seryny tworzących triadę katalityczną.

ginina i lizyna (3,4,6). U niektórych bakterii, np. *L. lactis* subsp. *cremoris* FD27 i E8 i *L. lactis* subsp. *lactis* UC 317 stwierdzono obecność proteinaz przejawiających obydwa typy aktywności kazeinolitycznej (typ pośredni P_I/P_{III}), ale są one kodowane również przez jeden gen (12,18).

Specyficzność proteinaz typu P_I wobec β -kazeiny jest dość szeroka, jakkolwiek przejawiają one pewne preferencje wobec wiązań utworzonych przez resztę glutaminy i seryny. Atakują one wiązania umiejscowione głównie w C-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego β -kazeiny, o silnie hydrofobowym charakterze i dużej zawartości reszt proliny. Juillard i wsp. (19) wykazali, że proteinaza P_I z *L. lactis* Wg2 degraduje β -kazeinę do blisko 100 peptydów złożonych z 4-30 reszt aminokwasowych, jakkolwiek najczęściej uwalnianych produktów zawiera od 4 do 10 reszt. Jeden z pierwszych produktów, uwalnianych z β -kazeiny przez te enzymy zawierający reszty 194-209, przejawia silnie gorzki smak. Proteinazy P_{III} hydrolizują więcej wiązań peptydowych w tym białku niż proteinazy typu P_I. Bardzo podatne na ich działanie są wiązania: Fen₅₂ - Ala₅₃, Gln₄₆ - Asp₄₇, Asp₄₃ - Glu₄₄, Tyr₁₉₃ - Gln₁₉₄, Leu₁₉₂ - Tyr₁₉₃ (12,20,21). Łatwiej atakują też α _{s1}-kazeinę. W pierwszej kolejności, na skutek hydrolizy wiązań Leu₁₆ - Asn₁₇ i Asn₁₇ - Glu₁₈, odszczepiają fragmenty (1-17) i (17-23) tego białka. Wiązanie Fen₂₃ - Fen₂₄ w α _{s1}-kazeinie, najbardziej podatne na działanie chymozyny, jest przez te proteinazy bardzo wolno rozkładane. Na ogół proteinazy typu P_{III} rozszczepiają wiązania utworzone przez Glx-X lub X-Glx, przy czym najczęściej w pozycjach P_I lub P_I' występują duże hydrofobowe reszty (Leu, Tyr, Fen, Met) (20,22). Aktywność tych proteinaz, jak się wydaje, jest związana ze szczepami tzw. niegorzkimi (21).

Obydwa typy proteinaz degradują też χ -kazeinę. W pierwszej kolejności rozszczepiają w niej wiązania: Leu₇₉ - Ser₈₀, Met₉₅ - Ala₉₆ i Met₁₀₆ - Ala₁₀₇. Dalszą hydrolizę wiązań w tym białku prowadzą już odmiennie. Dla P_I proteinaz są to wiązania: Leu₃₂ - Ser₃₃ i Asn₄₁ - Tyr₄₂, a dla P_{III}: Asn₁₆₀ - Trp₁₆₁ i Ala₆₅ - Ala₆₆. Proteinyzy typu pośredniego P_I / P_{III} rozszczepiają wszystkie te wiązania (17). Jeden z pierwszych peptydów uwalnianych z χ -kazeiny przez obydwa typy proteinaz, zawierający reszty 96-106 natywnego białka, jak się wydaje, ma szczególne znaczenie, gdyż jest pierwszym źródłem niezbędnej dla tych bakterii histydyny (7,12).

De Vos i wsp. (23) przekształcili aktywność proteinyzy typu P_{III} z *L. lactis* subsp. *cremoris* SK11 w typ P_I (jak w szczepie Wg2) poprzez wymianę dwóch fragmentów DNA w ich genach z obszaru reszt odpowiedzialnych za ich specyficzność. Substytucja tylko jednego fragmentu pozwoliła otrzymać hybrydy proteinaz różniące się specyficznością od rodzicielskiej pary enzymów. Badania te otwierają możliwość konstrukcji nowych proteinaz o potencjalnie dużym znaczeniu i wykorzystaniu w przetwórstwie mleczarskim.

U bakterii fermentacji mlekowej wykazano też obecność proteinaz wewnątrzkomórkowych, m.in. u szczepów *L. lactis* subsp. *lactis*: IAM 1198 (24), NCDO 763 (25) i MG 1363 (26). Są wśród nich zarówno enzymy degradujące kazeinę jak i pozbawione aktywności kazeinolitycznej. Niektóre z nich są metaloproteinazami, inne należą do grupy proteinaz serynowych lub cysteinowych. Najprawdopodobniej biorą one udział w aktywacji enzymów lub w degradacji peptydów sygnałowych, czy też w odbudowie zdenaturowanych białek wewnątrz komórki (25).

