

MONIKA GARBOWSKA, ILONA STEFAŃSKA, MARLENA MŁYNEK

## AKTYWNOŚĆ PEPTYDAZ WYBRANYCH SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS* PODDANYCH OBRÓBCE TERMICZNEJ

### Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie aktywności amino- i dipeptydaz wybranych kultur bakterii mlekowych (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*), poddanych działaniu temperatury 50 ÷ 75 °C, przez 1, 15 i 25 min. Badane kultury *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy o podobnej specyficzności substratowej, ale z różną aktywnością. Wykazywały one wyższą aktywność aminopeptydaz w porównaniu z aktywnością dipeptydaz. Średnia aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* była wyższa o 45 % od średniej aktywności bakterii *Lb. casei*. Wyższą o 25 % aktywnością aminopeptydaz charakteryzował się szczep *Lb. casei*. Szczep ten wykazywał największą specyficzność względem substratów: Ala-Leu, Ala-Ala, Gly-Leu, natomiast *Lb. acidophilus* – względem Ala-Ala oraz Ala-pNa. Najwyższą aktywność amino- i dipeptydaz *Lb. casei* oraz dipeptydaz *Lb. acidophilus* stwierdzono po obróbce termicznej bakterii przez 15 min. W przypadku amino- i dipeptydaz *Lb. casei* ich aktywność wynosiła odpowiednio: 5,10 i 0,83 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> oraz 1,66 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> – w przypadku dipeptydaz *Lb. acidophilus*. Z kolei średnia aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* wzrastała wraz z wydłużaniem czasu ogrzewania – najwyższe jej wartości uzyskano po 25 min (3,89 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>). Wykazano, że wydłużenie czasu obróbki termicznej wpłynęło statystycznie istotnie (p < 0,05) na wzrost aktywności aminopeptydaz badanych kultur bakterii, co wskazuje na ich wysoką termostabilność.

**Słowa kluczowe:** : bakterie kwasu mlekowego, aminopeptydazy, dipeptydazy, aktywność proteolityczna, obróbka termiczna

### Wprowadzenie

Proteoliza jest procesem biochemicznym odgrywającym zasadniczą rolę w wytwarzaniu i przechowywaniu mleknych produktów fermentowanych. Podczas produkcji sera rozkład kazeiny do polipeptydów, peptydów i aminokwasów jest bardzo

---

Dr inż. M. Garbowska, Międzyzakładowa Grupa Problemowa ds. Mleczarstwa, dr n. wet. I. Stefańska, mgr inż. M. Młynek, Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.  
Kontakt: monika.garbowska@ibprs.pl

istotny, ponieważ powstałe w wyniku proteolizy produkty są prekursorami specyficznych cech smakowo-zapachowych, tworzonych przez takie związki, jak: alkohole, aldehydy, kwasy, estry oraz związki siarkowe [24]. Smak gorzki, będący wynikiem nagromadzenia peptydów hydrofobowych (zwłaszcza bogatych w prolinę), jest technologicznym wskaźnikiem jakościowym serów typu Gouda i Cheddar [25].

System proteolityczny bakterii kwasu mlekowego składa się z trzech elementów: 1) proteinaz związanych ze ścianą komórkową (CEPs – *cell envelope proteinases*), które rozpoczynają degradację kazeiny do oligopeptydów, 2) systemów transportu peptydów do wnętrza komórki, 3) różnorodnych wewnątrzkomórkowych peptydaz rozkładających peptydy do krótszych peptydów i aminokwasów [2, 22].

Specyficzność CEPs odgrywa zasadniczą rolę w wytwarzaniu gorzkich peptydów [4, 20]. Peptydazy kultur bakterii kwasu mlekowego (LAB - *lactic acid bacteria*), takie jak: PepN, PepX, PepO2, PepO3 biorą udział w degradacji gorzkich peptydów i są odpowiedzialne za jakość sensoryczną produktów mlecznych [5, 6, 26, 18]. Ważne jest, aby proteoliza przebiegała w sposób zrównoważony, czyli sprzyjający tworzeniu odpowiedniego smaku i zapachu, a zapobiegający nagromadzeniu gorzkich polipeptydów i peptydów [24].

Produkcja serów, w tym dojrzewanie, jest procesem złożonym, często zależnym od zastosowanych kultur starterowych. Kultura starterowa dodawana do mleka, głównie w celu zakwaszenia i właściwego dojrzewania, nadaje finalne i charakterystyczne cechy danemu gatunkowi sera. Podczas dojrzewania sera rozkład białek zachodzi głównie pod wpływem enzymów podpuszczki (np. renniny). Bakterie fermentacji mlekowej po całkowitym przefermentowaniu laktozy zaczynają stopniowo wymierać, a ich wpływ na przemiany białek polega wówczas na działalności uwolnionych po lizie komórek enzymów proteolitycznych. W celu przyspieszenia procesu dojrzewania nie można jednak stosować zwiększonej ilości startera lub dodatkowych zbyt aktywnych kultur bakterii. Więcej bakterii oznacza większą i szybszą produkcję kwasu mlekowego w początkowych etapach wyrobu sera i przekwaszenie masy serowej przed dojrzewaniem. W technologii serowarstwa opracowano metody „osłabiania” kultur bakteryjnych, które zapobiegają tworzeniu nadmiernych ilości kwasu mlekowego przed soleniem i dojrzewaniem sera [4, 15]. Sposobem ograniczającym przeżywalność komórek i zmniejszenie ich aktywności kwaszącej, najłatwiejszym do zastosowania przemysłowego, jest metoda szoku termicznego pod wpływem wysokiej temperatury. Z zastosowaniem termizowanych kultur LAB wiąże się wiele korzyści, jednak nie jest to ciągle metoda szeroko stosowana w produkcji, co może być wynikiem zmiany końcowych cech sensorycznych serów otrzymanych z zastosowaniem dodatkowych kultur bakterii oraz kosztów takiego procesu. Badania dotyczące zastosowania dodatkowych osłabionych termicznie kultur w serowarstwie dotyczyły głównie bakterii ogrzewanych w temp. 50 ÷ 72 °C, najczęściej przez 10 ÷ 20 s. Nieliczne badania z tego zakre-

su dotyczyły dodatkowych kultur bakterii ogrzewanych do 65 °C w ciągu kilku min [14].

