

LAKTOKOKLARDA KAZEİN METABOLİZMASI

CASEIN METABOLISM IN LACTOCOCCI

Mustafa AKÇELİK, Pınar ŞANLIBABA

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Dışkapı / ANKARA

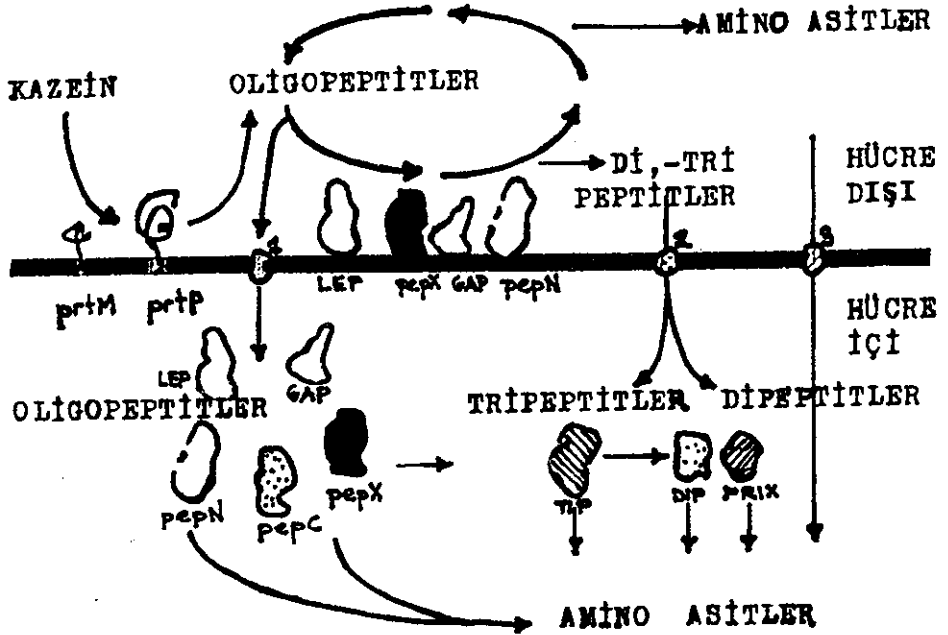
ÖZET: Laktokoklar, değişik süt fermentasyon süreçlerinde starter kültür olarak kullanılan Gram-pozitif bakterilerdir. Bu bakteriler; içerdikleri kompleks proteolitik sistemler sayesinde, temel süt proteinleri kazeinleri, bazıları gelişmeleri için zorunlu olan küçük peptitlere ve aminoasitlere kadar parçalayarak, süt ortamında hızlı gelişme yeteneği kazanmaktadır. Kazeinler, starter kültürlerle besinsel kaynak oluşturmaları yanında, peynirlerde aromanın gelişiminde de önemli rol oynamaktadır. Laktokoklarda yürütülen yoğun araştırmalar, proteinazlar üzerinde genetik ve biyokimyasal verilerin hızlı bir şekilde artmasına yol açmıştır. Bu makalede, laktokokların proteolitik sistemleri ve bu sistemlerin süt ürünlerinin üretimindeki rolü tartışılmıştır.

ABSTRACT: Lactococci are Gram-positive bacteria that are used as starter cultures in variety of dairy fermentation process. This bacteria have a complex proteolytic systems which enables them to rapid growth in milk by degradating caseins, the major milk proteins, into small peptides and free amino acids, some of which are essential for cell growth. Besides being an important nutritional source for the starter bacteria, caseins also play a curial role in the development of flavor in cheese. The intensified researches in lactococci have resulted in a rapid increase of genetic and biochemical data on lactococcal proteinases. In this review, the proteolytic systems of lactococci and their role in manufacture of milk products is discussed.