Główną rolę w dalszej degradacji pobranych z podłoża peptydów do mniejszych fragmentów prowadzą wewnątrzkomórkowe peptydazy. Lokalizację tych enzymów wewnątrz komórki potwierdzono w licznych badaniach, w których wykazano zgodność ich sekwencji aminoterminalnej ustalonej na podstawie analizy nukleotydów w genie z sekwencją N-końcowych reszt aminokwasowych w oczyszczonych białkach, wskazującą tym samym na brak w ich strukturze peptydu sygnałowego. Występują wśród nich zarówno endo- jak i egzopeptydazy (tab.1). U bakterii z rodzaju *Lactococcus* nie wykazano jednak karboksypeptydaz, ale stwierdzono ich obecność u niektórych gatunków z rodzaju *Lactobacillus* (2,4).

Większe substraty peptydowe degradowane są przez endopeptydazy (oligopeptydazy). Enzymy te wydzielono z wielu gatunków. Różnią się one od kazeinaz występujących na powierzchni komórki. Nie degradują natywnych frakcji kazeinowych. Działają na mniejsze substraty zawierające do 30 reszt aminokwasowych. Do monitorowania ich aktywności najczęściej wykorzystywano peptyd (α_{s1} -CN 1-23) pochodzący z hydrolizy α_{s1} -kazeiny pod wpływem chymozyny, zawierający reszty 1-23 natywnego białka (27,28,46), a także metenkefalinę (32) i bradykininę (47). Z gatunku *L. lactis* subsp. *cremoris* H61 wyizolowano dwie takie endopeptydazy: LEP I i LEP II (27,28). Obydwe należą do grupy metalopeptydaz, jakkolwiek pierwszy z tych enzymów będący białkiem monomerycznym reaktywowany jest jonami Mn²⁺, drugi natomiast wykazujący strukturę dimeryczną, jonami Zn²⁺. Wykazują one zdecydowanie

TABELA 1
PEPTYDAZY BAKTERII Z RODZAJU *Lactococcus*

Enzym	Symbol*	Typ	Substrat	Literatura
endopeptydazy	LEP I/LEP II	metalopeptydaza	(X) - ↓(Y)	(27,28)
	Pep O	metalopeptydaza	(X) - ↓(Y), metenkefalina	(29)
	Pep F	metalopeptydaza	(X) - ↓(Y)	(30)
aminopeptydazy:	Pep N	metalopeptydaza	Leu/Lys - ↓pNA	(31,32)
	Pep C	cysteinowa	Leu/Lys - ↓pNA	(33,34)
	Pep P	metalopeptydaza	X - ↓Pro - X - Y	(35)
glutamyl-aminopeptydaza	Pep A	metalopeptydaza	Glu/Asp - ↓pNA	(36,37)
pyrolidonylo-karboksylopeptydaza	PCP	serynowa	PyroGlu - ↓pNA	(2)
prolinaza	PIP	metalopeptydaza	Pro - ↓X - (Y)	(38)
X-prolylodipeptydylo-aminopeptydaza	Pep XP	serynowa	X - Pro - ↓pNA	(39,40)
prolidaza	PRD	metalopeptydaza	X - ↓Pro	(41)
dipeptydaza	Pep D	metalopeptydaza	Leu - ↓Leu	(42)
tripeptydazy:	Pep T	metalopeptydaza	Leu - ↓Gly - Gly	(43)
	TRP	metalopeptydaza	Leu - ↓Leu - Leu	(44,45)

*Peptydazy, które zostały scharakteryzowane na poziomie genetycznym są opisywane symbolem „Pep”, a dodana do niego duża litera odnosi się do specyfiki danego enzymu. Natomiast peptydazy o nieznannej strukturze genowej posiadają skróty nazw biochemicznych.

