

УДК 637.146.34

В.Г. ЮКАЛО, О.М. РИБАК

Тернопільський національний технічний університет ім. Івана Пулюя
вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001

ЗНАЧЕННЯ ПЕПТИДАЗ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ У БІОТЕХНОЛОГІЯХ МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

В оглядовій статті узагальнено результати світових наукових досліджень щодо біохімічних властивостей пептидаз молочнокислих мікроорганізмів. Зазначено значимість процесу розщеплення пептидів до амінокислот у біотехнологіях молочних продуктів для формування якісних органолептичних показників. Наведено характеристику властивостей й специфічності пептидаз різних видів (амінопептидази, дипептидаз, трипептидаз, ендопептидаз, пролін-імінопептидаз, пролідаз, проліназ та ін.), штамів молочнокислих мікроорганізмів, які їх продукують. Розглянуто експресію пептидаз у залежності від штамів мікроорганізмів та живильного середовища, яке було використано для їхнього росту.

Ключові слова: пептидаза, молочнокислі мікроорганізми, аміносполуки, сир, кисломолочні продукти

Під час виробництва і реалізації харчових продуктів та молочних, зокрема, органолептичні властивості (смак, запах, консистенція) готового продукту є одним з основних факторів, що гарантує високий рівень попиту серед споживачів. Особливий, характерний для кожного продукту смак і запах забезпечують різноманітні харчові речовини (білки, жири, вуглеводи) та продукти їхнього розпаду [1-4]. Значна кількість смако-ароматичних речовин у молочних продуктах утворюються у результаті протеолізу білків молока [1,2,5,6]. Зокрема, протеоліз активно відбувається під час виробництва кисломолочних продуктів (кефір, кумис, сир кисломолочний та ін.) і особливо інтенсивно – при виробництві твердих сирів, в основі визрівання яких є біохімічні зміни білків молока. Розщеплення білків і амінокислот ферментами молочнокислих й пропіоновокислих бактерій сприяє збагаченню молочних продуктів розчинними у воді азотовмісними та безазотними сполуками, у результаті продукт набуває необхідної консистенції, смаку і запаху [7-14].

Відомо, що протеоліз білків під дією молочнокислих мікроорганізмів відбувається поступово [1-3]. Спочатку паракапаказеїнфосфатний комплекс розпадається на розчинні у воді білкові речовини (високомолекулярні поліпептиди – альбуміни), потім на середньо- і низькомолекулярні поліпептиди (пептони, пептиди) і, нарешті, на амінокислоти. Одночасно проходить відщеплення амінокислот і низькомолекулярних пептидів від поліпептидів.

Слід зазначити, що особливості біохімічних перетворень на початкових етапах протеолізу у біотехнологіях молочних продуктів є предметом досліджень багатьох науковців як вітчизняних так і закордонних [13-17]. Однак на даний час, не існує систематизованих даних щодо дії ферментів молочнокислих мікроорганізмів на більш глибоких стадіях протеолізу – утворення амінокислот із пептидів, що і є визначальним у формуванні органолептичних властивостей молочних продуктів.

Виходячи із вищевикладеного, метою даної роботи є аналіз та узагальнення існуючої наукової інформації про особливості будови, умови утворення й біохімічні властивості пептидаз молочнокислих бактерій, які широко використовуються при виробництві молочних продуктів.

Пептидази – це ферменти класу гідролаз, які відщеплюють від молекул пептидів по одній амінокислоті з карбоксильного або амінного кінця. У науковій літературі існує багато робіт,

присвячених будові, властивостям і специфічності пептидаз, основні результати яких систематизовані у таблиці.

У молочнокислих бактерій виявлено дві амінопептидази – *PepN* й *PepC*. Вивчення генів *PepN* у різних бактерій показало великий ступінь їх ідентичності [18]. Первинна структура *PepN* гомологічна до амінопептидази *N* у ссавців [19].

PepN може відщеплювати *N*-кінцеві амінокислоти у ди- і трипептидів. Проте дипептиди, в яких міститься залишок проліну в першому або другому положеннях, не розщеплюються *PepN*, тоді як такий зв'язок у трипептидах піддається гідролізу [20, 21]. *PepN* краще гідролізує дипептиди, у яких *N*-кінцевий амінокислотний залишок аргінін. Слабше гідролізуються дипептиди, які містять лізин і лейцин у першому положенні [22]. Активність ферменту зростає із підвищенням гідрофобності *C*-кінцевого амінокислотного залишку дипептиду *Arg-X*. *PepN* з *Lb. helveticus* має подібні властивості по відношенню до дипептидів *Ala-X* і *Lей-X* [20].

