

JÓZEFA CHRZANOWSKA
Akademia Rolnicza we Wrocławiu
ANTONI POLANOWSKI
Uniwersytet im. B. Bieruta we Wrocławiu

PROTEINAZY WYKAZUJĄCE ZDOLNOŚĆ KOAGULACJI KAZEINY MLEKA

Jednym z najstarszych przykładów pozakomórkowego wykorzystania enzymów jest zastosowanie otrzymywanej z trawieńców młodych cieląt chymozyny (podpuszczka, rennina EC 3.4.23.4) do koagulacji mleka przy produkcji serów dojrzewających. W technologii mleczarskiej operuje się nazwą podpuszczka i pod tym pojęciem rozumie się techniczny preparat enzymatyczny, zawierający w przewodzie enzym chymozynę i niewielką ilość pepsyny. Według Nelsona [82] w preparacie takim występuje 94% chymozyny i 6% pepsyny.

Wzrastająca ciągle produkcja serów przy jednoczesnym ograniczeniu uboju cieląt powoduje jednak pogłębiający się jej deficyt i stwarza konieczność stosowania enzymów zastępczych.

Pomimo iż enzymy wykazujące zdolność koagulacji mleka są szeroko rozpowszechnione zarówno w świecie roślin jak i zwierząt [109, 110, 111, 120] to nie wszystkie jednak są odpowiednimi substytutami podpuszczki. Najbardziej zbliżone do niej właściwości wykazują należące do tej samej grupy, różnego pochodzenia proteiny aspartylowe (EC 3.4.23) [40]. Enzymy te posiadają identyczny aparat katalityczny zbudowany przede wszystkim z dwóch reszt kwasu asparaginowego. Reszty te usytuowane są w środkowej części „kieszeni” wiążącej substrat w odległości jednego wiązania wodorowego [127, 128, 129]. Z enzymów pochodzenia zwierzęcego, będących substytutami podpuszczki, do celów serowarskich najczęściej wykorzystuje się pepsynę otrzymaną z żołądków wieprzowych, wołowych i kurzych [54]. Wśród mikroorganizmów głównymi producentami kwaśnych chymozynopodobnych enzymów są liczne gatunki grzybów, szczególnie z rodzaju *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* i *Penicillium* [109, 110, 111, 120]. Niektóre proteiny grzybowe jak proteiny z *Mucor pusillus*, z *Mucor miehei* i z *Endothia parasitica* można już uważać za uznane substytuty podpuszczki. Są one dostępne w formie preparatów koagulujących o różnych nazwach firmowych [111].

*Praca wykonana w ramach problemu CPBP 04.11/2.9 i CPBR 10—16/1.2.6

Ostatnio obiecujące wyniki w produkcji preparatów koagulujących mleka uzyskano stosując metody inżynierii genetycznej [115, 122]. Hodowle mikroorganizmów transformowanych plazmidem, zawierającym w strukturze sekwencję nukleotydów kodujących prochymozynę, pozwalają na razie w skali mikro, na produkcję zdolnego do aktywacji zymogenu nieróżniącego się właściwościami od chymozyny cięłejcej.

Enzym taki z dobrym skutkiem wykorzystano w eksperymentalnej produkcji serów [42, 58].

Ogólna charakterystyka proteinaz aspartylowych

Zwierzęce aspartylowe proteinazy pochodzenia żołądkowego są wydzielane w formie nieaktywnych prekursorów-zymogenów, których ilość zależy od gatunku zwierząt. Asato i Rand [5] wykazali w soku żołądkowym cieląt obecność czterech zymogenów reninny. Taką samą ilość zymogenów pepsyny stwierdzono w soku żołądkowym świń i starszych przeżuwaczy, natomiast u kur wykazano aż pięć pepsynogenów [40]. Każdy zymogen jest prekursorem innego enzymu [4, 40]. Jego aktywacji odbywającej się na drodze autokatalizy, przyspieszanej obecnością jonów wodorowych, towarzyszy odszczepienie N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego [33].

Mikrobiologiczne proteinazy są to najczęściej enzymy pozakomórkowe, które w przeciwieństwie do zwierzęcych enzymów koagulujących są syntetyzowane w formie aktywnej, ale podobnie do nich wykazują również znaczną heterogenność [40]. Aspartylowe proteinazy, niezależnie od źródła pochodzenia, zbudowane są z ok. 320 reszt aminokwasowych i posiadają zbliżoną masę cząsteczkową (30—40 kDa) [40, 129]. Niektóre z nich jak proteinazy z *M. pusillus* i z *M. miehei* [28, 91, 118] a także z *Fusarium moniliforme* [59] zawierają w cząsteczce reszty cukrowe. Charakterystyczną cechą aspartylowych proteinaz jest niewielka zawartość aminokwasów zasadowych a wysoka aminokwasów kwaśnych, co decyduje o ich niskim punkcie izoelektrycznym [67]. Dla pepsyny wieprzowej wynosi on ok. 1,0, dla renniny — 4,6, dla proteinazy z *Endothia parasitica* — 5,5 z *Fusarium moniliforme* 4,9 [59], a dla proteinaz z *M. pusillus* i z *M. miehei* odpowiednio 3,7 i 4,2 [109]. Optymalne działanie tych proteinaz wobec różnych substratów jest w pH 1,5—5,0 [40]. W wyższych PH ulegają one szybko inaktywacji, np. pepsyna wieprzowa [37] i proteinaza z *Fusarium moniliforme* [59] już w pH ok. 6,0 [37], rennina w pH ok. 7,0 [31], proteinaza z *Endothia parasitica* — 6,5 [139], z *M. miehei* — 6,7 [1], a pepsyna kurza przy pH 8,0 [9]. W centrum aktywnym tych proteinoz znajdują się dwie reszty kwasu asparaginowego, z których jedna występuje w formie niezjonizowanej [127, 128, 129]. Obok nich, w nie-