różne preferencje wobec atakowanych wiązań peptydowych. Łatwo rozkładają peptyd α_{s1} -CN 1-23, przy czym endopeptydaza LEP I rozszczepia w tym substracie tylko jedno wiązanie pomiędzy Glu₁₈ - Asn₁₉, natomiast LEP II atakuje ich kilka: Gln₉ - Gly₁₀, Gln₁₃ - Glu₁₄ i Leu₂₀ - Leu₂₁ i w przeciwieństwie do pierwszego enzymu działa również na glukagon i utleniony łańcuch B insuliny. Z innego szczepu tego samego gatunku (Wg2) otrzymano w stanie homogenym inną endopeptydazę (Pep O), która degradowała wiele substratów oligopeptydowych m.in. hormony peptydowe (bradykininę, glukagon, utleniony łańcuch B insuliny) i fragmenty β -kazeiny, preferując w nich wiązania X-Fen i X-Leu. Nie działała ona jednak na peptydy zawierające poniżej pięciu reszt aminokwasowych (32). W analizie sekwencji aminokwasów w cząsteczce tej peptydazy wykazano jej podobieństwo do neprilizyny (enkefalinazy) (EC.3.4.24.11) występującej u ssaków (29). W porównaniu z ludzką neprilizyną wynosi ono 27,1%, ale wzrasta do 71% przy porównaniu sekwencji w centrum aktywnym obu enzymów. Badania sekwencji nukleotydów genu kodującego peptydazę Pep O potwierdziły, że jest on zlokalizowany w operonie kodującym system transportu oligopeptydów u *Lactococcus*, ale w przeciwieństwie do pozostałych genów tego operonu jego obecność nie jest niezbędna dla wzrostu bakterii w podłożu zawierającym oligo-

peptydy lub kazeinę (13,29). Podobne do Pep 0 właściwości wykazuje też wewnątrzkomórkowa endopeptydaza z *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 (46). Natomiast inna oligopeptydaza Pep F z *L. lactis* wykazuje węższą specyficzność i atakuje peptydy zawierające tylko 7-17 reszt aminokwasowych w łańcuchu (30).

Aminopeptydazy, odszczepiające N-końcowe reszty aminokwasowe w substratach peptydowych i oligopeptydowych wyizolowano z licznych gatunków tak z rodzaju *Lactococcus*, *Streptococcus* jak i *Lactobacillus*. Wśród nich wyróżnia się kilka typów enzymów określanymi różnymi symbolami, przejawiających różne właściwości katalityczne i inne preferencje wobec N-terminalnych reszt (2,4,12).

Aminopeptydazy N (lub Pep N) są metaloenzymami, wykazującymi najwyższą aktywność wobec substratów zawierających w pozycji N-końcowej reszty alifatyczne i ujemnie naładowane. W znacznie słabszym stopniu odszczepiają one reszty: Ala, Fen i Met. Tego typu aminopeptydazy otrzymano w stanie homogenym z dwóch różnych szczepów *L. lactis* subsp. *cremoris* (31,48). Wykazują one podobieństwo do aminopeptydaz występujących w organizmach ssaków, ale są typowymi białkami wewnątrzkomórkowymi, pozbawionymi sekwencji sygnałnej (42).

Aminopeptydazę C (Pep C) wyizolowano z *L. lactis* subsp. *cremoris* AM 2 (34). W przeciwieństwie do monomerycznych aminopeptydaz N jest ona białkiem złożonym aż z 6 podjednostek o m.c. 50 kDa każda. Różni się od nich również mechanizmem katalizy, który uwarunkowany jest obecnością w centrum aktywnym reszty sulfhydrylowej. Jej struktura pierwszorzędowa ustalona z sekwencji nukleotydów kodującego ją genu, wykazuje duże podobieństwo do innych cysteinowych endopeptydaz takich jak papaina i katepsyny H i L (33). Najłatwiej odszczepia ona N-terminalne reszty: Ala, Lys, His, Glu i Fen.

Swoistą w stosunku do N-końcowej reszty glutamylovej lub aspartylovej aminopeptydazę A (Pep A) otrzymywano m.in. z: *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 712 (37) i *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2 (36). Obydwie okazały się metalopeptydazami zbudowanymi z sześciu podjednostek, o masie odpowiednio 245 i 240 kDa. Charakteryzują się one wysoką termostabilnością.

Pyrolidonylokarboksylopeptydaza (PCP) jest aminopeptydazą odszczepiającą kwas pyroglutaminowy, który może powstawać na skutek spontanicznej intramolekularnej cyklizacji reszty glutamylovej. Wiele peptydów uwalnianych w serze zawiera w pozycji N-terminalnej ten aminokwas; w strukturze pierwszorzędowej kazeiny stanowi on aż 22,4%. Aktywność tego enzymu stwierdzono w 23 spośród 25 analizowanych szczepów bakterii z rodzaju *Lactococcus* i *Lb. helveticus* (2). Działaniu aminopeptydaz bakterii fermentacji mlekowej przypisuje się dużą rolę w poprawie cech smakowych produktów mlekowych (2,4,37).