Таблиця

Пептидази молочнокислих бактерій

Назва ферменту	Субстрат	Штам бактерії	Молекулярна маса, кДа	Четвертинна структура	Тип пептидази ¹
Амінопептидази N <i>PepN</i>	X↓(X) _n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	95	мономер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> MG1363	95		
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> HP	95		
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> LGG	87	мономер	М
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> IFPL731	95	мономер	М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	95	мономер	М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	95	мономер	М
		<i>Lb. helveticus</i> ITGL1	97	мономер	М
		<i>Lb. helveticus</i> SBT2171	95	мономер	М
		<i>Lb. sanfrancisco</i> CB1	75	мономер	М
<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i> CNRZ302	97	мономер	М		
Амінопептидази C <i>PepC</i>	X↓(X) _n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	50	гексамер	Ц
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	51		Ц
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	54	тетрамер	Ц
		<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	50		Ц
		<i>S. salivarius ssp. Thermophilus</i>	50	гексамер	Ц
Амінопептидази A <i>PepA</i>		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	40	гексамер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> MG1363	38		
		<i>S. salivarius ssp. Thermophilus</i>	45	октомер	М
Трипептидази <i>PepT</i>	X↓X-X	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	52	димер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	52	димер	М
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> IMN-C12	23	тример	Ц
Трипептидази (неклаسیфіковані)		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	38	димер	М
		<i>Lb. Sace</i>	55	мономер	М
		<i>Pedicoccus pentosaceus</i> K9.2.	45	димер	М
Дипептидази V <i>PepV</i>	X↓X	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> Wg2	49	мономер	
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> MG1363	51		М
		<i>L. lactis biov. Diacetilactis</i>	50		М

БІОХІМІЯ

		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	52		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	51	мономер	М
		<i>Lb. helveticus</i> SBT2171	50	мономер	М
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> IFPL731	46	мономер	М
		<i>Lb. sake</i>	50	мономер	М
		<i>Lb. sanfrancisco</i> CB1	65	мономер	М
Дипептидази D, PepD	X↓X	<i>Lb. helveticus</i> 53/7	54	октамер	Т
Пролідази Q PepQ	X↓Про	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	42	мономер	М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	41		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. Bulgaricus</i>	41		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> CNRZ	41	димер	
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> IFPL731	41	мономер	М
Пролінази R PepR	Про↓X	<i>Lb. helveticus</i> CNBZ32	33	тетрамер	С
		<i>Lb. Rhamnosus</i>	34		
		<i>Lb. curvatus</i> DPC2024	32	димер	
Продовження таблиці					
Пролінази P PepP	X↓Про-(X)n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> NCDO763	43	мономер	М
		<i>L. lactis</i>	46		М
Пролінази L PepL		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	35		С
Х-проліл-дипептидил-амінопептидаза PepX	X-Про↓(X)n	<i>L. lactis ssp. lactis</i> H1	83	димер	С
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> P-8-2-47	90		С
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> AM2	59	димер	С
		<i>L. lactis ssp. cremoris</i> nTR	88	димер	С
		<i>Lb. casei ssp. casei</i> LLG	79		С
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	88		С
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> B14	95	димер	С
		<i>Lb. helveticus</i> 53/7	91	димер	С
		<i>Lb. helveticus</i> LHE-51	87		С
		<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	90		С
		<i>S. salivarius ssp. thermophilus</i> ACA-DC4	80	димер	С
Пролін-імінопептидази PepI	Про↓X-(X)n	<i>L. lactis ssp. cremoris</i> HP	50		М
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	33		С
		<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> CNRZ	33		С
		<i>Lb. helveticus</i> 53/7	34	димер	С
Ендопептидази Pep E Pep G Pep O PepF1, PepF2		<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	52		Ц
		<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i> DSM7290	50		Ц
		<i>Lb. helveticus</i> CNRZ32	71		М
		<i>L. lactis</i>	71		М
		<i>L. lactis</i>	70		
Некласифіковані		<i>Lb. paracasei</i>	30	мультимер	М
		<i>L. lactis ssp. lactis</i> MG1363	70	мономер	М
		<i>L. lactis</i>	52	мультимер	М
		<i>L. lactis</i>	180	мультимер	М

¹Примітка. М – металопептидаза; С – серинова; Ц – цистеїнова пептидаза.