GİRİŞ

Laktik asit bakterilerinin 15 cinsinden biri olan *Lactococcus* genus'u; *L. lactis*, *L. gaviae*, *L. piscium*, *L. plantarum* ve *L. raffinolactis* türlerini içermektedir. Bu türler içerisinde *L. lactis* üyeleri (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) süt endüstrisinde starter kültür suşları olarak kullanımları nedeniyle ticari öneme sahiptir. Laktokokların süt endüstrisinde starter kültürler olarak kullanımına esas teşkil eden özelliklerini; süt şekeri laktozu fermente ederek laktik asit oluşturmaları, kazein hidrolizi (proteolitik aktivite), sitrattan diasetil formasyonu (sadece biovar. *diacetylactis*), ortamın redoks potansiyelinin düşürülmesi ve faj dirençlilik olarak özetlemek mümkündür (TEUBER, 1990).

Laktokok suşlarının süt ortamında gelişme oranı, kazein hidrolizi yetenekleri ile doğrudan ilişkilidir. Süt proteinlerinin yaklaşık % 80'ini oluşturan kazeinin, α S1, α S2, β ve K-kazein olmak üzere başlıca 4 tipi bulunmaktadır. Tüm tipler helisel sarmallar halinde rastgele kıvrılmış protein formasyonundadır ve aktif hidrofobrik bölgeler içermektedir. Çözülebilir yapıdaki bu miseller, laktokoklar için zorunlu ve gelişmelerini teşvik eden amino asitlerin kaynağını teşkil etmektedir (POOLMAN ve ark. 1991). Ayrıca kazein parçalanma ürünlerinin peynirlerde tat ve aromanın oluşumunda anahtar rol oynadığı saptanmıştır (CHOPIN, 1993). Laktokoklarda kazein hidrolizi; hücre dışı proteinazlar (Prt P) tarafından kazeinin değişik uzunluktaki peptitlere parçalanması, oluşan peptitlerin oligopeptit transport sistemi aracılığı ile hücre içine alınması ve bu peptitlerin hücre içi peptidazlar tarafından amino asitlere kadar parçalanması, olmak üzere üç temel aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 1 Tablo 1) (POOLMAN ve ark. 1995; MIREAU ve ark. 1996).



Şekil 1 : Laktokoklarda kazein metabolizması (POOLMAN ve ark. 1995)

Çizelge 1. Laktokokal Proteolitik ve Peptidolitik Enzimler (MIREAU ve ark. 1996)

Enzim	Molekül Ağırlığı kDa	Substrat	Sınıf	Tanımladığı Suş
Proteinaz Prt P Nötral proteinaz	200 93	Kazein β -kazein	Serin Proteinaz Metallo	
Endopeptidaz LEP I LEP II LEP III	98 40 70	α s1-kazein f (1-23) α s1-kazein f (1-23) metekaphalin	Metallo Metallo Metallo	L. lactis subsp. cremoris H61 L. lactis subsp. cremoris H61 L. lactis subsp. cremoris Wg2
Genel Aminopeptidaz Pep N Pep C	95 50	Leu/Lys-pNa His-pNA	Metallo Sistein proteinaz	L. lactis subsp. cremoris Wg2 L. lactis subsp. cremoris AM1
Glutamil Aminopeptidaz GAP I GAP II	43 41	Glu-Glu Glu-pNa	Metallo Metallo	L. lactis subsp. cremoris HP L. lactis subsp. lactis NCDO712
X-prolil-dipeptidil Aminopeptidaz Pep X	90	X-Pro-pNA	Serin Proteinaz	L. lactis subsp. cremoris P8
Prolidaz PRD	43	X-Pro	Metallo	L. Lactis subsp. cremoris H61
Prolin İmino Peptidaz PIP	45	Pro-X-(Y)	Metallo	L. lactis subsp. cremoris HP
Dipeptidaz DIP II DIP III DIP I	100 49 50	Leu-Leu Leu-Leu Leu-Leu	Metallo Metallo Metallo	L. lactis subsp. cremoris HP L. lactis subsp. cremoris Wg2 L. diacetyllactis CNRZ 267
Tripeptidaz TRP	52	Leu-Gly-Gly	Metallo	L. lactis subsp. cremoris Wg2

Metankaphalin: Trozil-Glisil-Glisil-Fenil alanil-Metiyonin
pNA: p Nitro alanidin

HÜCRE DIŞI PROTEİNAZ SPESİFİTESİ

Laktokoklarda hücre dışı proteinazlar (PrpP), kazein kullanımında ilk aşamayı katalize etmektedir. Subtilisin familyası üyeleri ile (serin proteinazlar) büyük ölçüde homoloji veren laktokokkal proteinazlar, pre-pro-protein halinde sentezlenmektedir. Olgun PrpP stoplazmik membrana karboksil ucu ile bağlanmakta ve amino ucu ise hücre dışında serbest kalmaktadır. PrpP aktivasyonu, bu enzime yakın bölgede yer alan Prt M proteini tarafından regüle edilmektedir (Şekil 1) (VENEMA, 1993). Aktiviteleri esas alınarak, laktokokkal hücre dışı proteinazları PI ve PIII olmak üzere iki guruba ayırmak olasıdır. 80-140 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahip bu enzimler, fenilmetanosülfanil florit (PMSF) veya diizopropilfloro fosfat (DFP) tarafından inaktive edilebilmektedir (TAN, 1992; BOULHAB ve ark. 1993; POOLMAN ve ark. 1995).

PI tip proteinazların primer substratı β -kazeindir, ancak K-kazein de bu enzimler tarafından parçalanabilmektedir. PIII tip enzimler ise α SI, β ve K-kazeinleri parçalama yeteneğinde bulunmuştur (PRICHARD ve COOLBEAR, 1993; MIREAU, 1996). PI ve PIII tip proteinaz genlerinin klonlanması ve DNA dizi analizleri sonucu % 98 oranında homoloji gösterdikleri saptanmıştır (KOK ve VENEMA, 1988; KOK, 1996). Her iki tip proteinaz enzimi de kazeinlerden oligopeptitleri oluşturmalarına rağmen, proteoliz ürünleri yüksek oranda farklılık göstermektedir. Dolayısı ile, hücre duvarı dış yüzeyine lokalize olmuş bu enzim sistemlerinin etkinliği, oligopeptit transport sisteminin (Opp) etkinliği ile doğru orantılı kabul edilmektedir (FLAMBARD ve ark. 1997; HELLINCK ve ark. 1997).

Her iki tip proteinaz enziminin hücre dışı aktiviteleri sonucunda da kazeinlerden farklı uzunlukta oligopeptitler oluşturulmaktadır. Di ve tripeptitlerin bu aşamada oluştuğuna dair herhangi bir sonuç ise elde edilememiştir. *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 suşunda yürütülen çalışmalarda, PI tip proteinazların PIII tip proteinazlara oranla oligopeptit transport sistemi tarafından daha fazla tercih edilen fragmentler oluşturduğu saptanmıştır (JULLIARD ve ark. 1996; KUNJI ve ark. 1996). Özellikle PI ve PIII tip proteinaz sistemlerini içeren suşların kullandığı karışık starter kültürlerde laktokok suşları, içerdikleri proteinaz tipine bağlı olarak farklı gelişme kinetikleri göstermektedir. Peynir endüstrisinde giderek önemi artan Prt⁻ laktokok suşlarının kullanımı, farklı proteolitik aktiviteye sahip suşların karışık kültürlerdeki interaksiyon tiplerinin tanımlanması çalışmaları ile olanaklı hale gelmiştir (SMID ve ark. 1991; REID ve ark. 1994; FLAMBARD ve ark. 1996; AKÇELİK 2000).