Ważną rolę w degradacji peptydów zawierających resztę proliny spełniają inne swoiste peptydazy: prolinoiminopeptydaza, X-prolylodipeptydyloaminopeptydaza i prolidaza. Kazeina jest białkiem o szczególnie wysokiej zawartości proliny (11,7% w α_{S1} i 16,7% w β -kazeinie), również produkty jej rozkładu,

jak np. fragment C-końcowy β -kazeiny uwalniany pod wpływem kazeinazy P₁ lub inne peptydy, bogate są w ten aminokwas.

Odlączenie N-końcowej reszty proliny z peptydów prowadzi prolinoiniminopeptydazy. Enzym taki wydzielono z *L. lactis* subsp. *cremoris* HP (38). Ma on budowę dimeryczną (m.cz. 110 kDa) i jest metalopeptydazą zależną od Co²⁺ i Mn²⁺. Najwyższą aktywność przejawia wobec tripeptydów zawierających N-terminalną prolinę, a mniejsze powinowactwo wykazuje wobec Pro-X dipeptydów.

Uwalnianie X-Pro dipeptydów z większych substratów peptydowych prowadzi prolylodipeptydyloaminopeptydazy. Obecność tych enzymów stwierdzono u wszystkich bakterii fermentacji mlekowej (2,4,49). Na ogół są to serynowe peptydazy inaktywowane przez inhibitory typowe dla tej grupy enzymów. Występują one jako monomery (m.cz. 80 – 95kDa) lub dimery (160 – 200 kDa) (3,39). Z sekwencji genów, zlokalizowanych w chromosomowym DNA, ustalono pierwszorzędową strukturę niektórych z nich (39,40). Jej porównanie wskazuje na daleko posuniętą homologię enzymów. Różnice stwierdzono w podstawieniu zaledwie siedmiu reszt w ich cząsteczkach złożonych z 763 aminokwasów. Enzymy te nie wykazują natomiast homologii ani z proteinazą V₈ z *Staphylococcus aureus* ani z proteinazą z *L. lactis* subsp. *cremoris*, czy też z proteinazami z *Bacillus subtilis*, co może sugerować inne niż pozostałych serynowych proteinaz pochodzenie ewolucyjne ich genów (40). Dla niektórych X-prolylodipeptydyloaminopeptydaz znakomitym substratem okazał się opiatowy peptyd uwalniany z β -kazeiny: β -kazeinomorfina 7 (Tyr₆₀ – Pro – Fen – Pro – Gly – Pro – Ile₆₆), skądinąd bardzo oporny na działanie innych proteaz (50).

Rozkład natomiast X-Pro dipeptydów, których znaczne ilości uwalniane są z kazeiny przez dipeptydową aminopeptydazę odbywa się głównie pod wpływem prolidazy. Otrzymana w stanie homogenym prolidaza z *L. lactis* subsp. *cremoris* H61 okazała się monomerycznym białkiem o masie 43 kDa należącym do metalopeptydaz (41). Degraduje ona głównie dipeptydy Leu-Pro, Fen-Pro, Ala-Pro i Val-Pro, nie rozkłada natomiast Gly-Pro.

Produkty powstające w wyniku działania endopeptydaz i aminopeptydaz stanowią substraty dla di- i tripeptydaz. Wiele z uwalnianych peptydów wykazuje wyraźnie gorzki smak, co związane jest z obecnością reszt aminokwasowych o wysokiej hydrofobowości (leucyna, fenyloalanina, walina) (2,5). Hydrolityczny ich rozkład prowadzi do powstania mniejszych niegorzkich peptydów i wolnych aminokwasów, co przyczynia się do usunięcia niepożądanego posmaku goryczki i kształtowania prawidłowych cech organoleptycznych gotowych produktów. Aktywność di- i tripeptydaz u poszczególnych szczepów jest bardzo zróżnicowana. Wśród scharakteryzowanych dotychczas dipeptydaz większość stanowią metalopeptydazy przejawiające różne preferencje wobec hydrolizowanych wiązań peptydowych (2-4,42).

Natomiast oczyszczone do homogenności tripeptydazy m.in. z *L. lactis* subsp. *cremoris* ze szczepu:Wg2 (44) oraz IMN-C12 (45), zbudowane są z 2-3 podjednostek; ich masy cząsteczkowe wynoszą odpowiednio 105 i 72 kDa. Przejawiają one różną wrażliwość na inhibitory proteaz. Pierwszy z nich jest

hamowany zarówno przez związki kompleksujące jony metali jak i przez związki redukujące (DTT i β -merkaptotanol), które z kolei działają silnie stymulująco na aktywność drugiego enzymu wrażliwego głównie na pCMB i tylko częściowo na EDTA. Enzymy te różnią się też specyficznością. Pierwszy z enzymów wykazuje szeroką specyficzność wobec tripeptydów, drugi natomiast przejawia preferencję wobec trileucyny.