których proteinach takich jak chymozyna [44] i proteina z *M. pusillus* [2, 29, 30] ważną rolę w aktywności katalitycznej odgrywa również histydyna. Fotooksydacja tego aminokwasu błękitem metylenowym powoduje utratę ich aktywności enzymatycznej. Etoh i wsp. [30] sugerują, że obecność histydyny w centrum aktywnym może być cechą charakterystyczną dla typowych enzymów koagulujących. Wszystkie aspartyłowe proteiny w wyniku chemicznej modyfikacji estrem metylowym dwuazocetylo-DL-norleucyny (DAN) lub 1,2-epoxy-3(p-nitrofenoksy)propanem (EPNP) ulegają inaktywacji wskutek estryfikacji grup karboksylowych, pełniących funkcję katalityczną [11, 72, 124, 125]. W pepsynie w reakcji z DAN ulega zablokowaniu reszta kwasu asparaginowego, znajdująca się w pozycji 215, a w reakcji z EPNP w pozycji 32 [127, 129].

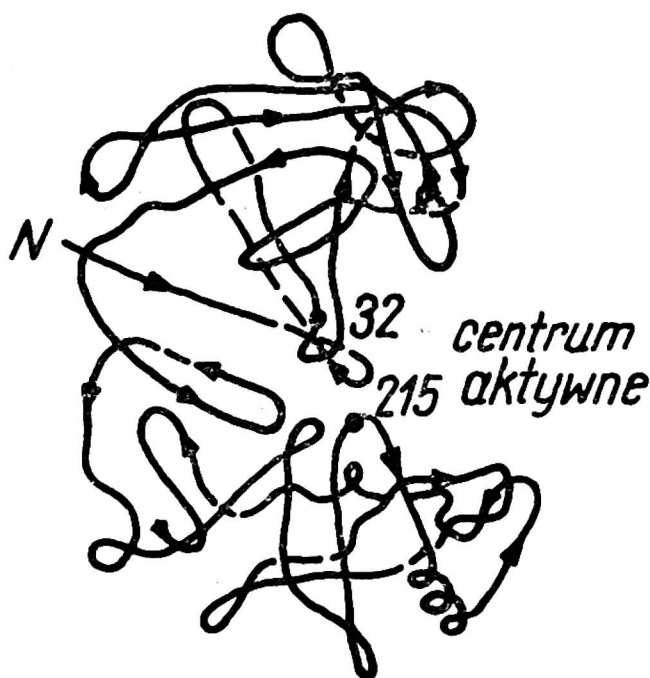
Specyficznym inhibitorem aspartyłowych proteinaz jest także pepstatyna — pentaptyd syntetyzowany przez bakterie należące do promieniowców z rodzaju *Streptomyces* [123, 124, 127, 64]. Proteiny te nie są natomiast wrażliwe na działanie czynników blokujących grupy surfhidrylowe i związków chelatujących jony metali oraz dwuizopropylodifluorofosforanu (DFP) [67]. Obok podobnego mechanizmu działania, proteiny aspartyłowe wykazują również zbliżoną budowę chemiczną nawet wówczas, gdy pochodzą z gatunków bardzo odległych filogenetycznie. Porównanie pepsyny z proteiną z *Penicillium janthinellum* (penicillopepsyną) wykazało w ok. 32% homologiczną strukturę [48]. Duże podobieństwo w strukturze pierwszorzędowej, szczególnie N-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego stwierdzono również pomiędzy proteiną z *M. miehei* i chymozyną. Spośród 122 aminokwasów, 49 znajdowało się w identycznych pozycjach w obydwu enzymach [8]. Natomiast w chymozynie i penicillopepsynie wykazano 78 identycznie zlokalizowanych reszt aminokwasowych, a w chymozynie i pepsynie aż 189 [32].

Szczególnie godną podkreślenia jest homologia w sekwencji aminokwasów wokół reaktywnych reszt aspartyłowych w centrum aktywnym (tab.) [12, 79].

Identyczna topologia wielu aminokwasów w cząsteczkach tych enzymów prawdopodobnie, determinuje też podobieństwo w przestrzennym ukształtowaniu ich łańcuchów polipeptydowych [32]. Dotychczas poznano strukturę przestrzenną pepsyny, penicillopepsyny, proteiny z *Rhizopus chinensis* i z *Endothia parasitica*. Strukturę tę przedstawiono schematycznie na przykładzie penicillopepsyny na rysunku 1. Stwierdzono, że łańcuch polipeptydowy tych enzymów występuje głównie w konfrontacji β . N i C-końcowe fragmenty enzymu tworzą dwie oddzielne domeny, a w ich hydrofobowej „kieszce” usytuowane jest centrum aktywne [23, 32, 33]. Według Tanga i wsp. [128, 129] homologiczna struktura aspartyłowych proteinaz zarówno pochodzenia mikrobiologicznego jak i zwierzęcego po-

Sekwencja aminokwasów wokół reaktywnych reszt aspartylowych w centrum aktywnym niektórych proteinaz aspartylowych (79)

Enzymy	Sekwencja wokół reszty aspartylowej reagującej z DAN	Sekwencja wokół reszty aspartylowej reagującej z EPNP
Rennina	Asp-Tre-Gly-Tre-Ser-Lys-Leu	Asp-Tre-Gly-Ser-Ser
Pepsyna	Ileu-Val-Asp-Tre-Gly-Tre-Ser-Leu	Asp-Tre-Gly-Ser-Ser-Asn
Penicillopepsyna	Ileu-Val-Asp-Tre-Gly-Tre-Tre-Leu	Asp-Tre-Gly-Ser-Ser
Proteinaza z Rh. chinensis	Asp-Tre-Gly-Tre-Tre-Leu	Asp-Tre-Gly-Ser-Ser-Asp



Rys. 1. Konformacja łańcucha polipeptydowego penicillopepsyny [23].

zwala przypuszczać, że wywodzą się one od jednego „praenzymu” złożonego z ok. 150 aminokwasów, którego rozwój ewolucyjny odbywał się poprzez duplikację i fuzję kodującego go „pragenu”.