Zastosowanie dodatkowych kultur *Lactobacillus* do produkcji sera może wpływać na kontrolę procesu dojrzewania oraz wzrostu spontanicznej flory bakteryjnej tworzonej przez niestarterowe bakterie kwasu mlekowego (NSLAB – *non starter lactic acid bacteria*). [21]. Zastosowanie pałeczek mlekowych z rodzaju *Lactobacillus*, osłabionych poprzez obróbkę termiczną, w produkcji serów podpuszczkowych dojrzewających może być dobrym rozwiązaniem w przyspieszaniu dojrzewania serów z uwagi na ich dużą stabilność biochemiczną (podstawowe cechy tych kultur kodowane są w DNA chromosomalnym) [9] oraz stosunkowo wysoką aktywność peptydazową. Cechy LAB, takie jak: wytwarzanie kwasu, aktywność proteinaz i peptydaz, autoliza, synteza związków hamujących są niezwykle ważne ze względu na możliwość ich zastosowania jako kultur dodatkowych w produkcji serów [3].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu obróbki termicznej wybranych szczepów *Lactobacillus* stosowanych w mleczarstwie na aktywność amino- i dipeptydaz.

### **Materiał i metody badań**

Materiał doświadczalny stanowiły dwie kultury bakterii kwasu mlekowego: *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (FD-DVS LA-5, Chr. Hansen, Dania) oraz *Lactobacillus casei*-431 (F-DVS CRL-431, Chr. Hansen, Dania).

W badaniach zastosowano 6 dipeptydów: Ala-Ala, Leu-Gly, Gly-Leu, Leu-Leu, Gly-Glu, Ala-Leu (Sigma Aldrich, Polska), 4 aminopeptydy: Leu-pNA, Lys-pNA, Ala-pNa i Gly-pNA (Sigma Aldrich, Polska), podłoże mikrobiologiczne: MRS-bulion (Merck, Polska), bufor fosforanowy pH 7,0 (Sigma Aldrich, Polska) oraz odczynniki: ninhydrynę (Sigma Aldrich, Polska), kwas trichlorooctowy – TCA (POCH, Polska), kwas octowy, (POCH, Polska), etanol (POCH, Polska), odczynnik Folina i Ciocalteu'a (POCH, Polska), metanol (POCH, Polska).

Aktywność amino- i dipeptydaz oznaczano według metody opisanej przez El Soda'a i Desmazeaud [8]. W celu określenia aktywności peptydaz przygotowywano hodowlę płynną badanej kultury starterowej. Do 100 ml pożywki MRS-bulion dodawano 2 % danej kultury bakteryjnej. Obróbka termiczna badanych bakterii *Lactobacillus* sp. prowadzona była w temp.: 50, 55, 60, 65, 70, 75 °C przez 1, 15 oraz 25 min. Następnie badane szczepy poddawano dezintegracji ultradźwiękami przy użyciu dezintegratora Sonics, Vibra cell, VCX130 (Sonics & Materials, Inc., USA) w układzie: 30 s puls włączony / 15 s puls wyłączony przez 15 min, z wykorzystaniem amplitudy 90 %. W czasie dezintegracji próbki zanurzone były w mieszaninie etanolu z lodem, aby zapobiec nadmiernemu przegrzaniu. Zdezintegrowaną biomasę rozpuszczano w 0,05 M buforze fosforanowym o pH 7,0 i odwirowywano (10000 g, temp. 4 °C, 25 min). Aktywność amino- i dipeptydaz określano także w próbkach niepoddanych

obróbce termicznej (próba kontrolna). W ekstrakcie enzymatycznym oznaczano również zawartość białka metodą Lowry'ego [16].

Jednostkę aktywności specyficznej definiowano jako zmianę absorbancji o 0,01 w czasie 1 min reakcji enzymatycznej, w przeliczeniu na 1 mg białka, mierzonej przy długości fali  $\lambda = 410$  nm (aminopeptydazy) lub  $\lambda = 570$  nm (dipeptydazy) [8]. Pomiar absorbancji wykonywano przy użyciu spektrofotometru UV-VIS (Genesis 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu komputerowego StatGraphicPlus 4.1. Przeprowadzono jedno- lub wieloczynnikową analizę wariancji. Do zweryfikowania istotności różnic między wartościami średnimi stosowano test Tukeya ( $p = 0,05$ ).

### Wyniki i dyskusja

Aktywność enzymatyczna dipeptydaz *Lb. casei*, rozkładających substraty Ala-Leu, Gly-Leu, Leu-Gly, Leu-Leu, Gly-Glu i Ala-Ala, zawierała się odpowiednio w zakresach [ $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]:  $0 \div 3,65$ ,  $0 \div 2,20$ ,  $0 \div 0,57$ ,  $0 \div 0,71$ ,  $0 \div 1,37$ ,  $0 \div 2,83$  (tab. 1), natomiast aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* względem tych substratów mieściła się odpowiednio w zakresach [ $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]:  $0 \div 2,94$ ,  $0 \div 3,48$ ,  $0,38 \div 2,25$ ,  $0 \div 1,71$ ,  $0 \div 1,81$ ,  $0 \div 10,92$  (tab. 2).

Zakresy aktywności aminopeptydaz kultury *Lb. casei* wobec Ala-pNa, Gly-pNa, Leu-pNa, Lys-pNa wynosiły odpowiednio [ $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]:  $0,39 \div 8,47$ ,  $0,64 \div 6,98$ ,  $1,25 \div 10,62$ ,  $1,38 \div 7,41$  (tab. 3), natomiast w przypadku kultury *Lb. acidophilus* wynosiły odpowiednio [ $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ]:  $0,75 \div 9,96$ ,  $0 \div 4,25$ ,  $0,39 \div 9,23$ ,  $0,15 \div 3,49$  (tab. 4).

Po porównaniu obu badanych kultur bakterii stwierdzono, że aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus*, w porównaniu z *Lb. casei*, była wyższa względem substratów: Ala-Ala, Gly-Leu, Leu-Gly, Gly-Glu oraz Leu-Leu. Jedynie hydroliza dipeptydu Ala-Leu przez *Lb. casei* powodowała wyższą średnią aktywność enzymatyczną w porównaniu z *Lb. acidophilus*. Interesujące jest, że średnia aktywność enzymatyczna *Lb. acidophilus* wobec Ala-Ala przyjmowała najwyższe wartości spośród wszystkich badanych substratów. Z kolei średnia aktywność dipeptydaz *Lb. casei* w porównaniu z aktywnością *Lb. acidophilus* względem Ala-Ala była ponad trzykrotnie mniejsza.

Według danych literaturowych aktywność dipeptydaz wobec substratu Ala-Ala charakteryzuje duża zmienność w zależności od badanego drobnoustroju. Cichosz i wsp. [7] nie stwierdzili aktywności peptydaz syntetyzowanych przez *Lb. acidophilus* względem tego dipeptydu, natomiast enzymy *Lb. casei* i *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* rozkładały go z aktywnością odpowiednio: 1,25 i 1,08  $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Również szczep *Lb. helveticus* SBT 2171 nie wykazywał aktywności wobec Ala-Ala [27]. Magboul i McSweeney [17] podają poziom aktywności enzymatycznej względnej szczepu *Lb. curvatus* DPC 2024 równy 99 %.