System proteolityczny bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jest mniej poznany niż bakterii *Lactococcus*. Bakterie te wykazują z reguły wyższą niż laktokoki aktywność proteolityczną. Jest ona też bardziej stabilna. Wykazano u nich obecność zarówno proteinaz związanych ze ścianą komórkową, jak i proteinaz i peptydaz wewnątrzkomórkowych (2,4). Proteinazy występujące na powierzchni komórki kodowane są przez gen zlokalizowany w chromosomalnym DNA. Obecność jednak genu *prtM* wskazuje na podobny proces dojrzewania tych enzymów. Niektóre z poznanych proteinaz jak np. proteinaza z *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* wykazuje duże, sięgające 96%, podobieństwo struktury pierwszorzędowej do proteinaz *Lactococcus* (51). Są to na ogół proteinazy serynowe, przejawiające często specyficzność typu P_I lub P_{III}. Inne natomiast proteinazy, jak np. wydzielone z termofilnych pałeczek *Lb. helveticus* i *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* różnią się od nich swoistością działania wobec substratów kazeinowych i wykazują wrażliwość nie tylko na inhibitory proteinaz serynowych, ale też cysteinowych (52,53). Nie ulegają one też w przeciwieństwie do proteinazy *Lb. casei* (54) wydzieleniu ze struktur ściany komórkowej metodą wymywania buforem nie zawierającym jonów wapnia (52). U jednego ze szczepów *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ACA DC235 (55) stwierdzono na powierzchni komórki aż dwie różne proteinazy, przy czym jedna z nich jest serynową proteinazą, druga natomiast zależną od cynku metaloproteinazą. Ich aktywność kazeinolityczna jest pod kontrolą pH środowiska. W pierwszej fazie fermentacji laktozy przeważa aktywność proteinazy serynowej, w późniejszej natomiast, gdy wzrasta kwasowość środowiska, większy udział w degradacji kazeiny wykazuje metaloproteinaza. Wewnątrz komórek pałeczek mlekowych występują podobne jak u laktokoków peptydazy (49,56-58).

3. Proteazy mikroflory starterowej wtórnej

Ważną rolę w przemianach degradacyjnych białek niektórych gatunków serów odgrywają enzymy proteolityczne tzw. wtórnej mikroflory starterowej (1,2). Zaliczają się do niej bakterie fermentacji propionowej, bakterie z rodzaju *Brevibacterium* — głównie gatunek *Brevibacterium linens*, a także niektóre gatunki grzybów.

Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* (*P. freundenreichii* spp. *freundenreichii*, *P. freundenreichii* spp. *shermanii*) wchodzi w skład mikroflory serów typu szwajcarskiego. Przyczyniają się do wykształcenia ich swoistych cech organoleptycznych, głównie dzięki wytwarzaniu kwasu propionowego i uwalnianiu znacznych ilości proliny (59). W skład ich systemu proteolitycznego

wchodzą co najmniej dwie proteinazy, w tym jedna związana ze ścianą komórkową, a druga — wewnątrzkomórkowa oraz liczne peptydazy, wśród których występują aminopeptydazy, di- i tripeptydazy, endopeptydazy i karboksypeptydazy (59-63). Przejawiają one jednak inną niż enzymy laktokoków specyficzność, co sprawia, że sery szwajcarskie mają wykształcony unikatowy profil peptydowy. Najwyższą aktywność wykazują aminopeptydazy swoiste wobec reszty proliny występującej na ostatniej lub przedostatniej pozycji w N-końcowym fragmencie substratu (61). Bakterie propionowe wykazują ponadto dużą zdolność degradacji niektórych aminokwasów, szczególnie kwasu asparaginowego, alaniny, seryny i glicyny (59).