HÜCRE DIŞI OLİGOPEPTİT HİDROLİZİ

Kazeinden türeyen oligopeptitler, hücre dışı peptidazlar tarafından hidrolize edilmekte ve oluşan peptitler aminopeptidazlar tarafından hücre içine taşınmaktadır. Bu bakterilerde karboksipeptidaz aktivitesi ise tanımlanmamıştır. Genellikle hücre içi aktivite gösteren aminopeptidazların çok az bir kısmı hücre dışında kazein türevi peptitleri hidrolize etme yeteneğinde bulunmuştur. Hücre dışı oligopeptit hidrolizinde sınırlı bir aktivite gösteren aminopeptidazların kazein türevi oligopeptitler üzerindeki enzimatik faaliyeti ile; serin, treonin, glutamin, valin, lösin, alanin ve lizin gibi amino asitler serbest kalmakta ve serin-lösin ya da glisin-serin içeren dipeptitler üretilmektedir. Oluşan bu amino asitler ve dipeptitler, amino asit ya da di ve tripeptit transport sistemleri üzerinden hücrelere alınmaktadır. Bütün laktokok türleri için zorunlu amino asitler olan histidin, metionin ve izolösin ile, söz konusu bakterilerin gelişmelerini teşvik eden prolin ve fenil alanin ise aminopeptidaz aktivitesi sonucu üretilmemektedir (MONNET ve ark. 1989; VISSER ve ark. 1994; GILBERT ve ark. 1997; JULLIARD ve ark. 1997). Laktokoklar için zorunlu ve gelişmelerini teşvik eden bu amino asitlerin hücre içine alınımında, serbest peptit ve amino asitlerin transportunu sağlayan mekanizmalar rol oynamaktadır. Laktokoklarda fonksiyonel peptit ve amino asit transport sistemleri, bu sistemlerin aktif mekanizmaları ve spesifiteleri Çizelge 2'de verilmiştir (JULLIARD ve ark. 1997).

HÜCRE İÇİ PEPTİT HİDROLİZİ

Hücre içi peptit hidrolizi, laktokoklardaki proteolitik aktivitelerin üçüncü ve son basamağını teşkil etmektedir. hücre içi peptidazlar, hücreye alınan peptitlerde tüm peptit bağlarını hidrolize ederek amino asitleri serbest bırakmaktadır. Bugüne kadar, değişik araştırmacılar tarafından izole edilen peptidazlar farklı adlandırmalara tabi tutulmuş, çoğu kez aynı enzim için birden fazla isim ve kısaltma kullanılmıştır. Bu karmaşık sınıflandırmada; peptidazların alt ünite yapıları, izoelektrik noktaları, optimum pH ve sıcaklık istekleri, çeşitli kimyasal ajanlarla verdikleri reaksiyon tipi ile substrat spesifiklikleri gibi kriterler kullanılmıştır (HUGEOLTZ ve ark. 197; BRUINBERG ve deVOS, 1992; GELAIS ve ark. 1992; McGARRY ve ark. 1994; REID ve ark. 1994; KOK, 1996). Günümüzde laktokokal peptidazlar etki ettikleri substratlara göre iki ana grup altında incelenmektedir:

1. Endopeptidazlar : LEP I, LEP II ve LEP III (Şekil 1 ve Tablo 1) olarak adlandırılan üç farklı tipi tanımlanmıştır. Kazein fragmentleri üzerinde farklı spesifite gösteren bu endopeptidazlar metalloenzim özelliindedir. Aktivasyonları için; LEP I Mn^{+2} , LEP III Co^{+2} ve LEP II Zn^{+2} metal iyonlarına gereksinim duymaktadır. Her üç enzim aktivitesinin de EDTA uygulaması ile inhibe edildiği saptanmıştır (McSWEENEY ve ark. 1993; TAN ve ark. 1993; GILBERT ve ark. 1997).

2. Aminopeptidazlar : Laktokoklarda hücre dışında da sınırlı aktivite gösteren aminopeptidazlar substrat spesifitliklerine göre; genel aminopeptidazlar (AMP), glutamil aminopeptidazlar (GAP), X-prolil-dipeptidil aminopeptidazlar (X-PDAP), tripeptidazlar (TRP), dipeptidazlar (DIP) prolidazlar (PRD) olmak üzere (Şekil 1 ve Tablo 1) 6 alt guruba ayrılmaktadır (TAN 1992; MIREAU 1993; SABLE ve ark. 1997).

SONUÇ

Fermente süt endüstrisinde starter kültür olarak kullanılan laktokok suşlarında kazeinolitik aktivite sonucu söz konusu bakterilerin gelişimleri teşvik edilmekte, diğer yandan ürünün olgunlaşması esnasında tipik tat ve aroma bileşikleri oluşturulmaktadır. Bu süreç; rennet proteinazları, süte özgü proteinazlar ve starter proteinazları tarafından kazeinin hidrolizi ve peptitlerin amino asitlere hidrolizi olmak üzere iki ana aşamada gerçekleşmektedir. Ancak bazı suşlarda peptidolitik aktiviteler sonucu istenmeyen tat ve aroma bileşikleri de oluşturulabilmektedir. Laktokok suşlarında proteolitik aktivitede rol oynayan enzim sistemlerinin detaylı genetik ve biyokimyasal analizleri sonucu, ürüne spesifik proteolitik aktivite içeren suş ya da suş kombinasyonlarının geliştirilmesi mümkün olmaktadır. Ürün standardizasyonu açısından büyük önem taşıyan bu çalışmalar, laktokoklarda daha çok plazmidler üzerinde yürütülen genetik manipülasyonları esas almaktadır. Zira bu bakterilerde proteolitik sistemin birçok komponentine ait gen kodu plazmidler üzerinde taşınmaktadır.

Diğer yandan farklı proteolitik aktiviteye sahip suşların kullanımı ile karışık suş içeren kültürlerde dengelenmiş bir proteolitik sistemin oluşturulması, fermentasyon ortamlarında suş aktivitelerinin arzu edilen düzeylerde tutulmasını ve kontrolünü olanaklı kılmaktadır. Laktokok suşları içerisinde proteolitik sistem elemanları hem genetik hem de stokiyometrik açıdan homojenite göstermemektedir. Bu durum; süt endüstrisinde kullanılacak starter kültür suşlarının seçiminde, proteolitik sistemlerin genetik ve biyokimyasal yönden tanımlanmasını zorunlu kılmaktadır.

Çizelge 2. Laktokoklardaki Peptit ve Aminoasit Transport Sistemleri (JULLIARD ve ark. 1997).

Transport Sistemi	Mekanizma	Spesifitesi
Dallanmış zincir aminoasit	PMF*	Leu, Ile, Val
Nötral aminoasit I	PMF	Ala, Gly
Nötral aminoasit II	PMF	Ser, Thr
Glutamat	FP**	Glu, Gln
Asparajin	FP	Asn
aspartat	Madde değişimi	Asp, Glu
Temel aminoasit I	PMF	Lys, Orn
Temel aminoasit II	PMF	His
Arg-Orn antiporter	Madde değişimi	Arg, Orn, Lys
Aromatik aminoasit	PMF	Phe, Tyr, Trp
Prolin	Difüzyon	
Di ve Tri peptitler	PMF	Di ve tripeptitler ^a
Oligopeptit	Bilinmiyor	Tri ve hepzapeptitler ^b

a: arjinin içeren peptidler taşınmamaktadır

b: nötral oligopeptidler prolin kalıntısı içermemektedir.