Tabela 1. Aktywność dipeptydaz *Lactobacillus casei* ogrzewanych w temp. 50 ÷ 75 °C przez 1, 15 i 25 minTable 1. Dipeptidase activity of *Lactobacillus casei* that were heat-treated at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 min

Substrat Substrate	Czas obróbki termicznej Heat-treatment time [min]	Temperatura / Temperature [°C]						
		K	50	55	60	65	70	75
		Aktywność dipeptydaz / Dipeptidase activity [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> białka] / [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> of protein]						
Ala-Leu	1	1,21 <sup>ab</sup> ± 0,48	2,15 <sup>b</sup> ± 0,69	1,18 <sup>ab</sup> ± 0,79	1,67 <sup>ab</sup> ± 1,28	0,20 <sup>a</sup> ± 0,13	0,74 <sup>ab</sup> ± 0,36	0,80 <sup>ab</sup> ± 0,13
	15	1,21 <sup>c</sup> ± 0,48	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,62 <sup>b</sup> ± 0,44	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	25	1,21 <sup>a</sup> ± 0,48	2,63 <sup>abc</sup> ± 0,65	1,96 <sup>ab</sup> ± 1,03	2,54 <sup>abc</sup> ± 0,80	3,39 <sup>bc</sup> ± 0,26	2,47 <sup>abc</sup> ± 0,03	3,65 <sup>c</sup> ± 0,72
Gly-Leu	1	1,88 <sup>b</sup> ± 1,25	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	15	1,88 <sup>a</sup> ± 1,25	2,20 <sup>a</sup> ± 0,04	1,65 <sup>a</sup> ± 1,37	1,18 <sup>a</sup> ± 0,10	1,59 <sup>a</sup> ± 0,01	1,94 <sup>a</sup> ± 0,43	1,23 <sup>a</sup> ± 0,10
	25	1,88 <sup>b</sup> ± 1,25	0,21 <sup>a</sup> ± 0,14	0,48 <sup>a</sup> ± 0,27	0,20 <sup>a</sup> ± 0,13	0,39 <sup>a</sup> ± 0,35	0,91 <sup>ab</sup> ± 0,32	0,76 <sup>ab</sup> ± 0,30
Leu-Gly	1	0,01 <sup>a</sup> ± 0,006	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	15	0,01 <sup>a</sup> ± 0,006	0,28 <sup>a</sup> ± 0,22	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,23 <sup>a</sup> ± 0,20	0,38 <sup>a</sup> ± 0,34	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,57 <sup>a</sup> ± 0,56
	25	0,01 <sup>a</sup> ± 0,006	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
Leu-Leu	1	0,47 <sup>a</sup> ± 0,44	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	15	0,47 <sup>a</sup> ± 0,44	0,18 <sup>a</sup> ± 0,11	0,43 <sup>a</sup> ± 0,40	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,04 <sup>a</sup> ± 0,04	0,71 <sup>a</sup> ± 0,62
	25	0,47 <sup>a</sup> ± 0,44	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
Gly-Glu	1	0,60 <sup>a</sup> ± 0,58	1,37 <sup>a</sup> ± 0,14	1,01 <sup>a</sup> ± 0,03	0,94 <sup>a</sup> ± 0,26	1,33 <sup>a</sup> ± 1,19	0,55 <sup>a</sup> ± 0,15	0,53 <sup>a</sup> ± 0,19
	15	0,60 <sup>ab</sup> ± 0,58	0,99 <sup>b</sup> ± 0,37	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	1,22 <sup>b</sup> ± 0,63	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,12 <sup>a</sup> ± 0,11
	25	0,60 <sup>b</sup> ± 0,58	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
Ala-Ala	1	2,83 <sup>b</sup> ± 0,90	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	15	2,83 <sup>b</sup> ± 0,90	2,43 <sup>b</sup> ± 0,37	0,99 <sup>a</sup> ± 0,28	2,02 <sup>ab</sup> ± 0,15	2,31 <sup>b</sup> ± 0,10	2,40 <sup>b</sup> ± 0,36	2,22 <sup>b</sup> ± 0,57
	25	2,83 <sup>b</sup> ± 0,90	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00

Objaśnienia: / Explanatory notes:

K – próbka nieogrzewana (kontrolna) / non-heated sample (control); n = 5;

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations.

Wartości średnie oznaczone różnymi literami w wierszu różnią się statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ) / Mean values in rows and denoted by different letters are statistically significantly different ( $p < 0.05$ ).

Tabela 2. Aktywność dipeptydaz *Lactobacillus acidophilus* ogrzewanych w temp. 50 ÷ 75 °C przez 1, 15 i 25 min

Table 2. Dipeptidase activity of *Lactobacillus acidophilus* that were heat-treated at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 min

Substrat Substrate	Czas obróbki termicznej Heat-treatment time [min]	Temperatura / Temperature [°C]						
		K	50	55	60	65	70	75
		Aktywność dipeptydaz / Dipeptidase activity [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> białka] / [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> of protein]						
Ala-Leu	1	1,66 <sup>c</sup> ± 0,52	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,59 <sup>abc</sup> ± 0,57	0,62 <sup>abc</sup> ± 0,58	0,41 <sup>ab</sup> ± 0,13	0,37 <sup>ab</sup> ± 0,12	1,22 <sup>bc</sup> ± 0,83
	15	1,66 <sup>b</sup> ± 0,52	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	25	1,66 <sup>bcd</sup> ± 0,52	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,99 <sup>ab</sup> ± 0,83	2,33 <sup>de</sup> ± 0,03	1,18 <sup>bc</sup> ± 0,14	2,20 <sup>cde</sup> ± 0,61	2,94 <sup>e</sup> ± 0,41
Gly-Leu	1	1,42 <sup>ab</sup> ± 0,91	0,70 <sup>a</sup> ± 0,26	2,09 <sup>b</sup> ± 0,18	2,08 <sup>b</sup> ± 0,05	1,93 <sup>b</sup> ± 0,24	2,03 <sup>b</sup> ± 0,33	2,38 <sup>b</sup> ± 0,38
	15	1,42 <sup>b</sup> ± 0,91	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	25	1,42 <sup>ab</sup> ± 0,91	3,48 <sup>b</sup> ± 1,35	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,58 <sup>ab</sup> ± 0,01	0,26 <sup>a</sup> ± 0,20	0,46 <sup>ab</sup> ± 0,36	1,38 <sup>ab</sup> ± 0,01
Leu-Gly	1	0,85 <sup>ab</sup> ± 0,01	1,78 <sup>c</sup> ± 0,03	1,15 <sup>bc</sup> ± 0,67	0,89 <sup>ab</sup> ± 0,13	0,38 <sup>a</sup> ± 0,31	0,93 <sup>ab</sup> ± 0,24	0,83 <sup>ab</sup> ± 0,15
	15	0,85 <sup>a</sup> ± 0,01	1,13 <sup>a</sup> ± 0,13	0,64 <sup>a</sup> ± 0,19	0,69 <sup>a</sup> ± 0,20	0,66 <sup>a</sup> ± 0,65	1,24 <sup>a</sup> ± 0,20	0,77 <sup>a</sup> ± 0,68
	25	0,85 <sup>a</sup> ± 0,01	0,62 <sup>a</sup> ± 0,61	1,05 <sup>a</sup> ± 0,19	1,33 <sup>ab</sup> ± 0,19	2,25 <sup>b</sup> ± 0,62	0,91 <sup>a</sup> ± 0,38	1,53 <sup>ab</sup> ± 0,36
Leu-Leu	1	0,39 <sup>b</sup> ± 0,23	0,14 <sup>ab</sup> ± 0,13	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,01 <sup>a</sup> ± 0,01	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,05 <sup>a</sup> ± 0,04	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	15	0,39 <sup>b</sup> ± 0,23	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
	25	0,39 <sup>a</sup> ± 0,23	1,55 <sup>b</sup> ± 0,40	1,31 <sup>b</sup> ± 0,45	1,71 <sup>b</sup> ± 0,44	1,15 <sup>ab</sup> ± 0,05	1,15 <sup>ab</sup> ± 0,48	1,60 <sup>b</sup> ± 0,24
Gly-Glu	1	0,47 <sup>a</sup> ± 0,15	0,32 <sup>a</sup> ± 0,27	0,53 <sup>a</sup> ± 0,20	1,81 <sup>a</sup> ± 1,51	1,36 <sup>a</sup> ± 1,14	0,78 <sup>a</sup> ± 0,01	0,98 <sup>a</sup> ± 0,17
	15	0,47 <sup>ab</sup> ± 0,15	0,86 <sup>ab</sup> ± 0,22	0,94 <sup>b</sup> ± 0,44	0,64 <sup>ab</sup> ± 0,05	0,59 <sup>ab</sup> ± 0,58	0,38 <sup>ab</sup> ± 0,02	0,15 <sup>a</sup> ± 0,12
	25	0,47 <sup>b</sup> ± 0,15	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
Ala-Ala	1	1,23 <sup>bc</sup> ± 0,27	0,91 <sup>b</sup> ± 0,11	1,02 <sup>b</sup> ± 0,18	0,24 <sup>a</sup> ± 0,23	1,68 <sup>c</sup> ± 0,16	1,05 <sup>b</sup> ± 0,46	0,97 <sup>b</sup> ± 0,28
	15	1,23 <sup>a</sup> ± 0,27	4,78 <sup>ab</sup> ± 1,51	10,92 <sup>c</sup> ± 1,87	10,58 <sup>c</sup> ± 0,15	10,33 <sup>c</sup> ± 0,93	8,69 <sup>bc</sup> ± 1,86	9,72 <sup>bc</sup> ± 0,83
	25	1,23 <sup>a</sup> ± 0,27	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,18 <sup>a</sup> ± 0,16	1,41 <sup>a</sup> ± 0,63	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00	0,13 <sup>a</sup> ± 0,12	0,19 <sup>a</sup> ± 0,13

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Tabela 3. Aktywność aminopeptydaz *Lactobacillus casei* ogrzewanych w temp. 50 ÷ 75 °C przez 1, 15 i 25 minTable 3. Aminopeptidase activity of *Lactobacillus casei* that were heat-treated at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 min

Substrat Substrate	Czas obróbki termicznej Heat-treatment time [min]	Temperatura / Temperature [°C]						
		K	50	55	60	65	70	75
		Aktywność aminopeptydaz / Aminopeptidase activity [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> białka] / [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> of protein]						
Ala-pNa	1	2,45 <sup>a</sup> ± 0,26	2,42 <sup>a</sup> ± 0,16	2,69 <sup>ab</sup> ± 0,07	2,67 <sup>ab</sup> ± 0,01	2,91 <sup>b</sup> ± 0,27	2,73 <sup>ab</sup> ± 0,12	2,81 <sup>ab</sup> ± 0,16
	15	2,45 <sup>a</sup> ± 0,26	8,13 <sup>cd</sup> ± 0,19	8,47 <sup>d</sup> ± 1,22	7,46 <sup>cd</sup> ± 0,08	5,72 <sup>bcd</sup> ± 0,05	4,51 <sup>ab</sup> ± 0,12	5,33 <sup>bc</sup> ± 1,03
	25	2,45 <sup>ab</sup> ± 0,26	2,77 <sup>ab</sup> ± 0,24	3,68 <sup>ab</sup> ± 0,45	2,19 <sup>ab</sup> ± 0,73	5,22 <sup>b</sup> ± 1,12	0,39 <sup>a</sup> ± 0,13	0,39 <sup>a</sup> ± 0,14
Gly-pNa	1	5,49 <sup>c</sup> ± 0,32	2,92 <sup>a</sup> ± 0,16	3,17 <sup>a</sup> ± 0,51	3,36 <sup>a</sup> ± 0,14	4,23 <sup>b</sup> ± 0,07	3,52 <sup>a</sup> ± 0,13	4,16 <sup>b</sup> ± 0,27
	15	5,49 <sup>c</sup> ± 0,32	5,42 <sup>c</sup> ± 0,30	6,89 <sup>d</sup> ± 0,08	6,98 <sup>d</sup> ± 0,28	3,86 <sup>b</sup> ± 0,14	3,36 <sup>b</sup> ± 0,24	1,11 <sup>a</sup> ± 0,19
	25	5,49 <sup>b</sup> ± 0,32	6,40 <sup>b</sup> ± 1,66	3,52 <sup>ab</sup> ± 0,08	3,01 <sup>ab</sup> ± 0,55	3,89 <sup>ab</sup> ± 1,08	0,74 <sup>a</sup> ± 0,21	0,64 <sup>a</sup> ± 0,07
Leu-pNa	1	5,54 <sup>c</sup> ± 0,26	1,78 <sup>ab</sup> ± 0,67	3,26 <sup>b</sup> ± 0,15	1,28 <sup>ab</sup> ± 0,22	1,36 <sup>ab</sup> ± 0,03	1,67 <sup>ab</sup> ± 0,10	1,25 <sup>a</sup> ± 0,09
	15	5,54 <sup>bc</sup> ± 0,26	5,79 <sup>bcd</sup> ± 0,29	6,79 <sup>d</sup> ± 0,32	6,68 <sup>cd</sup> ± 0,77	6,07 <sup>cd</sup> ± 0,25	4,87 <sup>b</sup> ± 0,86	1,49 <sup>a</sup> ± 0,33
	25	5,54 <sup>b</sup> ± 0,26	3,77 <sup>ab</sup> ± 0,30	4,78 <sup>b</sup> ± 0,85	10,62 <sup>c</sup> ± 1,28	3,88 <sup>ab</sup> ± 1,29	2,20 <sup>a</sup> ± 0,32	1,48 <sup>a</sup> ± 0,48
Lys-pNa	1	4,96 <sup>ab</sup> ± 1,09	4,41 <sup>ab</sup> ± 0,24	7,41 <sup>b</sup> ± 1,28	3,55 <sup>a</sup> ± 0,13	3,37 <sup>a</sup> ± 0,28	3,37 <sup>a</sup> ± 0,13	3,45 <sup>a</sup> ± 0,51
	15	4,96 <sup>c</sup> ± 1,09	5,26 <sup>c</sup> ± 0,07	5,76 <sup>c</sup> ± 0,22	5,75 <sup>c</sup> ± 0,40	3,91 <sup>b</sup> ± 0,08	3,44 <sup>b</sup> ± 0,03	1,38 <sup>a</sup> ± 0,05
	25	4,96 <sup>c</sup> ± 1,09	3,17 <sup>b</sup> ± 0,06	2,62 <sup>ab</sup> ± 0,13	2,23 <sup>ab</sup> ± 0,12	2,09 <sup>a</sup> ± 0,22	1,66 <sup>a</sup> ± 0,14	1,64 <sup>a</sup> ± 0,17