Wysoką aktywność proteolityczną, tak zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkową, przejawia gatunek *Brevibacterium linens* rozwijający się na powierzchni serów maziowych (romadur, limburgier). Hayashi i wsp. (64) wyizolowali ze szczepu *B. linens* F pięć zewnątrzkomórkowych serynowych proteinaz. Dwie z nich z dobrym efektem zastosowano do przyspieszania dojrzewania sera cheddar. Wśród zewnątrzkomórkowych proteinaz *B. linens* wykazano też obecność cysteinowej endopeptydazy, która hydrolizowała zarówno frakcję α_{s1} jak i β -kazeiny do wysokocząsteczkowych peptydów. Enzym ten przejawia wysoką termostabilność i pH-stabilność w szerokim zakresie od 2 do 12 (65). W równie szerokim zakresie pH, tj. od 3 do 11,5, aktywna jest wydzielona z *B. linens* ATCC9174 (66) zewnątrzkomórkowa aminopeptydaza, natomiast wewnątrzkomórkowa aminopeptydaza z tego szczepu działa w węższym zakresie pH, od 8 do 10 z optimum w pH 8,5 (67). Pierwszy z enzymów jest zbudowaną z podjednostek metalopeptydazą, podobnie jak dwie inne aminopeptydazy A i B wyizolowane z *B. linens* F (68), drugi natomiast peptydazą sulfhydrylową o strukturze monomerycznej. Wykazują one preferencję odpowiednio wobec reszty leucyny i alaniny. W homogenatach kilku szczepów bakterii *B. linens* stwierdzono też występowanie peptydaz aktywnych wobec sześciu różnych substratów (69).

W technologii produkcji serów z porostem (brie, camembert) i przerostem pleśniowym (typu Roquefort) wykorzystane są gatunki grzybów odpowiednio *Penicillium camemberti* i *P. roqueforti*. Powodują one bardzo intensywny przebieg proteolizy białek w tych serach, do czego przyczyniają się zarówno endo- jak i egzopeptydazy syntetyzowane przez te grzyby.

Gatunki te posiadają podobny system proteolityczny. Obejmuje on proteazy poza- i wewnątrzkomórkowe, jakkolwiek te pierwsze zostały lepiej poznane. Wśród enzymów pozakomórkowych znajdują się proteinazy aspartylowe, metaloproteinazy, karboksypeptydazy i alkaliczne aminopeptydazy (70,71). U *P. camemberti* stwierdzono obecność aminopeptydazy swoistej wobec N-końcowej reszty prolinowej (72).

Poszczególne enzymy z obydwu gatunków pleśni wykazują znaczne podobieństwo. Aspartylowe proteinazy podobnie działają też na poszczególne frakcje kazeiny. We frakcji β -kazeiny rozszczepiają co najmniej 3 wiązania peptydowe (typu Lys-X) pomiędzy resztami Lys₂₉ - Ile₃₀, Lys₉₇ - Val₉₈ i Lys₉₉ - Glu₁₀₀ uwalniając peptydy oznaczone symbolami od β_{ap1} do β_{ap5} odpowiadające fragmentom natywnego białka 98-209, 100-209, 30-209, 1-29 i 1-

97/99. Z frakcji α_{s1} -kazeiny obydwie proteiny uwalniały po 6 produktów, jakkolwiek stwierdzono pewne różnice w szybkości hydrolizy poszczególnych wiązań przez te enzymy.

Metaloproteiny obydwu gatunków grzybów w przeciwieństwie do innych termolizynopodobnych metaloprotein optymalnie działają w kwaśnym środowisku. Najwyższą aktywność wobec kazeiny przejawiają w pH 5,5-6,0. Zidentyfikowano 3 wiązania peptydowe hydrolizowane w β -kazeinie przez metaloproteinę z *P. camemberti*: Lys₂₈-Lys₂₉, Pro₉₀-Glu₉₁, Glu₁₀₀-Ala₁₀₁, w wyniku czego odłączały się peptydy zawierające reszty 29-209, 91-209 i 101-209 tego białka. Wewnątrzkomórkowy system proteolityczny grzybów *P. roqueforti* jak i *P. camemberti* jest mniej poznany. W ekstraktach komórkowych tych grzybów wykazano aktywność endopeptydazową o optimum działania w pH 5-6,0. U *P. roqueforti* stwierdzono też występowanie aktywności odpowiadających kwaśnej i alkalicznej karboksypeptydazie oraz alkalicznej aminopeptydazie (70).

4. Podsumowanie

Dogłębna znajomość enzymów zaangażowanych w proces degradacji kazeiny umożliwia zrozumienie mechanizmów powstawania związków nadających odpowiednie cechy sensoryczne serom podczas dojrzewania. Pozwala też na pełniejszą kontrolę tego procesu, co jednocześnie gwarantuje otrzymywanie produktów o standardowej jakości. Enzymy proteolityczne mikroflory starterowej odgrywają zasadniczą rolę w przemianach tego białka. Od ich ilości (aktywności), specyficzności i stabilności zależy tempo i kierunek tych przemian, a tym samym ilość i rodzaj powstających produktów kształtujących określony profil smakowo-zapachowy serów.