Specyficzność aspartylowych proteinaz

Aspartylowe proteinazy hydrolizują szereg substratów białkowych, ale najbardziej aktywne są wobec hemoglobiny w pH 3—4 [73]. Hydrolizują również wiązania w substratach peptydowych, jakkolwiek szybkość hydrolizy tych wiązań uzależniona jest od rozmiarów cząsteczki substratu. Wzrasta ona wraz z wydłużaniem łańcucha peptydowego, co wskazuje, że istotną rolę w mechanizmie katalizy tych proteinaz odgry-

wają drugorzędowe oddziaływania, one też są najprawdopodobniej przyczyną różnic w ich specyficzności wobec różnych substratów [84].

Proteiny pochodzenia mikrobiologicznego wykazują jednak znacznie niższą od pepsyny zdolność rozszczepiania wiązań w substratach peptydowych [73, 83, 84]. Aspartylowe proteiny na ogół hydrolizują wiązania peptydowe utworzone przez aminokwasy o resztach hydrofobowych w tym także aromatycznych [73, 120]. W utlenionym łańcuchu B insuliny preferują wiązania: Leu₁₅-Tyr₁₆, Tyr₁₆-Leu₁₇, Fen₂₄-Fen₂₅, Fen₂₅-Tyr₂₆ [73].

Niektóre mikrobiologiczne proteiny jak penicillopepsyna, proteina z *Rhizopus chinensis* i z *Aspergillus saitoi* posiadają zdolność aktywacji trypsynogenu, która polega na rozszczepieniu wiązania Lis₆-Ileu₇ i odłączeniu maskującego peptydu [67, 116]. Nie wykazują jej jednak proteiny z *M. pusillus* i z *M. miehei* [74, 83], a także z *Fusarium moniliforme* [59]. Obok aktywności proteolitycznej, niektóre enzymy z tej grupy jak pepsyna wieprzowa i wołowa, penicillopepsyna i proteina z *Rhizopus chinensis* wykazują również aktywność esterazową [16, 37, 67] a pepsyna posiada ponadto aktywność transpeptydazową [37].

Właściwości koagulujące mleko tych enzymów wypływają ze zdolności rozszczepiania wiązania Fen₁₀₅-Met₁₀₆ lub któregoś z wiązań sąsiadujących we frakcji κ -kazeiny [36, 40, 119]. Warunki oraz przebieg tej reakcji najlepiej poznano dla chymozyny. Wybiórcza hydroliza wiązania Fen₁₀₅-Met₁₀₆ pod wpływem chymozyny nazwana została pierwszą lub enzymatyczną fazą koagulacji mleka [21]. Podatność tego wiązania na jej działanie uzależnione jest jednak od obecności aminokwasów sąsiadujących, szczególnie histydyny [94] i seryny [104, 135]. W syntetycznych peptydach bowiem wiązanie to jest znacznie wolniej hydrolizowane niż w κ -kazeinie [65, 104, 134, 135], a w dipeptydzie w ogóle nie ulega rozszczepieniu [119]. Natomiast we fragmencie κ -kazeiny zawierającym reszty aminokwasowe od 98 do 129, wiązanie Fen₁₀₅-Met₁₀₆ jest hydrolizowane z taką samą szybkością jak w całej cząsteczce κ -kazeiny [45]. W wyniku hydrolizy κ -kazeiny, pełniącej funkcję stabilizującą cały kompleks kazeinowy powstaje glikomakropeptyd, zawierający reszty aminokwasowe od 106 do 169 i wszystkie reszty cukrowe natywnej κ -kazeiny oraz para- κ -kazeina złożona z aminokwasów od 1 do 105 z fenyloalaniną jako C-końcowym aminokwasem. Pierwszy z tych produktów jest rozpuszczalny i przechodzi do serwatki, para- κ -kazeina natomiast ulega wytrąceniu razem z pozostałymi frakcjami kazeiny α_s i β tworząc skrzep. Proces ten, tj. nieenzymatyczna lub koagulująca faza krzepnięcia mleka wymaga obecności jonów wapnia jak również jest bardziej zależny od temperatury ($Q_{10} = 15$) niż pierwsza faza enzymatyczna [111]. Zachodzi on w temperaturze dopiero powyżej 20°C, faza enzymatyczna natomiast może przebiegać nawet w temperaturze bliskiej 0°C.

Specyficzność chymozyny określono również wobec frakcji α_{s1} i β -kazeiny. We frakcji α_{s1} - β kazeiny najbardziej podatne na jej działanie jest wiązanie Fen₂₃-Fen₂₄ lub Fen₂₄-Val₂₅ [46, 76]. W wyniku jego rozszczepienia uwalniany jest peptyd α_{s1} -I, złożony z aminokwasów od 24 lub 25 do 199 [18, 138, 70]. Hydroliza dalszych wiązań peptydowych zależy w znacznym stopniu od pH, siły jonowej oraz stopnia agregacji substratu. Mulvihill i Fox [76] wykazali, że w dalszej kolejności uwalniane są pod wpływem chymozyny peptydy, stanowiące odpowiednio fragmenty α_{s1} - kazeiny:

α_{s1} — II (24/25—169), α_{s1} — III/IV (24/25—149/150),

α_{s1} — V (29/33—199) i α_{s1} — VII (56—179).

Według Pelissiera i wsp. [93] we frakcji tej co najmniej 25 wiązań peptydowych jest podatnych na działanie chymozyny. Są to głównie wiązania utworzone przez grupy karboksylowe fenyloalaniny i leucyny. We frakcji β -kazeiny chymozyna wykazuje preferencję do wiązań usytuowanych w C-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego [17, 20, 137]. Są to wiązania znajdujące się w pozycji 189—190, 163—164 i 139—140, w wyniku ich rozszczepienia powstają kolejno peptydy β -1, β -II i β -III [20, 137]. W warunkach podwyższonej kwasowości następuje rozszczepienie większej ilości wiązań. Visser i Slangen [137] uszeregowali je w kolejności: Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ > Ala₁₈₉-Fen₁₉₀ > Leu₁₆₅-Ser₁₆₆ \geq Gln₁₆₇-Ser₁₆₈ \geq Leu₁₆₃-Ser₁₆₄ > Leu₁₃₉-Leu₁₄₀ \geq Leu₁₂₇-Tre₁₂₈. Podobną do chymozyny specyficzność wobec β -kazeiny wykazują pepsyny wieprzowe i bydlęce, jakkolwiek ich aktywność wobec tego białka jest wyższa [77]. Hydrolizują one również szybko α_{s1} -kazeinę z uwolnieniem peptydu α_{s1} -I, który dalej już znacznie wolniej jest hydrolizowany do produktów innych niż otrzymuje się pod wpływem chymozyny [36]. Również mikrobiologiczne aspartylowe proteinazy wykazują znacznie wyższą aktywność wobec frakcji kazeinowych niż chymozyna [15, 47, 71, 92, 121, 126, 132]. Różnią się ponadto specyficznością lecz nie jest ona jeszcze poza nielicznymi przykładami dokładnie poznana.

Kobayashi i wsp. [55, 56] określili specyficzność jednego z dwóch enzymów koagulujących wytwarzanych przez grzyb *Irpex lacteus*, który też z powodzeniem zastosowano do produkcji sera Cheddar [57].

Specyficzność tego enzymu wobec wydzielonych frakcji kazeinowych przedstawiono na rysunku 2.

Wpływ aspartylowych proteinaz na przebieg dojrzewania i jakość serów

O przydatności enzymów koagulujących jako substytutów podpuszczki w technolgi serowarskiej decyduje stosunek ich zdolności koagula-

α -kazeina									
1	30 31	79 80	105 106	169					
PyrGlu-Glu-Gln-Tyr-Val-Leu---Val-Leu-Ser-Asp---Ser-Fen-Met-Ala---Ala-Val-OH									
<i>Irpeex lacteus</i>	↑								
chymozyna									
β -kazeina									
1	139 140	142 143	163 164 165 166	189 190	192 193				
H-Arg-Glu---Leu-Leu-Gln-Ser-Try-Met---Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln---Gln-Ala-Fen-Leu-Leu-Tyr-Gln---									
<i>Irpeex lacteus</i>	↑								209
chymozyna	↑				↑			↑	Ile-Val-OH
α_{s1} -kazeina									
1	8 9	23 24	103 104						
H-Arg-Pro-Liz---Ile-Liz-His-Gln-Gly-Leu---Leu-Arg-Fen-Val-Ala---Leu-Liz-Liz-Tyr-Liz-Val---									
<i>Irpeex lacteus</i>	↑								
chymozyna									
β -kazeina									
1	149 150	153 154	169 170	199					
-Pro-Glu-Leu-Fen-Arg-Gln---Arg-Gln-Fen-Tyr-Gln-Leu---Val-Pro-Leu-Gly-Tre-Gln---Pro-Leu-Try-OH									
<i>Irpeex lacteus</i>									
chymozyna									

Rys. 2. Porównanie specyficzności proteiny z *Irpeex lacteus* i chymozyny wobec frakcji kazeinowych [55, 56].

cyjnej do aktywności proteolitycznej a także zakres i głębokość degradacji parakazeiny w czasie dojrzewania serów. Podpuszczka w trakcie tego procesu prowadzi ograniczoną proteolizę białek [111]. W wyniku jej działania powstają wysokocząsteczkowe peptydy [43, 85, 87], których dalszy rozkład zachodzi pod wpływem enzymów bakteryjnych wprowadzonych z zakwasem [85, 87]. Degraduje ona głównie frakcję α_{s1} -kazeiny [22, 43, 61, 81, 136], jakkolwiek stopień tej degradacji zależy od typu sera [19, 36]. β -kazeina w serach jest bardzo wolno hydrolizowana pod wpływem chymozyny [25, 61, 136]. Przyczyną tego może być wysoka w nich zawartość NaCl, który jak wykazali Fox i Walley [35] hamuje proteolizę tej frakcji w większym stopniu niż frakcji α_{s1} . Rozkład β -kazeiny w czasie dojrzewania serów przypisuje się głównie endogennym proteinazom mleka. Frakcja α_{s2} [36] i para- κ -kazeina [81] natomiast nie ulegają rozkładowi.

Produkty degradacji pozostałych frakcji kazeinowych zawartych w serze obok produktów pochodzących z rozkładu laktozy i tłuszczu wpływają na wykształcenie typowych cech smakowo-zapachowych gotowego wyrobu. Niższej jakości sery — w porównaniu z podpuszczkowymi — uzyskuje się przy stosowaniu pepsyny wieprzowej jako enzymu koagulującego [109, 120]. Enzym ten w pH powyżej 6,0 jest niestabilny, dlatego też w mleku wykazuje znacznie niższą aktywność niż chymozyna [69], co prowadzi do wydłużenia czasu koagulacji mleka. Przy jego stosowaniu otrzymuje się skrzep gorszej jakości i o niższej wydajności, spowodowanej większymi ubytkami tłuszczu do serwatki [109, 110]. Według Green [38] i O'Keeffe i wsp. [86] pepsyna wieprzowa już w trakcie procesu technologicznego jest w znacznym stopniu inaktywowana, co w rezultacie jest przyczyną zbyt wolnej proteolizy białek w czasie dojrzewania serów wyprodukowanych przy jej udziale [38, 39, 69].

Jednak w serach zakwaszonych laktonem kwasu D-glukonowego degraduje ona parakazeinę znacznie intensywniej niż chymozyna [39]. Według Ma i Nakai [63] modyfikacja pepsyny karboksydiimidem powoduje znaczne podwyższenie zarówno jej stabilności jak i aktywności koagulującej przy zachowaniu niezmięnionej aktywności kazeinolitycznej.

Tak zmodyfikowana pepsyna może być lepszym substytutem podpuszczki niż natywny enzym. Obecnie pepsynę wieprzową najczęściej stosuje się w mieszaninie z podpuszczką w stosunku 50:50 [40] lub 40:60 [95] lub w mieszaninie z innymi enzymami pochodzenia mikroboiologicznego [52], uzyskując sery o jakości porównywalnej z serami podpuszczkowymi. Według Foxa [34] pepsyna bydlęca jest znacznie lepszym zamiennikiem podpuszczki niż pepsyna wieprzowa. Jest bardziej stabilna w mleku oraz wykazuje wobec kazeiny w pH 5,5 podobną aktywność jak chy-

można. Ser cheddar wyprodukowany przy jej udziale jest jakościowo zbliżony do podpuszczkowego [38], z drugiej strony jednak, jak wykazano [27] powoduje ona również obniżenie wydajności produktu. Znacznie gorszej jakości sery otrzymuje się przy zastosowaniu pepsyny kurzej, której niska specyficzność jest przyczyną intensywnej proteolizy para-kazeiny [41, 49]. Zastosowanie jej jednak w mieszaninie z podpuszczką w stosunku 30:70 pozwalało otrzymać sery o standardowej jakości [49]. Również proteinazy grzybowe intensywniej i mniej specyficznie degradują białka w serach. W porównaniu z chymozyną powodują znacznie głębszy rozkład zarówno frakcji α_s jak i β -kazeiny [25, 71, 132]. Proteinaza z *Endothia parasitica*, która wykazuje szczególnie wysoką aktywność proteolityczną, degradowe obok kazeiny również białka serwatkowe [75]. Proces dojrzewania serów wyprodukowanych przy jej udziale jest bardzo szybki [75, 112, 130], co powoduje, że ich jakość w wielu przypadkach jest niższa od jakości serów wyprodukowanych przy użyciu podpuszczki cielęcej [106, 130]. W serach tych obserwuje się również często występowanie goryczki spowodowane nagromadzeniem się gorzkich peptydów [111].

Sery otrzymane przy użyciu proteinazy z *M. pusillus* są jakościowo zbliżone do serów otrzymanych przy użyciu chymozyny [108, 140], jakkolwiek nadmierna aktywność proteolityczna wobec białek mleka już w trakcie procesu produkcyjnego powoduje często, podobnie jak w przypadku proteinazy z *Endothia parasitica*, obniżenie ich wydatku [40]. Niektóre handlowe preparaty tej proteiny zawierają również enzymy lipolityczne [108, 114] oraz celulolityczne [40]. Obecność lipaz wpływa na przyspieszenie procesu dojrzewania serów [108] ale ich nadmierna zawartość może być przyczyną powstawania wad smakowo-zapachowych [40], celulazy natomiast obniżają trwałość chust serowarskich [82], są więc dodatkiem niepożądanym.

Z licznych badań wynika, że najlepszym substytutem podpuszczki jest proteinaza z *M. miehei* [40]. Z powodzeniem zastosowano ją do produkcji różnych gatunków serów [66, 100, 107]. Jednak w porównaniu z chymozyną jak i innymi enzymami najczęściej stosowanymi do koagulacji kazeiny, wykazuje znacznie wyższą termostabilność [24, 131]. Zachowując swoją aktywność w serwatce spasteryzowanej stwarza pewne problemy w dalszym jej przerobieniu. Według Branner-Jorgensen i wsp. [10] przez oksydację tej proteiny można otrzymać bardziej termolabilny enzym i w efekcie lepszy substytut deficytowej chymozyny. Inne proteinazy, otrzymywane z *Byssochlamys fulva* [53] i z *Rhizopus oligosporus* [80] wywierają podobny efekt na przebieg procesu dojrzewania jak większość enzymów opisanych poprzednio.

Enzymy koagulujące pochodzenia bakteryjnego

Zdolność biosyntezy enzymów o właściwościach koagulujących wykazują również liczne gatunki bakterii szczególnie z rodzaju *Bacillus* jak *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyx*, *B. megaterium* i *B. mesentericus* [109]. Enzymy te w przeciwieństwie do kwaśnych chymozynopodobnych enzymów pochodzenia grzybowego są najczęściej proteinazami alkalicznymi lub obojętnymi o wysokiej aktywności proteolitycznej w porównaniu do aktywności koagulacyjnej, w związku z czym nie są najlepszymi substytutami podpuszczki [40, 110]. Dlatego też w tym aspekcie nie są tak dokładnie zbadane jak proteiny grzybowe. Proteiny produkowane przez *B. subtilis* [97, 98] i *B. subtilis* K-26 [93] są obojętnymi metalo-proteinazami. Enzymy te wykazują najwyższą aktywność i są najbardziej stabilne w środowisku lekko zasadowym. Ich aktywność podobnie jak i proteiny z *B. mesentericus* [60] jest hamowana związkiem chelatującym jony metali (EDTA). *B. subtilis* syntetyzuje ponadto alkaliczną proteinazę [97, 98], którą wykazano także u *B. polymyxa* [109]. Pierwszy z tych enzymów był aktywny w pH 5—10 i ulegał hamowaniu pod wpływem inhibitora z ziemniaka. Obok aktywności proteolitycznej wykazywał również aktywność esterazową. *B. subtilis* produkuje również w niewielkich ilościach proteinazę kwaśną [97], która jednak nie była szczegółowo badana. Badania przydatności proteinaz z wyżej wymienionych gatunków z rodzaju *Bacillus* wykazały, że enzymy te z uwagi na niską specyficzność powodują głęboką degradację kazeiny [13, 14, 51, 68, 70, 98, 105]. Szczególnie intensywnie degradują frakcję β -kazeiny. Zastosowanie do produkcji serów proteinaz z *B. subtilis* [99], z *B. subtilis* K-26 [103], z *B. polymyxa* [106] lub z *B. megaterium* i *B. cereus* [113] powoduje zatem niski wydatek produktu jak również szybki i często nietypowy proces dojrzewania, co w efekcie prowadzi do pogorszenia jego jakości.

Enzymy koagulujące roślin wyższych

Enzymy o właściwościach koagulujących wykazano również w różnych częściach anatomicznych niektórych roślin wyższych [109, 110, 111]. Najbardziej znane z nich to sulfhydrylowe proteiny — z *Carica papaya* — papaina i z *Ficus carica-ficyna* i z *Ananas sativa-bromelaina* [111]. Wykazują one wysoką aktywność wobec różnych substratów białkowych i peptydowych. Obok aktywności proteolitycznej posiadają również aktywność esterolityczną i transferazową [3, 62, 78]. Ta wysoka aktywność w tym również i kazeinolityczna nie pozwala jednak na wykorzystanie ich do produkcji serów [50, 110]. W drodze chemicznej modyfikacji kwa-

sem jodooctowym lub sorbowym można obniżyć ich aktywność proteolityczną, poprawiając właściwości koagulujące. Pozwala to na otrzymanie przy ich udziale prawidłowych skrzepów parakazeiny [50].

Źródłem enzymu koagulującego jest również gatunek *Wrightiana calysina*, wykorzystywany w Indonezji do wyrobu seropodobnego produktu pod nazwą „Litsusu” [88, 89, 90]. Enzym ten, o masie cząsteczkowej 69 kDa, wykazuje wysoką termostabilność [88]. Jest on wrażliwy na DFP i sojowy inhibitor trypsyny [89]. Spośród białek mleka najłatwiej hydrolizuje on α_s i κ -kazeinę, najslabiej natomiast β -laktoglobulinę [90].

Niektóre roślinne enzymy zastosowano z powodzeniem do produkcji niektórych gatunków sera np. proteinazę z *Solanum torvum*, która okazała się korzystna przy wyrobie sera Domiati, nie powodując ani obniżenia jego wydajności ani pogorszenia jakości [26].

Innym enzymem roślinnym tradycyjnie stosowanym w Portugalii do wyrobu serów Serra i Serpa z mleka owczego, jest proteinaza otrzymywana z kwiatów *Cynara cardunculus*. Enzym ten wykorzystany do produkcji serów z mleka krowiego powodował jednak zbyt szybką proteolizę białek w czasie dojrzewania, połączoną ze znacznym obniżeniem ich wydajności. W efekcie gotowe produkty wykazywały zbyt miękką konsystencję oraz charakteryzowały się gorzkim smakiem [6, 7, 133]. Jak dotąd nie znalazł również zastosowania w technologii serowarskiej enzym, otrzymywany z *Cirsium arvense*, który charakteryzuje się bardzo wysoką termostabilnością jak również wykazuje zbyt wysoką aktywność proteolityczną w porównaniu do aktywności koagulacyjnej [96].

LITERATURA

1. Alais C., Lagrange A.: *Le Lait* 52, 407—426, 1972.
2. Armia K.J., Iwasaki S.: *Meth. in Enzymol.* 19 t. 446—459, 1970.
3. Arnon R.: *Meth. in Enzymol.* 19 t., 226—244, 1970.
4. Asato N., Rand A.G.: *Analyt. Biochem.* 44, 32—41, 1971.
5. Asato N., Rand A.G.: *Biochem. J.* 129, 841—846, 1972.
6. Barbosa M. i in.: *Le Lait* 56, 1—17, 1976.
7. Barbosa M., Corradini C., Battistotti B.: *Neth. Milk Dairy J.* 35, 307—312, 1981.
8. Bech A.M., Foltman B.: *Neth. Milk Dairy J.* 35, 275—280, 1981.
9. Bohak Z.: *J. Biol. Chem.* 244, 4638—4648, 1969.
10. Branner-Jorgensen S., Eigtved P., Schneider P.: *Neth. Milk Dairy J.* 35, 361—364, 1981.
11. Chang W.J., Takahashi K.J.: *Biochem.* 74, 231—237, 1973.
12. Chang N.J., Takahashi K.J.: *Biochem.* 76, 467—474, 1974.
13. Choudhery A.K., Mikolajcik E.M.: *J. Dairy Sci.* 53, 363—366, 1970.
14. Choudhery A.K., Mikolajcik E.M.: *J. Dairy Sci.* 54, 321—325, 1971.

15. Chrzanowska J. Praca dysertacyjna. Akademia Rolnicza, Wrocław 1984.
16. Chu S.S.T., Nakagawa Y.: *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 625—629, 1982.
17. Creamer L.K., Mills O.E., Richards E.L.: *J. Dairy Res.* 38, 269—280, 1971.
18. Creamer L.K., Richardson B.C, N.Z.: *J. Dairy Sci. Technol.* 9,9—13, 1974.
19. Cramer L.K.: *J. Dairy Sci.* 58, 287—292, 1975.
20. Creamer L.K.: *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 11, 30—39, 1976.
21. Delfour A. i in.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 452—455, 1965.
22. Desmazeaud M.J. i in.: *Le Lait* 54, 379—396, 1976.
23. Drenth J.: *Neth. Milk Dairy J.* 35, 197—208, 1981.
24. Duersch J.W., Ernstrem C.A.: *J. Dairy Sci.* 57, 590, 1974.
25. Edwards J.L., Kosikowski F.U.: *J. Dairy Sci.* 52, 1675—1678, 1969.
26. El-Koussy L. i in.: *Agric. Res. Rev.* 54, 153, 157, 1976.
27. Emmons D.E.: *J. Dairy Sci.* 57, 590, 1974.
28. Etoh Y. i in.: *Agr. Biol. Chem.* 43, 209—215, 1979.
29. Etoh i in.: *Biochem.* 91, 747—753, 1982.
30. Etoh Y. i in.: *J. Biochem.* 91, 2039—2046, 1982.
31. Foltmann B.: *Meth. in Enzymol.* 19t, 421—431, 1970.
32. Foltmann i in.: *Biol. Chem.* 254, 8447—8456, 1979.
33. Foltmann B.: *Neth. Milk Dairy J.* 35, 233—231, 1981.
34. Fox P.F.: *J. Dairy Res.* 36, 427—433, 1969.
35. Fox P.F., Walley B.P.: *J. Dairy Res.* 38, 165—170, 1971.
36. Fox P.F.: *Neth. Milk Dairy J.* 35, 233—253, 1981.
37. Fruton J.S.: *Enzymes 3* (ed. Boyer), 120—165, 1971.
38. Green M.L.: *J. Dairy Res.* 39, 261—273, 1972.
39. Green M.L., Foster P.M.D.: *J. Dairy Res.* 41, 269—282, 1974.
40. Green M.L.: *J. Dairy Res.* 44, 159—188, 1977.
41. Green M.L., Valler, Kay J.: *J. Dairy Res.* 51, 334—340, 1984.
42. Green M. i in.: *J. Dairy Res.* 52, 281—286, 1985.
43. Gripon J.G. i in.: *Le Lait* 54, 502—516, 1975.
44. Hill R.D., Laing R.R.: *Biochem. Biophys. Acta* 99, 352—359, 1965.
45. Hill R.D., Hocking U.M.: *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.* 13, 195—201, 1978.
46. Hill R.D., Lahav E., Givol D.: *J. Dairy Res.* 147—153, 1974.
47. Houins G., Deroanne U., Coppens R.: *Le Lait* 53, 610—624, 1973.
48. Hsu I.N. i in.: *Nature* 226, 140—145, 1977.
49. Husek V., Dedek M.: *Neth. Milk Dairy J.* 35, 302—306, 1981.
50. Ilany (Feigenbaum) J., Netzer A.: *J. Dairy Sci.* 52, 43—46, 1969.
51. Itoh T., Thomasow J.: *Milchwiss.* 26, 671—675, 1971.
52. Jarmul I. i in.: *XXI Int. Dairy Congress vol. 1(1)*, 498, 1982.
53. Jędrychowski L. i in.: *Acta Alimen. pol.* 27, 29—38, 1977.
54. Kay J., Valler M.J.: *Neth. Milk. Dairy J.* 35, 281—286, 1981.
55. Kobayashi H. i in.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 1621—1631, 1985.
56. Kobayashi H., Kusakabe I., Murakami K.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 1611—1619, 1985.
57. Kobayashi H., Kusakabe I., Murakami K.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 1605—1609, 1985.
58. Koch W., Prokopek D., Krusch V.: *Kielev. Milchwirtsch. Forschungs,* 38, 193—197, 1986.

59. Kołaczowska M., Wieczorek M., Polanowski A.: *Eur. J. Biochem.* 132, 557—561, 1983.
60. Konowałow S.A., Drorokhow V.A.: *Prikl. Biochim. Mikrobiol.* 5, 131—136, 1969.
61. Ledford R.A., o'Sullivan A.C., Nath K.R.: *J. Dairy Sci.* 49, 1098—1104, 1966.
62. Liener I.E., Friedenson B.: *Meth. in Enzymol.* 19t, 261—273, 1970.
63. Ma C.Y., Nakai S.J.: *Dairy Sci.* 63, 705—714, 1980.
64. Marciniszyn J.Jr., Hartsuk J.A., Tang J.J.: *Biol. Chem.* 251, 7088—7094, 1976.
65. Martin P. i in.: *Biochem. Biophys. Acta* 612, 410—420, 1980.
66. Martens R.: *Milchwiss.* 28, 87—91, 1973.
67. Matsubara H., Feder J.J.: *Enzymes* 3 (ed. Boyer), 721—744, 1971.
68. Melachouris N.P., Tuckey S.L.: *J. Dairy Sci.* 51, 650—655, 1968.
69. Melachouris N.P., Tuckey S.L.: *J. Dairy Sci.* 47, 1—7, 1964.
70. Mesrob K., Stoeva P.: *Milchwiss.* 33, 483—486, 1978.
71. Mickelsen R., Fish N.L.: *J. Dairy Sci.* 53, 704—710, 1971.
72. Mizobe F., Takahashi K., Ando T.: *J. Biochem.* 73, 61—68, 1973.
73. Morihara K.: *Adv. Enzymol.* 41, 179—243, 1974.
74. Morihara K., Oka T.: *Arch. Biochem. Biophys.* 157, 561—572, 1973.
75. Moubois J.L.: *Mocquot G.: Le Lait* 52, 497—506, 1972.
76. Mulvihill D.M., Fox P.F.: *J. Dairy Res.* 46, 641—651, 1979.
77. Mulvihill D.M., Fox P.F.: *Milchwiss.* 34, 680—683, 1979.
78. Murachi T.: *Meth. in Enzymol.* 19t, 273—284, 1970.
79. Nakamura S., Takahashi K.: *J. Biochem.* 84, 1593—1600, 1978.
80. Nand K. i in.: *Nahrung* 24, 859—869, 1980.
81. Nath K.R., Ledford R.A.: *J. Dairy Sci.* 56, 710—715, 1973.
82. Nelson J.M.: *J. Dairy Sci.* 58, 1739—1750, 1975.
83. Oka T. i in.: *Agr. Biol. Chem.* 37, 1177—1184, 1973.
84. Oka T., Morihara K.: *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 552—559, 1973.
85. O'Keefe R.B., Fox P.P., Daly C.: *J. Dairy Res.* 43, 97—107, 1976.
86. O'Keefe A.M., Fox P.E., Daly K.: *J. Dairy Res.* 44, 335—343, 1977.
87. O'Keefe A., Fox P.P., Daly C.: *J. Dairy Res.* 45, 465—477, 1978.
88. Otani H. i in.: *Milchwiss.* 38, 531—534, 1983.
89. Otani i in.: *Milchwiss.* 39, 156—158, 1984.
90. Otani H. i in.: *Milchwiss.* 40, 137—139, 1985.
91. Ottesen M., Rickert N.: *Meth. in Enzymol.* 19t, 459—460, 1970.
92. Pacquet D., Alsis C.: *Milchwiss.* 33, 87—90, 1978.
93. Pellissier J.P., Mercier J.C., Ribadeau-Dumas B.: *Ann. Biol. Anim. Biophys.* 14, 343—362, 1974.
94. Polzhofer K.P.: *Tetrahedron* 28, 855—865, 1972.
95. Poznański S. i in.: *Przem. Spoż.* 27, 302—306, 1973.
96. Poznański S., Reps A., Pakulska E.: *Rocz. Inst. Przem. Mlecz.* 16/3, 47—57, 1974.
97. Puhan Z.: *J. Dairy Sci.* 52, 889, 1969.
98. Puhan Z.: *J. Dairy Sci.* 52, 1372—1378, 1969.
99. Puhan Z., Irvine D.M.: *J. Dairy Sci.* 56, 317—322, 1973.
100. Ramet J.P., Alais C.: *Le Lait* 52, 654—663, 1972.
101. Ramet J.P., Alais C.: *Le Lait* 53, 154—152, 1973.
102. Rao L.K., Mathur D.K.: *Biotechnol. Bioeng.* 21, 535—549, 1979.

103. Rao L.K., Mathur D.K.: *J. Dairy Sci.* 62, 378—383, 1979.
104. Raymond M.N., Bricas E.: *J. Dairy Sci.* 62, 1719—1725, 1979.
105. Rejs A. i in.: *Rocz. Inst. Przem. Mlecz.* 16/1, 27—39, 1974.
106. Rejs A. i in.: *Rocz. Inst. Przem. Mlecz.* 16/2, 5—20, 1974.
107. Rejs A.: *Zesz. Nauk. ART Olsztyn, Technol. Żywn.* 14, 271—313, 1979.
108. Richardson G.H. i in.: *J. Dairy Sci.* 50, 1066—1072, 1967.
109. Sardinias J.L.: *Adv. Appl. Microbiol.* 15, 39—73, 1972.
110. Sardinias J.L.: *Process Biochem.* 11, 10—17, 1976.
111. Scott R.: *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology* 3, 103—169, 1979.
112. Shovers J., Bavisotto V.S.: *J. Dairy Sci.* 50, 942—943, 1967.
113. Singh A. i in.: *J. Dairy Sci.* 50, 1886—1890, 1967.
114. Somkuti G.A.: *J. Dairy Sci.* 57, 591, 1974.
115. Smith R.A., Duncan M.J., Moir D.T.: *Science* 229, 1219—1223, 1985.
116. Sodek I., Hofmann T.: *Meth. in Enzymol.* 19t, 372—397, 1970.
117. Stanley D.W. i in.: *Can. Inst. Food Sci Technol. J.* 13, 97—102, 1980.
118. Stenberg M.Z.: *J. Dairy Sci.* 54, 159—167, 1971.
119. Sternberg M.: *Biochem. Biophys. Acta* 285, 383—392, 1972.
120. Sternber M.: *Adv. Appl. Microbiol.* 19, 135—157, 1976.
121. Sun P.S., Chu P.S.: *Biochem. Biophys. Acta* 568, 91—102, 1979.
122. Surgue R. i in.: *Bioch. Soc. Trans.* 13, 1146, 1985.
123. Takahashi K., Chang W.J.: *J. Biochem.* 73, 675—677, 1973.
124. Takahashi K., Chang W.J.: *J. Biochem.* 80, 497—506, 1976.
125. Takahashi K., Chang W.J., Arima K.: *J. Biochem.* 80, 61—67, 1976.
126. Tam J.J., Whitaker J.R.: *J. Dairy Sci.* 55, 1523—1531, 1972.
127. Tang J.: *T.B.S.* 1, 205—208, 1976.
128. Tang J.: i in.: *Nature* 271, 618—621, 1978.
129. Tang J.: *Mol. Cell. Biochem.* 26, 93—109, 1979.
130. Thomasow J., Mrowetz G., Schmanke E.: *Milchwiss.* 25, 211—217, 1970.
131. Thunell R.K., Duersch J.N., Ernstrom C.A.: *J. Dairy Sci.* 62, 373—377, 1979.
132. Vanderpoorten R., Weckx M.: *Neth. Milk Dairy J.* 26, 47—59, 1972.
133. Vieira de Sa F., Barbosa M.: *J. Dairy Res.* 39, 335—343, 1971.
134. Visser i in.: *Biochem. Biophys. Acta* 438, 265—272, 1976.
135. Visser S. i in.: *Biochem. Biophys. Acta* 481, 171—176, 1977.
136. Visser F.M.W., de Groot-Mostert A.E.A.: *Neth. Milk. Dairy J.* 31, 247—264, 1977.
137. Visser S., Slangen J.: *Neth. Milk Dairy J.* 31, 16—30, 1977.
138. Visser S.: *Neth. Milk Dairy J.* 35, 65—88, 1981.
139. Whitaker J.R.: *Meth. in Enzymol.* 19t, 436—445, 1970.
140. Wong W.P. i in.: *J. Dairy Sci.* 60, 1522—1526, 1977.

Materiały nadesłano do redakcji w styczniu 1988 r.