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Stwierdzono różnice pod względem stopnia hydrolizy Leu-Gly przez peptydazy badanych kultur bakterii. *Lb. acidophilus* rozkładał Leu-Gly ze średnią aktywnością 1,02 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> w całym zakresie temperatury, natomiast *Lb. casei* wykazywał tylko minimalną aktywność równą 0,07 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> względem tego substratu. Aktywność dipeptydaz względem Leu-Gly, podawana w literaturze przedmiotu, jest stosunkowo wysoka, co jest rozbieżne z wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy. Cichosz i wsp. [7] podają, że aktywność enzymatyczna szczepów *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* oraz *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* wobec Leu-Gly wynosiła odpowiednio: 4,42, 6,12 oraz 3,02 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>. Z kolei *Lb. curvatus* rozkładał ten dipeptyd z aktywnością względną równą 62 % [17]. Również peptydazy *Lb. helveticus* SBT2171 wykazywały aktywność względem tego dipeptydu [27].

Tabela 4. Aktywność aminopeptydaz *Lactobacillus acidophilus* ogrzewanych w temp. 50 - 75 °C przez 1, 15 i 25 minTable 4. Aminopeptidase activity of *Lactobacillus acidophilus* that were heat-treated at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 min

Substrat Substrate	Czas obróbki termicznej Heat-treatment time [min]	Temperatura / Temperature [°C]						
		K	50	55	60	65	70	75
		Aktywność aminopeptydaz / Aminopeptidase activity [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> białka] / [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> of protein]						
Ala-pNa	1	5,32 <sup>a</sup> ± 0,34	6,01 <sup>a</sup> ± 0,63	5,79 <sup>a</sup> ± 0,13	5,41 <sup>a</sup> ± 0,06	5,37 <sup>a</sup> ± 0,28	5,25 <sup>a</sup> ± 0,18	5,99 <sup>a</sup> ± 0,31
	15	5,32 <sup>c</sup> ± 0,34	0,94 <sup>ab</sup> ± 0,22	4,21 <sup>bc</sup> ± 1,61	0,87 <sup>ab</sup> ± 0,54	1,18 <sup>ab</sup> ± 0,04	1,19 <sup>ab</sup> ± 0,94	0,75 <sup>a</sup> ± 0,67
	25	5,32 <sup>a</sup> ± 0,34	7,20 <sup>b</sup> ± 0,30	9,96 <sup>c</sup> ± 1,07	5,44 <sup>a</sup> ± 0,14	8,02 <sup>c</sup> ± 1,56	4,25 <sup>a</sup> ± 0,12	4,37 <sup>a</sup> ± 0,46
Gly-pNa	1	2,26 <sup>b</sup> ± 0,27	2,07 <sup>ab</sup> ± 0,37	2,19 <sup>b</sup> ± 0,42	0,69 <sup>a</sup> ± 0,18	2,34 <sup>b</sup> ± 0,65	1,99 <sup>ab</sup> ± 0,15	2,24 <sup>b</sup> ± 0,35
	15	2,26 <sup>a</sup> ± 0,27	3,14 <sup>a</sup> ± 1,01	2,92 <sup>a</sup> ± 0,23	2,73 <sup>a</sup> ± 0,38	2,22 <sup>a</sup> ± 0,29	4,25 <sup>a</sup> ± 1,28	1,61 <sup>a</sup> ± 0,13
	25	2,26 <sup>b</sup> ± 0,27	1,17 <sup>ab</sup> ± 0,38	0,24 <sup>a</sup> ± 0,16	0,75 <sup>a</sup> ± 0,43	0,91 <sup>a</sup> ± 0,59	0,23 <sup>a</sup> ± 0,11	0,00 <sup>a</sup> ± 0,00
Leu-pNa	1	5,33 <sup>b</sup> ± 1,25	0,48 <sup>a</sup> ± 0,01	0,47 <sup>a</sup> ± 0,01	0,39 <sup>a</sup> ± 0,01	0,46 <sup>a</sup> ± 0,02	0,44 <sup>a</sup> ± 0,01	0,54 <sup>a</sup> ± 0,07
	15	5,33 <sup>a</sup> ± 1,25	3,48 <sup>a</sup> ± 0,11	4,76 <sup>a</sup> ± 0,34	4,92 <sup>a</sup> ± 0,75	4,07 <sup>a</sup> ± 0,70	4,34 <sup>a</sup> ± 0,57	4,88 <sup>a</sup> ± 0,32
	25	5,33 <sup>a</sup> ± 1,25	9,23 <sup>b</sup> ± 2,77	6,83 <sup>ab</sup> ± 0,78	6,30 <sup>a</sup> ± 0,85	4,97 <sup>a</sup> ± 0,06	4,89 <sup>a</sup> ± 0,04	4,82 <sup>a</sup> ± 0,36
Lys-pNa	1	2,98 <sup>b</sup> ± 1,14	0,25 <sup>a</sup> ± 0,02	0,24 <sup>a</sup> ± 0,01	0,15 <sup>a</sup> ± 0,01	0,19 <sup>a</sup> ± 0,02	0,21 <sup>a</sup> ± 0,01	0,20 <sup>a</sup> ± 0,02
	15	2,98 <sup>b</sup> ± 1,14	1,30 <sup>a</sup> ± 0,26	2,28 <sup>ab</sup> ± 0,25	2,75 <sup>ab</sup> ± 0,95	2,42 <sup>ab</sup> ± 0,18	2,90 <sup>b</sup> ± 0,77	2,22 <sup>ab</sup> ± 0,54
	25	2,98 <sup>bc</sup> ± 1,14	3,49 <sup>c</sup> ± 0,24	2,93 <sup>bc</sup> ± 0,25	3,28 <sup>c</sup> ± 1,73	1,77 <sup>abc</sup> ± 0,68	1,24 <sup>ab</sup> ± 0,31	0,85 <sup>a</sup> ± 0,02

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Seo i wsp. [23] stwierdzili, że dipeptydaza pochodząca z *B. longum* BORI po ogrzewaniu w temp. 80 °C przez 10 min utrzymała 60 % aktywności wyjściowej. Garbowska i wsp. [11] określili, że peptydazy ogrzewanej kultury CHN-19 wykazywały zdolność hydrolizy wszystkich badanych dipeptydów. Peptydazy te charakteryzowała największa aktywność wobec dipeptydów zawierających aminokwasy hydrofobowe (leucyna, fenyloalanina), których obecność często stwierdzana była w gorzkich peptydach. Specyficzność ta może być korzystna w zastosowaniu takiego startera do produkcji serów podpuszczkowych, jako prekursora w rozkładzie gorzkich peptydów i kształtowaniu właściwego smaku. Poddana obróbce cieplnej (50 ÷ 80 °C, 15 s, 10



i 30 min) kultura bakterii mlekowych (CHN-19) w dużym stopniu zachowywała aktywność peptydolityczną.

Aktywność aminopeptydaz badanych kultur bakterii względem Ala-pNa i Leu-pNa była bardzo zbliżona. Zaobserwowano natomiast różnice aktywności peptydaz w stosunku do pozostałych badanych substratów. Zarówno względem Gly-pNa, jak i Lys-pNa, określono dwukrotnie wyższą aktywność peptydaz *Lb. casei*, która wynosiła odpowiednio: 3,98 i 4,06 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> w całym zakresie badanej temperatury w porównaniu z aktywnością peptydaz syntetyzowanych przez *Lb. acidophilus* (1,79 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> w przypadku obu substratów). Aguirre i wsp. [1] stwierdzili najwyższą aktywność aminopeptydaz szczepów LAB (*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* CRL 207, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581, *Lb. helveticus* CRL 1062, *Lb. reuteri* CRL 1099) względem substratów zawierających na N-końcu łańcucha leucynę i lizynę. Requena i wsp. [19] podają, że w przypadku *Lb. casei* ssp. *casei* IFPL 731 aktywność aminopeptydaz względem Leu-pNa była trzykrotnie wyższa niż wobec Lys-pNa i blisko sześciokrotnie wyższa niż w przypadku Ala-pNa. Peptydazy bakterii *Lb. helveticus* CNRZ 32, *Lb. helveticus* ATCC 10797 oraz *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 12278 były zdolne do hydrolizy Ala-pNa, Leu-pNa oraz Lys-pNa, natomiast Gly-pNa rozkładany był przez te bakterie w znacznie mniejszym stopniu [13].

Najwyższą aktywność amino- i dipeptydaz syntetyzowanych przez *Lb. casei* stwierdzono po obróbce cieplej bakterii przez 15 min. Podobnie najwyższą aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* określono po zastosowaniu 15-minutowej obróbki cieplej. Z kolei średnia aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* wzrastała wraz z wydłużaniem czasu obróbki termicznej. Najwyższe wartości uzyskano po ogrzewaniu bakterii przez 25 min. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że enzymy syntetyzowane przez *Lb. acidophilus*, odpowiedzialne za rozkład dipeptydów, wykazują wyższą aktywność po działaniu wysoką temperaturą w porównaniu z *Lb. casei*. Oceniając wpływ czasu obróbki termicznej na aktywność peptydolityczną badanych kultur *Lactobacillus* wykazano statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ) różnice odnoszące się jedynie do aktywności aminopeptydaz. W przypadku *Lb. casei* wyższą średnią aktywność aminopeptydaz oznaczono po ogrzewaniu kultury przez 15 min, a niższą – po obróbce termicznej przez 1 i 25 min. Z kolei aminopeptydazy syntetyzowane przez *Lb. acidophilus* wykazywały wyższą średnią aktywność po ogrzewaniu przez 25 min, a najniższą – po 1 min. Czas obróbki termicznej nie wpływał różnicująco na aktywność dipeptydaz badanych kultur bakterii.

Najwyższą aktywność dipeptydaz *Lb. casei* w temperaturze optymalnej (czyli w temperaturze obróbki termicznej badanych kultur bakterii, po zastosowaniu której dipeptydazy wykazywały maksymalną aktywność enzymatyczną względem danego substratu) wykazywały enzymy hydrolizujące Ala-Leu (3,65 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>), natomiast najmniejszą – Leu-Gly (0,57 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>). Natomiast dipeptydazy *Lb. acidophilus*

z wysoką aktywnością rozkładały Ala-Ala ( $10,92 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), a z najniższą – Leu-Leu ( $1,71 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Substraty zawierające w składzie resztę alaniny, takie jak Ala-Leu i Ala-Ala, wykorzystywane były efektywnie przez obie badane kultury bakterii (aktywność odpowiednio:  $3,65$  i  $2,83 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  – *Lb. casei* oraz  $2,94$  i  $10,92 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  – *Lb. acidophilus*). Wysoką aktywność wykazywały peptydazy syntetyzowane przez *Lb. casei* i *Lb. acidophilus* wobec Gly-Leu (odpowiednio:  $2,20$  i  $3,48 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Gdy na N-końcu substratu znajdowała się reszta aminokwasu alifatycznego – leucyny, dipeptydy takie, jak Leu-Gly i Leu-Leu hydrolizowane były z najniższą aktywnością, odpowiednio:  $0,57$  i  $0,71 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  w przypadku *Lb. casei* oraz  $2,25$  i  $1,71 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  w przypadku *Lb. acidophilus*. Jednocześnie stwierdzono, że aktywność peptydaz badanych kultur bakterii względem Leu-Gly była mniejsza niż wobec Gly-Leu. Porównywalną aktywność dipeptydaz *Lb. casei* ( $1,37 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) i *Lb. acidophilus* ( $1,81 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) stwierdzono w stosunku do jednego dipeptydu zawierającego resztę o kwasowym charakterze (Gly-Glu) – tab. 5.

Tabela 5. Aktywność dipeptydaz badanych bakterii *Lactobacillus* w temperaturze optymalnej dla hydrolizy danego substratu

Table 5. Dipeptidase activity of examined *Lactobacillus* bacteria at temperature optimal for hydrolysis of given substrate

Substrat Substrate	Maksymalna aktywność enzymatyczna [ $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka] Maximum enzymatic activity [ $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ of protein]	
	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
Ala-Leu	3,65 (75 °C/25 min)	2,94 (75 °C/25 min)
Gly-Leu	2,20 (50 °C/15 min)	3,48 (50 °C/25 min)
Leu-Leu	0,71 (75 °C/15 min)	1,71 (60 °C/25 min)
Gly-Glu	1,37 (50 °C/1 min)	1,81 (60 °C/1 min)
Leu-Gly	0,57 (75 °C/15 min)	2,25 (65 °C/25 min)
Ala-Ala	2,83 (kontrolna/control)	10,92 (55 °C/15 min)

Najwyższą aktywność aminopeptydaz *Lb. casei* w temperaturze optymalnej stwierdzono względem substratu Leu-pNa ( $10,62 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), natomiast w przypadku peptydaz *Lb. acidophilus* wobec Ala-pNa ( $9,96 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Stosunkowo niewielką aktywność aminopeptydaz szczepów *Lactobacillus* oznaczono wobec Gly-pNa ( $6,98 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  – *Lb. casei* i  $4,25 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  – *Lb. acidophilus*). Aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* i *Lb. casei* względem jednego substratu zawierającego aminokwas polarny (Lys-pNa) wynosiła odpowiednio:  $3,49$  i  $7,41 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  – tab. 6.

Tabela 6. Aktywność aminopeptydaz badanych bakterii *Lactobacillus* w temperaturze optymalnej dla hydrolizy danego substratuTable 6. Aminopeptidase activity of examined *Lactobacillus* bacteria at temperature optimal for hydrolysis of given substrate

Substrat Substrate	Maksymalna aktywność enzymatyczna [U·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> białka] Maximum enzymatic activity [U min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> of protein]	
	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
Ala-pNa	8,47 (55 °C/15 min)	9,96 (55 °C/25 min)
Gly-pNa	6,98 (60 °C/15 min)	4,25 (70 °C/15 min)
Leu-pNa	10,62 (60 °C/25 min)	9,23 (50 °C/25 min)
Lys-pNa	7,41 (55 °C/1 min)	3,49 (50 °C/25 min)

W badaniach bakterii wyizolowanych z tradycyjnego hiszpańskiego sera Genestoso wykazano, że aktywność peptydolityczna w znacznym stopniu zależy od szczepu badanego drobnoustroju [12]. Autorzy podają, że występuje szeroka zmienność aktywności, zarówno wśród ziarniaków, jak i pałeczek mlekowych. Określili wysoką specyficzną badanych bakterii względem substratu Leu-Leu, a niską wobec Leu-Gly. Jednocześnie najwyższe wartości aktywności aminopeptydaz stwierdzili w stosunku do Leu-pNa, a niewielkie – wobec Ala-pNa. W niniejszej pracy również stwierdzono nieznaczną aktywność dipeptydaz względem Leu-Gly, ale, w przeciwieństwie do badań przedstawionych przez Gonzáleza i wsp. [12], wykazano stosunkowo niską aktywność enzymów badanych kultur bakterii względem Leu-Leu oraz Ala-pNa.

W badaniach własnych wykazano, że w przypadku aktywności dipeptydaz *Lb. casei* czynnikiem statystycznie istotnym ( $p < 0,05$ ) był rodzaj użytego substratu. Określono, że spośród wszystkich badanych substratów najniższą aktywność wykazywały peptydazy w stosunku do Leu-Gly i Leu-Leu (odpowiednio: 0,07 i 0,13 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>), natomiast największą – wobec Ala-Leu (1,32 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>). Również w przypadku peptydaz *Lb. acidophilus* wykazano różnice statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ), a największą aktywność dipeptydaz określono względem dipeptydu Ala-Ala (3,17 U·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>).

W ocenie statystycznej dotyczącej aminopeptydów jako substratów nie wykazano różnic statystycznie istotnych w zakresie hydrolizy i wpływu na aktywność enzymatyczną *Lb. casei*. Z kolei w przypadku aktywności aminopeptydaz *Lb. acidophilus* określono, że czynnikiem statystycznie istotnym ( $p < 0,05$ ) był rodzaj substratu. Największą aktywność wykazywały enzymy względem Ala-pNa oraz Leu-pNa, natomiast mniejszą – wobec Lys-pNa i Gly-pNa. W przypadku aminopeptydaz syntetyzowanych przez *Lb. casei*, w odróżnieniu od syntetyzowanych przez *Lb. acidophilus*, wyższą średnią aktywność określono wobec Leu-pNa, Lys-pNa i Gly-pNa. Jedynie względem Ala-pNa stwierdzono większą aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus*.

Najwyższą średnią aktywnością charakteryzowały się dipeptydazy *Lb. acidophilus* ( $1,17 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), co stanowi wartość prawie dwukrotnie wyższą w porównaniu z aktywnością dipeptydaz *Lb. casei*, która wynosiła  $0,64 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Natomiast wyższą średnią aktywność aminopeptydaz wykazywały peptydazy *Lb. casei* ( $4,05 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) w porównaniu z *Lb. acidophilus* ( $3,05 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

Otrzymane wyniki wskazują na podobną specyficzność substratową enzymów badanych kultur bakterii mlekowych. Obie kultury wykazywały jednak różną aktywność zarówno di-, jak i aminopeptydaz po działaniu na nie czynnikiem stresowym, jakim była temperatura i czas jej działania.

W niniejszej pracy wykazano, że ogrzewane szczepy *Lactobacillus* w znacznym stopniu zachowywały aktywność peptydaz, co może pozytywnie wpływać na proces koagulacji mleka i zapobiegać powstawaniu smaku gorzkiego w serach. Aktywność peptydolityczna badanych bakterii wskazuje na możliwość ich zastosowania jako dodatkowych kultur starterowych. Jest to ważne we wczesnych etapach produkcji sera, w czasie kształtowania się jego charakterystycznego smaku.

## Wnioski

1. Badane kultury *Lactobacillus* syntetyzowały peptydazy o podobnej specyficzności substratowej, ale ze zróżnicowaną aktywnością.
2. *Lb. casei* wykazywał największą specyficzność względem substratów: Ala-Leu, Ala-Ala, Gly-Leu, natomiast *Lb. acidophilus* – względem Ala-Ala oraz Ala-pNa.
3. Najwyższą aktywność specyficzną dipeptydaz *Lb. casei* stwierdzono względem substratu Ala-Leu w próbkach ogrzewanych w temp.  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 25 min ( $3,65 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). W przypadku *Lb. acidophilus* najwyższą aktywność dipeptydaz ( $10,92 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) stwierdzono wobec Ala-Ala w próbce ogrzewanej w temp.  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 15 min. W przypadku aminopeptydaz najwyższą aktywność *Lb. casei* ( $10,62 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) stwierdzono względem Leu-pNa w próbce ogrzewanej w temp.  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 25 min. Najwyższa aktywność aminopeptydaz *Lb. acidophilus* wynosiła  $9,96 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  wobec Ala-pNa, w próbce ogrzewanej w temp.  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 25 min.
4. Najwyższą aktywność dipeptydaz *Lb. casei* określono w próbkach kontrolnych (niepoddanych obróbce termicznej), natomiast w przypadku aminopeptydaz równie wysoką aktywność enzymatyczną, jak w próbkach kontrolnych, stwierdzono w próbkach ogrzewanych w temp.  $50$ ,  $55$  i  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Najwyższą aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* uzyskano w próbkach ogrzewanych w temp.  $60$  i  $75 \text{ }^\circ\text{C}$ , a wśród aminopeptydaz w próbce kontrolnej i poddanej obróbce termicznej – w  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ .

5. Średnia aktywność dipeptydaz *Lb. acidophilus* była wyższa o 45 % od aktywności tych enzymów kultury *Lb. casei*. Z kolei wyższą o 25 % aktywnością aminopeptydaz charakteryzował się *Lb. casei*.
6. Wykazano, że wydłużenie czasu obróbki termicznej wpływa istotnie ( $p < 0,05$ ) na wzrost aktywności aminopeptydaz badanych kultur pałeczek mlekowych.

*Niniejsza praca była finansowana w ramach tematu statutowego Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego nr 500-01-GM-01.*

### Literatura

- [1] Aguirre L., Hebert E.M., Garro M.S., Savoy de Giori G.: Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains on soybean proteins. *LWT – Food Sci. Technol.*, 2014, **59**, 780-785.
- [2] Beganović J., Kos B., Pavunc A.L., Uroić K., Džidara P., Šušković J.: Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*, 2013, **20**, 58-64.
- [3] Bozoudi D., Kotzamanidis Ch., Hatzikamari M., Tzanetakis N., Menexes G., Litopoulou-Tzanetaki E.: A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. *Int. J. Food Microbiol.*, 2015, **200**, 87-96.
- [4] Broadbent J.R., Barnes M., Brennand C., Strickland M., Houck K., Johnson M.E., Steele J.L.: Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 1778-1785.
- [5] Chen Y.S., Christensen J.E., Strickland M., Steele J.L.: Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 1276-1282.
- [6] Christensen J.E., Steele J.L.: Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. Bacteriol.*, 2003, **185**, 3297-3306
- [7] Cichosz G., Kornacki M., Giczewska M., Konopka A.: Aktywność peptydazowa wybranych szczepów *Lactobacillus*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2006, **46**, 66-74.
- [8] El Soda M., Desmazeaud M.J.: Les peptides hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*. I. Mise en évidence de ces activités chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.*, 1982, **28**, 1181.
- [9] El-Soda M.: The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1993, **12**, 239-252.
- [10] Garbowska M., Pluta A.: Metody przyspieszania dojrzewania serów. *ZPPNR*, 2014, **578**, 27-38.
- [11] Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A.: Dipeptidase activity and growth of heat-treated commercial dairy starter culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, **175**, 2602-2615.
- [12] González L., Sacristán N., Arenas R., Fresno J.M., Tornadizo M.E.: Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from traditional Spanish cheese. *Food Microbiol.*, 2010, **27**, 592-597.
- [13] 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.
- [14] Klein N., Lortal S.: Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening – a review. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 751-762.

- [15] Law B.A.: Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for New technology. *Int. Dairy J.*, 2001, **11**, 383-398.
- [16] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.
- [17] Magboul A.A., McSweeney P.L.H.: Purification and characterization of a aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 107-116.
- [18] O'Sullivan O., O'Callaghan J., Sangrador-Vegas A., McAuliffe O., Slattery L., Kaleta P., Callanan M., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Beresford T.: Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol.*, 2009, **9** (50), 1-9.
- [19] Requena T., Pelaez C., Fox P.F.: Peptidase and proteinase activity of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Z. Lebensm. Unters. For.*, 1993, **196**, 351-355.
- [20] Rodriguez J., Requena T., Goudéranche H., Maubois J.L., Juárez M.: Accelerated ripening of reduced fat semi-hard cheese from a mixture of cow's, goat's and ewe's ultrafiltrated milk by using a Lac-Prt-strain of lactococci. *Le Lait*, 1996, **76**, 513-522.
- [21] Ruysen T., Janssens M., van Gasse B., van Laere D., van der Eecken N., De Meerleer M., Vermeiren L., van Hoorde K., Martins J.C., Uyttendaele M., De Vuyst L.: Characterisation of Gouda cheeses based on sensory, analytical and high-field 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy determinations: Effect of adjunct cultures and brine composition on sodium-reduced Gouda cheese. *Int. Dairy J.*, **33**, 2013, 142-152.
- [22] Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P.: Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **71**, 394-406.
- [23] Seo J.M., Ji G.E., Cho S.H., Park M.S., Lee H.J.: Characterization of a *Bifidobacterium longum* BORI dipeptidase belonging to the U34 family. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 5598-5606.
- [24] Smit G., Smit B.A., Engels W.J.M.: Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, **29**, 591-610.
- [25] Smukowski M., Wendorff W.L., Ping Y., Rao R.D.: Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 364.
- [26] Sridhar V.R., Hughes J.E., Welker D.L., Broadbent J.R., Steele J.L.: Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl. Environ. Microb.*, 2005, **71**, 3025-3032.
- [27] Tan P.S.T., Sasaki M., Bosman B.W., Iwaszki T.: Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* SBT2171. *Appl. Environ. Microb.*, 1995, **61**, 3430-3435.

## PEPTIDASE ACTIVITY OF SELECTED HEAT-TREATED *LACTOBACILLUS* STRAINS

### S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the amino- and dipeptidase activity of selected lactic acid bacteria cultures (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*) subjected to heat-treatment at temperatures ranging between 50 and 75 °C for 1, 15, and 25 minutes. The analyzed *Lactobacillus* cultures synthesized peptidases that had a similar substrate specificity but different activities. They showed a higher activity of aminopeptidases compared to the activity of dipeptidases. The mean dipeptidase activity of *Lb. acidophilus* was 45% higher than that of *Lb. casei*. The *Lb. casei* strain was characterized by a 25% higher activity of aminopeptidases. This strain exhibited the highest specificity to the Ala-Leu, Ala-Ala, and Gly-Leu substrates, whereas the *Lb. acidophilus* strain – to the Ala-Ala and Ala-pNA substrates. The highest activity of the amino- and dipeptidases of *Lb. casei* and of the dipeptidases of *Lb. acidophilus* was reported after the bacteria were heat-treated for 15 min. As for the amino- and dipeptidases of *Lb. casei*, their activity was, respectively: 5, 10, and 0.83 U/min/mg, and as for the dipeptidases of

*Lb. acidophilus*, it was 1.66 U/min/mg. The mean aminopeptidase activity of *Lb. acidophilus* increased along with the increasing heat-treatment time; its highest values were reached after 25 min (3.89 U/min/mg). It was proved that the increasing of the heat-treatment time significantly impacted the growth of aminopeptidase activity of lactic acid bacteria; this fact confirms their high temperature resistance.

**Key words:** lactic acid bacteria, aminopeptidases, dipeptidases, proteolytic activity, heat-treatment ☒