Ojaśnienia skrótów: DFP — diizopropylodifluorofosforan, DTT — ditiotreitrol, EDTA — kwas etylenodiaminoczworocowy, pCMB — parachlorortęciobenzoesan, PMSF — fluorek fenylo-metylosulfonylu.

Literatura

1. Cogan T. M., Hill C., (1993), *Cheese starter cultures. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Ed. P. F. Fox, Chapman & Hall, London, 1, 193-256.
2. Fox P. F., Singh T. K., McSweeney P. L. H., (1995), *Biogenesis of flavor compounds in cheese. Chemistry of Structure-Function Relationship in Cheese*, Eds. E. L. Malin, M. H. Tunick, Plenum Press, New York, 59-98.
3. Kok J., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 2056-2064.
4. Law J., Haandrikman A., (1997), *Int. Dairy J.*, 7, 1-11.
5. Thomas T. D., Pritchard G. G., (1987), *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 245-268.
6. Kok J., (1990), *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 15-42.
7. Smid E. J., Poolman B., Konings N., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2447-2452.
8. Hagting A., Kunji E. R. S., Leenhout K. J., Poolman B., Konings W. N., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 11391-11399.

9. Konings W. N., Poolman B., Driessen A. J. M., (1989), *Crit. Rev.*, 16, 4190476.
10. Kunji E. R. S., Smid J., Plapp R., Poolman B., Konings W. N., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 2052-2059.
11. Poolman B., Kunji E. R. S., Hagting A., Juillard V., Konings W. N., (1995), *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 65S-75S.
12. Pritchard G. G., Coolbear T., (1993), *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 179-206.
13. Tynkkynen S., Buist G., Kunji E. R. S., Haandrikman A., Kok J., Poolman B., Venema G., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 7523-7532.
14. Kok J., Leenhouts K., Haandrikman A. J., Ledebøer A. M., Venema G., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 231-238.
15. Kiwaki M., Ikemura H., Kadota H. S., Hirashima A., (1989), *Mol. Microbiol.*, 3, 359-369.
16. de Vos W. M., Vos P., de Haard H., Boerigter I., (1989), *Gene*, 85, 169-176.
17. Monnet V., Ley J. P., Gonzales S., (1992), *Int. J. Biochem.*, 24, 707-718.
18. Law J., Vos P., Hayes F., Daly C., de Vos W. M., Fitzgerald G., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 709-718.
19. Juillard V., Laan H., Kunji E. R. S., Jeronimus-Stratingh C. M., Bruins A. P., Konings W. N., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 3472-3428.
20. Reid J. R., Ng K. H., Moore C. H., Coolberg T., Pritchard G. G., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 344-351.
21. Visser S., Robbes A. J. A. M., Slangen C. J., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 477-483.
22. Exterkate F. A., Alting A. C., Slangen C. J., (1991), *Biochem. J.*, 237, 135-139.
23. de Vos P., Boerigter I. J., Buist G., Haandrikman A. J., Nijhuis M., de Reuver M. B., Siezen R. J., Venema W. M., de Vos W. M., Kok J., (1991), *Prot. Eng.*, 4, 479-484.
24. Akuzawa R., Yokoyama K., Mutsuishi M., Okitani A., (1990), *J. Dairy Sci.*, 73, 3385-3392.
25. Muset G., Monnet V., Gripon J. C., (1989), *J. Dairy Res.*, 56, 765-778.
26. Stepaniak L., Gobbetti M., Fox P. F., (1996), *Lait*, 76, 489-499.
27. Yan T. R., Azuma N., Kaminogawa S., Yamauchi K., (1987a), *Eur. J. Biochem.*, 163, 259-265.
28. Yan T. R., Azuma N., Kaminogawa S., Yamauchi K., (1987b), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2296-2302.
29. Mierau I., Tan P. S. T., Haandrikman A. J., Kok J., Leenhouts K. J., Konings W. N., Venema G., (1993), *J. Bacteriol.*, 175, 2087-2096.
30. Monnet V., Nardi M., Chopin A., Chopin M. C., Gripon J. C., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 32070-32076.
31. Exterkate F. A., deJong M., de Veer G. J. C. M., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 46-54.
32. Tan P. S. T., Pos K. M., Konings W. N., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3593-3599.
33. Chapout-Chartier M. P., Nardi M., Chopin M. C., Chopin A., Gripon J. C., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 330-333.
34. Neviani E., Boquien C. Y., Monnet V., Phan Thanh L., Gripon J. C., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2308-2314.
35. Monnet V., Mars I., Gripon J. C., (1993), *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 80.
36. Bacon C. L., Jennings P. V., Fhaolain I. N., O'Cuinn G., (1994), *Int. Dairy J.*, 4, 503-519.
37. Niven G. W., (1991), *J. Gen. Microbiol.*, 137, 1207-1212.
38. Baankreis R., Exterkate F. A., (1991), *Syst. Appl. Microbiol.*, 14, 317-323.
39. Mayo B., Kok J., Venema K., Bockelmann W., Teuber M., Reinke H., Venema G., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 38-44.
40. Nardi M., Chopin M. C., Chopin A., Cals M. M., Gripon J. C., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 45-50.
41. Kaminogawa J., Azuma N., Hwang I. K., Suzuki Y., Yamauchi K., (1984), *Agric. Biol. Chem.*, 48, 3035-3040.
42. van Boven A., Tan P. S. T., Konings W. N., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 43-49.