*.: Proton motivasyon gücü

**.: Amino asit transfer sistemleri

KAYNAKLAR

- AKÇELİK, M. 2000. Interaction Between Proteinase-Positive and Proteinase-Negative *L. lactis* subsp. *lactis* Strains Cocultured in Milk. *KUKEM (Basımda)*.
- BOULHAB, S., FAVROT, C., MAUBOIS, J.L. 1993. Growth Promoting Activity of Tryptic Digest of Caseomacropptide for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Lait*, 73; 73-77.
- BRUINENBERG, P. G., deVOS, W. M. 1992. Proteinase Overproduction in *Lactococcus lactis* Strains: Regulation and Effect on Growth and Acidification in Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 58; 78-84.
- CHOPIN, A. 1993. Organization and Regulation of Genes for Aminoacid Biosynthesis in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12; 21-38.
- FLAMBARD, B., RICHARD, J., JULLIARD, V. 1996. Interaction Between Proteolytic Strains of *Lactococcus lactis* Influenced by Different Types of Proteinase During Growth in Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 63; 2131-2135.
- GELAIS, D., FOY, D., HACHE, S., DESJARDINGS, M. L. 1992. Growth of Nonproteolytic *Lactococcus lactis* in Culture Medium Supplemented with Different Casein Hydrolyzates. *J. Dairy Sci.* 76; 3327-3337.
- GILBERT, C., BLANC, B., COUTAZ, J., PORTALIER, R., ATLAN, D. 1997. Comparison of Cell Surface Proteinase Activities within the *lactobacillus* Genus. *J. Dairy Res.* 64; 561-571.
- HELLINCK, S., RICHARD, J., JULLIARD, V. 1997. The Effects of Adding Lactococcal Proteinase on the Growth Rate of *Lactococcus lactis* in Milk Depend on the Type of Enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 63; 2124-2130.
- HUGENHOLTZ, J. M., VELDKAMP, H., KOK, J. 1987. Aminoacid Limited Growth of Starter Cultures in Milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 45; 191-198.
- JULLIARD, V., LAAN, H., KUNJI, E.R.S., BRUINS, A.P., KONINGS, W.N. 1996. The Extracellular PI-Type Proteinase of *Lactococcus lactis* Hydrolyses β -Casein Into More Than One Hundred Different Peptides. *J. Bacteriol.* 177; 3472-3478.
- JULLIARD, V., RICHARD, J., FLAMBARD, B. 1997. Mixed Starter Cultures of Proteinase-Positive and Proteinase-Negative Strains of *Lactococcus lactis* in Milk. *J. Dairy Sci.* 19; 964-970.
- KOK, J., VENEMA, G. 1986. Genetics of proteinases of Lactic Acid Bacteria. *Biochimie*, 70; 475-488.
- KOK, J. 1996. Inducible Gene Expression and Environmentally Regulated Genes in Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwen.* 70; 129-145.
- KUNJI, E.R.S., MIREAU, I., HAGTING, A., POOLMAN, B., KONINGS, W.N. 1996. The Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Antonie van Leeuwen.* 70; 187-221.
- MCGARRY, A., LAW, J., COFFEY, A., DALY, C., FOX, P.F., FITZGERALD, G.F. 1994. Effect of Genetically Modifying the Lactococcal Proteolytic System on Ripening and Flavour Development in Cheddar Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 60; 4226-4233.
- McSWEENEY, P.L.H., FOX, P.F., LAW, J. 1993. Contribution of Cell Wall-Associated Proteinases of *Lactococcus* to the Primary Proteolysis of β -Casein in Cheddar Cheese. *Milchwissenschaft*, 48; 319-321.
- MIREAU, I. 1996. Casein Degradation in *Lactococcus lactis*: A first Exploration. *Antonie van Leeuwen.* 70; 144-170.
- MONNET, V., BOCKELMAN, W., GRIPON, J.C., TEUBER, M. 1989. Comparison of Cell Wall Proteinases from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ACI and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO763. II. Specificity Towards Bovine β -Casein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31; 112-118.
- POOLMAN, B.E., SMID, E.J., KUNJI, S., HAGTING, A., JULLIARD, V., KONINGS, N.V. 1995. The Proteolytic Pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 79; 65-75.
- PRICHARD, G.G., COOLBEAR, T. 1993. A Genetic and Biochemical Characterization of the Oligopeptide Transport System of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175; 7523-7527.
- REID, J., COOLBEAR, T., PILLIDGE, C.J., PRITCHARD, G.G. 1994. Specificity of Hydrolysis of Bovine-K-casein by Cell Envelope-Associated Proteinases from *Lactococcus lactis* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60; 801-806.
- SABLE, S., PORTRAIT, V., GAUTIER, F., LETELLIER, F., COTTENCEAU, G. 1997. Microbiological Changes in a Row Goats Milk Cheese During Ripening. *Enzyme and Microbial. Technol.* 21; 212-220.
- SMID, E.J., POOLMAN, B., KONINGS, N.V. 1991. Casein Utilisation by *Lactococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57; 2447-2452.
- TAN, P.S.T. 1992. The Biochemical, Genetic and Physiological Properties of Aminopeptidase N from *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwen.* 49; 225-249.
- TAN, P.S.T., VAN KESSEL, T.A.J., VAN de VEERDONK, F.L.M. 1993. Degradation and Debittering of a Tryptic digest form β -Casein by Aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 59; 1430-1436.
- VENEMA, G. 1993. Molecular Biology and Genetic Modifications in *Lactococci*. *J. Dairy Sci.* 2133-2144.
- VISSER, S., SLANGEN, C.J., ROBBEN, A.J.P.M., PONGEN, W.D., HEERMA, W., HAVERKAMP, J. 1994. Action of a Cell Envelope Proteinase (CEP/III-Type) from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM1 on Bovine-K-Casein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41;644-651.