У кількох роботах досліджувалась дія *PepN* на олігопептиди [21,22]. На прикладі використання як субстрату продуктів трипсинового гідролізату β-казеїну показано здатність *PepN* розщеплювати олігопептиди, які включають від 4 до 14 амінокислотних залишків. Дію очищеної *PepN* на пептиди типу Ліз-Фен-(Глі)_n вивчали за співвідношенням V_{max}/K_m та встановлено, що оптимальним субстратом для *PepN* є гексапептид [22]. Амінопептидаза *N* з *Lb. helveticus* здатна гідролізувати пептиди, які містять до 10 амінокислот, причому, в першому положенні може бути залишок проліну. Також відомо, що фермент здатен відщеплювати кінцевий тирозин від фрагменту *b-CNf193-209*, який містить 16 амінокислотних залишків [23].

Регуляція експресії *PepN* у *L. lactis* залежить від штаму бактерій, а також від живильного середовища [18]. При рості лактококів у молоці активність *PepN* вища, ніж при рості на штучних живильних середовищах. Відомо, що дипептид Про-Лей знижує експресію *PepN* у *L.*

lactis MG1363 [24]. Для з'ясування фізіологічної ролі пептидази *N* використовували мутанти *Lb. helveticus* і *L. lactis* з делецією гену *pepN* [23, 25]. Незначне зменшення росту на молочному середовищі виявлене у лактобацил, тоді як на штучному комплексному живильному середовищі різниці в їх рості не виявлено. Аналогічно ростуть мутанти і дикі штами *L. lactis* на штучному живильному середовищі, проте в молоці значно відстають у рості.

Амінопептидаза *C* (*PepC*) виділена з багатьох штамів лактобацил і лактококів [18, 26]. Використовуючи β -нафтіламідні (β -NAP) і пара-нітроанілідні (-pNA), встановлено значну активність *PepC* при розщепленні пептидних зв'язків, утворених основними (Арг, Гіс, Ліз), кислими (Глу, Асп), гідрофобними (Ала, Лей) і ароматичними (Фен) амінокислотами. При цьому не розривалися зв'язки, утворені проліном типу: Про-pNA, Про- β NAP, Х-Про-pNA, Х-Про- β NAP. Дії *PepC* на субстрат типу Глі_n (n=2-5) має найвищу активність у розщепленні тетрапептидів. Структурне моделювання *PepC* з *L.lactis* показало, що до складу активного центру ферменту входять С-термінальні залишки і беруть участь у взаємодії α -карбоксильної групи *PepC* і α -аміногрупи субстрату [27]. Це ж підтверджено при дослідженні мутантів без С-термінального залишку *PepC*. Мутанти *L. lactis* з делецією гену *pepC* не відставали у рості в живильному середовищі, але у молоці зменшувалися на 10 % [25].

Амінопептидаза *A* (*PepA*) здатна відщеплювати кислі *N*-термінальні амінокислотні залишки, добре гідролізувати Глу- і Асп-pNA й значно менше Глу- і Асп- β NAP [28, 29]. *PepA* здатна відщеплювати *N*-термінальні Глу і Асп у пептидів різної величини (від 2 до 10 залишків). Мутанти *L. lactis*, у яких відсутня *PepA*, дещо відстають у рості під час лаг-фази, але у кінцевому варіанті досягають такої ж концентрації як і у диких штамів.

У штамів багатьох видів молочнокислих бактерій виявлена Х-проліл-дипептидил-амінопептидаза (*PepX*), що відщеплює дипептиди типу Х-Про з *N*-термінальної частини пептидів. Крім того, *PepX* проявляє амідазну і естеразну активність [30, 31]. Найвища активність *PepX* при розщепленні Х-Про-PNA субстратів, у яких *N*-термінальна амінокислота не заряджена (Ала, Глі) або основна (Арг). Відомо, що *PepX* не гідролізує дипептиди, але розщеплює пептиди, які містять від 3 до 7 амінокислотних залишків [30-32]. Дипептиди, які звільняються у результаті дії *PepX*, можуть містити в першому положенні залишки основних амінокислот (Арг, Гіс, Ліз), ароматичні (Фен, Тир) і гідрофобні (Ала, Іле, Вал, Глі) амінокислоти. Використовуючи фрагмент *b*-казеїну *f* 176-182 (Ліз-Ала-Вал-Про-Тир-Про-Глі), встановлено специфічність *PepX* до субстратів типу Х-Ала-(Х)_n і одержано при розщепленні два дипептиди Ліз-Ала і Вал-Про [31, 32]. Крім того, *PepX* здатна гідролізувати субстрати типу Про-Про-(Х)_n, але майже не розщеплює Х-Про-Про [33].

Крім амінопептидаз у молочнокислих бактерій виявлені дипептидази *PepD* і *PepV* [18, 34]. *PepD* володіє широкою специфічністю, проте не гідролізує AA-pNA, дипептиди, які містять пролінові залишки, і дипептиди з *N*-термінальними залишками гліцину. На відміну від *PepD*, пептидаза *PepV* є важливішою для росту молочнокислих бактерій. На прикладі *L. lactis* було показано, що штами, в яких відсутня *PepV*, на 22 % відставали у рості [35].

Розповсюдженою у молочнокислих бактерій є пролін-імінопептидаза (*PepI*), що відщеплює *N*-термінальний залишок проліну в пептидів. [35, 37]. Каталітична тріада ферменту складається з Сер-107, Асп-246 і Гіс-273 [38]. Гідролітичну активність *PepI* проявляє до пептидів типу Про-Х, де Х може бути гідрофобним залишком (Ала, Іле, Лей, Вал), кислим (Глу) або ароматичним залишком (Фен, Тир). Використання в якості субстратів пептидів різної величини показало, що *PepI* і лактобацил і лактококів в основному відщеплює *N*-термінальний пролін в ди- і трипептидах (рідко у тетрапептидах, наприклад, Про-Фен-Глі-Ліз), але не у пентапептидах [36]. За своєю специфічністю *PepI* лактококів і лактобацил відрізняються між собою: *PepI* лактококів – металопептидаза, а *PepI* лактобацил – серинова. Відсутність пролін-імінопептидази у мутантів з делецією гену *PepI* не впливає на їх ріст у комплексних штучних живильних середовищах. Час подвоєння мікроорганізмів в молочному середовищі при цьому збільшується на 9 %.

Пептидаза, яка відщеплює *N*-термінальну амінокислоту, коли в другому положенні знаходиться залишок проліну – пролідаза (*PepQ*) [39, 40]. Пролідаза вважається ферментом, який гідролізує дипептид Х-Про. Проте не всі пролідази є дипептидазами, а також не всі субстрати типу Х-Про вони здатні гідролізувати. У першу чергу *PepQ* гідролізує дипептиди, в

яких у першому положенні є залишки гідрофобних (Ала, Іле, Лей, Вал), основних (Гіс), ароматичних (Фен, Тир) і сірковмісних (Мет) амінокислот. Деякі пролідази виявляють не зовсім зрозумілу високу здатність розщеплювати пептиди без залишків проліну, або містили його у першому положенні (Про-Ала, Про-Про, Про-Вал). У молочному середовищі штами *Lb. Helveticus*, дефіцитні по *PepQ*, розвивались на 13 % повільніше. Вивчення штамів бактерій, у яких нормально функціонує *PepQ*, і штамів без цього ферменту показали, що майже 100 % дипептидів Мет-Про, Лей-Про і Фен-Про гідролізується за участю *PepQ*.

Лише у лактококів *L. lactis* було виявлено оригінальну амінопептидазу *PepP*, яка звільняє *N*-термінальні амінокислоти з пептидів типу X-Про-Про-(Y)_n [41,42]. Найвищу активність *PepP* проявляла по відношенню до пентапептидів, які містять від 3 до 9 амінокислотних залишків. Встановлено специфічність *PepP* до наступних *N*-термінальних амінокислот (X): Арг, Мет, Ліз, Лей і Тир. Різниця в швидкості росту в штучному і молочному середовищах у мутантів з делецією гену *PepP* і диких штамів *L. lactis* незначна.

Трипептидаза *PepT*, виділена з *L. lactis*, гідролізує трипептиди, крім пептидів типу X-Про-Y. Вони не здатні гідролізувати ди-, тетра- або більші пептиди [43]. Інші трипептидази характеризуються більшою здатність розщеплювати трипептиди із гідрофобними і ароматичними амінокислотними залишками [44, 45]. Фізіологічна роль *PepT* вивчена мало. Відомо тільки, що відсутність *PepT* у лактококів затримує їх ріст у молоці [25].

Пептидаза *PepO* розщеплює олігопептиди, які включають від 5 до 35 амінокислотних залишків [45, 46, 47]. Це Мет- і Лей-енкефаліни, фрагмент α_{s1}-казеїну (f 165-199), брадікінін, нейротензин, ангіотензин. Подібно до термолізіну, *PepO* гідролізує пептидні зв'язки, утворені лейцином і фенілаланіном. Хоча *PepO* розщеплює ряд казеїнових фрагментів, нативні білки казеїнового комплексу гідролізу не піддаються. Ріст мутантів з делецією гену *pepO* і диких штамів *Lb. helveticus* досліджували на різних живильних середовищах [46]. Незначне відставання в рості спостерігали у мутантів *L.lactis* при використанні в якості живильного середовища молока [25].

Ще одна пептидаза (*PepF*), яка розщеплює олігопептиди виявлена лише у лактококів [48]. Причому у підвиді *L. lactis ssp. lactis* ген *pepF1* локалізований на хромосомі, а у *L. lactis ssp. cremoris* ген *pepF2*, який кодує гомологічну пептидазу, розміщений на лактозо-протеїназній плазміді [49]. *PepF* гідролізує олігопептиди, які включають від 5 до 17 амінокислотних залишків [48]. Найвищу розщеплюючу здатність *PepF* проявляє по відношенню до субстратів, що складаються з 8 або 9 залишків. У фрагменті АКТГ (f 1-24) *PepF* гідролізує три зв'язки, звільняючи пептиди від 3 до 5 залишків. Відсутність активності *PepF* до β-ланцюга інсуліну (30 залишків), глюкагону (29 залишків) і фрагменту АКТГ (f 1-24) дозволяє визначити межу розмірів субстратів (менше 24 залишків). Нативні білки казеїнового комплексу протеїназа *PepF* не розщеплює. Цей фермент відіграє важливу роль у процесах росту лактококів у молочному середовищі. У мутантів, дефіцитних за *PepF*, час генерації збільшується на 16 % [49].

Серед великої кількості різних за специфічністю пептидаз молочнокислих бактерій не було виявлено ні однієї з карбоксипептидазною активністю.

Питання локалізації пептидаз у клітинах молочнокислих бактерій від часу його виникнення зазнало змін. У ранніх роботах вказувалося про локалізацію їх на клітинних мембранах і навіть поза клітинами [50]. На сьогоднішній день більшість дослідників схиляються до думки про внутрішньоклітинну локалізацію всіх пептидаз молочнокислих бактерій [18, 33, 34, 39]. Доказами цього може бути відсутність сигнальних послідовностей та анкорних ділянок для фіксування на мембрані у всіх пептидаз, для яких була встановлена первинна структура. Крім цього, транспортна система олігопептидів молочнокислих бактерій може забезпечити проходження в клітину великих пептидів, що утворюються при протеолізі казеїну. При цьому немає необхідності розщеплення пептидів поза клітиною чи на клітинних мембранах.

Висновки

На основі проведеного аналізу наукових джерел встановлено, що широковикористовувані у біотехнологіях молочних продуктів мікроорганізми здатні продукувати ряд пептидаз, які відіграють важливу роль у звільненні амінокислот із екзогенних пептидів. У більшості випадків мутанти, дефіцитні по кожній з пептидаз, не відрізняються у своєму рості від диких штамів

молочнокислих бактерій в комплексних штучних живильних середовищах, а на молочному середовищі значно відставали у рості.

Рекомендовано у процесі підбору видового складу заквасок застосовувати систематизовані характеристики пептидаз тих чи інших мікроорганізмів з метою забезпечення якісних органолептичних показників молочних продуктів.

1. *Гобатова К.К.* Химия и физика молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова, П.И. Гунькова; под ред. К.К. Горбатова. — СПб.:ГИОРД, 2012. — 336 с.
2. *Голуб Б.* Протеоліз у про біотичних напоях, ферментованих біфідобактеріями / Богдан Голуб // Товари і ринки. — 2013. — № 2. — С. 100—107.
3. *Макуян С.С.* Изменения микрофлоры в сыре «Швейцарский», выработанном при двухстороннем прессовании / С.С. Макуян // Сыроделие и маслоделие. — 2012. — № 6. — С. 19—20.
4. *Ножечкина Г.Н.* Формирование органолептических показателей твердых сыров. Факторы созревания твердых сыров / Г.Н. Ножечкина // Молочная индустрия. — 2013. — № 1. — С. 28—30.
5. *Орлюк Ю.Т.* Дослідження протеолізу в сирі, що визріває за участі двох видів плісняви / Ю.Т. Орлюк, М.І. Степанищев // Наукові праці НУХТ. — 2013. — № 50. — С. 143—147.
6. *Справочник технолога молочного производства.* Том 3. Сыры. / В.В.Кузнецов, Г.Г.Шилер; под ред. Г.Г.Шилера. — СПб.: ГИОРД, 2003. — 512 с.
7. *Степанова Л.И.* Справочник технолога молочного производства. Том 1. Цельномолочные продукты / Л. И. Степанова. — СПб.: ГИОРД, 1999. — 384 с.
8. *A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from Lactococcus lactis subsp. cremoris* / G.W.Niven, S.A.Holder, P. Stroman // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1995. — Vol. 43. — P. 91—97.
9. *Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids* / S. Helinck, D. Le Bars, D. Moreau et al. // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — № 70. — P. 3855—3861.
10. *Ardö Y.* Flavour formation by amino acids catabolism / Y. Ardö // Biotechnol. Adv. — 2006. — № 24. — P. 238—242.
11. *Baankreis R.* Characterization of a peptidase from Lactococcus lactis ssp. cremoris HP that hydrolyses di- and tripeptides containing proline or hydrophobic residues as a amino-terminal amino acid / R.Baankreis, F.A. Exterkate // Syst. Appl. Microbiol. — 1991. — Vol. 14. — P 317—323.
12. *Biochemical and genetic characterization of Pep F, an oligopeptidase from Lactococcus lactis* / V.Monnet, M.Nardi, A. Chopin // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269. — P. 32070—32076.
13. *Characterization of a prolidase from Lactobacillus delbruckii ssp. bulgaricus CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis* / F.Morel, J.Frot-Coutaz, D. Aubel // Microbiol. — 1999. — Vol. 145. — P. 437—446.
14. *Characterization of the recombinant exopeptidases PepX and PepN from Lactobacillus helveticus ATCC 12046 important for food protein hydrolysis* / T Stressler, T. Eisele, M. Schlayer // PLoS One. — 2013. — Vol. 8(7). — e70055.
15. *Chen Y.S.* Genetic characterization and physiological role of endopeptidase O from Lactobacillus helveticus CNRZ 32 / Y.S.Chen, J.L.Steele // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — Vol. 64. — P. 3411—3415.
16. *Christensen J.E.* Characterization of peptidase-deficient Lactobacillus helveticus CNRZ 32 derivatives / J.E.Christensen, J.L. Steele // Fifth Symposium on Lactic Acid Bacteria. — Veldhoven, The Netherlands. — 1996. — P. 391—397.
17. *Cloning of the pepX gene of Lactobacillus helveticus IF03809 encoding salt-tolerant X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase and characterization of the enzyme* / K. Kimura, A. Nagasawa, M. Fujii // J Biosci Bioeng. — 2002. — Vol. 93. — P. 589—594.
18. *Degradation and debittering of a tryptic digest from β -casein by aminopeptidase N from Lactococcus lactis subsp. cremoris Wg 2* / P.S.T.Tan, T.A.Van Kessel, Van de Veerdonk // Appl. Environ. Microbiol. — 1993. — Vol. 59. — P. 1430—1436.
19. *Duplication of pep F and shuffling of DNA fragments on the lactose plasmid of Lactococcus lactis* / M.Nardi, P.Renault, V. Monnet // J. Bacteriol. — 1997. — Vol. 179. — P. 4164—4171.
20. *Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins* / I.M. Ferreira, O. Pinho, D. Monteiro et al. // J.Dairy Sci. — 2010. — Vol. 93, Issue 1. — P. 27—31.
21. *Enzymatic ability of Bifidobacterium animalis subsp. lactis to hydrolyze milk proteins: identification and characterization of endopeptidase O* / C.Janer, F.Arighoni, B.H.Lee et al // Appl Environ Microbiol. — 2005. — Vol. 71. — P. 8460—8465.
22. *Experimental evidence for the essential role of the C-terminal residue in the strict aminopeptidase activity of the thiol aminopeptidase Pep C a bacterial bleomycin hydrolase* / L. Mata, M. Erra-Pujada, J.C. Gripon et al // Biochem. J. — 1997. — Vol. 328. — P. 343—347.

23. *Expression* of six peptidases from *Lactobacillus helveticus* in *Lactococcus lactis* / S. Luoma, K. Peltoniemi, V. Joutsjoki et al. // *Appl Environ Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 1232—1238.
24. *Fernández M.* Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria / M.Fernández, M.Zuniga // *Crit. Rev. Microbiol.* — 2006. — № 32. — P. 155—183.
25. *Fitz G.R.J.* Milk protein – derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme / G.R.J. Fitz, H. Meisel // *British. J. Nutrition.* — 2000. — Vol. 84. — P. 33—37.
26. *Growth, survival, and peptidolytic activity* of *Lactobacillus plantarum* I91 in a hard-cheese model / C.V. Bergamini, G.H. Peralta, M.M. Milesi et al. // *J. Dairy Sci.* — 2013. — Vol. 96, Issue 9. — P. 5465—5476.
27. *Hydrolysis* of milk-derived bioactive peptides by cell-associated extracellular peptidases of *Streptococcus thermophilus*. / Z. Hafeez, C. Cakir -Kiefer, J.M. Girardet et al. // *Appl Microbiol Biotechnol.* — 2013. — Vol. 97. — P. 9787—9799.
28. *Identification* and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO₂, an endopeptidase with post-proline specificity / Y.S.Chen, J.E. Christensen, J.R.Broadbent et al. // *Appl Environ Microbiol.* — 2003. — Vol. 69. — P. 1276—1282.
29. *Introduction* of peptidase genes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* into *Lactococcus lactis* and controlled expression / U.Wegmann, J.R.Klein, I. Drumm et al. // *Appl Environ Microbiol.* — 1999. — Vol. 65(11). — P. 4729—33.
30. *Lactobacillus helveticus* as a tool to change proteolysis and functionality in Swiss-type cheeses / L. Sadat-Mekmene, R. Richoux, L. Aubert-Frogerais et al. // *J.Dairy Sci.* — 2013. — Vol. 96, Issue 3. — P. 1455—1470.
31. *Marilley L.* Flavours of cheese products: Metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains / L. Marilley, M.G.Casey // *Int. J. Food Microbiol.* — 2004. — № 90. — P. 139—159.
32. *Medium-dependet* regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides / J.D.Marugg, W.Meijer, Van Kranenburg // *J. Bacteriol* — 1995. — Vol. 177. — P. 2982—2989.
33. *Mireau I.* Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk / I.Mireau, E.R.S. Kunji, K.J. Leenhouts // *J. Bacteriol.* — 1996. — Vol. 178. — P. 2794—2803.
34. *Mistou M.Y.* Catalytic properties of the cysteine aminopeptidase Pep C, a bacterial bleomycin hydrolase / M.Y.Mistou, J.C.Gripon // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — Vol. 3. — P. 63—70.
35. *Nonstarter* lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components / E. Sgarbi, C. Lazzi, G. Tabanelli et al. // *J. Dairy Sci.* — 2013. — Vol. 96, Issue 7. — P. 4223—4234.
36. *Rawlings N. D.* Handbook of Proteolytic Enzymes / N. D. Rawlings, A.J.Barrett, J. F. Woessner et al. — Elsevier, 2004. — 984 p.
37. *Peptidase* activity in various species of dairy thermophilic lactobacilli/ M. Gatti, M.E. Fornasari, C.Lazzi // *J Appl Microbiol.* — 2004. — Vol. 96(2). — P. 223—229.
38. *Role* of the microbial population on the flavor of the soft-bodied cheese Torta del Casar / E.Ordiales, A.Martin, M. J. Benito, et al. // *J. Dairy Sci.* — 2013. — Vol. 96, Issue 9. — P. 5477—5486.
39. *Production, active staining and gas chromatography assay* analysis of recombinant aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DSM 20481 / T. Stressler, T. Eisele, M. Schlayer // *AMB Express.* — 2012. —doi: 10.1186/2191-0855-2-39.
40. *Rul F* Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis* / F.Rul, V. Monnet // *J. Appl. Microbiol.* — 1997. — Vol. 82(6). — P. 695—704.
41. *Purification* and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511 / H. Miyakawa, S. Kobayashi, S. Shimamura et al. // *J. Dairy Sci.* — 1992. — Vol. 75, № 1. — P. 27—35.
42. *Purification* and characterization of an aminotripeptidase from cytoplasm of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 / C.L.Bacon, M.Wilkinson, P.V. Jeninings // *Int. Dairy J.* — 1993. — Vol. 3. — P. 163—177.
43. *Purification and* characterization of an aminotripeptidase from cytoplasm of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2 / C.L. Bacon, P.V. Jeninings, I.N. Phaolain et al. // *Int. Dairy. J.* — 1994. — Vol. 4. — P. 503—519.
44. *Purification* and characterization of aminopeptidase P from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* / M. Mc Donnell, R. Fitzgerald, I.N. Fhaolain et al. // *J Dairy Res.* — 1997. — Vol. 64. — P. 399—407.
45. *Substrate* specificity of a tripeptidase as a metalloenzyme purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ATCC 13675 / S.Mori, S.Sumino, T.Kasumi // *J Biosci Bioeng.* — 2002. — Vol. 93. — P. 360—366.
46. *Tan P.S.T.* Characterization of the *Lactococcus lactis* pep N gene encoding an aminopeptidase homologous to mammalian aminopeptidase N / P.S.T.Tan, J.J.Van Alen-Boerrigter, B.Poolman // *FEBS Lett.* — 1992. — Vol. 306. — P. 9—16.

47. *The prolyl aminopeptidase from lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus belongs to the alpha/beta hydrolase fold family* / F.Morel, C.Gilbert, C. Geourjon // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1999. — Vol. 1429. — P. 501—505.
48. *Thomas T.D. Proteolytic enzymes of dairy starter cultures* / T.D.Thomas, G.Pritchard // *FEMS Microbiology Reviews.* —1987. — Vol. 46, № 3. — P. 245—268.
49. *Yang S.I Characterization of recombinant prolidase from Lactococcus lactis - changes in substrate specificity by metal cations, and allosteric behavior of the peptidase* / S.I Yang, T.Tanaka // *FEBS J.* — 2008. — Vol. 275. — P. 271—280.

В.Г. Юкало, О.Н. Рыбак

Тернопольский национальный технический университет им. Ивана Пулюя, Украина

ЗНАЧЕНИЕ ПЕПТИДАЗ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

В обзорной статье обобщены результаты мировых научных исследований об биохимических свойствах пептидаз молочнокислых микроорганизмов. Отмечено значимость процесса расщепления пептидов до аминокислот в биотехнологиях молочных продуктов для формирования качественных органолептических показателей. Приведена характеристика свойств и специфичности пептидаз различных видов (аминопептидаз, дипептидаз, трипептидаз, эндопептидаз, пролин-иминопептидаз, пролидаз, пролиназ и др.), штаммов молочнокислых микроорганизмов, которые их производят. Рассмотрено экспрессию пептидаз в зависимости от штаммов микроорганизмов и питательной среды их роста.

Ключевые слова: пептидаза, молочнокислые микроорганизмы, аминокосоединения, сыр, кисломолочные продукты

V.G. Ukalo, O.N. Rybak

Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ukraine

THE ROLE OF PEPTIDASES FROM LACTIC ACID BACTERIA IN DAIRY BIOTECHNOLOGIES

This review article summarizes the results of international research, which are related to biochemical characteristics of peptidases from lactic acid bacterias. The importance of peptides' proteolysis into amino acids to organoleptic property formation in dairy biotechnologies has been indicated. Properties and peculiarities of different peptidases (aminopeptidases, dipeptidases, tripeptidases, endopeptidases, proline-iminopeptidases, prolidases, prolinases etc.) as well as strains of lactic acid bacteria, that produce them, have been described. We analyzed the peptidase expression depending on strains and culture medium used for their growth.

Keywords: peptidase, lactic acid bacteria, aminocompound, cheese, fermented milk product

Рекомендує до друку

Надійшла 28.01.2014

О.Б. Столяр