43. Mierau I., Haandrikman A. J., Velterop O., Tan P. S. T., Leenhouts K. J., Konings W. N., Venema G., Kok J., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 2854-2861.
44. Bosman B. W., Tan P. T., Konings W. N., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1839-1843.
45. Sahlstrom S., Chrzanowska J., Sorhaug T., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3076-3082.
46. Stepianiak L., Fox P. F., (1995), *Int. Dairy J.*, 5, 69-713.
47. Pritchard G. G., Freebairn A. D., Coolbear T., (1994), *Microbiology*, 140, 923-930.
48. Tan P. S. T., Konings W. N., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 526-532.
49. Kok J., Venema G., (1995), *Int. Dairy J.*, 5, 737-755.
50. Yan T. R., Ho S. C., Hou C. L., (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 704-707.
51. Holck A., Naes H., (1992), *J. Gen. Microbiol.*, 138, 1353-1364.
52. Gilbert C., Atlan D., Blabc B., Portulier R., Germond J. E., Lapiere L., Mollet B., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 3059-3065.
53. Zevaco C., Gripon J. C., (1988), *Lait*, 68, 393-408.
54. Naes H., Chrzanowska J., Blom H., (1991), *Food Chem.*, 42, 65-79.
55. Stefanitsi D., Garel J. R., (1997), *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 180-184.
56. Bockelmann W., Beuck H. P., Lick S., Heller K., (1995), *Int. Dairy J.*, 5, 493-502.
57. Fernandez-Espla M. D., Martin-Hernandez M. C., Fox P. F., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 314-316.
58. Tobiassen R. O., Sorhaug T., Stepianiak L., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1284-1287.
59. Langsrud T., Sorhaug T., Vegarud G. E., (1995), *Lait*, 75, 325-330.
60. Depuis C., Corre C., Boyaval P., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 750-756.
61. Ostlie H., Floberghagen V., Reinbold G., Hammond E. G., Vegarud G., Langsrud T., (1995), *J. Dairy Sci.*, 78, 1224-1237.
62. Sahlstrom S., Espinoza C., Langsrud T., Sorhaug T., (1989), *J. Dairy Sci.*, 72, 324-350.
63. Stepianiak L., Tobiassen R. O., Chukwu J., Pripp A. H., Sorhaug T., (1998), *Int. Dairy J.*, 8, 33-37.
64. Hayashi K., Revell D. F., Law B. A., (1990), *J. Dairy Sci.*, 73, 579-583.
65. Clancy M., O'Sullivan M., (1993), *Irish J. Agric. Food Res.*, 32, 185-194.
66. Foissy H., (1978), *Milchwiss.*, 3, 221-223.
67. Rattray F. P., (1997), *Lait*, 77, 169-180.
68. Hayashi K., Law B. A., (1989), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 2027-2034.
69. Sorhaug T., (1981), *Milchwiss.*, 36, 137-139.
70. Cerning J., Gripon J. C., Lambert G., Lenoir J., (1987), *Lait*, 67, 3-35.
71. Chrzanowska J., Polanowski A., (1990), *Post. Mikrobiol.*, 29, 3-16.
72. Fuke Y., Matsuoka H., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 2478-2484.

Proteolytic enzymes of cheese starter microflora

Summary

In this review proteolytic enzymes of starter microflora involved in cheese ripening are described. The best known system is the proteolytic system of primary starter represented by mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria. An important role in the ripening of some kind of cheeses is played by enzymes of secondary starter represented by propionic acid bacteria, *Brevibacterium linens* and some strains of fungi of *Penicillium* genus. The extent of proteolysis and flavour development in cheese depends on the activity and specificity of all these proteases.

Key words:

cheese microflora, proteinases, peptidases, characteristics, specificity.

Adres do korespondencji:

Józefa Chrzanowska, Wydział Technologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław.