

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200190



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

458

ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑΣ  
ΧΗΜΙΚΟΥ

ΜΕΛΕΤΗ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΩΝ  
ΑΠΟ ΨΥΧΡΟΤΡΟΦΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ  
ΧΗΜΕΙΑΣ

Η έγκριση Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα.

(Ν. 5343 / 1932, άρθρο 202)



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ

Α. ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ

Α.1. ΜΕΛΟΣ

Α.2. ΥΠΟΜΟΝΗ

Α.3. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.4. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.5. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.6. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.7. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.8. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.9. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.10. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.11. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.12. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.13. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.14. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.15. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.16. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.17. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.18. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.19. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

Α.20. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

**Αφιερώνεται  
στους γονείς μου**

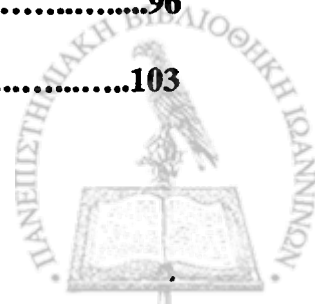


## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	i
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	iii
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ.....	15
A 1. Εισαγωγή.....	15
A 2. Ψυχρότροφα βακτήρια του νωπού γάλακτος.....	16
A 3. Έλεγχος ψυχροτρόφων βακτηρίων γάλακτος.....	19
A 4. Εξωκυτταρικές λιπάσες ψυχροτρόφων βακτηρίων γάλακτος.....	22
A 5. Εξωκυτταρικές πρωτεϊνάσες ψυχροτρόφων βακτηρίων γάλακτος.....	26
A 5.1. Κατάταξη πρωτεϊνασών.....	26
A 5.2. Ιδιότητες πρωτεϊνασών ψυχροτρόφων βακτηρίων γάλακτος.....	37
A 5.3. Επίδραση πρωτεϊνασών ψυχροτρόφων βακτηρίων στην ποιότητα προϊόντων γάλακτος.....	42
A 6. Πρωτεόλυση κατά την παρασκευή και ωρίμανση τυριών.....	45
A 6.1. Πρωτεΐνες γάλακτος.....	47
A 6.2. Πρωτεόλυση στα τυριά.....	49
A 7. Σκοπός της διατριβής.....	53
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
B 1. Απομόνωση και ταυτοποίηση ψυχροτρόφων στελεχών.....	55
B 2. Καθαρισμός ενζύμων.....	55
B 3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης.....	59
B 4. Προσδιορισμός πρωτεολυτικής δραστηριότητας.....	60
B 5. Χαρακτηρισμός ενζυμικών παρασκευασμάτων.....	63
B 5.1. Επίδραση θερμοκρασίας, pH και NaCl στη δραστηριότητα των ενζύμων.....	63



B 5.2.	Προσδιορισμός μοριακού βάρους ενζυμικών παρασκευασμάτων.....	64
B 5.3.	Προσδιορισμός ψευδαργύρου.....	65
B 5.4.	Κινητική υδρόλυσης ολικής καζεΐνης.....	65
B 5.5.	Επίδραση τροποποιητών στη δραστικότητα των ενζυμικών παρασκευασμάτων.....	66
B 5.6.	Επανενεργοποίηση αποενζύμων με μεταλλοϊόντα.....	67
B 6.	Θερμοανθεκτικότητα ενζυμικών παρασκευασμάτων.....	68
B 6.1.	Κατεργασίες σε χαμηλές θερμοκρασίες.....	68
B 6.2.	Κατεργασίες σε υψηλές θερμοκρασίες.....	71
B 7.	Υδρόλυση υποστρωμάτων.....	72
B 7.1.	Υδρόλυση καζεϊνών.....	72
B 7.2.	Υδρόλυση πεπτιδίων τυριών.....	75
B 7.3.	Δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης.....	77
B 8.	Υποστρώματα: καζεΐνες και πεπτίδια.....	78
B 8.1.	Καζεΐνες.....	78
B 8.2.	Πεπτίδια τυριών.....	78
B 9.	Έκφραση αποτελεσμάτων.....	79
Γ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	81
Γ 1.	Χαρακτηρισμός ψυχροτρόφων στελεχών.....	81
Γ 2.	Μελέτη εξωκυτταρικής πρωτεΐνάσης <i>Pseudomonas fluorescens</i> TR2.....	83
Γ 2.1.	Απομόνωση πρωτεΐνάσης.....	83
Γ 2.2.	Χαρακτηρισμός πρωτεΐνάσης.....	88
Γ 2.3.	Μελέτη θερμοανθεκτικότητας πρωτεΐνάσης.....	96
Γ 2.4.	Υδρόλυση υποστρωμάτων από την πρωτεΐνάση.....	103



<b>Γ 3. Μελέτη παρασκευάσματος εξωκυτταρικής πρωτεΐνωσης <i>Flavobacterium</i> spp. MTR3 .....</b>	<b>121</b>
<b>Γ 3.1. Καθαρισμός παρασκευάσματος πρωτεΐνωσης.....</b>	<b>121</b>
<b>Γ 3.2. Μελέτη ιδιοτήτων παρασκευάσματος πρωτεΐνωσης.....</b>	<b>121</b>
<b>Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>137</b>
<b>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>139</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>157</b>



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα ψυχρότροφα βακτήρια στην τεχνολογία του γάλακτος αποτέλεσε την αφορμή για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Τα ψυχρότροφα βακτήρια παράγουν εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και λιπάσες που επίφέρουν αλλοίωση στο γάλα και τα προϊόντα του. Από την άλλη πλευρά, είναι ενδεχόμενη η χρήση είτε επιλεγμένων στελεχών ψυχροτρόφων βακτηρίων είτε και ενζύμων τους στην παραγωγή προϊόντων γάλακτος.

Η ανάθεση του θέματος, όσο και η επίβλεψη της διδακτορικής διατριβής, έγινε από τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων Ιωάννη Ρούσση, τον οποίο ευχαριστώ θερμά. Ακόμη, τον ευχαριστώ για τη χρήση του εργαστηριακού παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων, ως υποστρώματος για το ένζυμο της μελέτης.

Επίσης, ευχαριστώ, ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, α) την Καθηγήτρια Μ. Σακαρέλλου για το ενδιαφέρον της, καθώς και για το ότι οι αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία έγιναν σε ερευνητικό εργαστήριο Πεπτιδοχημείας της ευθύνης της και β) τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ε. Παπαμιχαήλ για το ενδιαφέρον του, καθώς και για τον υπολογισμό της  $K_m$  με το στατιστικό πακέτο της Biosoft, που έγινε με τη βοήθειά του.

Ακόμη, ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Β. Καλφακάκου για την βοήθειά της στον προσδιορισμό του ψευδαργύρου με ατομική απορρόφηση σε ένζυμο που μελετήθηκε και τον Δρ. Χ. Αλεξόπουλο για την βοήθειά του στην επιτέλεση των αναλύσεων με υγρή χρωματογραφία.

Η μελέτη διεξήχθη σε ερευνητικό εργαστήριο του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων της ευθύνης του Επίκουρου Καθηγητή Ιωάννη Ρούσση. Επίσης, έγινε περιστασιακά χρήση οργάνων ερευνητικών εργαστηρίων Αναλυτικής Χημείας, Ανόργανης Χημείας, Βιοχημείας και Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας και Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής. Προς τούτο εκφράζω ευχαριστίες στον Επίκουρο Καθηγητή Μ. Δεμερτζή και στους Καθηγητές Ν. Χατζηλιάδη, Κ. Δραΐνα και Κ. Σακαρέλλο του Τμήματος Χημείας και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Β. Καλφακάκου της Ιατρικής Σχολής.





Επίσης, ευχαριστώ τους συναδέλφους μου Ε. Ματσέλη και Π. Κωνσταντίνου, οι οποίοι, επίσης εκπονούσαν στο ίδιο εργαστήριο και κατά την ίδια χρονική περίοδο τη διατριβή τους, για τη συμπαράσταση και την άψογη συνεργασία τους.

Ακόμη, ευχαριστώ τον θείο μου, Καθηγητή μαθηματικών Ν. Ραχμανίδη, για την υλική βοήθειά του και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και τον αδελφό του σύζυγο μου, Καθηγητή φυσικής Κ. Μπολονέζο για την βοήθειά του στην μορφοποίηση σχημάτων.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά, τον σύζυγό μου Ε. Μπολονέζο και τους γονείς μου Ε. Τριανταφυλλίδη και Ε. Τριανταφυλλίδου, για την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράστασή τους, χωρίς την οποία δεν θα είχα ολοκληρώσει την παρούσα μελέτη.



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BSA : αλβουμίνη βόδινου ορού

cfu : μονάδες (κύτταρα) που σχηματίζουν αποικία

-CN : καζεΐνη

DEAE : διαιθυλαμινοαιθυλ-

DEPC : πυροκαρβονικός διαιθυλεστέρας

DTB : 5,5-διθειο-2-δινιτροβενζοϊκό οξύ

DWSE : διαπυκνωμένο υδατικό εκχύλισμα

EDTA : αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ

EEDQ : N-αιθοξυκαρβονυλο-2-αιθοξυ-1,2-διυδροκινολίνη

HTST : παστερίωση (υψηλής θερμοκρασίας μικρού χρόνου)

IDF : διεθνής ομοσπονδία γάλακτος

Km : σταθερά Michaelis

LTI : αδρανοποίηση σε χαμηλή θερμοκρασία

NAI : N-ακετυλοϊμιδαζόλιο

PHMB : π-υδροξυ-υδραργυρο-βενζοϊκός εστέρας

PMSF : φαινυλο-μεθυλο-φθορο-σουλφονικό οξύ

RP-HPLC : υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης

SDS : δωδεκυλοξυ-θειικό νάτριο

SDS-PAGE : ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες

TCA : τριχλωρο-οξικό οξύ

TEMED : N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη

TFA : τριφθορο-οξικό οξύ

Tris : τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο

UHT : υπερυψηλή θέρμανση

Urea-PAGE : ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου παρουσία ουρίας

Urea-SDS-PAGE : ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου υπό μετουσιωτικές συνθήκες παρουσία ουρίας

WSE : υδατικό εκχύλισμα



## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

### A 1. Εισαγωγή

Σήμερα η ψύξη χρησιμοποιείται ευρέως για τη διατήρηση του νωπού γάλακτος. Το γάλα ψύχεται στα αγροκτήματα σε δεξαμενές ψύξης, στους 3 – 4°C, όπου και παραμένει υπό ψύξη για ποικίλο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, μεταφέρεται στις γαλακτοβιομηχανίες μέσα σε βυτιοφόρα που διαθέτουν ψύξη. Στις γαλακτοβιομηχανίες συνεχίζει να διατηρείται υπό ψύξη, μέχρι την τελική του επεξεργασία.

Η άμεση ψύξη του γάλακτος, είναι σημαντικός παράγοντας για τη μείωση της συνολικής χλωρίδας του και την επιμήκυνση του χρόνου ζωής του γάλακτος και προϊόντων του. Η ύπαρξη μεγάλων μονάδων παραγωγής και επεξεργασίας γάλακτος, ευνοεί το σωστό χειρισμό του νωπού γάλακτος και κατά συνέπεια την παραγωγή προϊόντων σταθερής και υψηλής ποιότητας.

Με την ψύξη του νωπού γάλακτος, περιορίζεται κυρίως η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, που είναι υπεύθυνα για την οξίνιση του γάλακτος, καθώς και των περισσότερων παθογόνων. Επίσης, έχει άμεσα οικονομικά πλεονεκτήματα, καθώς με αυτόν τον τρόπο μειώνεται το κόστος της μεταφοράς του γάλακτος, αφού δεν είναι απαραίτητο να μεταφέρεται άμεσα όλη η ποσότητά του, ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται και ομοιόμορφη τροφοδοσία στις γαλακτοβιομηχανίες.

Όμως, παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, η διατήρηση του νωπού γάλακτος σε θερμοκρασίες ψύξης δημιούργησε νέα προβλήματα. Αυτά, οφείλονται στην ανάπτυξη ψυχροτρόφων βακτηρίων, τα οποία προκαλούν σημαντική αλλοίωση του γάλακτος και προϊόντων του. Τα ψυχρότροφα βακτήρια μπορούν να πολλαπλασιάζονται στο ψυχόμενο γάλα σε θερμοκρασίες κοντά στους 0°C. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του νωπού γάλακτος σε θερμοκρασίες ψύξης, παρατηρείται αύξηση του συνολικού πληθυσμού των μικροοργανισμών στο γάλα, που ουσιαστικά οφείλεται στον πολλαπλασιασμό της ψυχρότροφης χλωρίδας.



Τα περισσότερα ψυχρότροφα βακτήρια καταστρέφονται με τις θερμικές κατεργασίες του γάλακτος, παστερίωση και UHT κατεργασία. Όμως, πολλά από αυτά παράγουν εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και λιπάσες. Τα ένζυμα αυτά δρουν σε ευρεία περιοχή θερμοκρασίας και pH και πολλά από αυτά είναι θερμοανθεκτικά και δρουν και μετά τη θερμική κατεργασία του γάλακτος. Οι πρωτεΐνες αυτές και οι λιπάσες, αποικοδομούν σημαντικά συστατικά του γάλακτος, πρωτεΐνες και λίπος, υποβαθμίζοντας τόσο το γάλα, όσο και προϊόντα του. Επίσης, ψυχρότροφα βακτήρια αναπτύσσονται ως επιμολύνσεις στα προϊόντα γάλακτος και παράγουν πρωτεΐνες και λιπάσες που μπορεί να επιφέρουν αλλοιώσεις στα διατηρούμενα υπό ψύξη προϊόντα.

Σήμερα τα ψυχρότροφα βακτήρια, λόγω των θερμοανθεκτικών ενζύμων που παράγουν, αποτελούν σημαντικό παράγοντα υποβάθμισης του γάλακτος και προϊόντων του.

## **A 2. Ψυχρότροφα βακτήρια του νωπού γάλακτος**

Ψυχρότροφοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στους 7°C ή και χαμηλότερα, ενώ η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι συνήθως μεγαλύτερη (IDF, 1976).

Σε χαμηλές θερμοκρασίες, τα ψυχρότροφα βακτήρια παράγουν αυξημένη αναλογία ακόρεστων λιπαρών οξέων στα ουδέτερα λιπίδια και φωσφολιπίδια, τα οποία αποτελούν κύρια συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης. Επειδή τα ακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν χαμηλότερο σημείο πήξης από τα κορεσμένα, το λίπος διατηρείται σε υγρή – κινητή φάση, επιτρέποντας έτσι τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης και κατ' επέκταση, την ανάπτυξη των βακτηρίων σε θερμοκρασίες ψύξης.

Στις χαμηλές θερμοκρασίες τα ψυχρότροφα βακτήρια έχουν βραδύτερους μεταβολικούς ρυθμούς από αυτούς που παρατηρούνται στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους. Από την άλλη πλευρά, δεν αναπτύσσονται σημαντικά σε θερμοκρασίες πάνω από τους 30 – 35°C.

Τα ψυχρότροφα βακτήρια που απαντούν στο γάλα είναι είτε θετικά κατά



Gram, είτε αρνητικά κατά Gram. Η κύρια όμως ψυχρότροφη χλωρίδα του γάλακτος, είναι αρνητικά κατά Gram ραβδία, με τα είδη του γένους *Pseudomonas* να αποτελούν μέχρι και το 50% του συνολικού αριθμού. Άλλα ψυχρότροφα βακτήρια που βρίσκονται στο νωπό γάλα, είναι τα είδη των γενών *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes Chromobacterium*, *Flavobacterium* και *Serratia*. Κυρίαρχο είδος του γένους *Pseudomonas* είναι το *P. fluorescens*. Άλλα είδη που συναντώνται, είναι τα *P. putida*, *P. fragi*, και *P. aeruginosa* (Suhren 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Champagne και συν. 1994, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Τα θετικά κατά Gram ψυχρότροφα βακτήρια συναντώνται σε μικρότερα ποσοστά στο νωπό γάλα. Τα περισσότερα από αυτά ανήκουν στο γένος *Bacillus*, που είναι σπορογόνα αερόβια βακτήρια. Άλλα γένη που απαντώνται είναι *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, και *Streptococcus*. Τα θετικά κατά Gram ψυχρότροφα βακτήρια, σε σύγκριση με τα αρνητικά κατά Gram, χαρακτηρίζονται είτε από μεγάλους χρόνους διπλασιασμού, είτε από μεγάλους χρόνους φάσης προσαρμογής. Έτσι, η σημασία τους στην αλλοίωση των προϊόντων γάλακτος είναι μικρότερη από εκείνη των Gram αρνητικών ψυχροτρόφων. Όμως, είδη του γένους *Bacillus* παράγουν αρκετά θερμοανθεκτικές πρωτεΐνες και λιπάσες. Επίσης, σημαντικός αριθμός προβλημάτων αλλοίωσης σε παστεριωμένα προϊόντα, οφείλεται σε θετικά κατά Gram θερμοανθεκτικά ψυχρότροφα βακτήρια (Suhren 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Champagne και συν. 1994, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Η μεγάλη πλειοψηφία των ψυχροτρόφων βακτηρίων που μελετήθηκαν είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Έχουν, όμως, απομονωθεί και μελετηθεί αναερόβια βακτήρια του γένους *Clostridium* (Suhren 1989).

Εκτός από τα βακτήρια, επίσης, αρκετά γένη μυκήτων και ζυμομυκήτων περιλαμβάνουν ψυχρότροφους αντιπροσώπους που μπορούν να επιφέρουν αλλοιώσεις στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Suhren 1989).

Το γάλα των υγιών ζώων κατά την έκκρισή του από τα αδενικά κύτταρα του μαστικού αδένου δεν περιέχει μικροοργανισμούς. Όμως, καθώς συγκεντρώνεται στις γαλακτοφόρους οδούς και ιδιαίτερα στο γαλακτοφόρο κόλπο, αποκτά μικρό αριθμό βακτηρίων. Τα βακτήρια αυτά ανήκουν κυρίως στα γένη *Streptococcus*, *Micrococcus*, αρνητικούς στην πηκτάση *Staphylococcus* και *Corynebacterium*



(Thomas και συν.1971). Μετά την άμελξή του, το γάλα επιμολύνεται από διάφορους μικροοργανισμούς. Αυτοί προέρχονται από τον θηλαίο πόρο του μαστού, το γύρω περιβάλλον του ζώου, το προσωπικό αλλά και τα σκεύη άμελξης. Από τον αριθμό και το είδος των μικροοργανισμών αυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό η ποιότητα του γάλακτος και των προϊόντων του, καθώς επίσης και οι αλλοιώσεις που ενδέχεται να υποστούν.

Ψυχρότροφα βακτήρια δεν έχουν βρεθεί σε γάλα που έχει ληφθεί ασηπτικά (Thomas και συν. 1971). Αυτά είναι επιμολύνσεις από τον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται, όταν δεν τηρούνται οι συνθήκες υγιεινής κατά την άμελξη του ζώου. Επίσης, μεγάλοι πληθυσμοί ψυχροτρόφων έχουν βρεθεί στο έδαφος, το νερό, τις ζωοτροφές, την κοπριά, στο μαστό και τη θηλή των ζώων, που συνιστούν πηγές επιμόλυνσης του γάλακτος (Suhren 1989, Phillips και Griffiths 1990). Ένα σημαντικό ποσοστό της αρχικής ολικής μικροβιακής χλωρίδας, 10 - 50%, οφείλεται σε τέτοιες επιμολύνσεις από ψυχρότροφα βακτήρια. Στη συνέχεια, σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα τα βακτήρια αυτά γίνονται κυρίαρχα κατά την αποθήκευση του γάλακτος υπό ψύξη. Έχει αναφερθεί ότι ξεκινώντας από έναν αρχικό πληθυσμό ψυχροτρόφων της τάξης του  $10^4$  cfu/ml, μετά από δύο ή τρεις μέρες σε θερμοκρασίες 5 - 7°C, ο πληθυσμός αυτός μπορεί να ξεπεράσει το  $10^6$  cfu/ml (Law και συν. 1979a). Επίσης, κατά την διατήρηση με ψύξη μεταβάλλεται η σύνθεση της «ψυχρότροφης» μικροχλωρίδας του νοπού γάλακτος (Rowe και συν. 2001).

Σημειώνεται ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες, τα ψυχρότροφα βακτήρια έχουν πάρα πολύ μεγάλη στατική φάση ανάπτυξης και έτσι μπορούν να επιζούν για μεγάλα διαστήματα σε υπολείμματα γάλακτος (Stead 1987, Suhren 1989).

Η ίδια η ανάπτυξη των ψυχροτρόφων δεν προκαλεί σημαντική αλλοίωση του γάλακτος. Τα προβλήματα αλλοίωσης προέρχονται από τα θερμοανθεκτικά εξωκυτταρικά ένζυμα, πρωτεϊνάσες και λιπάσες, που αυτά παράγουν. Τα ένζυμα αυτά δεν αδρανοποιούνται με την παστερίωση και την UHT κατεργασία του γάλακτος και έτσι παραμένουν δραστικά στο γάλα και προϊόντα του. Το γάλα είναι πολύ καλό θρεπτικό μέσο, τόσο για την ανάπτυξη των ψυχροτρόφων βακτηρίων, όσο και για την παραγωγή των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και λιπασών (Suhren



1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Champagne και συν. 1994, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Τα ψυχρότροφα βακτήρια παράγουν σημαντικά ποσά πρωτεϊνών και λιπασών σε θερμοκρασίες ψύξης, αν και η άριστη θερμοκρασία σύνθεσής τους είναι 20 – 30°C. Ο αερισμός, εκτός από την ανάπτυξη της πλειονότητας των ψυχροτρόφων βακτηρίων, φαίνεται ότι ευνοεί και την παραγωγή πρωτεϊνών από πολλά ψυχρότροφα στελέχη. Ακόμη, σε αεριζόμενες καλλιέργειες έχει αναφερθεί επίσης αύξηση και στην παραγωγή λιπασών, για αρκετά στελέχη ψυχροτρόφων. Έτσι, οι συνθήκες κατά τη συλλογή του γάλακτος ευνοούν σε σημαντικό βαθμό την παραγωγή των ενζύμων (Suhren 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Matselis και Roussis 1992, Matselis και Roussis 1998)

Η παραγωγή των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και λιπασών από ψυχρότροφα βακτήρια συμβαίνει κύρια στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης. Γενικά, μπορεί να λεχθεί ότι σημαντικά επίπεδα πρωτεϊνών και λιπασών παράγονται όταν τα επίπεδα των κυτταρικών πληθυσμών είναι  $10^6 - 10^7$  cfu/ml (Suhren 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Matselis και Roussis 1992, Matselis και Roussis 1998).

Τα ψυχρότροφα βακτήρια, με τις πρωτεΐνες και λιπάσες που παράγουν, μπορεί να επιφέρουν διάφορες αλλοιώσεις σε προϊόντα γάλακτος, όπως πίκρισμα και τάγγισμα. Όμως, η επίδραση των ψυχροτρόφων βακτηρίων σε προϊόντα από πρόβειο γάλα πιθανόν να είναι διαφορετική, όχι τόσο αρνητική είτε και θετική, από εκείνη σε προϊόντα από αγελαδινό γάλα. Επιπλέον, έχει αναφερθεί επιτυχής επιτάχυνση της ωρίμανσης του τυριού Cheddar, με προσθήκη πρωτεΐνης από στέλεχος *P. fluorescens* (Tye και συν. 1988).

### Α 3. Έλεγχος ψυχροτρόφων βακτηρίων γάλακτος

Ο καλύτερος τρόπος να αποφευχθεί η αλλοίωση του γάλακτος από τα ψυχρότροφα βακτήρια, είναι να αποκλειστεί η μόλυνσή του από αυτά. Όμως, αυτό είναι δύσκολο υπό τις πρακτικές συνθήκες που επικρατούν. Ωστόσο, με τήρηση καλών συνθηκών υγιεινής σε όλα τα στάδια παραγωγής και κατεργασίας του γάλακτος, μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα μόλυνσής του.



Η ελαχιστοποίηση του χρόνου διατήρησης του νωπού γάλακτος και η άμεση εφαρμογή ψύξης στους 3 – 4°C, θεωρούνται επίσης πρωταρχικά για τη διατήρηση της καλής ποιότητας του γάλακτος και προϊόντων του. Με την ψύξη επιμηκύνεται η φάση προσαρμογής και μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των ψυχροτρόφων βακτηρίων (Suhren 1989).

Η διατήρηση του γάλακτος στους 2°C φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στον έλεγχο της ανάπτυξης των ψυχροτρόφων βακτηρίων. Όμως, η διατήρηση του γάλακτος σε αυτή τη θερμοκρασία προκαλεί αποσύνδεση των καζεϊνών και μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς τις ιδιότητες του γάλακτος κατά την κατεργασία του (Banks 1990, Reimerdes 1982, Matselis και Roussis 1998).

Οι περισσότερες χρησιμοποιούμενες θερμικές κατεργασίες του γάλακτος, δηλαδή η παστερίωση (όπως 72°C, 15s) και η UHT κατεργασία (όπως 143°C, 3s) μειώνουν σε πολύ μεγάλο βαθμό τους πληθυσμούς των ψυχροτρόφων βακτηρίων. Το ίδιο επίσης επιτυγχάνεται με θερμική κατεργασία στους 130 – 145°C, <1s συνδυαζόμενη με ασηπτική συσκευασία, που παράγει υψηλής θέρμανσης παστεριωμένο γάλα με μεγαλύτερο χρόνο ζωής και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά παστεριωμένου γάλακτος (Sorhaug και Stepaniak 1991, Champagne και συν. 1994, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Το θέρμισμα (thermization) (60 – 66°C, 5 – 20s) μειώνει τους πληθυσμούς των ψυχροτρόφων βακτηρίων και επίσης επιφέρει καθυστέρηση στην ανάπτυξη των βακτηρίων που επιζούν. Σκοπός αυτής της μεθόδου, είναι να αυξηθεί ο χρόνος διατήρησης του νωπού γάλακτος μέχρι ο πληθυσμός των ψυχροτρόφων βακτηρίων να φτάσει σε επίπεδα ( $10^6$  –  $10^7$  cfu/ml) που παράγονται σημαντικά ποσά πρωτεϊνών και λιπασών. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν επιδρά στην ποιότητα του γάλακτος και των προϊόντων του (Skura 1989, Matselis και Roussis 1998).

Επιπροσθέτως, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι που αποσκοπούν κυρίως στη θανάτωση των ψυχροτρόφων βακτηρίων είτε στην αναστολή της ανάπτυξής τους, αλλά επίσης και στην αδρανοποίηση των πρωτεϊνών και λιπασών τους.

Η ενεργοποίηση του συστήματος λακτοπεροξειδάσης, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αναστολή ανάπτυξης των ψυχροτρόφων βακτηρίων. Το φυσικό





αυτό αντιμικροβιακό σύστημα του γάλακτος αποτελείται από το ένζυμο λακτοπεροξειδάση, τα θειοκυανιούχα και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η λακτοπεροξειδάση και τα θειοκυανιούχα βρίσκονται στο γάλα συνήθως σε επαρκείς ποσότητες, ενώ η συγκέντρωση των θειοκυανιούχων εξαρτάται από την τροφή του ζώου. Ο οριακός παράγοντας είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Η ενεργοποίηση του συστήματος λακτοπεροξειδάσης γίνεται με προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου και θειοκυανιούχων. Έχει γίνει χρήση της ενεργοποίησης του συστήματος λακτοπεροξειδάσης για αναστολή ανάπτυξης των ψυχοτρόφων στην παρασκευή τυριών από ψυγμένο πρόβειο γάλα (Stead 1986, Uceda και συν. 1994, Champagne και συν. 1994).

Τα γαλακτικά βακτήρια μπορούν να εμποδίζουν την ανάπτυξη των ψυχοτρόφων βακτηρίων. Η δράση τους θεωρείται ότι οφείλεται είτε στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, είτε και βακτηριοσινών. Με προσθήκη γαλακτικών βακτηρίων στο γάλα επιτεύχθηκε βελτίωση στην απόδοση και την υφή τυριών Cottage και Cheddar. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δημιουργία αλλοιώσεων στη γεύση και την οσμή του γάλακτος και των προϊόντων του (Mikolajcik 1979, Champagne 1990).

Πολλά συντηρητικά τροφίμων έχουν ελεγχθεί για την αποτελεσματικότητά τους στην αναστολή της ανάπτυξης των ψυχοτρόφων στο παστεριωμένο γάλα και στα προϊόντα του. Μεταξύ αυτών, το σορβικό κάλιο είναι αποτελεσματικός αναστολέας, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με  $H_2O_2$  (Mistry και Kosikowski 1985, Champagne και συν. 1994, Matselis και Roussis 1998).

Η κατεργασία του γάλακτος με  $CO_2$  αναστέλλει αποτελεσματικά την ανάπτυξη διάφορων στελεχών ψυχοτρόφων βακτηρίων και μειώνει την παραγωγή πρωτεϊνών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης, κατεργασία με  $CO_2$  έχει χρησιμοποιηθεί και σε παραγωγή τυριών (Sorhaug και Stepaniak 1991, Uceda και συν. 1994, Champagne και συν. 1994, Shah 1994, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Πολλές πρωτεΐνες και λιπάσες ψυχοτρόφων βακτηρίων είναι πιο ευαίσθητες σε κατεργασίες στους 50 – 65°C από ό,τι σε ισχυρότερες θερμικές κατεργασίες. Η αδρανοποίηση σε χαμηλές θερμοκρασίες (Low Temperature Inactivation, LTI) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε συνδυασμό με την UHT κατεργασία για αδρανοποίηση πρωτεϊνών και λιπασών από ψυχοτρόφα



βακτήρια. Κατ' αυτή, το γάλα θερμαίνεται στους 140°C για 5s και κατόπιν κρατείται στους 60°C για 5min (Bucky και συν. 1988). Όμως, άλλες μελέτες ανέφεραν ότι η αδρανοποίηση σε χαμηλές θερμοκρασίες ήταν λιγότερο επιτυχής στη διατήρηση της ποιότητας του UHT γάλακτος (Skura 1989, Sorhaug και Steraniak 1997).

Η χρήση ειδικών αναστολέων υδρολασών, όπως πεπτιδίων, για αδρανοποίηση των ενζύμων, η προσθήκη λυσοζύμης, είτε νισίνης και η βακτηριοκάθαρση για μείωση των βακτηριακών πληθυσμών, έχουν χρησιμοποιηθεί με θετικά αποτελέσματα για έλεγχο της δράσης των ψυχοτρόφων βακτηρίων. Επίσης, η εφαρμογή υψηλών πιέσεων μπορεί να είναι αποτελεσματική, τόσο στη μείωση των βακτηριακών πληθυσμών, όσο και των ενζυμικών δραστηριοτήτων (Phillips και Griffiths 1990, Garcia – Carenno 1996, Seyderhelm και συν. 1996, Sorhaug και Steraniak 1997). Ακόμη, έχουν χρησιμοποιηθεί συνδυασμοί διαφόρων παραμέτρων όπως θερμοκρασίας – ενεργότητας νερού – pH και θερμοκρασίας – υπερήχων (Braun και Fehlhaber 2002, Vercet και συν. 2002).

#### **A 4. Εξωκυτταρικές λιπάσες ψυχοτρόφων βακτηρίων γάλακτος**

Τα λιπολυτικά ένζυμα ή λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση των εστερικών δεσμών των καρβοξυλικών εστέρων. Είναι ένζυμα της τάξης 3., γνωστής με το όνομα υδρολάσες και ανήκουν στην υποκατηγορία 3.1.1. των υδρολασών εστερικών δεσμών καρβοξυλικών εστέρων.

Δρουν στην διεπιφάνεια λίπους – νερού, αν και μπορούν επίσης να υδρολύουν και διαλυτά υποστρώματα με χαμηλούς ρυθμούς. Η καταλυτική δράση των λιπασών θεωρείται ότι προχωράει σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η λιπάση αλληλεπιδρά με την επιφάνεια επαφής λίπους – νερού, ενώ στο δεύτερο στάδιο γίνεται κατάλυση εντός της περιοχής της επιφάνειας επαφής (ενδόφαση). Η δράση επομένως, των ενζύμων αυτών, είναι άμεση συνάρτηση όχι μόνο της χημικής δομής του υποστρώματος, αλλά και των φυσικών ιδιοτήτων της επιφάνειας επαφής στην οποία συμβαίνει η κατάλυση (Whitaker 1994).

Η αλληλεπίδραση της λιπάσης με την επιφάνεια επαφής, δεν είναι



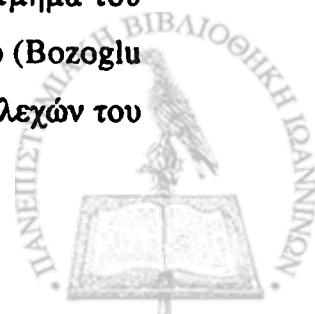
απαραίτητα συνδεδεμένη με την αντίληψη που υπάρχει για τη σύνδεση ενζύμου – υποστρώματος. Μπορεί η σύνδεση του ενζύμου με την επιφάνεια επαφής (προσρόφηση), να εμπλέκει ένα ή και περισσότερα μόρια υποστρώματος, ή ακόμη και άλλα μόρια, που δεν είναι υποστρώματα λιπάσης. Σε κάθε περίπτωση που δεν πραγματοποιείται η σύνδεση ενζύμου – επιφάνειας επαφής, δεν πραγματοποιείται και η κατάλυση. Η σύνδεση και η κατάλυση τροποποιούνται με την παρουσία φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια επαφής υποστρώματος – νερού (Whitaker 1994).

Οι περισσότερες μελετημένες λιπάσες είναι η παγκρεατική λιπάση και η λιπάση του γάλακτος. Τα δύο αυτά ένζυμα περιέχουν σουλφυδρυλομάδες και η δράση τους δεν αναστέλλεται από αναστολείς ενεργών (ή δραστικών) σερινών, ενώ το EDTA αποσταθεροποιεί την παγκρεατική λιπάση.

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει για λιπάσες ψυχοτρόφων βακτηρίων, αναφέρονται σε είδη του γένους *Pseudomonas*.

Τα μοριακά βάρη τους βρίσκονται στην περιοχή 16 έως 55kDa. Επίσης, έχουν αναφερθεί τιμές μεγαλύτερες από 100kDa, που πιθανόν όμως αντιστοιχούν σε συσσωματώματα. Η τιμή pH βέλτιστης δράσης τους βρίσκεται στην περιοχή 7 – 9, ενώ διατηρούν σημαντική δραστηριότητα στις φυσιολογικές τιμές pH του γάλακτος και των τυριών. Η άριστη θερμοκρασία δράσης τους, βρίσκεται στην περιοχή 30 – 50°C. Ωστόσο, διατηρούν σημαντικό μέρος της δραστηριότητάς τους σε θερμοκρασίες αποθήκευσης τυριών, ψύξης και κατάψυξης (Stead 1986, Sorhaug και Stepaniak 1991).

Οι λιπάσες από στελέχη του γένους *Pseudomonas* φαίνεται ότι αναστέλλονται με EDTA και λιπάσες κατεργασμένες με EDTA επανενεργοποιούνται με  $\text{Ca}^{2+}$  (Bozoglu και συν. 1984, Roussis και συν. 1988b, Abad και συν. 1993). Είναι πιθανό, οι λιπάσες από *Pseudomonas* να έχουν ως δραστική ομάδα το πρωτοταγές αλκοολικό υδροξύλιο της πλευρικής ομάδας της σερίνης, όπως συμβαίνει γενικά με τις λιπάσες (Maraganore και Heinrikson 1986, Roussis και συν. 1988a). Η μερική αναστολή από ειδικά αντιδραστήρια, όπως το ιωδοακεταμίδιο, ο π – υδροξυ – υδραργυρο – βενζοϊκός εστέρας, και η μερκαπτοαιθανόλη, υποδεικνύει ότι οι –SH / -S-S- ενώ δεν αποτελούν τμήμα του καταλυτικού κέντρου, συμμετέχουν στην ενεργό διαμόρφωση του μορίου (Bozoglu και συν. 1984, Roussis και συν. 1988a). Η λιπολυτική δραστηριότητα στελεχών του



γένους *Pseudomonas* φαίνεται να είναι δραστικότητα λιπάσης. Καθαρισμένο ένζυμο από στέλεχος *Pseudomonas* παρουσίαζε τριπλάσια δραστικότητα λιπάσης από ό,τι εστεράσης (Konstantinou και Roussis 1998).

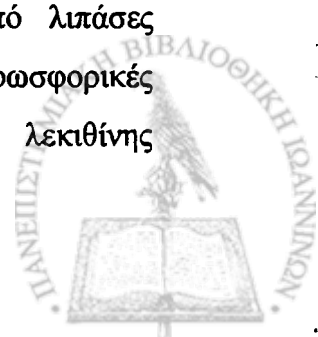
Λιπάσες από *P. fluorescens* και *P. fragi* εμφανίζουν προτίμηση στην υδρόλυση τριγλυκεριδίων με λιπαρά οξέα μικρής, είτε μεσαίας αλυσίδας. Λιπάση από *P. fragi* έχει αναφερθεί ότι υδρόλυε κατά προτίμηση τα τριγλυκερίδια στις θέσεις -1 και -3. Αντίθετα, λιπάση από *P. fluorescens* δεν έδειχνε τέτοια προτίμηση. Επίσης, έχει αναφερθεί προτίμηση υδρόλυσης μεταξύ εναντιομερών από λιπάσες από *P. fluorescens* (Stead 1986).

Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες των λιπασών από ψυχρότροφα βακτήρια, είναι η θερμοανθεκτικότητά τους. Πολλές είναι σταθερές στις κατεργασίες HTST ή ακόμη και UHT του γάλακτος (Stead 1986, Sorhaug και Stepaniak 1991). Λιπάσες ψυχροτρόφων βακτηρίων σε υπερκείμενα καλλιεργειών βρέθηκε ότι έχαναν 14,8 – 56,2% και 1,5 – 41,3% της δραστικότητάς τους μετά από κατεργασία στους 63°C για 30min και στους 72°C για 17sec αντίστοιχα (Kalogridou – Vassiliadou 1984). Όμως, πολλές λιπάσες ψυχροτρόφων βακτηρίων, παρά την θερμοανθεκτικότητά τους, εμφανίζουν αστάθεια σε χαμηλές θερμοκρασίες στην περιοχή 60 – 65°C (Stead 1986, Sorhaug και Stepaniak 1991). Η αδρανοποίηση λιπασών από στέλεχος *Pseudomonas* σε αυτή την περιοχή θερμοκρασιών, έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με αύξηση της φαινόμενης υδροφοβίας, πιθανόν λόγω μερικής μετουσίωσης των μορίων (Konstantinou και Roussis 1993, Konstantinou και Roussis 1998).

Παρουσία καζεΐνης λαμβάνει χώρα σύνδεση της μερικώς μετουσιωμένης λιπάσης με την καζεΐνη (Gasincova και συν. 1994).

Με αδρανοποίηση των ενζύμων των ψυχροτρόφων στους 60°C επιμηκύνονταν ο χρόνος διατήρησης του UHT γάλακτος (Bucky και συν. 1982). Αντίθετα, σε άλλες περιπτώσεις, κατεργασίες του γάλακτος σε χαμηλές θερμοκρασίες δεν ήταν αποτελεσματικές (Skura 1989, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Ορισμένα ψυχρότροφα βακτήρια του γάλακτος, εκτός από λιπάσες παράγουν και φωσφολιπάση C. Η φωσφολιπάση C ανήκει στις φωσφορικές υδρολάσες φωσφορικών διεστέρων. Καταλύει την διάσπαση της λεκιθίνης



υδρολύοντας τον εστερικό δεσμό μεταξύ της φωσφορικής ομάδας και της υδροξυλομάδας του τμήματος της γλυκερόλης. Σε αντίθεση με τις λιπάσες, οι φωσφολιπάσες, γενικά δεν χρειάζονται την χρήση γαλακτοματοποιητών, καθ' όσον τα ίδια τα υποστρώματα είναι έξοχα γαλακτοματοποιητικά μέσα.

Η λιπόλυση στο νωπό γάλα συχνά οφείλεται στη δράση της φυσικής λιπάσης του γάλακτος (Deeth και Fitz - Gerald 1976). Επίσης, αυξημένες συγκεντρώσεις ελεύθερων λιπαρών οξέων σε διατηρούμενο γάλα προκύπτουν από ανάπτυξη ψυχροτρόφων βακτηρίων.

Οι λιπάσες υδρολύουν το λίπος του γάλακτος και παράγουν ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία μεταβάλλουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του γάλακτος και προκαλούν την ανάπτυξη ταγγισμένης οσμής και γεύσης στα προϊόντα του. Συγκεκριμένα, λιπαρά οξέα με μήκος αλυσίδας C4 - C8 ευθύνονται για την ταγγή γεύση, C10 - C12 για τη σαπωνοειδή γεύση, ενώ C14 - C18 δεν συνεισφέρουν σε αλλοίωση οσμής και γεύσης. Με οργανοληπτική εξέταση γίνονται αντιληπτά από ειδικευμένους δοκιμαστές συνολικά ελεύθερα λιπαρά οξέα 1,2 - 1,5meq/100g λίπους, ενώ από το μέσο καταναλωτή 2,0 - 2,2meq/100g λίπους (Deeth και Fitz - Gerald 1976).

Για εμφάνιση λιπόλυσης στο γάλα έχει αναφερθεί ελάχιστος πληθυσμός ψυχροτρόφων βακτηρίων  $10^6 - 10^7$  cfu/ml. Υποβάθμιση γεύσης σε παστεριωμένο γάλα έχει αναφερθεί με προσθήκη ψυχροτρόφων βακτηρίων σε πληθυσμό  $5 \cdot 10^6$  cfu/ml, αλλά και  $10^3$  cfu/ml. Με επίδραση διαφόρων στελεχών *Pseudomonas* σε παστεριωμένο γάλα, διαπιστώθηκε αύξηση της τιμής της οξύτητας του λίπους και εμφάνιση τάγγισης, μετά από 2, 4, 8 και 14 ημέρες στους  $4^\circ\text{C}$ , ανάλογα με το στέλεχος (Stead 1986, Motar 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Οι λιπάσες των ψυχροτρόφων βακτηρίων προκαλούν αλλοίωση οσμής και γεύσης στο UHT γάλα. Με συσχέτιση του πληθυσμού ψυχροτρόφων στο νωπό γάλα και της απομένουσας λιπάσης σε UHT γάλα μετά από 4 μήνες στους  $20^\circ\text{C}$ , διαπιστώθηκε ότι, μόνο γάλατα με μικρούς πληθυσμούς ψυχροτρόφων πρέπει να χρησιμοποιούνται για παρασκευή UHT γάλακτος (Mottar 1981, Stead 1986, Mottar 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Sorhaug και Stepaniak 1997).



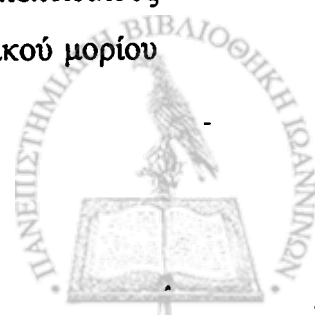
Η παρουσία θερμοανθεκτικών λιπασών ψυχοτρόφων βακτηρίων στο γάλα προκαλεί αλλοίωση της γεύσης και της οσμής σε τυριά. Σημειώνεται, ότι οι λιπάσες κατά την τυροκόμηση συγκεντρώνονται στο τυρόπηγμα. Κατά τη μελέτη δράσης ψυχοτρόφων βακτηρίων στο τυρί Cheddar παρατηρήθηκε τάγγιση στους 4 μήνες από την παρασκευή του (Law και συν. 1976). Τάγγιση παρατηρήθηκε, επίσης, σε ώριμο τελεμέ, που παρασκευάστηκε με γάλα διατηρημένο στους 4 – 5°C για 2 ημέρες (Kalogridou – Vassiliadou και Alichanidis 1984). Αντίθετα, σε τυρί Φέτα παρασκευασμένο με προσθήκη στελέχους *P. fluorescens*, ενώ υπήρχε αύξηση της λιπόλυσης δεν υπήρχε σημαντική οργανοληπτική υποβάθμιση (Roussis και συν. 1988b).

Μεγάλη πιθανότητα υποβάθμισης από τη δράση λιπασών ψυχοτρόφων βακτηρίων εμφανίζεται στην κρέμα, εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης λίπους, αλλά και της τάσης των λιπασών να συγκεντρώνονται στη λιπαρή φάση του γάλακτος. Λόγω της ικανότητας δράσης των λιπασών ψυχοτρόφων βακτηρίων σε χαμηλές ενεργότητες νερού, η παρουσία λιπάσης σε σκόνη γάλακτος μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις σε τρόφιμα που χρησιμοποιείται η σκόνη, αν αυτά περιέχουν λίπος και διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα (Stead 1986, Chen και συν. 2003).

## **A 5. Εξωκυτταρικές πρωτεϊνάσες ψυχοτρόφων βακτηρίων γάλακτος**

### **A 5.1. Κατάταξη πρωτεϊνασών**

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα ή πρωτεάσες καταλύουν την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες. Είναι ένζυμα της τάξης 3., γνωστής με το όνομα υδρολάσες και ανήκουν στην υποκατηγορία 3.4. των πεπτιδασών ή υδρολασών πεπτιδίων. Απαρτίζουν μια μεγάλη οικογένεια, στην οποία διακρίνουμε τις ενδοπεπτιδάσες ή πρωτεϊνάσες, που υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς σε σημεία που βρίσκονται στο εσωτερικό μέρος του πρωτεϊνικού μορίου



και τις εξωπεπτιδάσες, που απομακρύνουν αμινοξέα σταδιακά, είτε από το N – τελικό ή από το C – τελικό άκρο της πρωτεΐνης.

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα εμπλέκονται σε πάρα πολλές διεργασίες και η δράση τους μπορεί να διακριθεί σε δύο διαφορετικές κατηγορίες:

1) περιορισμένη πρωτεόλυση, κατά την οποία η πρωτεΐνάση υδρολύει μόνο έναν, ή μόνο έναν περιορισμένο αριθμό πεπτιδικών δεσμών της πρωτεΐνης – υποστρώματος και

2) μη περιορισμένη πρωτεόλυση, κατά την οποία οι πρωτεΐνες υποβαθμίζονται σταδιακά στα αμινοξέα από τα οποία αυτές αποτελούνται.

Η διεθνής ένωση βιοχημείας και μοριακής βιολογίας (International Union Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB, 1984) συνέστησε τη χρήση του όρου «πεπτιδάση» για τις υδρολάσες των πεπτιδικών δεσμών. Ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος όρος «πρωτεάση», είναι συνώνυμος με τον όρο «πεπτιδάση». Ο όρος «πρωτεΐνάση», επίσης, χρησιμοποιείται ως συνώνυμο της λέξης ενδοπεπτιδάση.

Σήμερα αναγνωρίζονται από την IUBMB, τέσσερις κατηγορίες πρωτεΐνασών, ανάλογα με τις δραστικές ομάδες που υπάρχουν στο ενεργό κέντρο τους και συμμετέχουν στην κατάλυση (μηχανισμό δράσης):

α) πρωτεΐνάσες σερίνης

β) πρωτεΐνάσες κυστεΐνης

γ) πρωτεΐνάσες του ασπαρτικού οξέος ή ασπαρτικές ενδοπεπτιδάσες

δ) μεταλλοπρωτεΐνάσες ή μεταλλο-ενδοπεπτιδάσες.

Επιπλέον, εκτός από αυτές τις τέσσερις, υπάρχει και μια ξεχωριστή κατηγορία, στην οποία κατατάσσονται πρωτεάσες των οποίων ο καταλυτικός μηχανισμός δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Αυτό υποδεικνύει την πιθανότητα να αναγνωριστούν και νέοι τύποι πρωτεασών.



### Πρωτεΐνάσες σερίνης

Οι πρωτεΐνάσες σερίνης, είναι αυτές που έχουν δραστική ομάδα την υδροξυλομάδα της σερίνης.

Η τάξη αυτή των υδρολασών, απαρτίζεται από δύο ξεχωριστές οικογένειες: α) την οικογένεια της χυμοτροψίνης, που περιλαμβάνει ένζυμα θηλαστικών όπως η χυμοτροψίνη, τρυψίνη ή ελαστάση ή καλλικρεΐνη και β) την οικογένεια της σαμπτιλίσίνης, που περιλαμβάνει ένζυμα βακτηρίων, όπως η σαμπτιλίσίνη. Γενικά, η τριτοταγής δομή για τις δύο αυτές οικογένειες είναι διαφορετική, όμως έχουν την ίδια γεωμετρία στο ενεργό τους κέντρο και έτσι η κατάλυση προχωράει με τον ίδιο μηχανισμό και για τις δύο. Οι πρωτεΐνάσες σερίνης επιδεικνύουν μεγάλη εξειδίκευση υποστρώματος, που σχετίζεται με τα αμινοξέα που υπάρχουν στις διάφορες περιοχές του ενζύμου και που αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα του υποστρώματος.

Τρία αμινοξέα, τα οποία σχηματίζουν μια καταλυτική τριάδα, είναι βασικά για την πορεία της κατάλυσης, για παράδειγμα His57, Asp102 και Ser195 (αρίθμηση στη χυμοτροψίνη). Τα αμινοξέα αυτά συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και η πόλωση του συστήματος αυτού, που είναι γνωστό ως «σύστημα μεταφοράς φορτίου», επειδή προκαλεί αρνητική φόρτιση στην καρβοξυλομάδα, κάνει το υδροξύλιο της σερίνης πυρηνόφιλο και ικανό να προσβάλλει τα υποστρώματα.

Το πρώτο βήμα για την κατάλυση, είναι ο σχηματισμός ενός ενδιάμεσου – ακυλο-ενζύμου, μεταξύ του υποστρώματος και της σερίνης στο ενεργό κέντρο. Αυτό το ομοιοπολικό ενδιάμεσο, σχηματίζοντας ένα αρνητικά φορτισμένο τετράεδρο, δημιουργεί μια νέα μεταβατική κατάσταση, η οποία ακολουθείται από την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου βήματος, της απο – ακυλίωσης, το ενδιάμεσο ακυλο-ένζυμο υδρολύεται από ένα μόριο νερού, οπότε ελευθερώνεται το πεπτίδιο και επανακτάται από το ένζυμο η υδροξυλομάδα της σερίνης. Η απο – ακυλίωση, η οποία επίσης συμπεριλαμβάνει το σχηματισμό ενός τετραέδρου ως μεταβατική κατάσταση, ακολουθεί ακριβώς τα αντίστροφα στάδια της ακυλίωσης. Σ' αυτήν την περίπτωση, ένα μόριο νερού είναι το προστιθέμενο πυρηνόφιλο, αντί της σερίνης. Η ιστιδίνη αποτελεί το δέκτη ενός υδρογονοϊόντος από την υδροξυλομάδα της σερίνης.



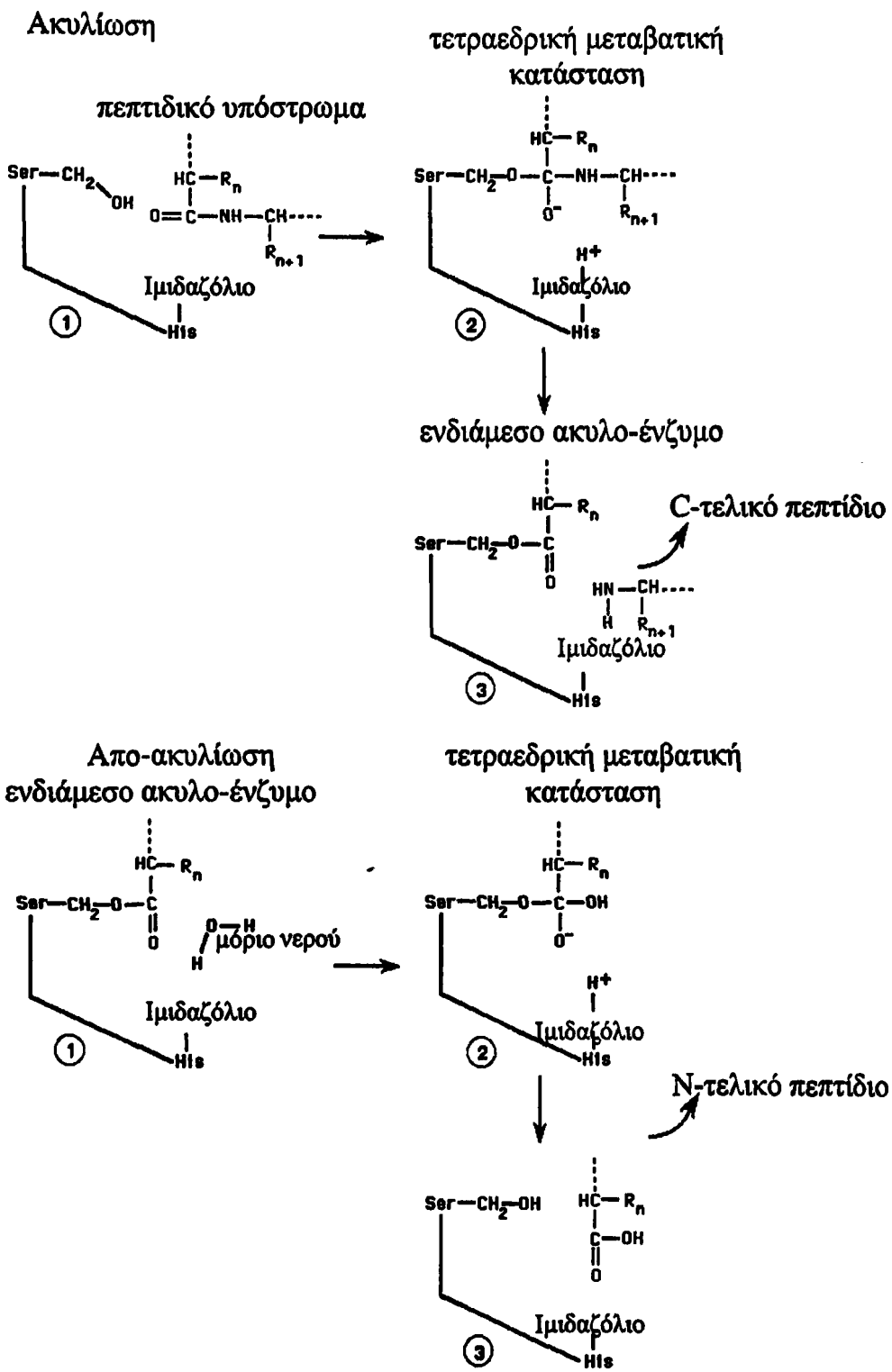


Ουσιαστικά πάντως, ο μηχανισμός δράσης των πρωτεασών σερίνης, βασίζεται σε πυρηνόφιλη προσβολή του προς υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού από μια σερίνη. Μόρια κυστεΐνης, θρεονίνης ή νερού, που συνδέονται με ασπαρτικό οξύ ή μέταλλα, μπορεί επίσης να έχουν κάποιο ρόλο. Σε πολλές περιπτώσεις, ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας της ομάδας, ενισχύεται από την παρουσία μιας ιστιδίνης που δρα σαν δέκτης ενός πρωτονίου από ένα ασπαρτικό οξύ.

Οι πρωτεΐνάσες σερίνης, αναστέλλονται από ομοιοπολικούς αναστολείς, όπως το διϊσοπροπυλοφθοριοφωσφορικό ιόν, που και αυτοί ακυλιώνουν το ένζυμο κατά παρόμοιο τρόπο, όπως και το υπόστρωμα.

Σχηματικά, ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης των πρωτεΐνασών σερίνης, φαίνεται παρακάτω:





Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνών σερίνης



### Πρωτεΐνάσες κυστεΐνης

Η οικογένεια αυτή συμπεριλαμβάνει πρωτεΐνάσες φυτών όπως η παπαΐνη, ακτινιδίνη ή βρωμελαΐνη, αρκετές λυσοσωματικές καθεψίνες θηλαστικών, τις κυτοσολικές καλπαΐνες (ενεργοποιούμενες από ασβέστιο), όπως επίσης και αρκετές παρασιτικές πρωτεάσες. Η παπαΐνη είναι το πιο μελετημένο μέλος της οικογένειας.

Το ενεργό κέντρο των πρωτεΐνασών κυστεΐνης, όπως η παπαΐνη, οριοθετείται αυστηρά και σχηματίζεται από τρία αμινοξέα: την Cys25, His159 και Asn175 (μέτρηση στην παπαΐνη). Η Cys25 και η His159 σχηματίζουν ένα ιοντικό ζευγάρι που σταθεροποιείται από την Asn175, μέσω ενός δεσμού υδρογόνου. Η τριάδα αυτή φαίνεται να έχει κάποιες ομοιότητες με την καταλυτική τριάδα που υπάρχει στο ενεργό κέντρο των πρωτεΐνασών σερίνης (Ser, His, Asp). Ωστόσο, σε αντίθεση με τις πρωτεΐνάσες σερίνης, το πυρηνόφιλο αμινοξύ της κυστεΐνης, έχει ήδη ιονιστεί πριν τη δέσμευση του υποστρώματος. Για το λόγο αυτό, οι πρωτεΐνάσες κυστεΐνης, μπορούν να θεωρηθούν ως «εκ των προτέρων» ενεργοποιημένα ένζυμα.

Κατά την υδρόλυση των πεπτιδίων, το πυρηνόφιλο θειούχο ιόν της κυστεΐνης, προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του δεσμού που πρόκειται να υδρολυθεί από το δεσμευμένο υπόστρωμα και σχηματίζει ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο. Το ενδιάμεσο αυτό σταθεροποιείται από την ονομαζόμενη «τρύπα οξυανιόντος» (oxyanion hole). Στη συνέχεια το τετραεδρικό ενδιάμεσο αυτό, μετασχηματίζεται σε ακυλο – ένζυμο (θειολοεστέρας ενζύμου – υποστρώματος) με ταυτόχρονη απελευθέρωση του C – τελικού τμήματος του υποστρώματος (ακυλίωση). Το βήμα αυτό ακολουθείται από την υδρόλυση του ακυλο-ενζύμου με νερό και το σχηματισμό ενός δεύτερου τετραεδρικού ενδιάμεσου, το οποίο τελικά διασπάται στο ελεύθερο ένζυμο και στο N – τελικό τμήμα του υποστρώματος (αποακυλίωση).

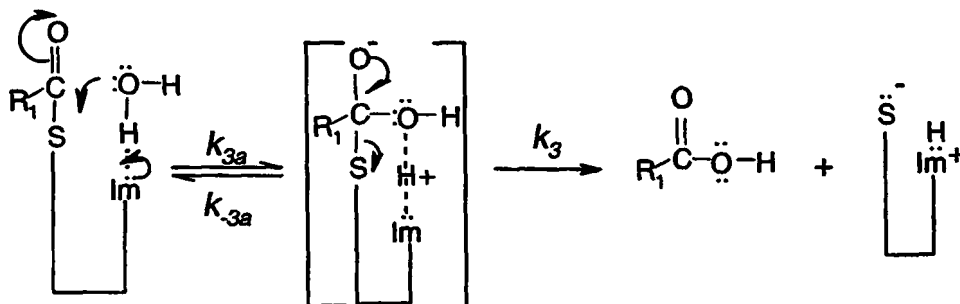
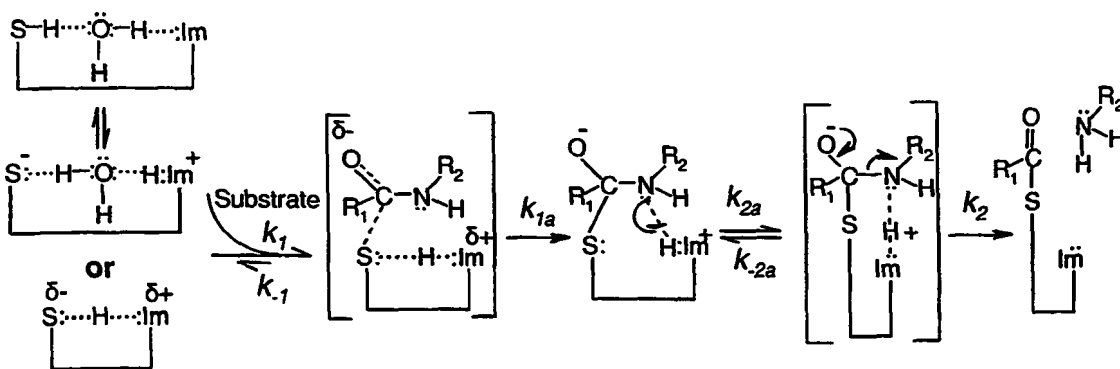
Ο καταλυτικός μηχανισμός των πρωτεΐνασών κυστεΐνης έχει διασαφηνιστεί πληρέστερα μόλις πρόσφατα. Κινητικές μελέτες με χρήση ισοτόπων, υποδεικνύουν ότι το αρχικό σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος ήδη αντιπροσωπεύει ένα τετραεδρικό κανάλι και ότι η βασικότητα του ατόμου του αζώτου του δεσμού που υδρολύεται προωθεί το σχηματισμό του ακυλο – ενζύμου. Επιπλέον, θεωρείται ότι



η μεταφορά πρωτονίου κατά την ακυλίωση (από το ιμιδαζολικό κατιόν στο άζωτο του δεσμού που υδρολύεται) και κατά την αποακυλίωση (από το πυρηνόφιλο μόριο του νερού στο άκυλο – ένζυμο), αντίστοιχα, είναι συνδυασμένες δράσεις, παρά ότι ακολουθούν η μία την άλλη.

Οι πρωτεΐνες κυστεΐνης αναστέλλονται από τα θειολο-αντιδραστήρια, όπως ο π-χλωρο-υδραργυρο-βενζοϊκός εστέρας, το ιωδοακεταμίδιο και τα βαρέα μέταλλα. Τα ένζυμα αυτά, έχουν στο ενεργό τους κέντρο ως δραστική ομάδα, τη σουλφιδρυλομάδα μιας κυστεΐνης.

Σχηματικά, ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης των πρωτεΐνασών κυστεΐνης, φαίνεται παρακάτω:



Μηχανισμός δράσης πρωτεΐνασών κυστεΐνης



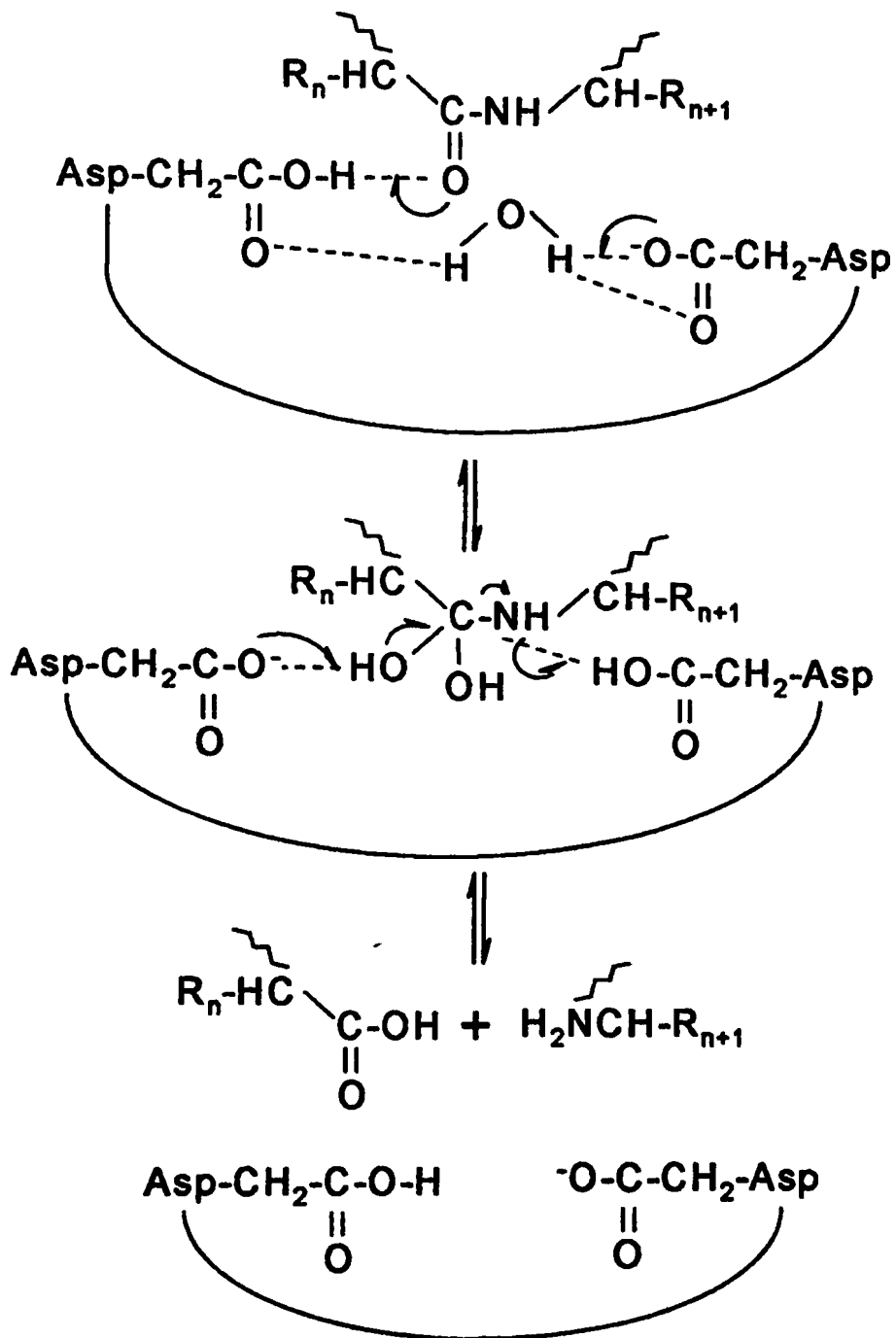
### Πρωτεΐνάσες ασπαρτικού οξέος

Οι περισσότερες πρωτεΐνάσες αυτής της κατηγορίας, ανήκουν στην οικογένεια της πεψίνης. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει ένζυμα πέψης όπως η πεψίνη και η χυμοζίνη, καθώς επίσης και λυσοσωματικές καθεψίνες D, ένζυμα όπως η ρεννίνη και τέλος αρκετές πρωτεάσες μυκήτων (πενικιλοπεψίνη, ενδοθειαιπεψίνη). Μια δεύτερη οικογένεια, αυτής της κατηγορίας, απαρτίζεται από πρωτεΐνάσες ιών, όπως η πρωτεΐνάση του ιού του AIDS (HIV), γνωστή ως ρетроπεψίνη. Το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών, περιέχει δύο μόρια ασπαρτικού οξέος και ένα βασικό αμινοξύ, το οποίο μπορεί να είναι αργινίνη ή λυσίνη. Πιθανή είναι και η εμπλοκή της τυροσίνης. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι τα ένζυμα αυτά είναι διπλά μόρια, με το ενεργό τους κέντρο τοποθετημένο ανάμεσα σε δύο ομόλογους «λοβούς». Κάθε ένας λοβός, συμβάλλει με ένα ασπαρτικό οξύ, στην καταλυτική ενεργή δυάδα των ασπαρτικών οξέων. Η γεωμετρία της θέσης των ασπαρτικών οξέων αυτών, σχετίζεται άμεσα με τη δραστηριότητα του ενζύμου. Στο ενεργό ενζυμικό μόριο και στην άριστη περιοχή τιμών pH, που κυμαίνεται μεταξύ 2 και 3, το ένα ασπαρτικό οξύ ιονίζεται, ενώ το άλλο όχι. Οι ρетроπεψίνες από την άλλη μεριά, είναι μονομερείς, αλλά για το σχηματισμό ενεργού ενζύμου, απαιτείται διμερισμός.

Σε αντίθεση με τις πρωτεάσες σερίνης και κυστεΐνης, η κατάλυση από πρωτεάσες του ασπαρτικού οξέος, δεν περιλαμβάνει ομοιοπολικό ενδιάμεσο, αν και υπάρχει ένα τετράεδρο ενδιάμεσο. Η πυρηνόφιλη προσβολή επιτυγχάνεται με δύο ταυτόχρονες μεταφορές πρωτονίων: μία από ένα μόριο νερού στη δυάδα των δύο καρβοξυλομάδων και άλλη μία από τη δυάδα των καρβοξυλομάδων, στο καρβονυλικό οξυγόνο του υποστρώματος με σύγχρονη υδρόλυση του δεσμού CO – NH. Μια τέτοια κατάλυση οξέως – βάσης, οδηγεί στο σχηματισμό ενός ουδέτερου τετραέδρου ως ενδιάμεσο.

Σχηματικά ο μηχανισμός δράσης των πρωτεϊνών αυτής της κατηγορίας, φαίνεται παρακάτω.





Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνικών ασπार्टικού οξέος

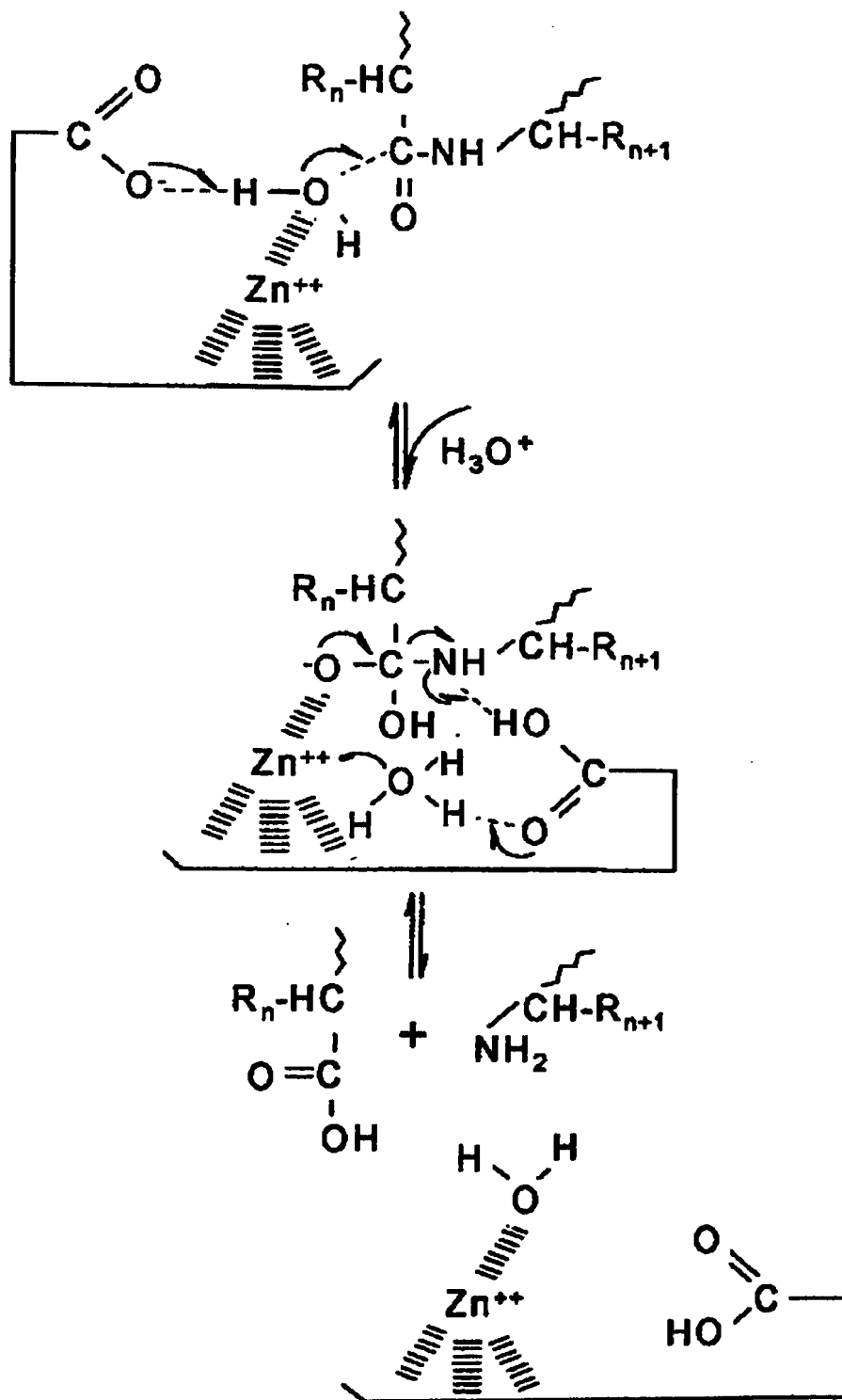


### Μεταλλοπρωτεΐνάσες

Ίσως οι μεταλλοπρωτεΐνάσες είναι μια από τις παλαιότερες κατηγορίες των πρωτεΐνσών. Βρίσκονται σε βακτήρια, μύκητες, αλλά και σε ανώτερους οργανισμούς. Διαφέρουν ευρέως στην αλληλουχία τους και στη δομή τους, αλλά στην πλειοψηφία τους, τα ένζυμα αυτά περιλαμβάνουν ένα άτομο ψευδαργύρου, το οποίο είναι καταλυτικά ενεργό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ψευδάργυρος μπορεί να αντικαθίσταται από άλλο μέταλλο, όπως κοβάλτιο ή νικέλιο, χωρίς απώλεια της δραστηρότητας του ενζύμου. Η βακτηριακή θερμολυσίνη, ένζυμο της κατηγορίας αυτής, έχει μελετηθεί και χαρακτηριστεί καλά και η κρυσταλλογραφική της δομή υποδεικνύει ότι ο ψευδάργυρος ενώνεται με δύο ιστιδίνες και ένα γλουταμινικό οξύ. Πολλά ένζυμα περιλαμβάνουν αλληλουχία, που δίνει δύο ligands (υποκαταστάτες) ιστιδίνης για τον ψευδάργυρο, ενώ ένας τρίτος ligand είναι είτε ένα γλουταμινικό οξύ, ή μια ιστιδίνη. Άλλες οικογένειες επιδεικνύουν έναν συγκεκριμένο τρόπο δέσμευσης του ατόμου του ψευδαργύρου. Ο καταλυτικός τους μηχανισμός οδηγεί σε σχηματισμό ενός μη ομοιοπολικού τετραέδρου ως ενδιάμεσο, μετά την προσβολή από ένα μόριο νερού δεσμευμένο στον ψευδάργυρο, στην καρβονυλομάδα του δεσμού που πρόκειται να υδρολυθεί. Αυτό, το ενδιάμεσο, καταρρέει στη συνέχεια με τη μεταφορά ενός πρωτονίου από το γλουταμινικό οξύ στην αποχωρούσα ομάδα.

Σχηματικά ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης των μεταλλοπρωτεΐνσών, φαίνεται παρακάτω:





Μηχανισμός δράσης μεταλλοπρωτεϊνών





## A 5.2. Ιδιότητες πρωτεϊνικών ψυχροτρόφων βακτηρίων γάλακτος

Οι πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί περισσότερο μεταξύ των ψυχροτρόφων βακτηρίων γάλακτος είναι του γένους *Pseudomonas* και κυρίως του είδους *P. fluorescens*. Τούτο είναι φυσικό, καθ' όσον στη ψυχρότροφη χλωρίδα του γάλακτος κυριαρχεί το γένος *Pseudomonas*, με κύριο το *P. fluorescens*. Επίσης, έχουν αναφερθεί μελέτες για πρωτεΐνες από άλλα γένη, κυρίως *Aeromonas*, *Serratia* και *Bacillus*. Μελέτες σχετικές με πρωτεΐνες από στελέχη του γένους *Flavobacterium* έχουν αναφερθεί μόνο λίγες (Fairbairn και Law 1986a, Fox και συν. 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Sorhaug και Stepaniak 1997).

### Εξωκυτταρικές πρωτεΐνες από στελέχη *P. fluorescens* και *Pseudomonas* spp.

Η πλειοψηφία των στελεχών *P. fluorescens* παράγουν μία κύρια πρωτεΐνη. Στελέχη *Pseudomonas* παράγουν δύο έως πέντε πρωτεΐνες. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα πολυενζυμικά αυτά συστήματα αποτελούνται από ουδέτερες και αλκαλικές ανοσολογικά μη σχετιζόμενες μεταλλο-πρωτεΐνες, ενώ σε άλλες συνίστανται από πρωτεΐνες σερίνης και μεταλλο-πρωτεΐνες (Fox και συν. 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991).

Οι περισσότερες πρωτεΐνες στελεχών *P. fluorescens* είναι ουδέτερες μεταλλο-πρωτεΐνες. Έτσι, χάνουν τη δραστηριότητά τους μετά από διαπίδυση με χηλωτικά αντιδραστήρια, όπως το EDTA. Η αναστολή της δράσης των πρωτεϊνών αυτών από την ο - φαινανθρολίνη υποδεικνύει τον ρόλο των  $Zn^{2+}$  στην ενζυμική δραστηριότητα. Τα αποένζυμά τους ενεργοποιούνται με  $Zn^{2+}$  αλλά και  $Ca^{2+}$ . Περιέχουν στο μόριό τους ψευδάργυρο, 1gatom/mole και ασβέστιο 6 - 8gatom/mole, που θεωρείται ότι συμμετέχει στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενζυμικού μορίου (Fairbairn και Law 1986a, Sorhaug και Stepaniak 1991). Επίσης, οι πρωτεΐνες αυτές δεν αναστέλλονται με ειδικούς αναστολείς άλλων κατηγοριών πρωτεϊνών, όπως σερίνης και κυστεΐνης (Stepaniak και Sorhaug 1989).

Από την άλλη πλευρά, ορισμένες πρωτεΐνες στελεχών *P. fluorescens* αναστέλλονται με PHMB και παρουσιάζουν συμπεριφορά πρωτεϊνών κυστεΐνης



(Alichanidis και Andrews 1977, Patel και συν. 1983a, Fairbairn και Law 1986b, Roussis και συν. 1990). Επίσης, πρωτεΐνάση στελέχους *P. fluorescens*, που ήταν ευαίσθητη στο EDTA, παρουσίαζε συμπεριφορά παρόμοια με της τρυψίνης (Yan και συν. 1985).

Οι περισσότερες πρωτεΐνάσες στελεχών *P. fluorescens* έχουν μοριακό βάρος 38.000 – 48.000Da και συνίστανται από μία πεπτιδική αλυσίδα. Με ελάχιστες εξαιρέσεις, δεν περιέχεται κυστεΐνη / κυστίνη στο μόριο των ενζύμων. Έχει αναφερθεί σημαντική ομοιότητα στη σύσταση αμινοξέων για αρκετά από αυτά τα ένζυμα (Fairbairn και Law 1986a, Fox και συν. 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991).

Η άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας των πρωτεΐνασών από στελέχη *Pseudomonas* βρίσκεται στην περιοχή 30 – 50°C και κυρίως γύρω στους 45°C (Fairbairn και Law 1986a, Fox και συν. 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991). Όμως, έχει αναφερθεί άριστη θερμοκρασία δραστηριότητας για πρωτεΐνάση στελέχους *Pseudomonas* στους 65°C (Malik και Mathur 1984). Η ενέργεια ενεργοποίησης για την υδρόλυση της καζεΐνης από πρωτεΐνάσες στελεχών *P. fluorescens* είναι μικρή, πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη των μεσόφιλων μικροοργανισμών. Έτσι, τα ένζυμα από στελέχη *Pseudomonas* αυτά παρουσιάζουν συνήθως πάνω από το 15% της μέγιστης δραστηριότητάς τους στους 4°C. Τούτο είναι πολύ σημαντικό στην τεχνολογία του γάλακτος, καθ' όσον το νωπό γάλα και τα περισσότερα προϊόντα του γάλακτος διατηρούνται υπό ψύξη (Patel και συν. 1983a, Jackman και συν. 1983, Fairbairn και Law 1986a, Mitchell και Marshall 1989a, Fox και συν. 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Το άριστο pH δραστηριότητας πολλών πρωτεΐνασών από στελέχη *Pseudomonas* κυμαίνεται στην περιοχή από 6,5 – 8,0, ενώ έχουν αναφερθεί και αλκαλικές πρωτεΐνάσες (άριστο pH > 8,0). Πάντως, σε pH μεγαλύτερο από 7,0 η καζεΐνη βρίσκεται σε συσσωματώματα μικρότερου μοριακού βάρους από ό,τι σε pH 7,0 και έτσι το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι πιο διαθέσιμο στη δράση πρωτεΐνασών. Πολλές πρωτεΐνάσες από στελέχη *Pseudomonas*, ακόμη και αλκαλικές, παρουσιάζουν σημαντική δραστηριότητα σε τιμές pH γύρω στο 5,5 (Fairbairn και Law 1986a, Fox και συν. 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991,



Sorhaug και Stepaniak 1997). Τούτο είναι σημαντικό στην τεχνολογία του γάλακτος καθ' όσον προϊόντα του γάλακτος έχουν όξινο pH.

Οι περισσότερες πρωτεΐνες από στελέχη *Pseudomonas* μπορούν να πήξουν το γάλα και υδρολύουν τις κ-, α<sub>1</sub>-, και β-καζεΐνες. Πιθανόν, προσβάλλουν στην αρχή την κ - καζεΐνη, αποσταθεροποιώντας το μικκύλιο κατά τρόπο ανάλογο με την δράση της χυμοζίνης και ακολουθεί υδρόλυση των υπολοίπων καζεϊνών (Fairbairn και Law 1986a, Cousin 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Sorhaug και Stepaniak 1997). Οι τιμές K<sub>m</sub> που έχουν αναφερθεί για την υδρόλυση της καζεΐνης από πρωτεΐνες στελεχών *P. fluorescens* κυμαίνονται στην περιοχή 0,9 έως 7,1mg/ml. Αναστολή υποστρώματος σε συγκεντρώσεις καζεΐνης μεγαλύτερες από 5 - 10mg/ml έχει αναφερθεί για ορισμένες πρωτεΐνες, ενώ για άλλες όχι (Alichanidis και Andrews 1977, Stepaniak και συν. 1982, Malik και Mathur 1984, Roussis και συν. 1990).

Οι πρωτεΐνες από στελέχη *Pseudomonas* παρουσιάζουν διαφορετική σχετική υδρόλυση μεταξύ της ολικής, κ-, α<sub>1</sub>-, και β- καζεΐνης Πάντως, η σχετική υδρόλυση των καζεϊνών μπορεί να επηρεάζεται από την κατάσταση των μικκυλίων της καζεΐνης και τις συνθήκες του πειράματος (Richardson και Te Whaiti 1978, Gebre - Egziabher και συν. 1980, Stepaniak και συν. 1982, Patel και συν. 1983, Mitchell και Ewings 1985, Yan και συν. 1985, Mitchell και Marshall 1989a, Cousin 1989, Roussis και συν. 1990, Sorhaug και Stepaniak 1991, Kumura και συν. 1993).

Αντίθετα με τις καζεΐνες, οι μη μετουσιωμένες πρωτεΐνες του ορού, υδρολύονται από τις πρωτεΐνες από στελέχη *Pseudomonas* μόνο σε μικρό βαθμό, πιθανόν επειδή είναι σταθερότερες από τις καζεΐνες λόγω της σφαιρικής τους δομής (Fairbairn και Law 1986a, Sorhaug και Stepaniak 1991).

Σημαντική ιδιότητα των πρωτεϊνών από στελέχη *Pseudomonas*, τόσο από τεχνολογική όσο και από θεωρητική σκοπιά, είναι η συμπεριφορά τους στις διάφορες θερμικές κατεργασίες. Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες και διατηρούν σημαντικό μέρος της δραστηότητάς τους με την παστερίωση και την UHT κατεργασία του γάλακτος. Η αδρανοποίησή τους σε υψηλές θερμοκρασίες θα απαιτούσε θερμικές κατεργασίες ακατάλληλες στην τεχνολογία γάλακτος. Η κατεργασία 150°C για 20s είναι ικανή για αδρανοποίηση



των πρωτεϊνών από στελέχη *Pseudomonas* σε ποσοστό μεγαλύτερο από 90%. Όμως, μία τέτοια κατεργασία θα μετέτρεπε το γάλα σε καστανωπό υγρό, λόγω της αντίδρασης Maillard (Fairbairn και Law 1986a, Kroll 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Η θερμοανθεκτικότητα πρωτεϊνών από στελέχη *Pseudomonas* είναι σημαντικά μεγαλύτερη στο γάλα και σε διαλύματα καζεΐνης από ό,τι σε ρυθμιστικά διαλύματα. Πολλές καθαρισμένες πρωτεΐνες από στελέχη *P. fluorescens* και *Pseudomonas* spp. είναι θερμοανθεκτικές σε ρυθμιστικά διαλύματα παρουσία ιόντων ασβεστίου και ορισμένες από αυτές και απουσία ιόντων ασβεστίου (Barach και συν. 1976a, Barach και Adams 1977, Stepaniak και Fox 1983, Patel και συν. 1986, Diermayr και συν. 1987, Roussis και συν. 1990). Η αδρανοποίηση πολλών πρωτεϊνών από στελέχη *P. fluorescens* σε υψηλές θερμοκρασίες, αναφέρθηκε ότι ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης, όταν αυτές θερμαίνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία αλάτων γάλακτος είτε ακόμη ορισμένες και απουσία των αλάτων αυτών (Alichanidis και Andrews 1977, Richardson 1981, Stepaniak και Fox 1983, Roussis και συν. 1990).

Η απομένουσα δραστηριότητα πρωτεϊνών από στελέχη *P. fluorescens* και *Pseudomonas* spp. μετά από την κατεργασία 90°C για 10 min, ήταν μεγαλύτερη όταν τα ένζυμα διατηρούνταν για 24h υπό ψύξη, υποδειχοντας επαναδίπλωση των ενζυμικών μορίων (Patel και συν. 1986).

Παρά την μεγάλη θερμοανθεκτικότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες, οι περισσότερες πρωτεΐνες από στελέχη *P. fluorescens* και *Pseudomonas* spp. παρουσιάζουν αστάθεια στην περιοχή 50 – 60°C (αδρανοποίηση σε χαμηλές θερμοκρασίες, LTI). Οι D τιμές (ο χρόνος που απαιτείται σε δεδομένη θερμοκρασία για αδρανοποίηση του ενζύμου κατά 90%) στους 55°C είναι σε επίπεδα seconds είτε minutes, ενώ εάν υπολογιστούν με δεδομένα αδρανοποίησης των ενζύμων σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τους 100°C είναι μερικές ώρες. Πάντως, υπάρχουν κάποιες διαφοροποιήσεις σχετικά με τα επίπεδα αδρανοποίησης στη χαμηλή ζώνη θερμοκρασιών (Barach και συν. 1976b, Stepaniak και Fox 1983, Fairbairn και Law 1986a, Kroll 1989, Roussis και συν. 1990, Sorhaug και Stepaniak 1991, Sorhaug και Stepaniak 1997, Triantafyllidou και Roussis 1999). Για την αδρανοποίηση πολλών πρωτεϊνών από στελέχη *P. fluorescens* και



*Pseudomonas* spp. στην περιοχή 50 – 90°C έχει παρατηρηθεί ασυνέχεια στο διάγραμμα Arrhenius (Barach και συν. 1978, Kroll και Klostermeyer 1984, Diernay και συν. 1987). Τα ιόντα ασβεστίου αναφέρθηκε ότι δεν σταθεροποιούν πρωτεΐνάσες από στελέχη *P. fluorescens* στους 50 – 60°C, ενώ πρωτεΐνες του γάλακτος προσφέρουν σημαντική σταθερότητα (Stepaniak και Fox 1983, Kroll και Klostermeyer 1984b, Kroll 1989).

Η αδρανοποίηση των πρωτεΐναιών από στελέχη *P. fluorescens* και *Pseudomonas* spp. σε χαμηλές θερμοκρασίες οφείλεται σε αυτόλυση των ενζύμων, και παρουσία καζεΐνης τόσο σε αυτόλυση όσο και σε συσσωμάτωση της πρωτεΐνάσης με την καζεΐνη (Barach και συν. 1978, Richardson 1981, Stepaniak και Fox 1983, Stepaniak και συν. 1991, Sorhaug και Stepaniak 1991).

#### Εξωκυτταρικές πρωτεΐνάσες από στελέχη *Flavobacterium*

Τα *flavobacteria* αποτελούν σημαντικό τμήμα της μικροχλωρίδας του ψυχόμενου νωπού γάλακτος (Cousin 1982, Fox και συν. 1989). Οι Zahran και συν. (1992) απομόνωσαν *flavobacteria* από νωπό γάλα σε ποσοστό 15% του συνόλου των απομονώσεών τους. Τα στελέχη ήταν σημαντικά πρωτεολυτικά. Σημαντική πρωτεολυτική δραστηριότητα στελεχών *Flavobacterium* που απομονώθηκαν από νωπό γάλα ανέφεραν, επίσης και άλλοι ερευνητές (Kalogridou – Vassiliadou 1984). Σε θερμοκρασίες ψύξης, στελέχη *Flavobacterium* υδρόλυαν την β- και την αs-καζεΐνη (Yanagiya και συν. 1973, Cousin και Marth 1977a). Επίσης, στέλεχος *Flavobacterium* υδρόλυε την β- και την αs-καζεΐνη στους 30°C, ενώ μόνο σε μικρό βαθμό την κ-καζεΐνη (Milliere και Veillet – Poncet 1979).

Στον αντίποδα, οι Jooste και Britz (1988) μελέτησαν τέσσερα στελέχη *Flavobacterium*, μόνο δύο από τα οποία αναπτύσσονταν στους 4°C. Αυτά, αν και ήταν έντονα πρωτεολυτικά στους 22°C, δεν παρήγαγαν πρωτεΐνάση σε ικανά επίπεδα στους 7°C.

Σχετικά με την θερμοανθεκτικότητα πρωτεΐναιών από *flavobacteria*, έχει αναφερθεί ότι πρωτεΐνάσες από στελέχη *F. arborescens* και *Flavobacterium* spp. ήταν θερμοευαίσθητες και αδρανοποιούνταν πλήρως στους 50 – 55°C για 15 min (Boguslawski και συν. 1983, Milliere και Veillet – Poncet 1985). Από την άλλη πλευρά, υπερκείμενο καλλιέργειας στελέχους *Flavobacterium* διατηρούσε



σημαντικό ποσοστό της πρωτεολυτικής του δραστηριότητας μετά την κατεργασία 140°C, 5s (Griffiths και συν. 1981).

### **A 5.3. Επίδραση πρωτεϊνικών ψυχροτρόφων βακτηρίων στην ποιότητα προϊόντων γάλακτος**

#### **Γάλα**

Η πρωτεολυτική δράση των ψυχροτρόφων βακτηρίων στο γάλα οδηγεί στην πήξη του καθώς και σε αλλοιώσεις που αφορούν το άρωμα και την γεύση του (Fairbairn και Law 1986a, Mottar 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991, Sorhaug και Stepaniak 1997).

Οι περισσότερες πρωτεϊνάσες ψυχροτρόφων, αποικοδομούν την κ-καζεΐνη, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης και τελικά την πήξη του γάλακτος. Η υδρόλυση της β-καζεΐνης πιθανόν οδηγεί στο σχηματισμό πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους που προσδίνουν πικρή γεύση στο γάλα (Fairbairn και Law 1986a, Mottar 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991).

Οι πληθυσμοί των ψυχροτρόφων βακτηρίων που απαιτούνται για αλλοίωση της οσμής και γεύσης του γάλακτος, ποικίλλουν λόγω των διαφορών στην πρωτεολυτική δραστηριότητα μεταξύ των στελεχών. Γενικά πάντως, ένας πληθυσμός της τάξης  $5 \cdot 10^6$  cfu/ml απαιτείται για ανιχνεύσιμη πρωτεόλυση και  $10^7$  cfu/ml για ανιχνεύσιμες οργανοληπτικές αλλαγές στο γάλα (Fairbairn και Law 1986a, Mottar 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991).

Η ανάπτυξη των ψυχροτρόφων στο νοπό γάλα πριν την παστερίωση μπορεί να οδηγήσει σε υποδεέστερο άρωμα – γεύση. Επίσης, η επιμόλυνση του παστεριωμένου γάλακτος με ψυχρότροφα βακτήρια -κυρίως στελέχη *Pseudomonas*- και η ανάπτυξή τους κατά την διατήρησή του υπό ψύξη, μπορεί να οδηγήσει σε πικρότητα και ανεπιθύμητο άρωμα – γεύση (Mottar 1989, Stepaniak 1991, Stepaniak και Abrahamsen 1995). Η εμφάνιση πικρής γεύσης αποδίδεται σε δράση πρωτεϊνικών ψυχροτρόφων στελεχών. Σε παστεριωμένο γάλα, που είχε εμβολιαστεί με πρωτεολυτικό στέλεχος *P. fluorescens*, παρατηρήθηκε πικρή γεύση (Tottie και συν. 1983).



Η κύρια αλλοίωση του UHT γάλακτος από ψυχρότροφα βακτήρια είναι η πήξη του, που προκαλείται από δράση πρωτεϊνών. Το UHT-αποστειρωμένο γάλα φαίνεται να είναι πολύ πιο ευαίσθητο στη δράση των πρωτεϊνών ψυχρότροφων βακτηρίων από ό,τι το νωπό γάλα (McKellar 1981).

Η ανάπτυξη ψυχροτρόφων στελεχών στο νωπό γάλα σε επίπεδα περίπου  $10^7$  cfu/ml, οδηγεί σε πήξη του UHT γάλακτος που διατηρείται στους  $20^\circ\text{C}$  μετά από 2 - 10 εβδομάδες, ενώ σε επίπεδα περίπου  $10^6$  cfu/ml μετά από 20 εβδομάδες (Mitchell και Ewings 1985, Mottar 1989, Sorhaug και Stepaniak 1997). Γάλατα στα οποία οι καζεΐνες είχαν υδρολυθεί σημαντικά από υψηλούς πληθυσμούς ( $10^8$  cfu/ml) ψυχρότροφων στελεχών, έπηζαν κατά την UHT-αποστείρωση (Adams και συν. 1976). Όμως, σε επίπεδα πληθυσμών ψυχροτρόφων χαμηλότερα από  $10^8$  cfu/ml δεν διαπιστώθηκε σημαντική επίδραση στη θερμική σταθερότητα και στην πήξη του γάλακτος με πυτιά (Stepaniak και συν. 1982).

Οι πρωτεΐνες των ψυχροτρόφων βακτηρίων επιφέρουν, επίσης, πικρή γεύση στο UHT γάλα. Η προσθήκη παρασκευασμάτων πρωτεΐνης από στελέχη *P. fluorescens* οδηγούν σε πικρότητα του προϊόντος κατά την αποθήκευσή του και υδρόλυση κυρίως των κ- και β-καζεϊνών αλλά και της ασι-καζεΐνης. Επίσης, ορισμένα στελέχη ψυχροτρόφων βακτηρίων αποικοδομούν και τις πρωτεΐνες του ορού, την β - λακτογλοβουλίνη και την α - λακταλβουμίνη (Adams και συν. 1976, Mottar 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991).

### Τυριά

Όπως προαναφέρθηκε η πρωτεολυτική δράση ψυχροτρόφων βακτηρίων μπορεί να οδηγεί στην πήξη του γάλακτος. Παράδειγμα πρωτεΐνες από στελέχη *P. fluorescens* και *P. aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν ως ένζυμα πήξης του γάλακτος στην παρασκευή τυριού Cheddar. Όμως, τα τυριά παρουσίαζαν μαλακή υφή και πικρότητα (Juffs 1974).

Η ανάπτυξη ψυχροτρόφων βακτηρίων στο προς τυροκόμηση γάλα, έχει αναφερθεί, ότι έχει σαν αποτέλεσμα είτε τη μείωση είτε και την αύξηση του χρόνου πήξης με πυτιά κατά την τυροκόμηση. Όμως, δεδομένου ότι ο χρόνος πήξης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι διαφορές δεν αποδόθηκαν στην ανάπτυξη ψυχροτρόφων βακτηρίων στο γάλα. Από την άλλη πλευρά, έχει

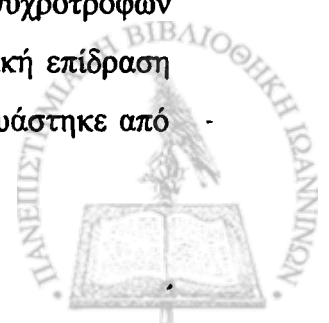


αναφερθεί ότι σε νωπό γάλα που περιείχε υψηλό πληθυσμό ψυχοτρόφων, είτε σε παστεριωμένο γάλα που περιείχε υπερκείμενο καλλιέργειας στελεχών *P. fluorescens*, η ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν μεγαλύτερη. Αυτό, που πιθανόν οφείλεται στην απελευθέρωση μικρού μοριακού βάρους αζωτούχων ενώσεων από τη δράση των ψυχοτρόφων, ενδεχομένως σχετίζεται με μικρότερους χρόνους πήξης (Law και συν. 1979, Fairbairn και Law 1986a).

Η ανάπτυξη ψυχοτρόφων βακτηρίων στο προς τυροκόμηση γάλα μπορεί να προκαλέσει μείωση της απόδοσης σε τυρί. Τούτο αποδίδεται στην απώλεια σημαντικού ποσοστού αζωτούχων ενώσεων στον ορό, που προκύπτει από τη δράση πρωτεϊνικών ψυχοτρόφων βακτηρίων. Υπάρχουν αρκετές αναφορές σχετικά με την μείωση της απόδοσης σε τυριά, με πληθυσμούς ψυχοτρόφων στο γάλα περίπου  $10^6$  cfu/ml (Fairbairn και Law 1986a, Mottar 1989, Sorhaug και Stepaniak 1991).

Από αρκετές μελέτες προκύπτει ότι μπορεί να παρασκευαστούν καλής ποιότητας τυριά από γάλα διατηρημένο υπό ψύξη (Fairbairn και Law 1986, Sorhaug και Stepaniak 1991). Τυρί Cheddar που παρασκευάστηκε από γάλα εμβολιασμένο με πρωτεολυτικά ψυχρότροφα στελέχη, δεν ανέπτυξε αλλοίωση που να σχετίζεται με την πρωτεόλυση (Law και συν. 1979b). Αντίθετα, προσθήκη ψυχρότροφου στελέχους, είτε πρώτεϊνάσης από το ίδιο στέλεχος στο γάλα επέφερε αυξημένη πρωτεόλυση και πικρή γεύση στο τυρί Cheddar (White και Marshall 1973). Επίσης, παρατηρήθηκε πικρότητα σε τυρί Cottage που σχετιζόταν με τους πληθυσμούς των ψυχοτρόφων στο προς τυροκόμηση γάλα (Sorhaug και Stepaniak 1991). Τυρί τύπου Γραβιέρα, από γάλα διατηρημένο υπό ψύξη, παρουσίασε αυξημένη πρωτεόλυση και πικρότητα (Lalos και Roussis 1999). Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί επιτυχημένη επιτάχυνση της ωρίμανσης τυριού Cheddar με χρήση ψυχρότροφου βακτηρίου. Η προσθήκη υπερκείμενου καλλιέργειας πρωτεολυτικού στελέχους *P. fluorescens* στο γάλα, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αρώματος – γεύσης χωρίς ανάπτυξη πικρότητας είτε άλλης αλλοίωσης (Tye και συν. 1988).

Υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικές με την επίδραση ψυχρότροφων βακτηρίων σε τυριά από πρόβειο γάλα, που υποδεικνύουν διαφορετική επίδραση σε σχέση με τα τυριά από αγελαδινό γάλα. Τυρί Φέτα που παρασκευάστηκε από





γάλα εμβολιασμένο με στέλεχος *P. fluorescens* παρουσίαζε υψηλότερα επίπεδα πρωτεόλυσης, όχι όμως οργανοληπτική αλλοίωση (Roussis και συν. 1988b). Επίσης, τυρί Φέτα που παρασκευάστηκε από γάλα διατηρημένο υπό ψύξη δεν παρουσίασε διαφορές στις παραμέτρους υφής, ενώ οργανοληπτική αλλοίωση παρατηρήθηκε μόνο σε ορισμένες παρτίδες (Lalos και συν. 1996). Τυρί Κεφαλογραβιέρα από γάλα διατηρημένο με ψύξη παρουσίασε ποσοτικές διαφορές σε υδατοδιαλυτά πεπτίδια και πιο πλούσια – πικάντικη γεύση (Lalos και Roussis 2000, Lalos και συν. 2001). Από την άλλη μεριά, γίδινο ημίκληρο τυρί από γάλα διατηρημένο με ψύξη, παρουσίασε υψηλότερα επίπεδα υδρόφοβων υδατοδιαλυτών πεπτιδίων και οργανοληπτική υποβάθμιση (Lalos και Roussis 2002).

#### Άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα

Επίσης, έχουν αναφερθεί αλλοιώσεις και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων από πρωτεϊνάσες ψυχρότροφων βακτηρίων.

Γιαούρτι παρασκευασμένο από γάλα προεμβολιασμένο με ψυχρότροφα στελέχη *Pseudomonas* και *Flavobacterium* παρουσίασε πικρή γεύση (Cousin και Marth 1977b).

Από την άλλη πλευρά, η προσθήκη ακαθάριστου ενζυμικού παρασκευάσματος πρωτεϊνάσης στελέχους *P. fluorescens* σε παγωτό και βούτυρο δεν επηρέαζε το άρωμα – γεύση των προϊόντων, πιθανόν λόγω της μικρής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες (White και Marshall 1973).

Ακόμη, οι πρωτεϊνάσες των ψυχροτρόφων βακτηρίων, δημιουργούν προβλήματα αλλοίωσης σε σκόνη γάλακτος κατά την διατήρησή της, με μεταβολή των λειτουργικών ιδιοτήτων αλλά και υποβάθμιση του αρώματος – γεύσης (Chen και συν. 2003).

#### **A 6. Πρωτεόλυση κατά την παρασκευή και ωρίμανση των τυριών**

Τα κύρια βιοχημικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την παρασκευή και ωρίμανση των τυριών είναι η αποικοδόμηση της λακτόζης, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Επίσης, η ζύμωση των κιτρικών είναι σημαντική στη δημιουργία



αρώματος στα τυριά που δεν ωριμάζουν, κυρίως λόγω του διακετυλίου και της ακεταλδεΐδης που παράγονται.

Η λακτόζη ζυμώνεται γρήγορα κυρίως προς γαλακτικό οξύ, το οποίο ισομεριώνεται,  $L (+) \rightarrow D (+)$ , είτε οξειδώνεται προς οξικό οξύ από γαλακτικά βακτήρια της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας. Στα τυριά ελβετικού τύπου, το γαλακτικό οξύ ζυμώνεται από προπιονικά βακτήρια προς  $CO_2$  (σχηματισμός οπών), προπιονικό και οξικό οξύ. Στα τυριά με γλοιώδη επικάλυψη, η λακτόζη μεταβολίζεται από ζυμομύκητες με αύξηση της τιμής του pH, ενώ στα τυριά που παράγονται με καλλιέργειες λακτόκοκκων η απομένουσα λακτόζη μεταβολίζεται κυρίως από την δευτερεύουσα οξυγαλακτική χλωρίδα.

Η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων που συμμετέχουν στο άρωμα – γεύση των τυριών, αν και κατά την ωρίμανση των τυριών χωρίς μύκητες υδρολύεται μικρό μόνο ποσοστό του λίπους. Σημαντική λιπόλυση συμβαίνει στα τυριά που ωριμάζουν με μύκητες και τα μπλε τυριά (λιπολυτική δράση μυκήτων) και στα τυριά ιταλικού τύπου που γίνεται προσθήκη ζωικής λιπάσης. Η αποικοδόμηση των λιπαρών οξέων οδηγεί στο σχηματισμό μεθυλοκετονών, αλδεϋδών και λακτονών και στη σύνθεση εστέρων. Οι μεθυλοκετόνες συμβάλλουν σημαντικά στο άρωμα των μπλε τυριών, η ακεταλδεΐδη συμμετέχει στο τυπικό άρωμα – γεύση του τυριού Cottage, ενώ οι θειο-εστέρες σχηματίζονται κυρίως στα τυριά με γλοιώδη επικάλυψη.

Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών είναι πιθανόν το πιο σημαντικό βιοχημικό γεγονός κατά την παρασκευή και ωρίμανση των περισσότερων ειδών τυριών, με σημαντική επίδραση στο άρωμα – γεύση και την υφή τους. Στους παράγοντες αποικοδόμησης των πρωτεϊνών περιλαμβάνονται τα προστιθέμενα ένζυμα πήξης του γάλακτος, οι πρωτεϊνάσες του γάλακτος, τα γαλακτικά βακτήρια της καλλιέργειας και άλλοι μικροοργανισμοί προστιθέμενοι ή μη (Law 1984, Fox 1989, Ρούσσης 1996).



### A 6.1. Πρωτεΐνες γάλακτος

Από τις αζωτούχες ενώσεις του γάλακτος, περίπου το 95% είναι πρωτεϊνικής φύσης και περίπου το 5% μη πρωτεϊνικής φύσης με πολύ μικρό μοριακό βάρος.

Το γάλα περιέχει περίπου 33g/L πρωτεΐνης, εκ των οποίων περίπου το 80% αποτελούν οι καζεΐνες και περίπου το 20% οι πρωτεΐνες του ορού. Οι πρωτεΐνες καταβυθίζονται με οξίνιση του γάλακτος σε pH 4,6, ενώ οι πρωτεΐνες του ορού παραμένουν σε διάλυση.

Οι πρωτεΐνες του γάλακτος διαχωρίζονται τόσο ηλεκτροφορητικά, όσο και χρωματογραφικά και με καθαρά χημικές μεθόδους.

Οι καζεΐνες του γάλακτος είναι η  $as_1$ -, η  $as_2$ -, η  $\beta$ -, και η  $\kappa$ -καζεΐνη. Οι  $\gamma$ -καζεΐνες που παλαιότερα θεωρούνταν πρωτεΐνες του γάλακτος, δείχθηκε ότι προέρχονται από την  $\beta$ -καζεΐνη, με περιορισμένη ειδική πρωτεόλυση από την ενδογενή πρωτεϊνάση του γάλακτος, πλασμίνη. Οι αναλογίες των  $as_1$ -,  $as_2$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -, και  $\gamma$ -καζεϊνών στο γάλα είναι περίπου 40, 10, 35, 12 και 3% των συνολικών πρωτεϊνών.

Η  $as_1$ -καζεΐνη ( $as_0+as_1$ ) αποτελείται από 199 αμινοξέα, περιέχει 8 άτομα φωσφόρου και είναι ευαίσθητη σε καταβύθιση παρουσία ιόντων ασβεστίου.

Η  $as_2$ -καζεΐνη αποτελείται από 207 αμινοξέα, περιέχει 10 – 13 άτομα φωσφόρου και είναι ευαίσθητη σε καταβύθιση παρουσία ιόντων ασβεστίου.

Η  $\beta$ -καζεΐνη αποτελείται από 209 αμινοξέα και περιέχει 5 άτομα φωσφόρου. Είναι πλούσια σε προλίνη και περισσότερο υδρόφοβη από την  $as_1$ -καζεΐνη. Είναι ευαίσθητη σε καταβύθιση παρουσία ιόντων ασβεστίου σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 15 – 20°C.

Η  $\kappa$ -καζεΐνη αποτελείται από 169 αμινοξέα και περιέχει 1 άτομο φωσφόρου. Είναι η μόνη καζεΐνη που περιέχει σάκχαρο στο μόριό της. Είναι διαλυτή παρουσία ιόντων ασβεστίου σε όλες τις θερμοκρασίες και σταθεροποιεί τις άλλες καζεΐνες έναντι των ιόντων ασβεστίου. Η  $\kappa$ -καζεΐνη έχει δεσμό, τον Phe105 – Met106, που είναι ευαίσθητος στη δράση της χυμοζίνης και υδρολύεται κατά τα αρχικά στάδια παρασκευής των τυριών πυτιάς.



Οι γ-καζεΐνες προέρχονται από το καρβοξυ-τελικό άκρο της β-καζεΐνης, ενώ από το αμινο-τελικό της προέρχονται οι πρωτεόζες – πεπτόνες. Οι γ-καζεΐνες είναι οι  $\gamma_1$ - (29 – 209 αμινοξέα),  $\gamma_2$ - (106 – 209) και  $\gamma_3$ - καζεΐνη (108 – 209 αμινοξέα).

Το μεγαλύτερο μέρος των καζεϊνών βρίσκεται στο γάλα σε κολλοειδή διασπορά (μικκύλια) και μικρό μόνο ποσοστό σε διαλυτή μορφή. Η διαλυτή καζεΐνη, περίπου 10% της ολικής, απαρτίζεται από μόρια ή αθροίσματα μορίων διαφόρων κλασμάτων καζεϊνών. Η αναλογία διαλυτής και κολλοειδούς καζεΐνης εξαρτάται από την συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου και φωσφορικών και από τη θερμοκρασία.

Το μικκύλιο περιλαμβάνει περίπου 25.000 μονομερή καζεΐνης (μέσο μοριακό βάρος μορίων καζεϊνών 23kDa) και έχει μέσο μοριακό βάρος  $10^4$  –  $10^6$ kDa. Η καζεΐνη διατηρείται στην κολλοειδή της μορφή κυρίως χάρη στο αρνητικό φορτίο των μικκυλίων. Το μικκύλιο, όπως δείχθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία, αποτελείται από υπομικκύλια. Στη σταθεροποίηση του μικκυλίου σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Η κ-καζεΐνη βρίσκεται κατά το μάλλον ήττον στην εξωτερική επιφάνεια και σταθεροποιεί το μικκύλιο με προσανατολισμό της πολικής ομάδας του σακχάρου που περιέχει, στο υδατικό περιβάλλον.

Οι πρωτεΐνες του ορού είναι η β – λακτογλοβουλίνη (β – Lg), η α – λακταλβουμίνη (α – La), η αλβουμίνη ορού (SA), οι ανοσοσφαιρίνες (Ig), και οι πρωτεόζες – πεπτόνες (P-P). Είναι πλούσιες σε κυστεΐνη, έτσι αναπληρώνουν την ανεπάρκεια των καζεϊνών σε κυστεΐνη και έχουν υψηλή διαιτητική αξία. Οι μεταξύ των πρωτεϊνών του ορού αναλογίες, είναι β – λακτογλοβουλίνη 50%, α – λακταλβουμίνη (και άλλες αλβουμίνες) 30%, ανοσοσφαιρίνες 10%, και πρωτεόζες – πεπτόνες 10%. Η β – γαλακτογλοβουλίνη έχει μοριακό βάρος περίπου 18kDa, η α – λακταλβουμίνη περίπου 14,5kDa και η οροαλβουμίνη περίπου 67kDa. Οι ανοσοσφαιρίνες είναι μονομερή είτε πολυμερή βασικής μονάδας με 160kDa μοριακό βάρος. Οι πρωτεόζες – πεπτόνες είναι μίγμα φωσφο – γλυκο – πρωτεϊνών και πεπτιδίων και προέρχονται από την β-καζεΐνη (Ανυφαντάκης 1986).



Τα παραπάνω αναφερόμενα αφορούν το αγελαδινό γάλα. Το πρόβειο γάλα περιέχει σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεϊνών από το αγελαδινό, 5,8% έναντι 3,3%, ενώ το γίδινο παρόμοια, 3,4%.

Η ομοιότητα των πρωτεϊνών αγελαδινού, πρόβειου και γίδινου γάλακτος είναι μεγαλύτερη για τις πρωτεΐνες του ορού και μικρότερη για τις καζεΐνες.

Η δομή του μικκυλίου της καζεΐνης είναι παρόμοια σε αγελαδινό, πρόβειο και γίδινο γάλα. Το μέγεθος των μικκυλίων ακολουθεί την σειρά γίδινο > πρόβειο > αγελαδινό (255, 199 και 175nm αντίστοιχα). Η αναλογία όγκου προς επιφάνεια των μικκυλίων της καζεΐνης ακολουθεί τη σειρά γίδινο > αγελαδινό > πρόβειο γάλα. Το μικκύλιο του πρόβειου και γίδινου γάλακτος είναι πιο πλούσιο σε ασβέστιο από το μικκύλιο του αγελαδινού γάλακτος (37, 36 και 28,9mg κolloειδούς φωσφορικού ασβεστίου ανά g καζεΐνης).

Το γίδινο γάλα περιέχει πολύ μικρότερα ποσοστά  $\alpha_1$ -καζεΐνης από ό,τι το αγελαδινό και πρόβειο γάλα.

Το τμήμα της κ-καζεΐνης που περιλαμβάνει το δεσμό Phe105 – Met106, που είναι ευαίσθητος στη δράση της χυμοζίνης, είναι παρόμοιο για τα τρία είδη γάλακτος. Το πρόβειο γάλα είναι πολύ ευαίσθητο στην πυτιά και η πήξη είναι ταχύτερη από ό,τι στο αγελαδινό γάλα, λόγω της μεγαλύτερης αναλογίας  $\beta$ - προς  $\alpha_1$ -καζεΐνη. Το πρόβειο γάλα απαιτεί λιγότερη πυτιά για επίτευξη του ίδιου χρόνου πήξης, ενώ συνήθως δεν προστίθεται ασβέστιο στην τυροκόμηση πρόβειου γάλακτος. Ο ρυθμός σχηματισμού πηγματος είναι μεγαλύτερος στο πρόβειο από ό,τι στο αγελαδινό γάλα, αλλά η περίοδος συναίρεσης είναι μεγαλύτερη. Τούτο μπορεί να αποδοθεί στα υψηλότερα επίπεδα καζεΐνης και κolloειδούς ασβεστίου στο πρόβειο γάλα (Alichanidis και Polychroniadou 1995).

## A 6.2. Πρωτεόλυση στα τυριά

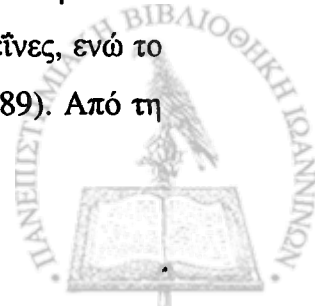
Το ενζυμικό παρασκεύασμα που χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την παρασκευή των τυριών είναι η πυτιά. Η πυτιά είναι μίγμα χυμοζίνης και πεψίνης, συνήθως σε αναλογία 75:25 αντίστοιχα. Ο δεσμός ο οποίος προσβάλλεται αρχικά από τη χυμοζίνη και μάλιστα με εξαιρετικά μεγάλη ταχύτητα, είναι μεταξύ του καρβοξυλίου της φαινυλαλανίνης Phe105 και της αμινικής ομάδας της μεθειονίνης



Met106 της κ-καζεΐνης. Κατά την υδρόλυση του δεσμού Phe – Met παράγονται: α) η αδιάλυτη παρα-κ-καζεΐνη (κ-CN f 1 – 105), η οποία παραμένει προσκολλημένη στα καζεϊνικά μικκύλια και ενσωματώνεται στο τυρόπηγμα και β) το διαλυτό όξινο γλυκομακροπεπτίδιο (κ-CN f 106 – 169), το μεγαλύτερο μέρος του οποίου αποβάλλεται στον ορό (Dalglish 1993). Αποτέλεσμα της αποσταθεροποίησης των μικκυλίων της καζεΐνης, λόγω υδρόλυσης της κ-καζεΐνης, είναι να σχηματίζεται το πήγμα παρουσία ιόντων ασβεστίου σε κατάλληλη θερμοκρασία. Μετά την ολοκλήρωση της πήξης του γάλακτος διαχωρίζεται το τυρόπηγμα από το τυρόγαλα. Το μεγαλύτερο μέρος της χυμοζίνης αποβάλλεται στο τυρόγαλα, αλλά ένα μέρος αυτής (5 – 15%) παραμένει στο τυρόπηγμα και προκαλεί υδρόλυση των καζεϊνών κατά την ωρίμανση του τυριού. Η πτυιά δρα στην  $\alpha_1$ -καζεΐνη του αγελαδινού τυριού στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης και υδρολύει το δεσμό Phe23 – Phe24 (Fox 1989). Στα πρόβεια τυριά ο δεσμός είναι Phe23 – Val24 (Holt και Sawyer 1993). Από την υδρόλυση δημιουργούνται τα πεπτίδια  $\alpha_1$ -CN f 24 – 199 ( $\alpha_1$ -I) και  $\alpha_1$ -CN f 1 – 23, το οποίο θεωρείται σημαντική πηγή αρώματος – γεύσης. Αποτέλεσμα της διάσπασης αυτής είναι το μαλάκωμα της μάζας του τυριού.

Η υδρόλυση της  $\alpha_1$ -καζεΐνης από τη χυμοζίνη συμβαίνει ακόμη και σε συγκεντρώσεις 20% (w/v) NaCl και σε ευρεία περιοχή pH (2,2 – 7,0). Η υδρόλυση της β-καζεΐνης από τη χυμοζίνη είναι πολύ λιγότερο εκτεταμένη από αυτή της  $\alpha_1$ -καζεΐνης. Το NaCl αναστέλλει την υδρόλυση της β-καζεΐνης από τη χυμοζίνη. Έτσι, σε συγκεντρώσεις 5% (w/v) NaCl αναστέλλεται η δράση της σε μεγάλο βαθμό και πλήρως σε συγκεντρώσεις 10% (w/v). Η παρα-κ-καζεΐνη δεν υδρολύεται από τη χυμοζίνη, παρά το ό,τι στο μόριό της περιέχει πιθανές θέσεις προσβολής από το ένζυμο αυτό. Επίσης, η  $\alpha_2$ -καζεΐνη δεν αποτελεί καλό υπόστρωμα για την πτυιά.

Στην ωρίμανση των τυριών συμμετέχει, ιδιαίτερα σε ορισμένα τυριά και η ενδογενής πρωτεΐνάση του γάλακτος πλασμίνη. Η πλασμίνη, το πλασμινογόνο και οι φυσικοί ενεργοποιητές του ενζύμου συνδέονται στο γάλα με το καζεϊνικό μικκύλιο και υδρολύουν κυρίως τις β- και  $\alpha_2$ -καζεΐνες. Τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης της β-καζεΐνης από την πλασμίνη στα τυριά είναι οι γ-καζεΐνες, ενώ το κλάσμα πρωτεόζης – πεπτόνης απομακρύνεται στο τυρόγαλα (Fox 1989). Από τη



δράση της χυμοζίνης και της πλασμίνης, παράγονται περισσότερα πολυπεπτίδια και λιγότερα ολιγοπεπτίδια, τα δε ελεύθερα αμινοξέα είναι πρακτικά αμελητέα (Fox 1989, van Den Berg και Exerkate 1993).

Ο ρόλος των γαλακτικών βακτηρίων στην υδρόλυση των καζεϊνών στα τυριά είναι πολύ μικρότερος σε σύγκριση με τα ένζυμα πήξης του γάλακτος.

Ο κύριος ρόλος των πρωτεϊνών των καλλιιεργειών φαίνεται να είναι η αργή αποικοδόμηση της β-καζεΐνης και των πολυπεπτιδίων που προκύπτουν από τη δράση της πυτιάς ειδικά στην α<sub>1</sub>-καζεΐνη. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι τα γαλακτικά βακτήρια της καλλιιεργείας, συνεισφέρουν στην αύξηση της συγκέντρωσης των πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους και αμινοξέων, με δράση των πεπτιδασών τους. Η αποικοδόμηση των πεπτιδίων του υδατοδιαλυτού αζώτου (κυρίως το α<sub>1</sub>-CN f 1 - 23) θεωρείται σημαντική για το σχηματισμό αρώματος - γεύσης. Η περαιτέρω υδρόλυση του πεπτιδίου α<sub>1</sub>-CN f 1 - 23 είναι πιθανόν ένα από τα σπουδαιότερα μονοπάτια αποικοδόμησης της α<sub>1</sub>-καζεΐνης (Fox και συν. 1993, van Den Berg και Exerkate 1993).

Οι πληθυσμοί των γαλακτικών βακτηρίων των καλλιιεργειών φτάνουν σε ένα μέγιστο με το τέλος της παρασκευής αρκετών τυριών και τα ζώντα κύτταρα στη συνέχεια μειώνονται. Τα μη ζώντα κύτταρα αυτολύονται και απελευθερώνουν τα ενδοκυτταρικά τους ένζυμα τα οποία διαχέονται στο περιβάλλον (Fox και συν. 1993).

Πεπτίδια με υψηλό περιεχόμενο σε υδρόφοβα αμινοξέα έχει δειχθεί ότι επιφέρουν πικρότητα στα τυριά. Πικρά πεπτίδια παράγονται με δράση της χυμοζίνης κύρια στη β-καζεΐνη, ενώ επίσης οι πρωτεΐνες των γαλακτικών βακτηρίων καλλιιεργειών παράγουν πικρά πεπτίδια από μη πικρά πεπτίδια που προέρχονται από την καζεΐνη. Οι πεπτιδάσες των γαλακτικών καλλιιεργειών μπορούν να αποικοδομούν πικρά πεπτίδια. Τα λεγόμενα «πικρά» στελέχη γαλακτικών καλλιιεργειών, είναι εκείνα που δεν έχουν ικανές πεπτιδασικές δραστηριότητες ώστε να αποικοδομούν τα πικρά πεπτίδια σε μη πικρά πεπτίδια και αμινοξέα (Law 1984, Fox και συν. 1993).

Η αποικοδόμηση των αμινοξέων οδηγεί στην παραγωγή πολυάριθμων ενώσεων αρώματος και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αρώματος - γεύσης των τυριών.



Η δευτερεύουσα χλωρίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των αμινοξέων και συμμετέχει έτσι στην ανάπτυξη του τυπικού αρώματος – γεύσης του κάθε τυριού. Τα αμινοξέα διασπώνται από απαμινάσες, καρβοξυλάσες, τρανσαμινάσες και ένζυμα που τροποποιούν τις πλευρικές αλυσίδες. Από τα πρωτογενή προϊόντα διάσπασης, τα α – κετονοξέα και οι αμίνες μετατρέπονται σε αλδεΐδες, αλκοόλες ή οξέα. Οι θειούχες ενώσεις είναι σημαντικά συστατικά των τυριών που ωριμάζουν με μύκητες. Η μεθανοθειώλη, που σχηματίζεται από την μεθειονίνη με μικροβιακή δράση, είναι πρόδρομος άλλων ενώσεων. Στα μπλε τυριά η αργινίνη αποικοδομείται προς ορνιθίνη και κιτροουλίνη, ενώ με αποκαρβοξυλίωση του γλουταμινικού οξέος παράγεται γ – αμινοβουτυρικό οξύ. Η φαινυλαλανίνη αποικοδομείται κύρια από επιφανειακούς ζυμομύκητες, προς φαινυλαιθανόλη, η οποία συνεισφέρει στο τυπικό άρωμα τυριών. Με απαμίνωση αμινοξέων, από διάφορους μικροοργανισμούς, παράγεται αμμωνία που συμμετέχει στο άρωμα τυριών. Οι αποκαρβοξυλιώσεις οδηγούν στο σχηματισμό αμινών όπως τυραμίνης, ισταμίνης, φαινυλαιθυλαμίνης, τρυπταμίνης, πουτρεσκίνης και καδαβερίνης. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται στην τυροκομία φαίνεται ότι δεν συμμετέχουν στην παραγωγή των παραπάνω προϊόντων στα τυριά. Αντίθετα, διάφοροι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως λακτοβάκιλλοι και διάφορες επιμολύνσεις, διασπών αμινοξέα σε θρεπτικά υλικά παράγοντας αμίνες (Ρούσσης 1996).

Στο κάθε τυρί οι ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν, με τη ξεχωριστή τεχνολογία παρασκευής του αλλά και τη διαφορετική ωρίμανση που υφίσταται, επηρεάζουν την σύνθεση της δευτερεύουσας μικροβιακής χλωρίδας. Ως αποτέλεσμα αυτού, σε κάθε τυρί λαμβάνουν χώρα διαφορετικές διασπάσεις και γενικά βιοχημικές μεταβολές που συμβάλλουν στη δημιουργία του ιδιαίτερου αρώματος – γεύσης του κάθε τυριού.





## A 7. Σκοπός της διατριβής

- Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη εξωκυτταρικών πρωτεϊνών από ψυχρότροφα στελέχη του ναπού γάλακτος.

Συγκεκριμένα:

1. Έγινε απομόνωση και μελετήθηκαν ιδιότητες εξωκυτταρικής πρωτεΐνης από στέλεχος *Pseudomonas fluorescens*. Μελετήθηκαν καταλυτικές και μοριακές ιδιότητες του ενζύμου, η θερμοανθεκτικότητά του σε κατεργασίες υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών, και η υδρόλυση καζεϊνών και πεπτιδίων τυριών από την πρωτεΐνάση,

2. Έγινε μερικός καθαρισμός και μελετήθηκαν ιδιότητες παρασκευάσματος εξωκυτταρικής πρωτεΐνης από στέλεχος *Flavobacterium*. Μελετήθηκαν καταλυτικές ιδιότητές του, η θερμοανθεκτικότητά του, και η υδρόλυση καζεϊνών και πεπτιδίων τυριών από το ενζυμικό παρασκεύασμα.

Ο σκοπός της διατριβής είναι η παραγωγή γνώσης σχετικά με τις ιδιότητες πρωτεϊνών από στέλεχος του πλέον συνήθους είδους στο γάλα, του *Pseudomonas fluorescens* και από στέλεχος γένους που απαντάται λιγότερο συχνά, του *Flavobacterium*.

Η μελέτη των ιδιοτήτων είναι προσανατολισμένη στην τεχνολογία του γάλακτος, με ιδιαίτερη αναφορά στην αποικοδόμηση καζεϊνών και πεπτιδίων τυριών.



## B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### B 1. Απομόνωση και ταυτοποίηση ψυχρότροφων στελεχών

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν, απομονώθηκαν από ψυχόμενο νωπό γάλα της περιοχής της Ηπείρου.

Τα δείγματα λαμβανόταν με ασηπτικές συνθήκες και διατηρούνταν στους 4°C. Το γάλα καθώς και αραιώσεις του, καλλιεργούνταν σε θρεπτικό άγαρ με την τεχνική της ενσωμάτωσης, χρησιμοποιώντας NaCl 9‰ (w/v) ως αραιωτικό. Η επώαση γινόταν στους 7°C, για την ανάπτυξη των ψυχροτρόφων βακτηρίων.

Η λήψη μεμονωμένης αποικίας, γινόταν από τρυβλίο με μικρό αριθμό αποικιών, με μεταφορά σε θρεπτικό ζωμό και επώαση στους 25°C για 24h. Ο καθαρισμός γινόταν με γραμμική διασπορά από το θρεπτικό ζωμό σε θρεπτικό άγαρ. Μετά από επώαση στους 30°C για 48h λαμβάνονταν μεμονωμένη αποικία και μεταφερόταν σε θρεπτικό ζωμό.

Τα στελέχη διατηρούνταν σε κεκλιμένα θρεπτικού άγαρ στους 4°C, με μηνιαία ανακαλλιέργεια. Επίσης, η διατήρηση των στελεχών γινόταν μετά από ανάπτυξη σε θρεπτικό ζωμό σε 30% (v/v) γλυκερόλη στην κατάψυξη.

Ο έλεγχος της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των στελεχών γινόταν με την μέθοδο της διάχυσης, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα άγαρ αποβουτυρωμένου γάλακτος (Skim Milk, Oxoid). Η επώαση γινόταν στους 25°C και 4°C. Η υδρόλυση των πρωτεϊνών διαπιστωνόταν από την δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από την ανάπτυξη των βακτηρίων (Harrigan και McCance, 1976).

Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με το σύστημα API 20 NE (LA BALME LES GROTTES 38390 MONTALIEU VERCIEU, FRANCE).

### B 2. Καθαρισμός ενζύμων

Για την παραγωγή πρωτεϊνάσης, τα στελέχη καλλιεργούνταν σε αποβουτυρωμένο γάλα (Skim Milk, Oxoid). Αρχικά, γινόταν δύο εικοσιτετράωρες ανακαλλιέργειες του κάθε στελέχους σε 10ml αποβουτυρωμένου γάλακτος στους 25°C. Έπειτα, γινόταν 1% (v/v) εμβολιασμός σε 500ml αποβουτυρωμένου



γάλακτος, σε κωνικές φιάλες του ενός λίτρου και επώαση στους 25°C με περιοδική ανακίνηση. Η διάρκεια της επώασης ήταν λίγες ημέρες. Για τη λήψη υψηλών επιπέδων πρωτεΐνάσης γινόταν έλεγχος της πρωτεολυτικής δραστηριότητας ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

Ο ελεύθερος κυττάρων ζωμός λαμβανόταν με φυγοκέντρηση της καλλιέργειας (12.000g x 30min, 4°C, 2 φορές). Ακολουθούσε διήθηση του υπερκειμένου από φίλτρα 0,45μm (Sartorius GmbH PF 3243 D - 3400 Gottingen FRG).

Στη συνέχεια, η πορεία καθαρισμού των ενζύμων ήταν διαφορετική για τα παρασκευάσματα των δύο στελεχών.

### Πρωτεΐνάση στελέχους *P. fluorescens* TR2

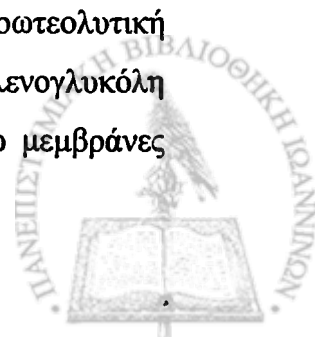
Ο ελεύθερος κυττάρων ζωμός λυοφιλοποιούνταν και διατηρούνταν στην κατάψυξη.

Ποσότητα από το λυοφιλοποιημένο ενζυμικό παρασκεύασμα του στελέχους επαναδιαλύοταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4$  /  $KH_2PO_4$ , pH 7,0. Ακολουθούσε διαπίδυση με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για 24h. Η διαπίδυση γινόταν σε μεμβράνες διαπίδυσης με όριο αποκλεισμού 10kDa (Visking Dialysis Tubing 20/32, d=16mm, membrane dialysis tubing 3787 D-12 A. H. Thomas Co Philadelphia, USA).

Ακολουθούσε έκλουση από στήλη ιονανταλλαγής DEAE Sepharose CL - 6B, με εκλουστικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,05M  $K_2HPO_4$  /  $KH_2PO_4$ , pH 7,0 και κλίση NaCl από 0,00 έως 1,14 M. Οι διαστάσεις της στήλης ήταν 26 x 700mm, ο όγκος του δείγματος 20ml, η ταχύτητα ροής 20ml/h και ο όγκος των κλασμάτων 15ml.

Η συγκέντρωση του NaCl στα κλάσματα της στήλης αυτής, προσδιοριζόταν με τη μέθοδο Mohr. Γινόταν αρχικά αραιώση των κλασμάτων με  $H_2O$  (αραιώση 1:9) και ακολουθούσε ογκομέτρηση των αραιωμένων κλασμάτων, με διάλυμα  $AgNO_3$  0,01N και δείκτη  $K_2CrO_4$ .

Τα κλάσματα που παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστηριότητα, συγκεντρώνονταν, συμπυκνώνονταν με πολυαιθυλενογλυκόλη (MG>17000 Type 2000, Cart Roth D75, Karlsruhe) στις παραπάνω μεμβράνες



διαπίδυσης και διαπιδύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0.

Το ενζυμικό αυτό παρασκεύασμα ακολούθως εκλούονταν από στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S – 200, με εκλουστικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 που περιείχε 0,05M NaCl. Οι διαστάσεις της στήλης ήταν 26 x 200mm, ο όγκος του δείγματος 5ml, η ταχύτητα ροής 20ml/h και ο όγκος των κλασμάτων 3,6ml.

Τα κλάσματα με τη μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστηριότητα, συγκεντρώνονταν, συμπυκνώνονταν με πολυαιθυλενογλυκόλη και διαπιδύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$  pH 7,0, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Το παρασκεύασμα λυοφιλοποιούνταν και αποτελούσε το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του στελέχους *P. fluorescens* TR2, το οποίο διατηρούνταν στην κατάψυξη.

Σε ορισμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ένζυμο σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0. Προς τούτο, ποσότητα του ενζύμου διαλυόταν και διαπιδύονταν στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα.

Η όλη πορεία καθαρισμού επιτελούνταν σε ψυχρό θάλαμο στους 5°C.

### Παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης στελέχους *Flavobacterium* spp. MTR3

Στον ελεύθερο κυττάρων ζωμό γινόταν προσθήκη  $(NH_4)_2SO_4$  σε 65% κορεσμό και παραμονή για 24h στους 7°C. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση (8.000g x 30min, 4°C, 2 φορές) και λήψη του ιζήματος. Το ιζημα επαναδιαλύονταν σε μικρό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M Tris – HCl, pH 7,0, διαπιδύονταν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, και λυοφιλοποιούνταν.

Ποσότητα από το λυοφιλοποιημένο ενζυμικό παρασκεύασμα του στελέχους αυτού, επαναδιαλύονταν και διαπιδύονταν για 24h σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0 που περιείχε 40mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Ακολουθούσε έκλουση από στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S – 200, με εκλουστικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0 που περιείχε 40mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ . Οι διαστάσεις της στήλης ήταν 26 x 200mm, ο όγκος του δείγματος 5ml, η ταχύτητα ροής 15ml/h και ο όγκος των κλασμάτων 3,6ml.



Τα κλάσματα που εμφάνιζαν τη μεγαλύτερη πρωτεολυτική δραστικότητα συγκεντρώνονταν, συμπυκνώνονταν με πολυαιθυλενογλυκόλη σε μεμβράνες διαπίδυσης και διαπιδύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0 που περιείχε 40mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O.

Το παρασκεύασμα αυτό αποτελούσε το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του στελέχους *Flavobacterium* spp. MTR3. Το παρασκεύασμα χρησιμοποιούνταν άμεσα.

Σε ορισμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0. Προς τούτο, όγκος του ενζυμικού παρασκευάσματος διαπιδύονταν στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα.

Η όλη πορεία καθαρισμού επιτελούνταν σε ψυχρό θάλαμο στους 5°C.

#### Έλεγχος καθαρότητας ενζυμικών παρασκευασμάτων

Ο έλεγχος καθαρότητας των ενζυμικών παρασκευασμάτων, γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία απορρυπαντικού (SDS – PAGE ηλεκτροφόρηση) (Laemmli 1970).

Τα διαλύματα της ηλεκτροφόρησης ήταν τα εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού: 0,375M Tris – HCl, pH 8,8 με 0,1% (w/v) SDS.

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής συσσώρευσης: 0,125M Tris – HCl, pH 6,8 με 0,1% (w/v) SDS.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων: 0,025M Tris - 0,192M γλυκίνη, pH 8,3 με 0,1% SDS.

Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων: 0,0625M Tris – HCl, pH 6,8 με 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη, 5% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, και 0,001% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης.

Η παρασκευή της πηκτής γινόταν ως εξής:

Πηκτή διαχωρισμού: 10% (w/v) ακρυλαμίδιο και 0,27% (w/v) δις – ακρυλαμίδιο στο ρυθμιστικό διάλυμα της πηκτής διαχωρισμού. Ακολουθούσε διήθηση, προσθήκη 0,025% (v/v) N, N, N', N' - τετραμέθυλο - αιθυλενο - διαμίνης



(TEMED), απαέρωση και προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου, 0,025% (w/v). Στη συνέχεια, ακολουθούσε τοποθέτηση στα σωληνάκια και παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 60min.

Πηκτή συσσώρευσης: 3% (w/v) ακρυλαμίδιο και 0,08% (w/v) δις - ακρυλαμίδιο στο ρυθμιστικό διάλυμα της πηκτής συσσώρευσης. Στη συνέχεια γινόταν διήθηση, προσθήκη 0,025% (v/v) TEMED και απαέρωση. Τέλος, γινόταν προσθήκη 0,025% (w/v) υπερθειικού αμμωνίου και τοποθέτηση στα σωληνάκια.

Τα ενζυμικά παρασκευάσματα αναμιγνυόταν σε αναλογία 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος διπλής ισχύος και θερμαίνονταν για 10min στους 100°C. Οι διαστάσεις της πηκτής ήταν 60 x 5mm, και ο όγκος του δείγματος 50μl. Για την ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε ρεύμα έντασης 1,5mA/πηκτή.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθούσε στερέωση και χρώση των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιούνταν διάλυμα 0,2% (w/v) της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 σε μίγμα CH<sub>3</sub>OH - H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>COOH, σε αναλογία 4 : 5 : 1. Οι πηκτές τοποθετούνταν στο διάλυμα της χρωστικής για 2 - 12 ώρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο αποχρωματισμός, γινόταν με μίγμα CH<sub>3</sub>OH - H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>COOH, σε αναλογία 2 : 7 : 1.

### **B 3. Προσδιορισμός πρωτεΐνης**

#### **Τελικά παρασκευάσματα και στάδια καθαρισμού**

Ο προσδιορισμός πρωτεΐνης στα ενζυμικά παρασκευάσματα, γινόταν με τη μέθοδο Lowry (Lowry και συν. 1951).

Σε 0,5ml ενζυμικού παρασκευάσματος προσθέτονταν 2,5ml διαλύματος αντίδρασης και 0,5ml αραιωμένου 1:1 εμπορικού αντιδραστηρίου Folin. Μετά από παραμονή του μίγματος για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ακολουθούσε μέτρηση της απορρόφησης στα 750nm. Όποτε ήταν απαραίτητο, γινόταν φυγοκέντρηση (2.000g x 5min, θερμοκρασία περιβάλλοντος).

Διάλυμα αντίδρασης: Μίγμα διαλύματος 2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> σε 0,1N NaOH και διαλύματος 0,5% (w/v) CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O σε 1% (w/v) τρυγικό καλιονάτριο σε αναλογία 50:1.



Για το τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του ενζυμικού παρασκευάσματος. Τα ενζυμικά παρασκευάσματα ήταν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε κατά τα στάδια του καθαρισμού τους. Δηλαδή 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 για την πρωτεΐνωση του στελέχους *P. fluorescens* TR2, και 0,1M Tris – HCl, pH 7,0 με 40mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  για το παρασκεύασμα πρωτεΐνωσης του στελέχους *Flavobacterium* spp. MTR3.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης κατασκευάζονταν πρότυπη καμπύλη με αλβουμίνη βόδινου ορού (bovine serum albumin, BSA, Sigma), διαλυμένη στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα που ήταν το κάθε ενζυμικό παρασκεύασμα. Οι συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κυμαίνονταν από 0 έως 200μg/ml.

#### Κλάσματα χρωματογραφίας

Η εκτίμηση της πρωτεΐνης στα κλάσματα χρωματογραφίας από τις στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια καθαρισμού, γινόταν με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm.

Ο μηδενισμός του οργάνου γινόταν με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, με το οποίο γινόταν η έκλουση του ενζυμικού παρασκευάσματος του κάθε στελέχους, κατά τα στάδια καθαρισμού του.

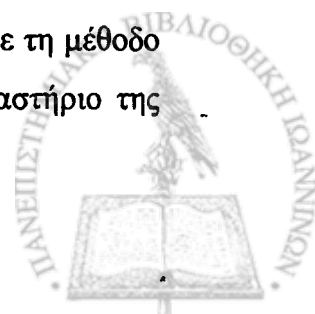
#### **B 4. Προσδιορισμός πρωτεολυτικής δραστηριότητας**

##### Τελικά παρασκευάσματα και στάδια καθαρισμού

Για τον προσδιορισμό της πρωτεολυτικής δραστηριότητας του ενζυμικού παρασκευάσματος του κάθε στελέχους, χρησιμοποιούνταν διαφορετική μέθοδος. Τούτο, διότι η παρουσία ιόντων ασβεστίου δεν είναι συμβατή με το ρυθμιστικό φωσφορικών και το ρυθμιστικό με Tris δεν είναι συμβατό με τη μέθοδο της ο – φθαλδιαλδεΐδης.

##### Πρωτεΐνωση στελέχους *P. fluorescens* TR2

Ο προσδιορισμός της πρωτεολυτικής δραστηριότητας, γινόταν με τη μέθοδο της ο – φθαλδιαλδεΐδης (OPA) (Church και συν. 1983). Το αντιδραστήριο της



μεθόδου αποτελούνταν από 25ml τετραβορικού νατρίου 100mM, 2,5ml δωδέκυλο – θειικού νατρίου 20% (w/v), 40mg ο – φθαλδιαλδεΐδης σε 1ml μεθανόλης και 100μl β – μερκαπτοαιθανόλης σε συνολικό όγκο 50ml.

Το μίγμα της αντίδρασης για τον προσδιορισμό της πρωτεολυτικής δραστηριότητας, αποτελούνταν από 0,5ml ενζυμικού παρασκευάσματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0, 1,0ml 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και 1,0ml από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Το μίγμα επωαζόταν στους 38°C για μία ώρα. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 2,5ml τριχλωρο-οξικού οξέος (TCA) 4% (w/v) και ακολουθούσε παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα, γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ακολουθούσε προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων συστατικών με τη μέθοδο της ο – φθαλδιαλδεΐδης.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, 150μl του διηθήματος, αναμιγνυόταν με 3,0ml του αντιδραστήριου ο – φθαλδιαλδεΐδης. Μετά από ακριβώς 2,5min παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γινόταν μέτρηση της απορρόφησης στα 340nm.

Ο μηδενισμός του οργάνου γινόταν με μίγμα που περιείχε 150μl ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 και 3,0ml αντιδραστήριου ο – φθαλδιαλδεΐδης. Για το τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης κατασκευάζονταν πρότυπη καμπύλη με γλυκίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0. Οι συγκεντρώσεις της γλυκίνης κυμαίνονταν από 0 έως 3.000μM.

Ως μονάδα πρωτεολυτικής δραστηριότητας ορίστηκε το ποσό του ενζύμου που απελευθέρωνε αζωτούχα, διαλυτά σε 2% (w/v) TCA, που έδιναν απορρόφηση ίση με 5μM γλυκίνης, στις συνθήκες του προσδιορισμού.

### **Παρασκευάσμα πρωτεΐνάσης στελέχους *Flavobacterium* spp. MTR3**

Ο προσδιορισμός της πρωτεολυτικής δραστηριότητας, για το ενζυμικό παρασκευάσμα του στελέχους αυτού, γινόταν με τη μέθοδο Lowry. Το αντιδραστήριο της μεθόδου αυτής έχει περιγραφεί παραπάνω.





Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 0,5ml ενζυμικού παρασκευάσματος σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0, 1,0ml 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και 1,0ml από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Το μίγμα επωαζόταν στους 38°C για μία ώρα και ακολουθούσε προσθήκη 2,5ml TCA 4% (w/v). Μετά από παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30min, γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ακολουθούσε προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων συστατικών με την μέθοδο Lowry, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

Για το τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης κατασκευάζονταν πρότυπη καμπύλη με BSA (Sigma) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0. Οι συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κυμαίνονταν από 0 έως 1.000μg/ml.

Ως μονάδα πρωτεολυτικής δραστηριότητας, ορίστηκε το ποσό του ενζύμου που απελευθέρωνε αζωτούχα, διαλυτά σε 2% (w/v) TCA, που έδιναν απορρόφηση ίση με 5μg/ml αλβουμίνης, στις συνθήκες του προσδιορισμού.

Σημειώνεται, ότι σε ορισμένα πειράματα με την πρωτεΐνάση του στελέχους *P. fluorescens* TR2, χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0 και η μέθοδος Lowry για τον προσδιορισμό των διαλυτών αζωτούχων συστατικών. Επίσης, σε ορισμένα πειράματα με το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του στελέχους *Flavobacterium* spp. MTR3 χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 και η μέθοδος ο – φθαλδιαλδεΐδης για τον προσδιορισμό των διαλυτών αζωτούχων συστατικών.

### Κλάσματα χρωματογραφίας

#### Πρωτεΐνάση στελέχους *P. fluorescens* TR2

Η ενζυμική αντίδραση, η επώαση και η προσθήκη του διαλύματος τριχλωρο – οξικού οξέος ήταν όπως περιγράφηκε παραπάνω για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας πρωτεΐνάσης στο τελικό παρασκεύασμα. Η αποτίμηση της συγκέντρωσης των διαλυτών αζωτούχων σε 2% (w/v) TCA γινόταν με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm.



Για το τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης στη θέση του κλάσματος.

### Παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης στελέχους *Flanobacterium* spp. MTR3

Η ενζυμική αντίδραση, η επώαση και η προσθήκη του διαλύματος τριχλωρο - οξικού οξέος ήταν όπως περιγράφηκε παραπάνω για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του παρασκευάσματος της πρωτεΐνάσης στο τελικό παρασκεύασμα. Η αποτίμηση της συγκέντρωσης των διαλυτών αζωτούχων σε 2% (w/v) TCA γινόταν με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm.

Για το τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης στη θέση του κλάσματος.

## **B 5. Χαρακτηρισμός ενζυμικών παρασκευασμάτων**

### **B 5.1. Επίδραση θερμοκρασίας, pH και NaCl στη δραστηριότητα των ενζύμων**

#### Επίδραση της θερμοκρασίας

Για τον προσδιορισμό της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των ενζυμικών παρασκευασμάτων χρησιμοποιούνταν η μέθοδος της ο - φθαλδιαλδεύδης. Το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος, 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 και 0,5ml 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολουθούσε επώαση του μίγματος αυτού σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (7, 32, 38 και 45°C) για μία ώρα. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 1,25ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ο προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο της ο - φθαλδιαλδεύδης όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.



### Επίδραση του pH

Ο προσδιορισμός της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των ενζυμικών παρασκευασμάτων γινόταν με τη μέθοδο ο – φθαλδιαλδεΐδης. Χρησιμοποιούνταν ρυθμιστικά διαλύματα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 6,0, 7,0 και 8,0. Επίσης, παρασκευάζονταν αντίστοιχο διάλυμα 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) σε κάθε ένα από αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα. Το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος, 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος (pH 6,0, 7,0 είτε 8,0) και 0,5ml διαλύματος καζεΐνης στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολουθούσε επώαση για μία ώρα στους 38°C. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 1,25ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ο προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο της ο – φθαλδιαλδεΐδης όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

### Επίδραση του NaCl

Η επίδραση του NaCl στη δραστηριότητα των ενζυμικών παρασκευασμάτων, μελετήθηκε για τις τιμές pH 6,0 και 7,0. Παρασκευάζονταν 10 % (w/v) NaCl σε ρυθμιστικό 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$  pH 6,0 είτε 7,0. Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος, 0,5ml του παραπάνω διαλύματος NaCl και 0,5ml 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (χωρίς NaCl). Η τελική συγκέντρωση του NaCl στο μίγμα της αντίδρασης ήταν 4% (w/v). Το μίγμα επωαζόταν στους 38°C για μία ώρα. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 1,25ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ο προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο της ο – φθαλδιαλδεΐδης, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

### **B 5.2. Προσδιορισμός μοριακού βάρους ενζυμικών παρασκευασμάτων**

Το μοριακό βάρος των ενζύμων προσδιορίστηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, σε στήλη Sephacryl S – 200 (26 x 200mm, ροή 15ml/h,



κλάσματα 1,6ml, εκλουστικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 που περιείχε 0,05M NaCl).

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους: κυτόχρωμα c (12,4kDa), καρβονική αφυδρογονάση (29,0kDa), αλβουμίνη (66,0kDa) και αλκοολική αφυδρογονάση (150,0kDa). Ο εξωτερικός όγκος (void volume) της στήλης, προσδιορίστηκε με μπλε της δεξτράνης (blue dextran 2.000).

### B 5.3. Προσδιορισμός ψευδαργύρου

Προσδιορίστηκε το περιεχόμενο της πρωτεΐνης του *P. fluorescens* TR2 σε ψευδάργυρο. Το μέταλλο προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, χρησιμοποιώντας το όργανο Perkin Elmer μοντέλο 560 A.A.S.

### B 5.4. Κινητική υδρόλυσης ολικής καζεΐνης

Η κινητική σταθερά  $K_m$  προσδιορίστηκε με το πακέτο της Ultrafit The Non-linear package, Biosoft.

Ο προσδιορισμός της πρωτεολυτικής δραστηριότητας γινόταν με υπόστρωμα ολική αγελαδινή καζεΐνη (C 3400, Sigma). Η καζεΐνη, διαλυόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0, έτσι ώστε η τελική της συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης να κυμαίνεται από 0,1 έως 16mg/ml.

Το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 0,1ml ενζυμικού παρασκευάσματος, 0,2ml διαλύματος καζεΐνης, και 0,2ml από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Γινόταν επώαση του μίγματος για μία ώρα στους 38°C. Ακολουθούσε πρόσθεση 0,5ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30min, γινόταν φυγοκέντρηση του μίγματος (2.500g x 5min, θερμοκρασία περιβάλλοντος). Ο προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο ο - φθαλδιαλδεΐδης, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.



### **B 5.5. Επίδραση τροποποιητών στη δραστικότητα των ενζυμικών παρασκευασμάτων**

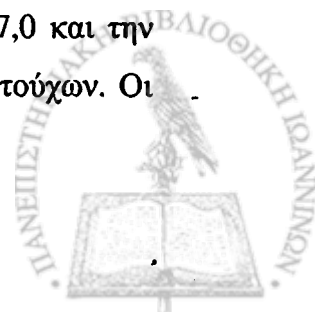
#### **Πρωτεΐνάση στελέχους *P. fluorescens* TR2**

Οι τροποποιητές που χρησιμοποιήθηκαν διαλύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0. Η τελική συγκέντρωσή τους στο μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης ήταν 1mM, είτε 10mM. Αρχικά, γινόταν προεπάση του ενζυμικού παρασκευάσματος με το διάλυμα του τροποποιητή για 30min στους 25°C. Το μίγμα της προεπάσης αποτελούνταν από 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος και 0,5ml διαλύματος τροποποιητή. Μετά το τέλος της προεπάσης, γινόταν προσθήκη 0,5ml 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολουθούσε επάση στους 38°C για μία ώρα. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 1,25ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ο προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο της ο – φθαλδιαλδεΐδης, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

Το % ποσοστό της απομένουσας πρωτεολυτικής δραστικότητας του ενζύμου, μετά την κατεργασία του με το αντίστοιχο αντιδραστήριο, υπολογιζόταν σε σχέση με τη δραστικότητα του ακατέργαστου ενζυμικού παρασκευάσματος. Ως ακατέργαστο ενζυμικό παρασκεύασμα, χρησιμοποιούνταν παρασκεύασμα το οποίο προεπωαζόταν στις ίδιες συνθήκες, με ρυθμιστικό διάλυμα αντί διαλύματος τροποποιητή. Ως τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του ενζυμικού παρασκευάσματος και για τον μηδενισμό του οργάνου ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του διηθήματος.

#### **Παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης στελέχους *Flavobacterium* spp. MTR3**

Στην περίπτωση των τροποποιητών 2 – μερκαπτοαιθανόλη, κυστεΐνη,  $HgCl_2$ , DEPC, EEDQ και NAI χρησιμοποιήθηκε η ίδια μεθοδολογία όπως περιγράφηκε παραπάνω για την πρωτεΐνάση του στελέχους *P. fluorescens* TR2 χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 και την μέθοδο ο – φθαλδιαλδεΐδης για τον προσδιορισμό των διαλυτών αζωτούχων. Οι



υπόλοιποι τροποποιητές διαλύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0. Η συγκέντρωση του κάθε τροποποιητή στο τελικό μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης ήταν 10mM. Γινόταν προεπάση το παρασκευάσματος με τον αντίστοιχο τροποποιητή, για 30min στους 25°C. Το μίγμα της προεπάσης αποτελούνταν από 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος και 0,5ml από το διάλυμα του τροποποιητή. Ακολουθούσε προσθήκη 0,5ml 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα και επάση για μια ώρα στους 38°C. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη 1,25ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ακολουθούσε διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ο προσδιορισμός των διαλυτών αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο Lowry, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

#### **B 5.6. Επανενεργοποίηση αποενζύμων με μεταλλοϊόντα.**

##### **Λήψη αποενζύμου**

Γινόταν κατεργασία των ενζυμικών παρασκευασμάτων με EDTA. Η κατεργασία γινόταν με προεπάση 1,0ml ενζυμικού παρασκευάσματος και 0,2ml διαλύματος EDTA σε 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 (τελική συγκέντρωση EDTA 10mM), στους 25°C για 30min. Ακολουθούσε διαπίδυση του κατεργασμένου ενζυμικού παρασκευάσματος στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για 48h στους 5°C.

##### **Επανενεργοποίηση αποενζύμου**

Η επίδραση ασβεστίου και ψευδαργύρου στο κατεργασμένο με EDTA ενζυμικό παρασκεύασμα ελεγχόταν με προεπάση του παρασκευάσματος με διάλυμα αλάτων των μετάλλων και ακολούθως μέτρηση της πρωτεολυτικής δραστικότητας. Το μίγμα της προεπάσης αποτελούνταν από 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος κατεργασμένου με EDTA και 0,5ml υδατικού διαλύματος  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  είτε  $ZnSO_4$  (τελική συγκέντρωση 1mM). Η προεπάση διαρκούσε 30min στους 25°C. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 0,5ml 1% (w/v) καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0 και επάση του μίγματος της ενζυμικής αντίδρασης για μία ώρα στους 38°C. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη



1,25ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ο προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων, γινόταν με τη μέθοδο της ο - φθαλδιαλδεϋδης, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

## **B 6. Θερμοανθεκτικότητα ενζυμικών παρασκευασμάτων**

### **B 6.1. Κατεργασίες σε χαμηλές θερμοκρασίες**

Η μελέτη της θερμοανθεκτικότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες αφορά κατεργασίες στη περιοχή θερμοκρασιών 50 – 92°C. Γινόταν έλεγχος της θερμοανθεκτικότητας των ενζυμικών παρασκευασμάτων είτε παρουσία, είτε και όχι ιόντων ασβεστίου.

Οι θερμικές κατεργασίες γίνονταν σε υδατόλουτρο το οποίο είχε ρυθμιστεί στη συγκεκριμένη κάθε φορά θερμοκρασία. Χρησιμοποιούνταν γυάλινα μικρά σωληνάκια με βιδωτό καπάκι, τα οποία προθερμαίνονταν για 10min, πριν την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Σε προθερμασμένο σωληνάκι προσθέτονταν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M Tris – HCl, pH 7,0, και θερμαίνονταν για 2min. Ακολούθως, προσθέτονταν 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος και γινόταν η θερμική κατεργασία, η οποία διαρκούσε 2min. Οι θερμοκρασίες στις οποίες γίνονταν οι θερμικές κατεργασίες, ήταν 50, 55, 60, 65, 70, 80 και 92°C.

Η επίδραση των  $\text{Ca}^{2+}$  στη θερμοανθεκτικότητα του ενζύμου ελεγχόταν με προεπάση του ενζυμικού παρασκευάσματος με διάλυμα  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Το μίγμα της προεπάσης αποτελούνταν από 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος και 0,5ml διαλύματος  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0 (τελική συγκέντρωση 10mM). Η προεπάση γινόταν σε σωληνάκι θερμικής κατεργασίας για 30min στους 25°C. Στη συνέχεια γινόταν η θερμική κατεργασία.

Μετά τη θερμική κατεργασία ακολουθούσε άμεση ψύξη σε παγωμένο νερό, προσθήκη 0,5ml 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα και το μίγμα επωάζονταν στους 38°C για μία ώρα.



Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 1,25ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ο προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο Lowry, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

Η % απομένουσα πρωτεολυτική δραστικότητα του ενζύμου υπολογιζόταν σε σχέση με τη δραστικότητα μη θερμικά κατεργασμένου ενζυμικού παρασκευάσματος, που είχε δεχθεί ανάλογο χειρισμό.

Για το τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του ενζυμικού παρασκευάσματος.

Ο μηδενισμός του οργάνου γινόταν με ρυθμιστικό διάλυμα.

### Μεταβολές πρωτεΐνάσης *P. fluorescens* TR2 στους 60°C

#### Έλεγχος αυτόλυσης με ηλεκτροφόρηση

Ο έλεγχος αυτόλυσης της πρωτεΐνάσης του στελέχους *P. fluorescens* TR2 κατά τη θερμική της κατεργασία στους 60°C έγινε ηλεκτροφορητικά. Ο έλεγχος αυτόλυσης γινόταν είτε απουσία, είτε και παρουσία καζεΐνης.

Η θερμική κατεργασία του ενζύμου γινόταν σε υδατόλουτρο, χρησιμοποιώντας γυάλινα μικρά σωληνάκια με βιδωτό καπάκι, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Το ενζυμικό παρασκεύασμα που χρησιμοποιούνταν περιείχε 114μg ενζυμικής πρωτεΐνης ανά 200μl.

#### Απουσία καζεΐνης

Το ένζυμο, όγκου 100μl, θερμαίνονταν στους 60°C για 6min, σε σωληνάκι που είχε προθερμανθεί σ' αυτή τη θερμοκρασία για 2min.

#### Παρουσία καζεΐνης

Προθερμαίνονταν 50μl διαλύματος καζεΐνης στους 60°C για 6min. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη 50μl παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης και θερμική κατεργασία του μίγματος για 6min στους 60°C. Το διάλυμα της καζεΐνης παρασκευαζόταν με διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0





και η συγκέντρωσή της στο μίγμα καζεΐνης – ενζύμου που στο οποίο γινόταν η θερμική κατεργασία, ήταν πενταπλάσια της συγκέντρωσης της ενζυμικής πρωτεΐνης.

Μετά την θερμική κατεργασία ακολουθούσε άμεση ψύξη σε παγωμένο νερό, προσθήκη ίσου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος ηλεκτροφόρησης διπλής ισχύος και θέρμανση για 10min στους 100°C. Οι διαστάσεις της πηκτής ήταν 60 x 5mm και ο όγκος του δείγματος 40μl. Για την ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε ρεύμα έντασης 1,5mA/πηκτή.

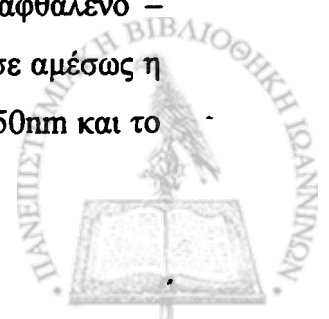
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθούσε στερέωση και χρώση των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιούνταν διάλυμα 0,2% (w/v) της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R – 250 σε μίγμα CH<sub>3</sub>OH – H<sub>2</sub>O – CH<sub>3</sub>COOH, σε αναλογία 4 : 5 : 1. Οι πηκτές τοποθετούνταν στο διάλυμα της χρωστικής για 2 – 12 ώρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο αποχρωματισμός, γινόταν με μίγμα CH<sub>3</sub>OH – H<sub>2</sub>O – CH<sub>3</sub>COOH, σε αναλογία 2 : 7 : 1.

Στα παραπάνω πειράματα χρησιμοποιούνταν επίσης, θερμικά ακατέργαστα παρασκευάσματα. Δηλαδή, θερμικά ακατέργαστο ενζυμικό παρασκεύασμα (του οποίου η πρωτεολυτική δραστηριότητα ήταν το 100% της αναμενόμενης), όπως και θερμικά ακατέργαστη καζεΐνη για έλεγχο τυχόν διάσπασής της.

### Φαινόμενη υδροφοβία και συσσωμάτωση

Η μεταβολή της φαινόμενης υδροφοβίας της πρωτεΐνάσης κατά τη θέρμανσή της στους 60°C μελετήθηκε φθορισμομετρικά με χρήση του ειδικού ιγνηθέτη 8 – ανιλινο – ναφθαλενο – σουλφονικό οξύ (Haque και Kinsella 1988).

Η θερμική κατεργασία γινόταν σε υδατόλουτρο, χρησιμοποιώντας μικρά γυάλινα σωληνάκια. Τα σωληνάκια, πριν την κατεργασία του ενζύμου, προθερμαίνονταν για 2min στους 60°C. Ποσότητα του ενζύμου, ίση με 0,4ml, προσθέτονταν στα σωληνάκια και εφαρμοζόταν θερμική κατεργασία στους 60°C για 0, 30, 60, 120 και 360 sec. Ακολουθούσε αμέσως ψύξη σε παγωμένο νερό και προσθήκη 0,8ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0. Το μίγμα αυτό αναμιγνυόταν με ίσο όγκο διαλύματος 8 – ανιλινο – ναφθαλενο – σουλφονικού οξέος (τελική συγκέντρωση 25·10<sup>-3</sup> mM) και ακολουθούσε αμέσως η μέτρηση της απορρόφησης. Το μήκος κύματος διέγερσης (λ<sub>ex</sub>), ήταν 350nm και το



μήκος κύματος εκπομπής ( $\lambda_{em}$ ), ήταν 470nm. Χρησιμοποιούνταν φθορισμόμετρο Perkin – Elmer LS – 3 και κυψελίδες χαλαζία (1cm x 1cm). Το πλάτος της σχισμής ήταν 5nm, και για τα δύο μήκη κύματος.

Η συσσωμάτωση της πρωτεΐνάσης κατά τη θέρμανσή της στους 60°C μελετήθηκε με μέτρηση της σκέδασης του φωτός, επίσης φθορισμομετρικά (Haque και Kinsella 1988).

Η θερμική κατεργασία γινόταν σε υδατόλουτρο και σωληνάκια, όπως περιγράφηκε στην περίπτωση μεταβολής της φαινόμενης υδροφοβίας. Ποσότητα του ενζύμου, ίση με 0,75ml, προσθέτονταν στα σωληνάκια και εφαρμοζόταν θερμική κατεργασία στους 60°C για 0, 30, 60, 120 και 360 sec. Ακολουθούσε αμέσως ψύξη σε παγωμένο νερό και προσθήκη 1,5ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M  $K_2HPO_4 / KH_2PO_4$ , pH 7,0. Μετά από καλή ανάδευση σε αναδευτήρα (Vortex) μετριόταν η απορρόφηση. Το μήκος κύματος διέγερσης ( $\lambda_{ex}$ ), ήταν 291nm και το μήκος κύματος εκπομπής ( $\lambda_{em}$ ), ήταν 297nm. Χρησιμοποιούνταν φθορισμόμετρο Perkin – Elmer LS – 3 και κυψελίδες χαλαζία (1cm x 1cm). Το πλάτος της σχισμής ήταν 10nm και για τα δύο μήκη κύματος.

Στα πειράματα μέτρησης της φαινόμενης υδροφοβίας και σκέδασης του φωτός χρησιμοποιούνταν και μη θερμικά κατεργασμένο ενζυμικό παρασκεύασμα. Ο μηδενισμός του οργάνου γινόταν με το παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα.

## **B 6.2. Κατεργασίες σε υψηλές θερμοκρασίες**

Η μελέτη της θερμοανθεκτικότητας των δύο ενζυμικών παρασκευασμάτων που μελετήθηκαν, σε υψηλές θερμοκρασίες, αφορά κατεργασίες στη περιοχή θερμοκρασιών 100 – 140°C. Η ανθεκτικότητα των ενζυμικών παρασκευασμάτων ελέγχονταν συνήθως παρουσία  $Ca^{2+}$  και σε ορισμένες περιπτώσεις και απουσία  $Ca^{2+}$ .

Οι θερμικές κατεργασίες γίνονταν σε ελαιόλουτρο, το οποίο είχε ρυθμιστεί στη συγκεκριμένη κάθε φορά θερμοκρασία. Χρησιμοποιούνταν γυάλινοι τριχοειδείς σωληνίσκοι χωρητικότητας 100μl (Drummond Microcap, Drummond Scientific Co., USA), οι οποίοι φράζονταν στα άκρα τους με τη βοήθεια φλόγας.



Αρχικά, γινόταν προεπώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με διάλυμα  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0 στους 25°C για 30min. Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  στο μίγμα της προεπώασης, ήταν 10mM. Στη συνέχεια, 80μl από το κατεργασμένο αυτό ενζυμικό παρασκεύασμα, τοποθετούνταν σε γυάλινο τριχοειδή σωληνίσκο και εφαρμοζόταν η θερμική κατεργασία. Ακολουθούσε ψύξη σε παγωμένο νερό.

Για τον προσδιορισμό της πρωτεολυτικής δραστηριότητας, το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 70μl θερμικά κατεργασμένου ενζυμικού παρασκευάσματος, 140μl του παραπάνω ρυθμιστικού διαλύματος και 140μl 1% (w/v) ολικής αγελαδινής καζεΐνης (C 3400, Sigma) στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια γινόταν επώαση για μία ώρα στους 38°C, προσθήκη 350μl TCA 4% (w/v), παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρωση (2.500g x 15min, θερμοκρασία περιβάλλοντος). Τα διαλυτά σε 2% (w/v) TCA αζωτούχα προσδιορίζονταν με τη μέθοδο Lowry, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

Ο υπολογισμός της % απομένουσας πρωτεολυτικής δραστηριότητας γινόταν σε σχέση με τη δραστηριότητα μη θερμικά κατεργασμένου ενζυμικού παρασκευάσματος που είχε δεχθεί ανάλογο χειρισμό.

Για το τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris – HCl, pH 7,0 στη θέση του ενζυμικού παρασκευάσματος στο μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης.

## **B 7. Υδρόλυση υποστρωμάτων**

### **B 7.1. Υδρόλυση καζεϊνών**

Η υδρόλυση της α – και β – καζεΐνης αγελαδινού γάλακτος (Sigma) παρακολουθήθηκε με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου παρουσία απορρυπαντικού (SDS – PAGE) (Laemmli 1970).

Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 0,1ml ενζυμικού παρασκευάσματος, 0,2ml υποστρώματος και 0,2ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0. Τα υποστρώματα, α – και β – καζεΐνης αγελαδινού



γάλακτος, ήταν διαλυμένα στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα, σε τελική συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης 1mg/ml. Η επώαση γινόταν στους 38°C. Η επώαση σταματούσε με προσθήκη ίσου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος ηλεκτροφόρησης διπλής ισχύος και ακολουθούσε θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C για 10min σε υδατόλουτρο. Οι διαστάσεις της πηκτής ήταν 60 x 5mm και ο όγκος του δείγματος 50μl. Για την ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε ρεύμα έντασης 1,5mA/πηκτική.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθούσε στερέωση και χρώση των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιούνταν διάλυμα 0,2% (w/v) της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R - 250 σε μίγμα CH<sub>3</sub>OH - H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>COOH, σε αναλογία 4 : 5 : 1. Οι πηκτές τοποθετούνταν στο διάλυμα της χρωστικής για 2 - 12 ώρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο αποχρωματισμός, γινόταν με μίγμα CH<sub>3</sub>OH - H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>COOH, σε αναλογία 2 : 7 : 1.

Η υδρόλυση της ολικής καζεΐνης αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, μελετήθηκε με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου παρουσία ουρίας (Urea - PAGE) (Andrews 1983).

Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από 0,1ml ενζυμικού παρασκευάσματος, 0,2ml υποστρώματος και 0,2ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0. Τα υποστρώματα, ολική αγελαδινή είτε πρόβεια καζεΐνη (εργαστηριακά παρασκευάσματα), ήταν διαλυμένα στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα, σε τελική συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης 1mg/ml. Η επώαση γινόταν στους 38°C για χρονικά διαστήματα από 0 έως 30min. Η επώαση σταματούσε με προσθήκη ίσου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος της ηλεκτροφόρησης και ακολουθούσε θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C για 10min σε υδατόλουτρο.

Τα διαλύματα της ηλεκτροφόρησης ήταν τα εξής:

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού: 32,15gr Tris και 192,85gr ουρία σε 500ml νερό. Το pH ρυθμιζόταν στην τιμή 8,9 με πυκνό HCl (37% (w/w), d=1,19kg/l).

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής συσσώρευσης: 4,15gr Tris και 150gr ουρία σε 500ml νερό. Το pH ρυθμιζόταν στην τιμή 7,6 με πυκνό HCl (37% (w/w), d=1,19kg/l).



Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων: 0,75gr Tris και 42gr ουρία και 0,7ml β – μερκαπτοαιθανόλη σε τελικό όγκο 100ml Το pH ρυθμιζόταν στην τιμή 7,6 με HCl (37% (w/w), d=1,19kg/l).

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων : 15gr Tris και 73gr γλυκίνη σε τελικό όγκο 5 λίτρα (με νερό). Το pH ρυθμιζόταν στην τιμή 8,4 με HCl (37% (w/w), d=1,19kg/l).

Διάλυμα ακρυλαμιδίου: 40% (w/v) ακρυλαμιδίου σε απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου: 10% (w/v) υπερθειικό αμμώνιο σε απεσταγμένο νερό.

Η παρασκευή της πηκτής γινόταν ως εξής:

Πηκτή διαχωρισμού: Αναμιγνύονταν 22,5ml του διαλύματος ακρυλαμιδίου με 52,5ml ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής διαχωρισμού και 0,375gr δις – ακρυλαμιδίου. Ακολουθούσε διήθηση και προσθήκη 37,5μl TEMED. Στη συνέχεια γινόταν απαέρωση, προσθήκη 282μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου και τοποθέτηση στα σωληνάκια. Στη συνέχεια αφηνόταν για 60min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός.

Πηκτή συσσώρευσης: Αναμιγνύονταν 5ml διαλύματος ακρυλαμιδίου με 45ml ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής συσσώρευσης και 0,1gr δις – ακρυλαμιδίου. Ακολουθούσε διήθηση και προσθήκη 25μl TEMED. Τέλος γινόταν απαέρωση, προσθήκη 300μl διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου και τοποθέτηση στα σωληνάκια. Όπως και για την πηκτή διαχωρισμού, απαιτούνταν στη συνέχεια 60min παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τον πολυμερισμό της πηκτής.

Τα δείγματα αναμιγνύονταν σε αναλογία 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος και θερμαίνονταν στους 100°C για 10min, σε υδατόλουτρο. Οι διαστάσεις της πηκτής ήταν 60 x 5mm, και ο όγκος του δείγματος 30μl. Για την ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε ρεύμα τάσης 100 V.

Η στερέωση και χρώση των πρωτεϊνών γινόταν με διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G – 250, σύμφωνα με τη μέθοδο Blakesley και Boezzi (1977). Οι πηκτές παρέμεναν στο διάλυμα της χρωστικής για μια νύχτα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια το διάλυμα της χρωστικής απομακρυνόταν και οι πηκτές εμβαπτιζόνταν σε απεσταγμένο νερό, ώστε να απομακρυνθεί η χρωστική από τα σημεία όπου δεν υπήρχαν πρωτεΐνες.



Το διάλυμα της χρώσης παρασκευαζόταν ως εξής: Παρασκευαζόταν 0,2% (w/v) διάλυμα της χρωστικής και αναμιγνυόταν με ίσο όγκο 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το μίγμα αφηνόταν για μια νύχτα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθούσε διήθηση από φίλτρο Whatman N°1 και ανάμιξη του διηθήματος με 10M KOH, σε αναλογία όγκων 9:1. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 12% (w/v) TCA.

### **B 7.2. Υδρόλυση πεπτιδίων τυριών**

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υδατικό εκχύλισμα τυριού (Water Soluble Extract, WSE), διαπιδυμένο υδατικό εκχύλισμα τυριού (Dialyzed Water Soluble Extract, DWSE) και παρασκεύασμα μικρών πεπτιδίων (εργαστηριακά παρασκευάσματα). Επίσης, ως μέτρο σύγκρισης, χρησιμοποιήθηκε και ολική αγελαδινή καζεΐνη (εργαστηριακό παρασκεύασμα).

Η υδρόλυση των υποστρωμάτων από τα παρασκευάσματα των δύο στελεχών που μελετήθηκαν παρακολουθήθηκε φωτομετρικά.

### **Πρωτεΐνάση *P. fluorescens* TR2**

Το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 0,25ml ενζυμικού παρασκευάσματος, 0,5ml υποστρώματος και 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0. Τα υποστρώματα διαλύονταν στο παραπάνω ρυθμιστικό διάλυμα, σε τελική συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης 1mg/ml. Η επώαση γινόταν στους 38°C για μία ώρα. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 1,25ml 4% (w/v) TCA και μετά από παραμονή για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, γινόταν διήθηση από φίλτρα Whatman N°1. Ο προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο της ο - φθαλδιαλδεΐδης όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

### **Παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης *Flavobacterium* spp. MTR3**

Εφαρμοζόταν η ίδια πορεία, όπως περιγράφηκε για την υδρόλυση από την πρωτεΐνάση του στελέχους *P. fluorescens* TR2. Οι διαφορές είναι ότι το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,1M Tris - HCl, pH 7,0 και ότι ο



προσδιορισμός των διαλυτών σε 2% (w/v) TCA αζωτούχων γινόταν με τη μέθοδο Lowry, όπως αυτή έχει ήδη περιγραφεί.

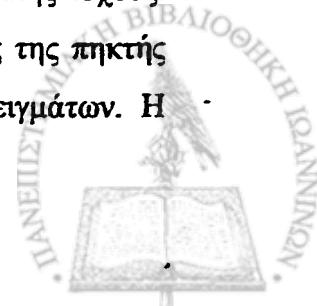
Η υδρόλυση πεπτιδίων του υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού είτε πρόβειου τυριού (WSE) και του παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων από την πρωτεΐνωση *P. fluorescens* TR2, παρακολούθηθηκε με ανάστροφη υγρή χρωματογραφία (RP – HPLC). Επιπλέον, η υδρόλυση πεπτιδίων του υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού είτε πρόβειου τυριού (WSE) από το ίδιο ένζυμο, παρακολούθηθηκε με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου παρουσία απορρυπαντικού (SDS – PAGE).

#### Ανάστροφη υγρή χρωματογραφία (RP – HPLC)

Το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 50μl ενζυμικού παρασκευάσματος και 500μl διαλύματος υποστρώματος. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης του παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων ήταν 2,5mg/ml. Η επώαση γινόταν στους 37°C για διάφορους χρόνους. Ακολουθούσε προσθήκη τριφθορο – οξικού οξέος (TFA), σε τελική συγκέντρωση 1,2% (v/v) και φυγοκέντρωση (2.000g x 5min, θερμοκρασία περιβάλλοντος). Το υπερκείμενο αναλύονταν με υγρή χρωματογραφία. Τα προς ανάλυση δείγματα διηθούνταν από φίλτρα οξικής κυτταρίνης 0,45μm (Altech Ass. Inc. Deerfield, IL, USA) πριν την έγχυσή τους στο χρωματογράφο. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας Waters 616 LC με ανιχνευτή φωτοδιόδων 996. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Millipore Delta Pak C18 (3,9 x 300mm, 5μm, 100Å). Η έκλυση γινόταν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με γραμμική βαθμίδωση από 100% A έως 50% B για 80min. Το διάλυμα A ήταν 0,1% (v/v) TFA (τριφθορο-οξικό οξύ) σε απεσταγμένο νερό και το διάλυμα B 0,1% (v/v) TFA σε ακετονιτρίλιο. Η ταχύτητα ροής ήταν 0,8ml/min. Η απορρόφηση του εκλούσματος μετριοταν στα 214nm.

#### Ηλεκτροφόρηση SDS – PAGE

Οι συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης ήταν οι ίδιες όπως στην περίπτωση της χρωματογραφικής ανάλυσης. Μετά την επώαση, τα δείγματα αναμιγνύονταν με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος ηλεκτροφόρησης διπλής ισχύος. Ποσότητα δείγματος, 10μl, φορτώνονταν στην πηκτή. Οι διαστάσεις της πηκτής ήταν 9cm x 9cm x 0,8mm και υπήρχαν σ' αυτή δέκα θέσεις δειγμάτων. Η



ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν σε τάση 100V. Στην περίπτωση του αγελαδινού υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος χρησιμοποιούνταν πηκτή διαχωρισμού 15% σε ακρυλαμίδιο και στην περίπτωση του πρόβειου 12%.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ακολουθούσε στερέωση και χρώση των πρωτεϊνών. Χρησιμοποιούνταν διάλυμα 0,2% (w/v) της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R - 250 σε μίγμα  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{COOH}$ , σε αναλογία 4 : 5 : 1. Οι πηκτές τοποθετούνταν στο διάλυμα της χρωστικής για 2 - 12 ώρες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο αποχρωματισμός, γινόταν με μίγμα  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3\text{COOH}$ , σε αναλογία 2 : 7 : 1.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως πρότυπα, αγελαδινή είτε πρόβεια καζεΐνη (εργαστηριακά παρασκευάσματα), 1mg/ml στο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος. Επίσης, διάλυμα δεικτών μοριακού βάρους (Gibco) που περιείχε λυσοζύμη (14,3kDa),  $\beta$  - λακτογλοβουλίνη (18,4kDa), καρβονική αφυδρογονάση (29,0kDa), ωαλβουμίνη (43,0kDa), αλβουμίνη βοδινού ορού (68,0kDa), φωσφορυλάση  $\beta$  (97,4kDa) και μυοσίνη / βαριά αλυσίδα (200,0kDa).

### B 7.3. Δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης

Η δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης των ενζυμικών παρασκευασμάτων προσδιορίζονταν φωτομετρικά με υποστρώματα νιτροανιλίδια (Brand και Zizer 1973). Το μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 0,3ml ενζυμικού παρασκευάσματος, 0,05ml υποστρώματος και 1,25ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,05M  $\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0. Τα ενζυμικά παρασκευάσματα ήταν στο παραπάνω ρυθμιστικό φωσφορικών. Τα διαλύματα των νιτροανιλιδίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανολικά, 5mg/ml.

Η επώαση γινόταν στους 38°C για 60min, και ακολουθούσε μέτρηση της απορρόφησης στα 410nm.

Για το τυφλό της μεθόδου χρησιμοποιούνταν ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του ενζυμικού παρασκευάσματος στο μίγμα της αντίδρασης.





## **B 8. Υποστρώματα: καζεΐνες και πεπτίδια**

### **B 8.1. Καζεΐνες**

#### **Ολική καζεΐνη**

Η αγελαδινή και πρόβεια καζεΐνη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εργαστηριακά παρασκευάσματα ισοηλεκτρικής καζεΐνης (Hill 1963). Οι λυοφιλοποιημένες καζεΐνες διατηρούνταν στην κατάψυξη.

#### **as<sub>1</sub> – καζεΐνη**

Η as<sub>1</sub> – καζεΐνη που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από ολική αγελαδινή καζεΐνη που διαχωρίστηκε με χρωματογραφία ιονανταλλαγής (DEAE – κυτταρίνη) (Creamer 1974). Η λυοφιλοποιημένη as<sub>1</sub> – καζεΐνη διατηρούνταν στην κατάψυξη.

### **B 8.2. Πεπτίδια τυριών**

#### **Υδατικό εκχύλισμα τυριού**

Το λειοτριβημένο τυρί, ομογενοποιούνταν με διπλάσια ποσότητα νερού για 5min σε Stomacher και το ομογενοποίημα κρατούνταν σε υδατόλουτρο στους 40°C για μία ώρα. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση σε 3.000g x 30min στους 4°C. Το λίπος που λαμβανόταν στην επιφάνεια, απομακρυνόταν με διήθηση από υαλοβάμβακα και το υπερκείμενο διηθούνταν από φίλτρα Whatman N°113 (Kuchroo και Fox 1982).

Το υδατικό εκχύλισμα (WSE) λυοφιλοποιούνταν και διατηρούνταν στην κατάψυξη.

#### **Διαπιδυμένο υδατικό εκχύλισμα τυριού**

Το διαπιδυμένο υδατικό εκχύλισμα τυριού (DWSN) λαμβανόταν με διαπίδυση (μεμβράνες διαπίδυσης 10kDa) του υδατικού εκχυλίσματος τυριού σε απεσταγμένο νερό στους 4°C. Το λυοφιλοποιημένο παρασκεύασμα διατηρούνταν στην κατάψυξη.



### Παρασκεύασμα μικρών πεπτιδίων

Τα παρασκεύασμα μικρών πεπτιδίων προέρχονταν από υδρόλυση της ασ<sub>1</sub>-καζεΐνης με πεψίνη (Shimizu και συν. 1984). Το μίγμα της αντίδρασης αποτελούνταν από διάλυμα 2% (w/v) ασ<sub>1</sub> - καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M οξικού νατρίου, pH 6,4 και πεψίνη (Sigma). Η αναλογία ενζύμου / υποστρώματος ήταν 1.: 330 (w/w). Η επώαση γίνονταν στους 30°C για 30min. Μετά την επώαση, το pH ρυθμιζόταν στην τιμή 8,0 και ακολουθούσε παραμονή για 20min, για αδρανοποίηση του ενζύμου. Το pH του μίγματος ρυθμιζόταν στο 6,4 με 0,1N HCl και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 1.840g για 10min. Το υπερκείμενο διαπιδύονταν σε απεσταγμένο νερό σε μεμβράνες διαπίδυσης με όριο αποκλεισμού 2kDa (benzoylated dialysis tubing, Sigma) στους 4°C. Το λυοφιλοποιημένο παρασκεύασμα διατηρούνταν στην κατάψυξη.

Ο έλεγχος του παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων, έγινε με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου παρουσία απορρυπαντικού και ουρίας (Urea - SDS - PAGE). Ακολουθήθηκε η μέθοδος των Swank και Munkres (1971) με ορισμένες τροποποιήσεις.

### **B 9. Έκφραση αποτελεσμάτων**

Τα αποτελέσματα για τις ιδιότητες των ενζυμικών παρασκευασμάτων είναι από ένα πείραμα. Όμως, τα πειράματα επιτελέστηκαν συνολικά τρεις φορές με παρόμοια αποτελέσματα.

Η πορεία απομόνωσης / καθαρισμού των ενζυμικών παρασκευασμάτων εφαρμόστηκε αρκετές φορές, δηλαδή όσο χρειάστηκε για τη λήψη ικανής ποσότητας παρασκευάσματος.



## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Γ.1. Χαρακτηρισμός ψυχρότροφων στελεχών

Τα δύο ψυχρότροφα στελέχη που απομονώθηκαν από νωπό γάλα και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ταυτοποιήθηκαν ως *Pseudomonas fluorescens* και *Flavobacterium* spp. Ονοματίστηκαν *Pseudomonas fluorescens* TR2 και *Flavobacterium* spp. MTR3.

Το γένος *Pseudomonas* περιλαμβάνει αρνητικά κατά Gram ασπορογόνα ραβδία, τα οποία κινούνται με μία ή περισσότερες πολικές βλεφαρίδες. Ο μεταβολισμός τους είναι αυστηρά οξειδωτικός και έχουν μικρές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά. Αρκετά είδη παράγουν υδατοδιαλυτές χρωστικές, ορισμένες από τις οποίες εμφανίζουν φθορισμό.

Τα είδη του γένους *Flavobacterium* είναι αρνητικά κατά Gram ασπορογόνα ραβδία, που κινούνται με περίτριχες βλεφαρίδες ή είναι ακίνητα. Η ανάπτυξή τους σε στερεά θρεπτικά υλικά εμφανίζει χρώμα κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο ή καστανό, λόγω των χρωστικών που παράγουν. Ο μεταβολισμός τους είναι οξειδωτικός, ενώ ελάχιστα μέλη είναι προαιρετικά αναερόβια. Εμφανίζουν απαιτήσεις σε θρεπτικά υλικά, όπως για βιταμίνες Β.

Στελέχη του γένους *Pseudomonas* και κυρίως του είδους *P. fluorescens* έχουν αναφερθεί ως οι συνηθέστεροι πρωτεολυτικοί και λιπολυτικοί οργανισμοί στο γάλα και τα προϊόντα του. Λόγω της μεγάλης συχνότητας εμφάνισής τους και επειδή στο γάλα δρουν με τα εξωκυτταρικά τους ένζυμα, πρωτεϊνάσες και λιπάσες, οι μελέτες των ενζύμων των ψυχρότροφων βακτηρίων αφορούν κυρίως ένζυμα στελεχών του *P. fluorescens* (Law 1979, Fairbairn και Law 1986a, Stead 1986, Sorhaug και Stepaniak 1991).

Συχνά έχουν απομονωθεί επίσης και *Flavobacteria* από ψυχρόμενο νωπό γάλα (Cousin 1982, Fox και συν. 1989). Ερευνητές ανέφεραν, ότι τα είδη του γένους *Flavobacterium*, αντιπροσωπεύουν σημαντικό ποσοστό μεταξύ των



πρωτεολυτικών ψυχροτρόφων βακτηρίων του γάλακτος και είναι μάλιστα το δεύτερο γένος, μετά το γένος *Pseudomonas* (Zahram και συν. 1992).

Τα δύο στελέχη που μελετήθηκαν παρουσίαζαν πρωτεολυτική δράση τόσο στους 25°C, όσο και στους 5°C, όπως αποτιμήθηκε με την ημιποσοτική μέθοδο της διάχυσης. Το *P. fluorescens* TR2 ήταν σαφώς περισσότερο πρωτεολυτικό από το *Flavobacterium* spp. MTR3.



## Γ 2. Μελέτη εξωκυτταρικής πρωτεΐνάσης *Pseudomonas fluorescens* TR2

### Γ 2.1. Απομόνωση πρωτεΐνάσης

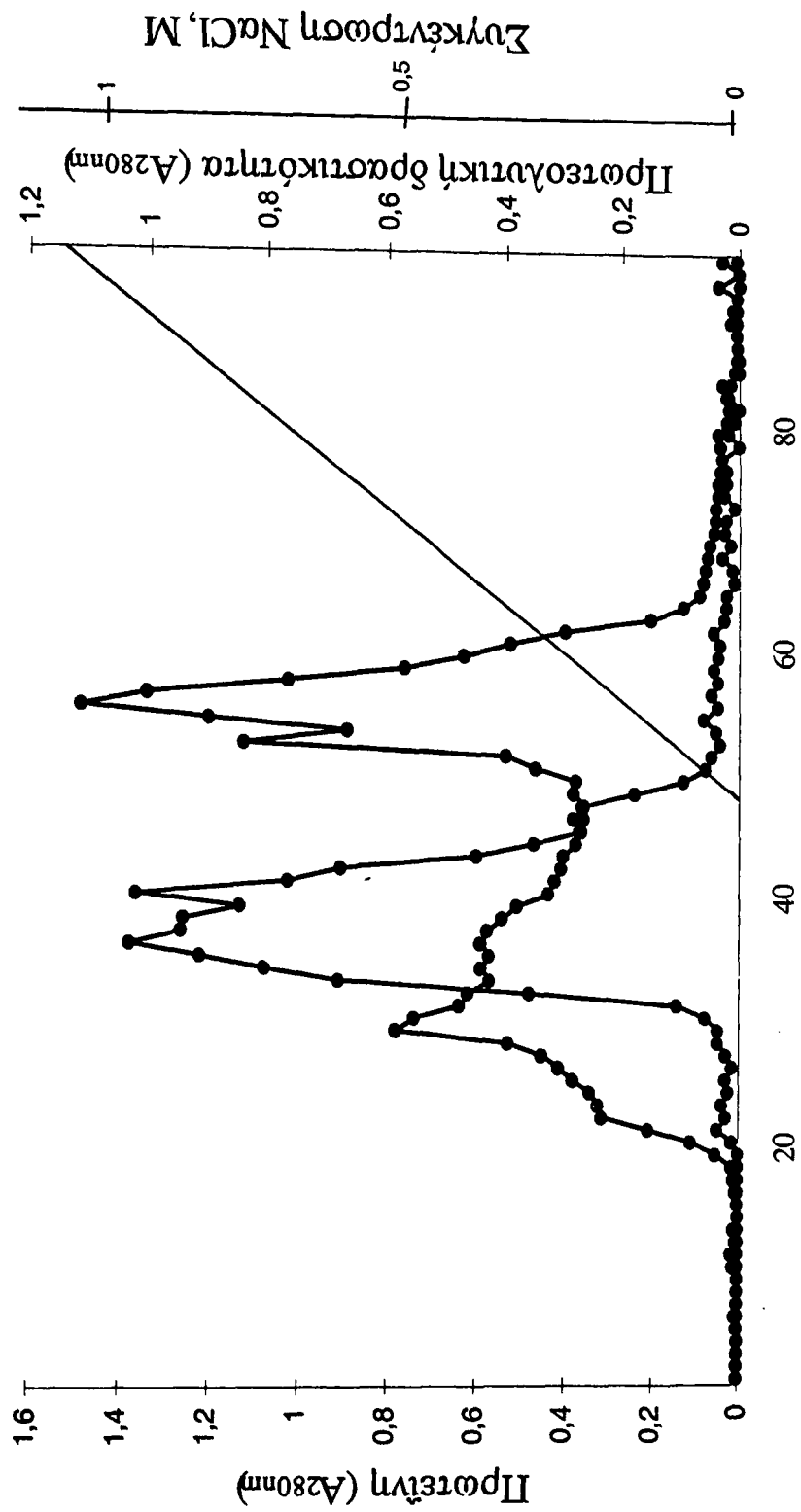
Η απομόνωση της εξωκυτταρικής πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2, από το υπερκείμενο καλλιέργειας του στελέχους σε αποβουτυρωμένο γάλα, επιτεύχθηκε με χρωματογραφία ιονανταλλαγής και χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Από την έκλουση από στήλη DEAE – Sepharose CL – 6B λαμβάνονταν μία μεγάλη κορυφή με πρωτεολυτική δραστηριότητα (Σχήμα 1). Τα κλάσματα 30 – 45 που αντιστοιχούσαν στην κορυφή αυτή, συγκεντρώνονταν, συμπυκνώνονταν, διαπιδύονταν και εκλούονταν από στήλη Sephacryl S – 200. Από την έκλουση λαμβάνονταν μία μεγάλη κορυφή με πρωτεολυτική δραστηριότητα (Σχήμα 2). Η κορυφή πρωτεολυτικής δραστηριότητας ήταν σχεδόν συμμετρική και ταυτιζόταν με μεγάλη κορυφή πρωτεΐνης, στοιχεία τα οποία είναι ενδεικτικά για την έκλουση μίας ενζυμικής πρωτεΐνης. Τα κλάσματα 20 – 30 που αντιστοιχούσαν στην κορυφή συγκεντρώνονταν, συμπυκνώνονταν και λυοφιλοποιούνταν. Το λυοφιλοποιημένο παρασκεύασμα, που χρησιμοποιούνταν μετά από διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα, αποτελούσε το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του στελέχους *P. fluorescens* TR2.

Το πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζύμου παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Η % απόδοση, που είναι μάλλον υψηλή και ο καθαρισμός, που είναι μάλλον μικρός, υποδεικνύουν τη μεγάλη παραγωγή εξωκυτταρικής πρωτεΐνάσης από το *P. fluorescens* TR2 και τον επιτυχή καθαρισμό του ενζύμου.

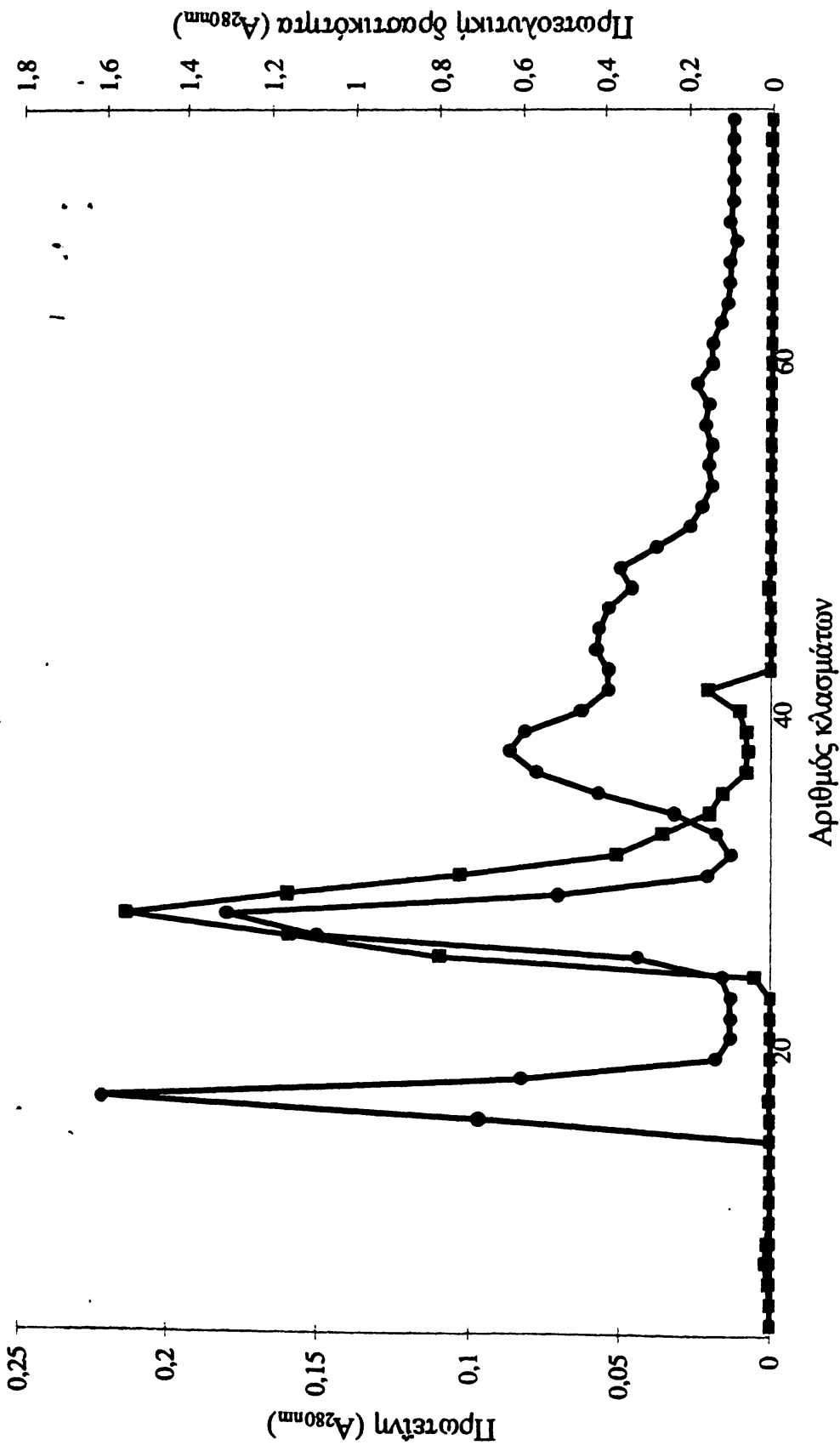
Το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης εμφάνιζε μία ζώνη σε ηλεκτροφόρηση υπό μετουσιωτικές συνθήκες (Σχήμα 3), το οποίο υποδεικνύει ότι το ένζυμο ήταν μάλλον ομοιογενές.

Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με πρωτεΐνάσες από στελέχη *P. fluorescens* αφορούν μερικώς καθαρισμένα ένζυμα. Επίσης, υπάρχουν αρκετές μελέτες σε απομονωμένα ένζυμα (Richardson 1981, Stepaniak και συν. 1982, Patel





**Σχήμα 1.** Χρωματογράφημα υπερεκτεταμένου καλλιέργειας του *Pseudomonas fluorescens* TR2 σε στήλη ιονανταλλαγής DEAE – Sepharose CL – 6B.



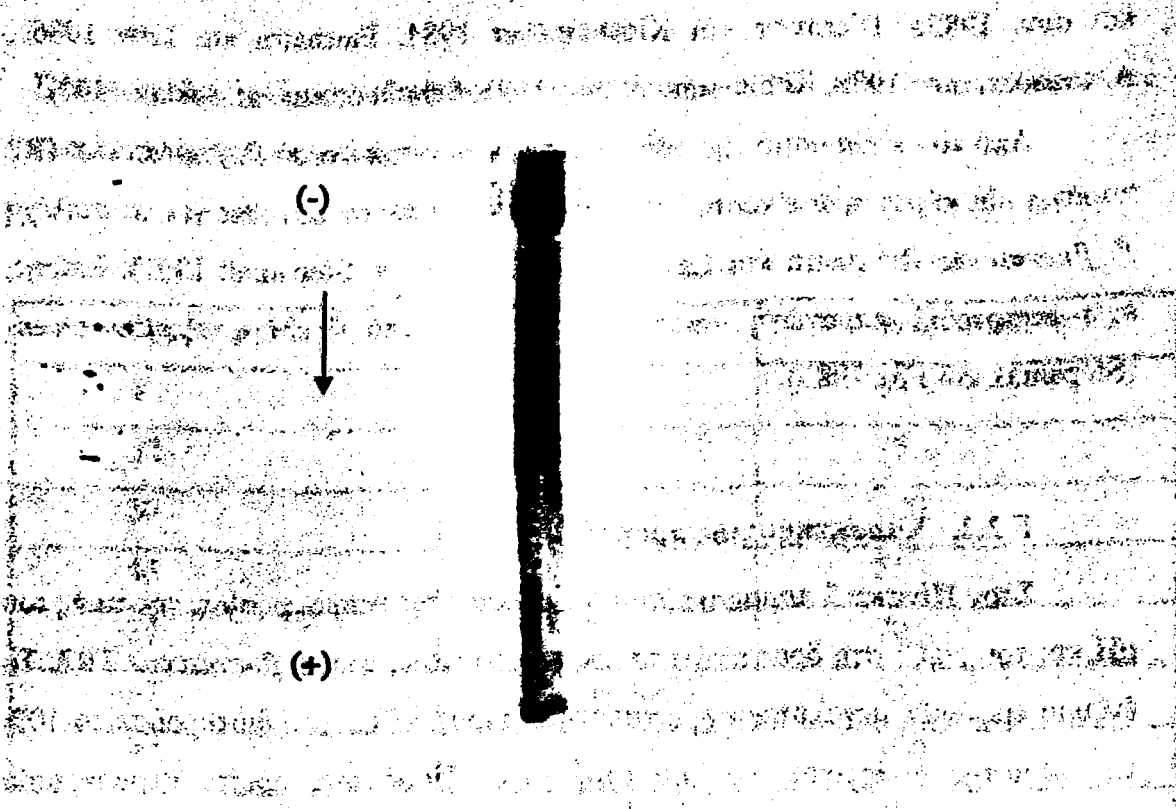
**Σχήμα 2.** Χρωματογράφημα εκλούσματος με πρωτεολυτική δραστικότητα από τη στήλη ιονταλλαγής παρασκευάσματος του *Pseudomonas fluorescens* TR2, σε στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S - 200

Πίνακας 1. Πρωτόκολλο καθαρισμού της πρωτεΐνης του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

Στάδιο καθαρισμού	Όγκος, ml	Πρωτεΐνη, mg/ml	Ολική δραστηριότητα, U	Ειδική δραστηριότητα, U/mg πρωτεΐνης	Καθαρισμός (φορές)	% απόδοση
Υπερκείμενο ελεύθερο κυττάρων	500	0,3	47.500	317	-	100
Λυοφιλίωση και διαπίδυση	20	6,9	45.900	333	1	97
DEAE Sepharose CL-6B	15	0,4	20.220	3.370	11	43
Sephacryl S-200	5	0,2	14.780	14.780	47	31







**Σχήμα 3. SDS - PAGE ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνάσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2.**

Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE της πρωτεΐνάσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2. Η εικόνα δείχνει ένα ηλεκτροφόρημα με αρνητικό (-) πόλο στην κορυφή και θετικό (+) πόλο στο κάτω μέρος. Η κεντρική περιοχή του ελαστικού είναι κλεισμένη με ένα μαύρο μπλοκ. Το υπόλοιπο κείμενο είναι πολύ χαμηλής ποιότητας και δεν μπορεί να αναγνωριστεί με ακρίβεια.



και συν. 1983a, Diermayr και Klostermeyer 1984, Fairbairn και Law 1986b, Azcona και συν. 1988, Kohlmann και συν. 1991, Schokker και vanBoekel 1997).

Από τον καθαρισμό της πρωτεΐνάσης προκύπτει ότι το *P. fluorescens* TR2 παράγει μία κύρια πρωτεΐνάση. Τούτο είναι και το πλέον σύνηθες για τα στελέχη *P. fluorescens* (Fairbairn και Law 1986a, Sorhaug και Stepaniak 1991). Επίσης, έχει αναφερθεί παραγωγή τριών πρωτεΐναισών από στελέχη *P. fluorescens* (Stepaniak και Fox 1985).

### Γ 2.2. Χαρακτηρισμός πρωτεΐνάσης

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας, της τιμής του pH και του NaCl στη δραστικότητα της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2. Το ένζυμο εμφάνιζε μεγαλύτερη δραστικότητα στους 37°C, ενώ διατηρούσε το 10% της μέγιστης δραστικότητάς του στους 7°C. Παρόμοια, άριστη θερμοκρασία δραστικότητας έχει αναφερθεί για τις περισσότερες πρωτεΐνάσες από στελέχη *P. fluorescens*, ενώ επίσης πολλές διατηρούν ικανή δραστικότητα σε θερμοκρασίες ψυγείου (Richardson 1981, Stepaniak και συν. 1982, Azcona και συν. 1988, Roussis και συν. 1990, Margesin και Schinner 1992, Frias και συν. 1994, Schokker και vanBoekel 1997, Koka και Weimer 2000).

Η πρωτεΐνάση παρουσίαζε μεγαλύτερη δραστικότητα σε pH 7,0 από ό,τι σε pH 8,0, ενώ ήταν σημαντικά δραστική και σε pH 6,0. Οι περισσότερες πρωτεΐνάσες από στελέχη *P. fluorescens* έχουν μέγιστη δραστικότητα σε ουδέτερο pH και άλλες σε pH μεγαλύτερο από 8,0, ενώ πολλές παρουσιάζουν σημαντική δραστικότητα σε όξινο pH (Richardson 1981, Stepaniak και συν. 1982, Stepaniak και Fox 1985, Azcona και συν. 1988, Roussis και συν. 1990, Kohlmann και συν. 1991, Margesin και Schinner 1992, Kumura και συν. 1993, Frias και συν. 1994, Schokker και vanBoekel 1997). Επίσης, έχει αναφερθεί άριστο pH δραστικότητας 5,0 για πρωτεΐνάση στελέχους *P. fluorescens* (Koka και Weimer 2000).

Η πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 ήταν δραστική παρουσία NaCl. Διατηρούσε το περίπου 35% της δραστικότητάς της σε pH 6,0 παρουσία 4% (w/v)



Πίνακας 2. Επίδραση θερμοκρασίας, pH και NaCl στη δραστηριότητα της πρωτεΐνάσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

Θερμοκρασία, °C	pH	% δραστηριότητα
7	7,0	10
32	7,0	75
37	7,0	100
45	7,0	55
37	6,0	70
37	6,0+ NaCl	35
37	7,0	100
37	7,0+ NaCl	35
37	8,0	90



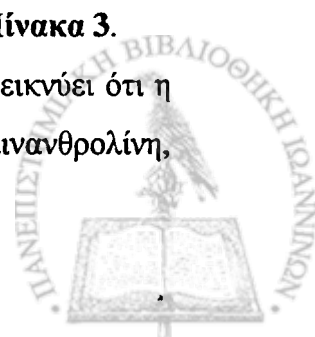
NaCl, δηλαδή το 50% της αντίστοιχης δραστηριότητας που εμφάνιζε απουσία NaCl στην ίδια τιμή pH. Τούτο δείχνει ότι η πρωτεΐνωση είναι δραστική σε σημαντικό βαθμό παρουσία NaCl, όταν η συγκέντρωσή του κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα μ' αυτά που συναντώνται στα τυριά. Η δραστηριότητα της πρωτεΐνωσης του *P. fluorescens* TR2 σε χαμηλή θερμοκρασία, όξινο pH και σε υψηλά επίπεδα NaCl, υποδεικνύουν ότι το ένζυμο μπορεί να είναι δραστικό σε συνθήκες κατεργασίας του γάλακτος και παραγωγής τυριών, που αναδεικνύει το ενδιαφέρον από τεχνολογική άποψη.

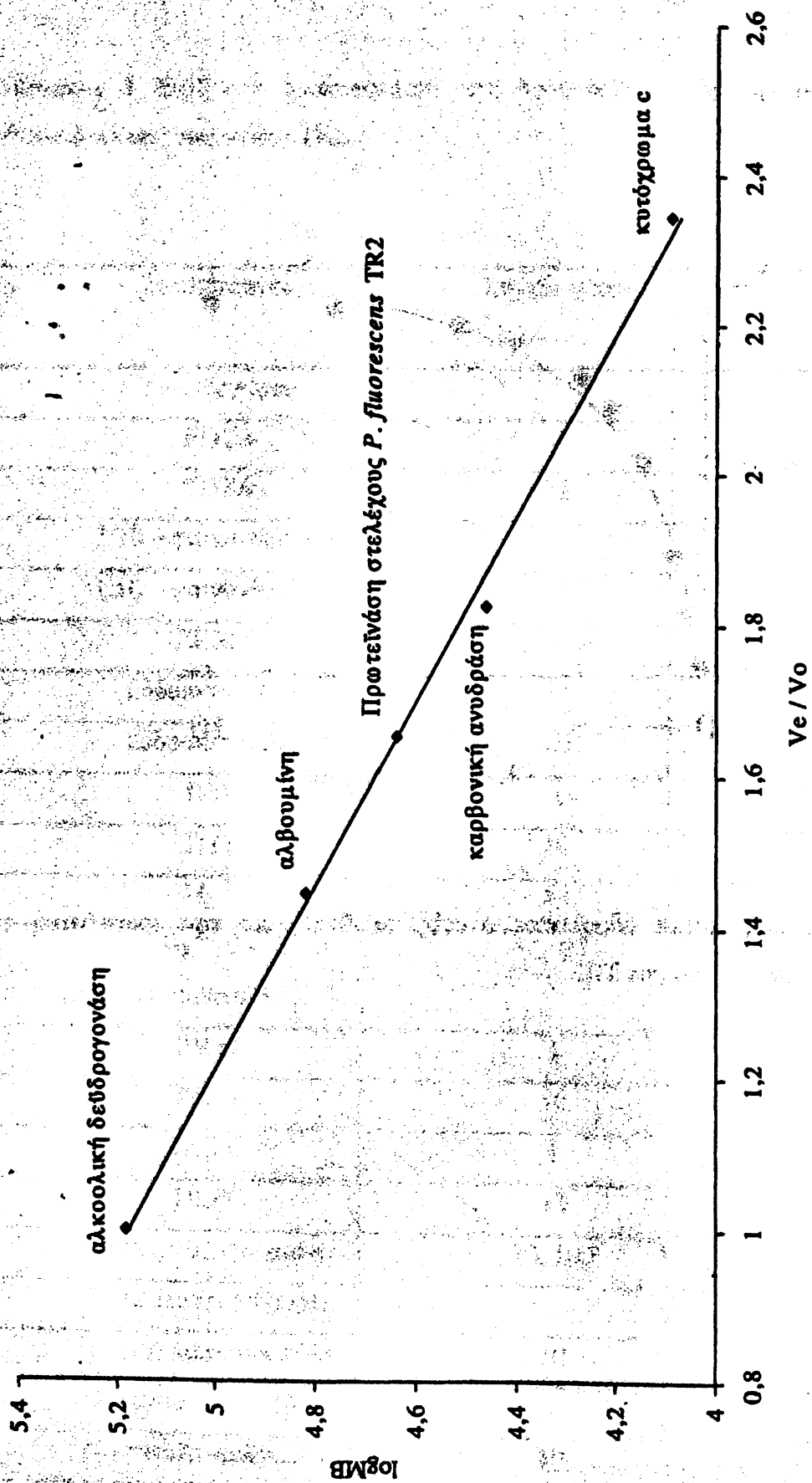
Το μοριακό βάρος της πρωτεΐνωσης του στελέχους *P. fluorescens* TR2, όπως προσδιορίστηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, ήταν 43,5kDa (Σχήμα 4). Τούτο είναι τυπικό για πρωτεΐνες από *P. fluorescens*, οι περισσότερες από τις οποίες παρουσιάζουν μοριακό βάρος 38 έως 48 – 52kDa (Richardson 1981, Patel και συν. 1983a, Diertmayr και Klostermeyer 1984, Fairbairn και Law 1986b, Schokker και vanBoekel 1997). Επίσης, έχει αναφερθεί μικρότερο μοριακό βάρος, 33kDa για πρωτεΐνωση στελέχους *P. fluorescens* (Azcona και συν. 1988). Η απομονωμένη πρωτεΐνωση περιείχε 1grat Zn ανά mole. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι μεταλλοπρωτεΐνες από άλλα στελέχη *P. fluorescens* περιέχουν ψευδάργυρο στο μόριό τους, συνήθως 1grat Zn ανά mole (Richardson 1981, Diertmayr και Klostermeyer 1984, Fairbairn και Law 1986b ).

Η δραστηριότητα της πρωτεΐνωσης εμφανίστηκε να υπακούει σε κινητική Michaelis – Menten (Σχήμα 5). Η τιμή  $K_m$  προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ολική αγελαδινή καζεΐνη ως υπόστρωμα. Η τιμή  $K_m$  ήταν 1,7mg/ml (0,07mM), χρησιμοποιώντας μέσο μοριακό βάρος για την καζεΐνη 23,0kDa. Η μικρή τιμή της  $K_m$  δείχνει την μεγάλη συγγένεια της πρωτεΐνωσης με την ολική καζεΐνη ως υπόστρωμα. Παρόμοιες, αλλά και μεγαλύτερες τιμές  $K_m$  έχουν αναφερθεί για πρωτεΐνες από άλλα στελέχη *P. fluorescens*, με υπόστρωμα είτε ολική είτε και α – καζεΐνη (Patel και συν. 1983a, Alichanidis και Andrews 1977, Malik και Mathur 1984, Roussis και συν. 1990, Margesin και Schinner 1992).

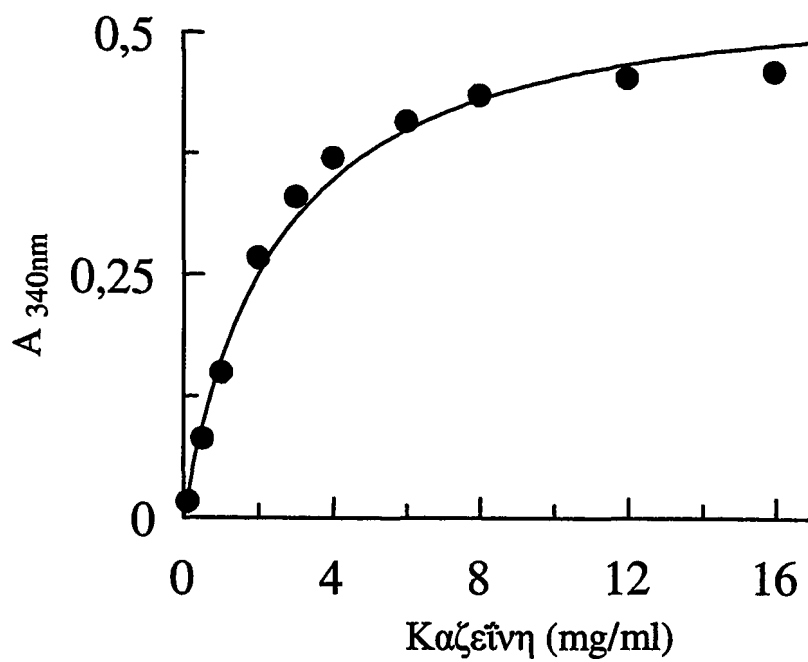
Η επίδραση διαφόρων αναστολέων πρωτεϊνών στη δραστηριότητα της πρωτεΐνωσης του στελέχους *P. fluorescens* TR2 παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.

Το ένζυμο αδρανοποιούνταν παρουσία EDTA, το οποίο υποδεικνύει ότι η δραστηριότητά του εξαρτάται από την παρουσία μετάλλων. Η 1,10 φαινανθρολίνη,





Σχήμα 4. Διάγραμμα προσδιορισμού του μοριακού βάρους της πρωτεΐνωσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

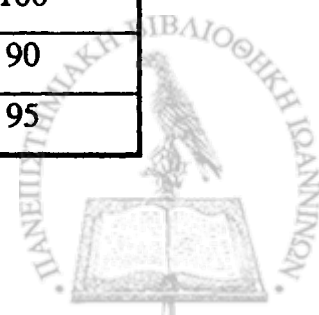


Σχήμα 5. Διάγραμμα υδρόλυσης ολικής καζεΐνης από την πρωτεΐνάση του *Pseudomonas fluorescens* TR2.



Πίνακας 3. Επίδραση τροποποιητών στη δραστικότητα της πρωτεΐνης του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

Τροποποιητής	Συγκέντρωση, mM	% δραστικότητα
Ακατέργαστο		100
EDTA	1	40
EDTA	10	0
1,10 – φαινανθρολίνη	1	15
1,10 – φαινανθρολίνη	10	2
PHMB	κορεσμού	90
Ιωδοακεταμίδιο	1	90
Ιωδοακεταμίδιο	10	98
DTB	1	95
DTB	10	95
Hg <sup>2+</sup>	10	5
Hg <sup>2+</sup> , 2 – μερκαπτοαιθανόλη	10, 100	50
PMSF	1	90
PMSF	10	95
DEPC	1	75
DEPC	10	60
DEPC, υδροξυλαμίνη	10, 100	105
2 – μερκαπτοαιθανόλη	1	100
2 – μερκαπτοαιθανόλη	10	85
N-ακετυλο-ιμιδαζόλιο	1	95
N-ακετυλο-ιμιδαζόλιο	10	100
EEDQ	1	90
EEDQ	10	95



ειδικός συμπλοκοποιητής του ψευδαργύρου, αδρανοποιούσε πλήρως την πρωτεΐνάση.

Από την άλλη πλευρά, το ένζυμο δεν εμφάνιζε συμπεριφορά πρωτεϊνών κυστεΐνης, καθ' όσον δεν αναστελλόταν από το PHMB, το ιωδοακεταμίδιο και το DTB, που είναι αναστολείς πρωτεϊνών κυστεΐνης. Ακόμη, δεν επανακτούσε την δραστηριότητά του με 2 – μερκαπτοαιθανόλη μετά την αδρανοποίησή του με ιόντα υδραργύρου. Το ένζυμο δεν εμφάνιζε, επίσης, συμπεριφορά πρωτεϊνών σερίνης, καθ' όσον δεν αναστελλόταν από το PMSF, που είναι αναστολέας πρωτεϊνών σερίνης.

Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την περιεκτικότητα της πρωτεΐνάσης σε ψευδάργυρο, δείχνουν ότι το ένζυμο είναι μεταλλοπρωτεΐνάση με ψευδάργυρο στο ενεργό της κέντρο. Οι περισσότερες πρωτεΐνάσες από στελέχη *P. fluorescens* που μελετήθηκαν ήταν μεταλλοπρωτεΐνάσες (Richardson 1981, Stepaniak και συν. 1982, Margesin και Schinner 1992, Kumura και συν. 1993). Από την άλλη πλευρά, μεταλλοπρωτεΐνάσες από στελέχη *P. fluorescens* ήταν ευαίσθητες στο PHMB (Alichanidis και Andrews 1977, Patel και συν. 1983, Fairbairn και Law 1986b, Azcona και συν. 1988, Roussis και συν. 1990).

Η πρωτεΐνάση αναστελλόταν σημαντικά παρουσία DEPC και η αναστολή αυτή ήταν αντιστρεπτή με υδροξυλαμίνη, που υποδεικνύουν πιθανή συμμετοχή ιστιδίνης στην ενζυμική κατάλυση. Η πιθανή συμμετοχή ιστιδίνης και ψευδαργύρου στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνάσης του στελέχους *P. fluorescens* TR2, αποτελούν στοιχεία από τα οποία διαφαίνεται σημαντική ομοιότητα με την αρκετά μελετηθείσα μεταλλοπρωτεΐνάση θερμολυσίνη. Η 2 – μερκαπτοαιθανόλη, το NAI και το EEDQ μόνο πολύ λίγο ανέστειλαν την πρωτεΐνάση. Έτσι, μπορεί να λεχθεί ότι δισουλφιδικοί δεσμοί, τυροσίνη και καρβοξυλικές ομάδες ασπαρτικού ή γλουταμινικού οξέος, δεν συμμετέχουν στην ενζυμική κατάλυση.

Το διαπιδυμένο αποένζυμο που λαμβανόταν με κατεργασία με EDTA, επανακτούσε πλήρως την δραστηριότητά του με προσθήκη ιόντων ψευδαργύρου (Πίνακας 4). Τούτο, επίσης συνηγορεί με τον χαρακτηρισμό του ενζύμου ως μεταλλοπρωτεΐνάσης με ψευδάργυρο στο ενεργό του κέντρο. Το αποένζυμο





**Πίνακας 4. Επίδραση ιόντων ασβεστίου και ψευδαργύρου στη δραστικότητα του αποενζύμου της πρωτεΐνωσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2.**

Κατεργασία	% δραστικότητα
Ακατέργαστο	100
EDTA	2
Ca <sup>2+</sup>	75
Zn <sup>2+</sup>	105



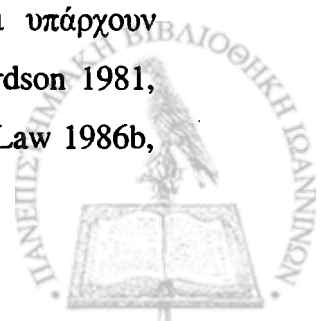
επανακτούσε το 75% της δραστικότητάς του με προσθήκη ιόντων ασβεστίου, το οποίο δεικνύει τη δυνατότητα του ασβεστίου να συμμετέχει στη ενεργή διαμόρφωση του ενζυμικού μορίου.

### Γ 2.3. Μελέτη θερμοανθεκτικότητας πρωτεΐνάσης

Η πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 ήταν ασταθής σε υψηλές θερμοκρασίες διατηρώντας μόνο 5% της δραστικότητάς της μετά από την κατεργασία 120°C, 40s. Όμως, σταθεροποιούνταν παρουσία ιόντων ασβεστίου σε αυτή την περιοχή θερμοκρασιών. Έτσι, παρουσία Ca<sup>2+</sup> διατηρούσε το 50% της δραστικότητάς της μετά από την κατεργασία 120°C, 40s. Μετά από τις κατεργασίες 100°C, 60s και 140°C, 20s, παρουσία Ca<sup>2+</sup>, διατηρούσε το 75% και 18% της δραστικότητάς της, αντίστοιχα (Πίνακας 5). Αρκετές πρωτεΐνάσες από στελέχη *P. fluorescens* αναφέρθηκε ότι ήταν σταθερές σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 100°C. Ορισμένες από αυτές ήταν σταθερές μόνο παρουσία Ca<sup>2+</sup> (Richardson 1981, Stepaniak και συν. 1982, Margesin και Schinner 1992, Kumura και συν. 1993). Αντίθετα, άλλες ήταν σχετικά σταθερές σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία Ca<sup>2+</sup> (Alichanidis και Andrews 1977, Fairbairn και Law 1986b, Azcona και συν. 1988, Roussis και συν. 1990).

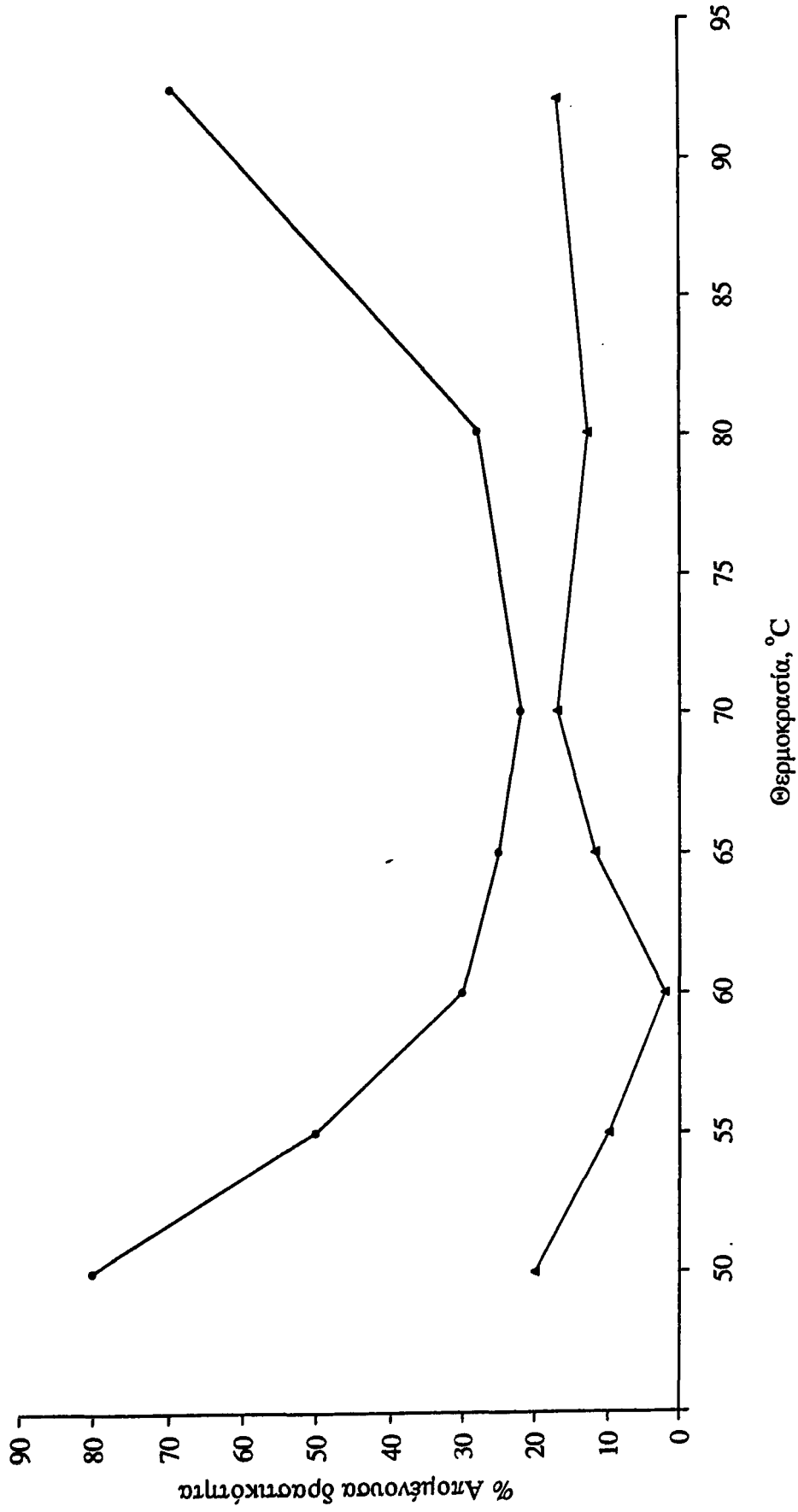
Η θερμοανθεκτικότητα της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2 παρουσία Ca<sup>2+</sup> υποδηλώνει ότι το ένζυμο θα διατηρεί σημαντικό μέρος της δραστικότητάς του μετά από τις θερμικές κατεργασίες του γάλακτος που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία.

Η θερμοανθεκτικότητα της πρωτεΐνάσης μελετήθηκε στη ζώνη χαμηλών θερμοκρασιών σε ρυθμιστικό διάλυμα, απουσία και παρουσία Ca<sup>2+</sup> (Σχήμα 6). Το ένζυμο παρουσίαζε ζώνη αστάθειας στους 55 – 65°C. Ιδιαίτερα μετά την κατεργασία 60°C, 4min αδρανοποιούνταν σχεδόν πλήρως. Αντίθετα, μετά τις κατεργασίες 50°C, 4min και 92°C, 4min διατηρούσε περίπου το 20% της δραστικότητάς του. Η αδρανοποίηση σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι χαρακτηριστικό πολλών πρωτεΐναςών από *P. fluorescens*, αν και υπάρχουν διαφοροποιήσεις όσον αφορά τα επίπεδα της αδρανοποίησης (Richardson 1981, Stepaniak και συν. 1982, Kroll και Klostermeyer 1984, Fairbairn και Law 1986b,



**Πίνακας 5.** Επίδραση κατεργασιών σε υψηλές θερμοκρασίες, παρουσία και απουσία ιόντων ασβεστίου, στη δραστικότητα της πρωτεΐνάσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

Θερμική Κατεργασία (°C)	100	120	140
Χρόνος (sec)	60	40	20
% απομένουσα δραστικότητα απουσία Ca <sup>2+</sup>	12	5	3
% απομένουσα δραστικότητα παρουσία Ca <sup>2+</sup>	75	50	18

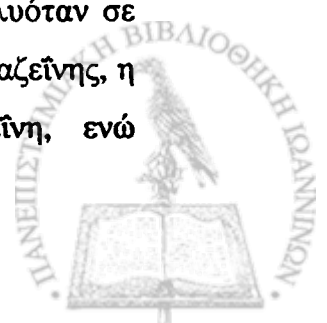


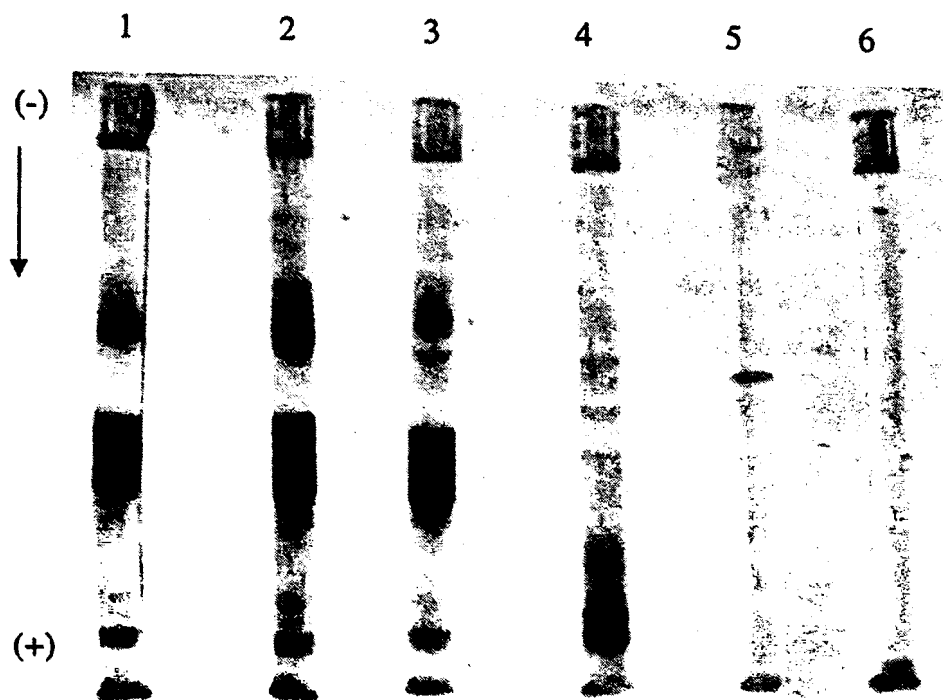
Σχήμα 6. Διάγραμμα αδρανοποίησης της πρωτεΐνωσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2 σε ρυθμιστικό 0,1M Tris – HCl pH 7,0, παρουσία είτε όχι  $Ca^{2+}$  στην περιοχή 50 – 92°C

Azcona και συν. 1988, Roussis και συν. 1990, Schokker και vanBoekel 1998). Η παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , μόνο σε μικρό βαθμό σταθεροποιούσε την πρωτεΐνάση στη ζώνη αστάθειάς της, την οποία ταυτόχρονα και μετατόπιζε σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Από την άλλη πλευρά, το  $\text{Ca}^{2+}$  σταθεροποιούσε σε μεγάλο βαθμό την πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 σε θερμοκρασίες χαμηλότερες και υψηλότερες της ζώνης αστάθειάς του. Παρόμοιες παρατηρήσεις για την επίδραση του  $\text{Ca}^{2+}$  στη θερμοανθεκτικότητα πρωτεϊνών από *P. fluorescens* έχουν αναφερθεί από άλλους ερευνητές (Steraniak και συν. 1982, Kroll και Klostermeyer 1984, Roussis και συν. 1990). Η συμπεριφορά πρωτεϊνών από στελέχη *P. fluorescens* στις θερμικές κατεργασίες φαίνεται να σχετίζεται με την ύπαρξη είτε όχι  $-\text{SH} / -\text{S}-\text{S}-$  στο μόριό τους. Οι μεταλλοπρωτεΐνες που δεν ήταν ευαίσθητες σε αναστολές πρωτεϊνών κυστεΐνης, ήταν ασταθείς σε υψηλές θερμοκρασίες απουσία  $\text{Ca}^{2+}$ , ενώ είναι αρκετά σταθερές παρουσία  $\text{Ca}^{2+}$ . Αυτά τα ένζυμα αδρανοποιούνταν σχεδόν πλήρως στη ζώνη χαμηλών θερμοκρασιών (Richardson 1981, Steraniak και συν. 1982, Margesin και Schinner 1992, Kumura και συν. 1993). Από την άλλη πλευρά, πρωτεΐνες ευαίσθητες στο PHMB εμφάνιζαν σχετική σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  και επίσης διατηρούσαν κάποια δραστηριότητα στην αδρανοποίηση στις χαμηλές θερμοκρασίες (Alichanidis και Andrews 1977, Fairbairn και Law 1986b, Azcona και συν. 1988, Roussis και συν. 1990). Τα παραπάνω είναι συμβατά με τα ισχύοντα σχετικά με την θερμική αδρανοποίηση θερμοευαίσθητων και θερμοανθεκτικών ενζύμων. Γενικώς, τα θερμοευαίσθητα ένζυμα αδρανοποιούνται με πλήρη μετουσίωση του μορίου, ενώ τα θερμοανθεκτικά με ομοιοπολική τροποποίηση όπως διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών.

Επίσης, πρέπει να ληφθεί υπόψη, η ενδεχόμενη μετουσίωση και επαναδίπλωση των ενζυμικών πρωτεϊνικών μορίων, όπως έχει αναφερθεί για πρωτεΐνες στελεχών *P. fluorescens* και *Pseudomonas* spp. (Patel και συν. 1986).

Η αδρανοποίηση της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2 στους  $60^{\circ}\text{C}$  μελετήθηκε ηλεκτροφορητικά (Σχήμα 7). Όπως προκύπτει από την εξαφάνιση της ζώνης του ενζύμου μετά την θερμική κατεργασία, η πρωτεΐνάση αυτολύταν σε αυτή τη θερμοκρασία. Κατά την κατεργασία στους  $60^{\circ}\text{C}$  παρουσία της καζεΐνης, η μελετηθείσα πρωτεΐνάση ήταν δραστική και υδρόλυε την καζεΐνη, ενώ





Σχήμα 7. SDS - PAGE ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνάσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2 μετά από θερμική κατεργασία στους 60°C.

- 1→καζεΐνη χωρίς θερμική κατεργασία
- 2→καζεΐνη στους 60°C για 1min
- 3→καζεΐνη και πρωτεΐνάση χωρίς θερμική κατεργασία
- 4→καζεΐνη και πρωτεΐνάση στους 60°C για 1min
- 5→πρωτεΐνάση χωρίς θερμική κατεργασία
- 6→πρωτεΐνάση στους 60°C για 1min

περιοριζόταν κατά ένα μέρος η αυτόλυσή της. Τούτο υποδεικνύει ότι η σύνδεση ενζύμου – καζεΐνης, σχέση ενζύμου – υποστρώματος στη σχετικά υψηλή αυτή θερμοκρασία, προσφέρει κάποια προστασία στο ένζυμο από την αυτόλυσή του.

Αυτόλυση πρωτεϊνών από στελέχη *P. fluorescens* κατά την αδρανοποίησή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες έχουν αναφέρει και άλλοι ερευνητές, (Richardson 1981, Schokker και vanBoekel 1998, Kumura και συν. 1999). Οι Barach και συν. (1978) έδειξαν ότι η αδρανοποίηση πρωτεΐνης στελέχους *Pseudomonas* spp. στους 55°C, παρουσία καζεΐνης, συμβαίνει με συσσωμάτωση του ενζύμου με τα μικκύλια της καζεΐνης. Άλλοι ερευνητές σε μελέτη πρωτεΐνης από στέλεχος *P. Fluorescens*, ανέφεραν ότι η αδρανοποίηση στους 55°C στο γάλα, συμβαίνει με αυτόλυση και με συσσωμάτωση με την καζεΐνη, ανάλογα με τη συγκέντρωση του ενζύμου (Stepaniak και συν. 1991).

Κατά την κατεργασία της πρωτεΐνης στους 60°C, μελετήθηκε η μεταβολή της φαινόμενης υδροφοβίας και η μεταβολή της σκέδασης του φωτός ως μέτρου της συσσωμάτωσης (Πίνακας 6). Κατά τη θέρμανση του ενζύμου παρατηρήθηκε αύξηση της φαινόμενης υδροφοβίας. Τούτο υποδεικνύει ότι κάποια μεταβολή είχε συμβεί στο ενζυμικό διάλυμα. Κατά τη θερμική κατεργασία μέχρι τα 360sec, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη σκέδαση του φωτός. Έτσι, η παρατηρηθείσα μεταβολή στη φαινόμενη υδροφοβία δεν μπορεί να συσχετιστεί με φαινόμενα συσσωμάτωσης. Συνεπώς, μπορεί να λεχθεί ότι η αύξηση στη φαινόμενη υδροφοβία υποδηλώνει κάποια μεταβολή στο ενζυμικό πρωτεϊνικό μόριο. Πιθανόν, η μεταβολή στο μόριο του ενζύμου και η μετέπειτα αυτόλυσή του οδηγούν σε αύξηση της φαινόμενης υδροφοβίας.

Τη μεταβολή στη φαινόμενη υδροφοβία με θερμικές κατεργασίες μελετήσαμε και σε πρωτεΐνη στελέχους *Pseudomonas* spp. (Triantafyllidou και Roussis 1999). Η καθαρισμένη μεταλλοπρωτεΐνη του *Pseudomonas* spp. 31 ήταν ευαίσθητη στους 55°C. Μετά την κατεργασία 55°C, 15min διατηρούσε το 10% της δραστηρότητάς της, ενώ μετά την κατεργασία 95°C, 15min το 16%. Η αύξηση της φαινόμενης υδροφοβίας μετά τις δύο παραπάνω κατεργασίες ήταν 60 και 140% αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι δύο διαφορετικά φαινόμενα συμβαίνουν στις δύο αυτές περιοχές θερμοκρασιών. Παρουσία καζεΐνης, μετά την κατεργασία 55°C, 15min το ένζυμο διατηρούσε το 16% της δραστηρότητάς του και η αύξηση της



Πίνακας 6. Φαινόμενη υδροφοβία και συσσωμάτωση κατά την θερμική κατεργασία της πρωτεΐνης του *Pseudomonas fluorescens* TR2 στους 60°C.

Χρόνος Ιδιότητα	0sec	30sec	60sec	120sec	360sec
Φαινόμενη υδροφοβία	8,0	8,0	8,1	9,1	10,2
Συσσωμάτωση	12,8	12,8	12,7	12,7	12,6





φαινόμενης υδροφοβίας ήταν 35%, υποδεικνύοντας ότι η καζεΐνη εμπλέκεται στην αδρανοποίησή του σε αυτή την θερμοκρασία.

Η αδρανοποίηση πρωτεϊνών από στελέχη *P. fluorescens* και *Pseudomonas* spp. στους 50 – 60°C (αδρανοποίηση σε χαμηλές θερμοκρασίες, LTI) έχει υπάρξει αντικείμενο μελέτης από αρκετούς ερευνητές.

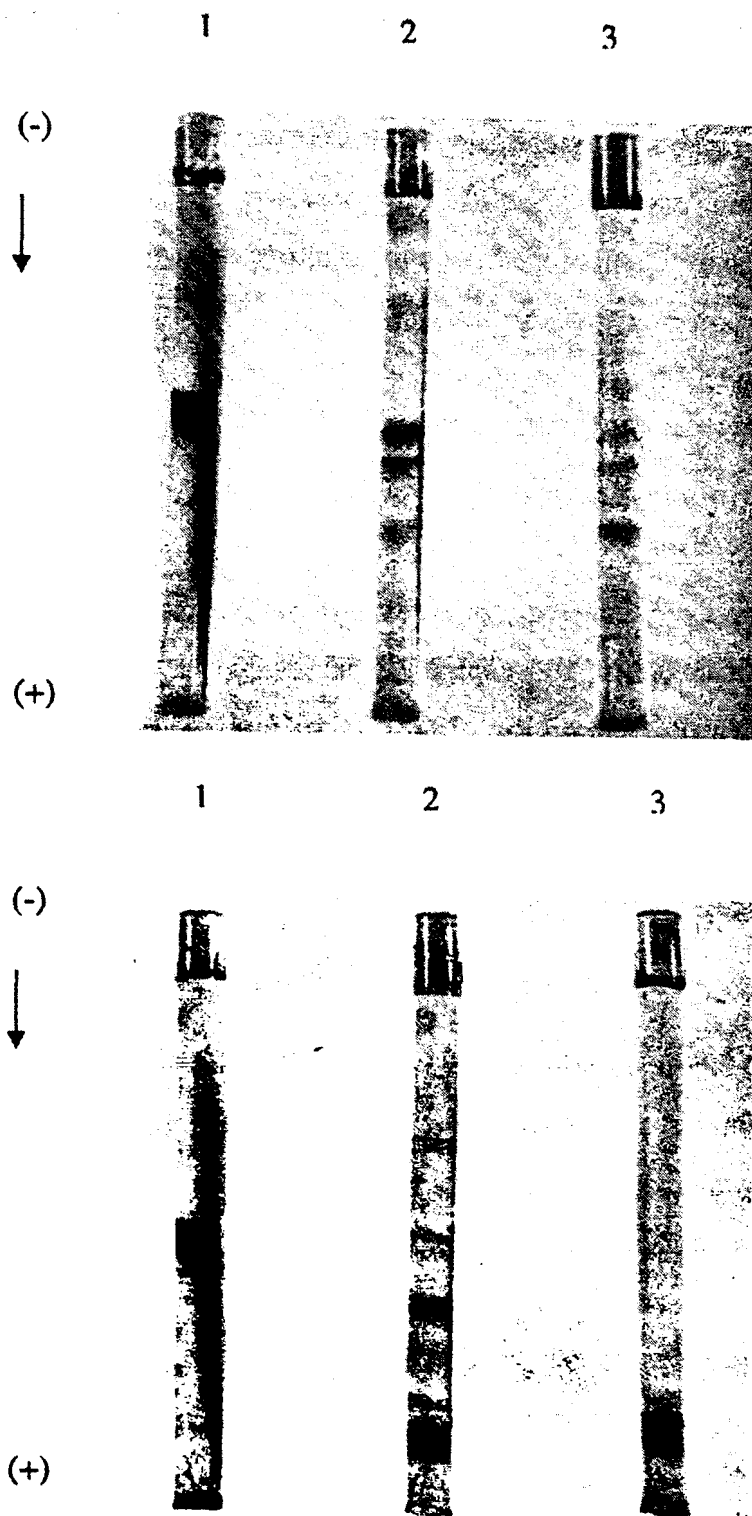
Η αυτόλυση των ενζύμων, που έχει δειχθεί, δεν συμβαίνει εάν το ένζυμο έχει αδρανοποιηθεί με 1,10 φαινανθρολίνη (Richardson 1981, Kumura και συν. 1999). Η αυτόλυση των ενζύμων θεωρήθηκε από ερευνητές ως διαμοριακή παρά ενδομοριακή διεργασία (Diermayr και συν. 1987, Schokker και vanBoekel 1998), ενώ άλλοι ερευνητές θεώρησαν ότι η διεργασία είναι ενδομοριακή (Sterpaniak και Fox, 1983). Παρουσία καζεΐνης, συμβαίνει συσσωμάτωση ενζύμου – καζεΐνης, πιθανόν με αλληλεπίδραση του μερικώς ξεδιπλωμένου ενζυμικού μορίου με την υδρόφοβη καζεΐνη (Barach και συν. 1978). Η αύξηση της φαινόμενης υδροφοβίας που παρατηρήθηκε κατά την θέρμανση της πρωτεΐνάσης του στελέχους *P. fluorescens* TR2, υποδηλώνει πιθανή σύμπλεξη ενζύμου – καζεΐνης με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

#### Γ 2.4. Υδρόλυση υποστρωμάτων από την πρωτεΐνάση

Μελετήθηκε η υδρόλυση της α – και β – καζεΐνης, όπως και της ολικής αγελαδινής και πρόβειας καζεΐνης. Επίσης, μελετήθηκε η υδρόλυση πεπτιδίων αγελαδινού και πρόβειου τυριού. Επιπλέον, ελέγχθηκε η αμινοπεπτιδασική δράση του ενζύμου.

Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται το SDS – PAGE ηλεκτροφόρημα υδρόλυσης της α – και β – αγελαδινής καζεΐνης από την πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2. Το ένζυμο υδρόλυε και τις δύο καζεΐνες, ταχύτερα την β – καζεΐνη. Από την υδρόλυση της α – και β – καζεΐνης παράγονταν συγκεκριμένα πεπτίδια σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους. Ορισμένα από τα παραγόμενα πεπτίδια υδρολύονταν, επίσης, περαιτέρω. Η υδρόλυση των δύο καζεϊνών σε πεπτίδια και η περαιτέρω υδρόλυση παραγομένων πεπτιδίων δείχνει ότι η πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 είναι ενδοπεπτιδάση και υδρολύει πρωτεΐνες αλλά και μεγάλα πεπτίδια. Ταχύτερη υδρόλυση της β – σε σύγκριση με την αs – καζεΐνη έχει, επίσης,





**Σχήμα 8.** SDS – PAGE ηλεκτροφόρημα υδρόλυσης  $\alpha$  – και  $\beta$  – καζεΐνης από την πρωτεΐνάση του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

(A):  $\alpha$  – καζεΐνη, (B):  $\beta$  – καζεΐνη

χρόνοι επώασης: 1→0min, 2→10min, 3→20min.

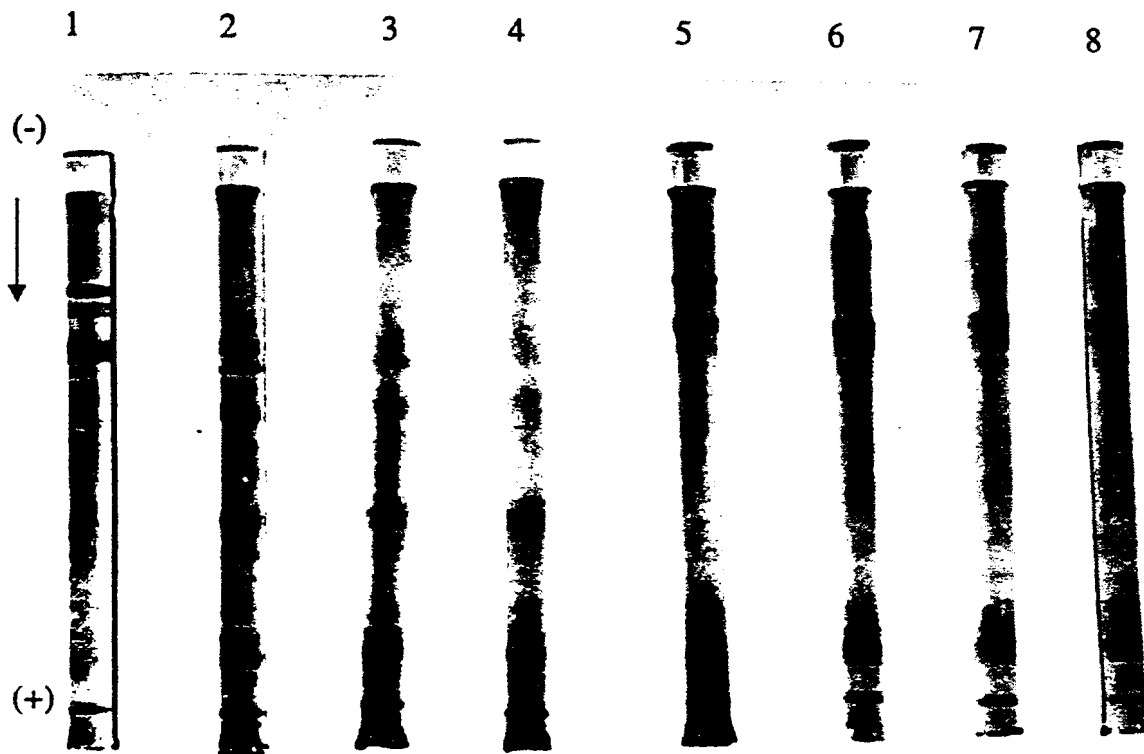


αναφερθεί για άλλες πρωτεΐνες *P. fluorescens* (Kumura και συν. 1993, Koka και Weimer 2000). Από την άλλη πλευρά, πρωτεΐνες στελεχών *P. Fluorescens* παρουσίαζαν διαφορετική μεταξύ τους προτίμηση υδρόλυσης της α - και β - καζεΐνης (Mitchell και Marshall 1989a).

Στο Σχήμα 9 παρουσιάζεται το Urea - PAGE ηλεκτροφόρημα υδρόλυσης αγελαδινής και πρόβειας καζεΐνης από την πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2. Από το ηλεκτροφόρημα φαίνεται ότι από την υδρόλυση της ολικής αγελαδινής είτε πρόβειας καζεΐνης παράγονταν πεπτίδια σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους. Η πρωτεΐνάση υδρόλυσε τις αs - και β - καζεΐνες, με την ολική - αγελαδινή είτε πρόβεια - καζεΐνη ως υπόστρωμα. Η υδρόλυση της β - καζεΐνης ήταν ταχύτερη και στις δύο ολικές καζεΐνες. Προτίμηση υδρόλυσης της β - από την αs - καζεΐνη πρόβειου γάλακτος από στέλεχος *P. fluorescens* έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές (Uceda και συν. 1993). Οι πρόβειες καζεΐνες ήταν πιο ανθεκτικές στην υδρόλυση από την πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 σε σχέση με τις αγελαδινές καζεΐνες. Παρόμοια, μικρότερη αποικοδόμηση β - και α - πρόβειων καζεϊνών σε σύγκριση με τις αντίστοιχες αγελαδινές από πρωτεΐνάση έχουν αναφέρει άλλοι ερευνητές (Fernandez - Garcia και συν. 1990). Η σχετική υδρόλυση πρόβειων και αγελαδινών καζεϊνών από πρωτεΐνάσες έχει σημαντικό τεχνολογικό ενδιαφέρον. Ενδεχομένως, σχετίζεται με το ότι τα τυριά από αγελαδινό γάλα εμφανίζουν πικρή γεύση, ενώ τα τυριά από πρόβειο γάλα όχι.

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η υδρόλυση ολικής αγελαδινής καζεΐνης, παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων και πεπτιδίων του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος τυριού. Η υδρόλυση του παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων ήταν σημαντική. Το παρασκεύασμα μικρών πεπτιδίων περιείχε δύο πεπτίδια, ένα κύριο και ένα δευτερεύον, μοριακού βάρους 2 - 5kDa, όπως προκύπτει από τις ζώνες στην ηλεκτροφόρηση Urea - SDS - PAGE (Σχήμα 10). Έτσι, μπορεί να λεχθεί ότι η πρωτεΐνάση υδρολύει σε σημαντικό βαθμό πεπτίδια 2 - 5kDa. Επίσης, το ένζυμο υδρόλυσε σε μεγάλο βαθμό πεπτίδια του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος αγελαδινού τυριού και επίσης του διαπιδυμένου υδατικού εκχυλίσματος τυριού. Από την υδρόλυση των παραπάνω υποστρωμάτων προκύπτει ότι η πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 υδρολύει μία μεγάλη γκάμα υποστρωμάτων από τις καζεΐνες μέχρι πεπτίδια 2 - 5kDa.





**Σχήμα 9.** Urea – PAGE ηλεκτροφόρημα υδρόλυσης ολικής καζεΐνης αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος από την πρώτεινάση του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

1, 2, 3, και 4: καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος,

5, 6, 7, και 8: καζεΐνη πρόβειου γάλακτος.

Χρόνοι επώασης:

1 και 5→0min,

2 και 6→5min,

3 και 7→10min,

4 και 8→20min.

**Πίνακας 7.** Υδρόλυση πεπτιδίων τυριού και ολικής καζεΐνης από την πρωτεΐνάση του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

Υπόστρωμα	Πρωτεόλυση, $\mu\text{M}$ γλυκίνης
Ολική καζεΐνη	438
Υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τυριού	459
Διαπυμένο υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τυριού	312
Παρασκεύασμα μικρών πεπτιδίων	535





Urea - SDS - PAGE ηλεκτροφόρημα του παρασκευάσματος πεπτιδίων

ακού βάρους.

ύασμα μικρών πεπτιδίων,

δεικτών μοριακών βαρών,

ίνη Β,

ίνη,

η,

μα c,

ίνη.



Η υδρόλυση του παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων από την μελετηθείσα πρωτεΐνάση παρακολούθηθηκε με RP – HPLC (Σχήμα 11). Η κύρια κορυφή του υποστρώματος εκλούονταν στα 53,5min. Το πεπτίδιο αυτό υδρολύονταν και παράγονταν ένα πεπτίδιο που εκλούονταν στα 56,0min. Επίσης, παράγονταν δύο πεπτίδια που εκλούονταν στα 16 – 23min τα οποία στη συνέχεια υδρολύονταν περαιτέρω. Από το χρωματογράφημα υδρόλυσης του παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων από την πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2, προκύπτει ότι το ένζυμο όχι μόνο υδρολύει πεπτίδια μοριακού βάρους 2 – 5kDa, αλλά επίσης και μικρότερα πεπτίδια που παράγονται με υδρόλυση των προηγούμενων.

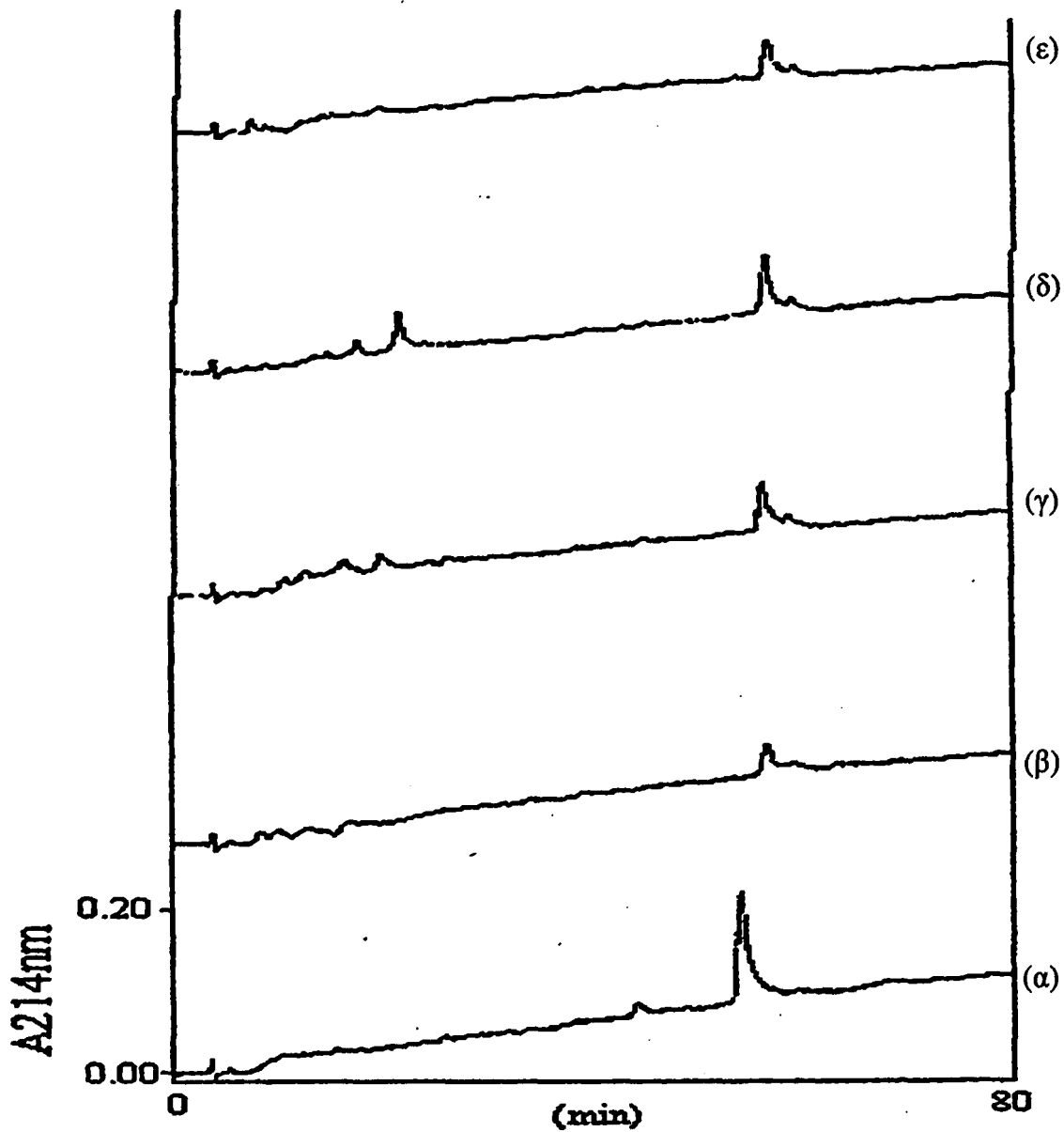
Στο Σχήμα 12 παρουσιάζεται το SDS – PAGE ηλεκτροφόρημα υδρόλυσης πεπτιδίων υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού και πρόβειου τυριού από την πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2. Από την υδρόλυση των πεπτιδίων υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού τυριού προκύπτει ότι δύο πεπτίδια με μοριακό βάρος περίπου 18 και 14kDa δεν αποικοδομούνται. Αντίθετα, τρία πεπτίδια με μοριακό βάρος μικρότερο από περίπου 14kDa υδρολύονταν από την πρωτεΐνάση. Επίσης, από την υδρόλυση των πεπτιδίων υδατικού εκχυλίσματος πρόβειου τυριού προκύπτει ότι δύο πεπτίδια με μοριακό βάρος περίπου 18 και 14kDa δεν υδρολύονταν από την μελετηθείσα πρωτεΐνάση. Αντίθετα, δύο πεπτίδια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από περίπου 18kDa υδρολύονταν από το ένζυμο.

Από την υδρόλυση των πεπτιδίων των υδατικών εκχυλισμάτων τυριών από την πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2, προκύπτει ότι το ένζυμο υδρολύει μεγάλα πεπτίδια που παράγονται κατά την πορεία παρασκευής αγελαδινών και πρόβειων τυριών.

Στα Σχήματα 13 και 14 παρουσιάζονται τα RP – HPLC χρωματογραφήματα υδρόλυσης των πεπτιδίων υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού και πρόβειου τυριού, αντίστοιχα. Κύριο χαρακτηριστικό της υδρόλυσης πεπτιδίων υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού τυριού είναι ότι αρκετά πεπτίδια που εκλούονταν στα 60 – 70min υδρολύονταν από την πρωτεΐνάση.

Αντίθετα, πεπτίδια που εκλούονταν στα 14-26 min παρέμεναν σχετικά σταθερά. Επίσης, κύριο χαρακτηριστικό της υδρόλυσης των πεπτιδίων υδατικού





Σχήμα 11. RP - HPLC χρωματογράφημα υδρόλυσης του παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων από την πρωτεΐνάση του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

Χρόνοι επώασης:

α→0min,

β→40min,

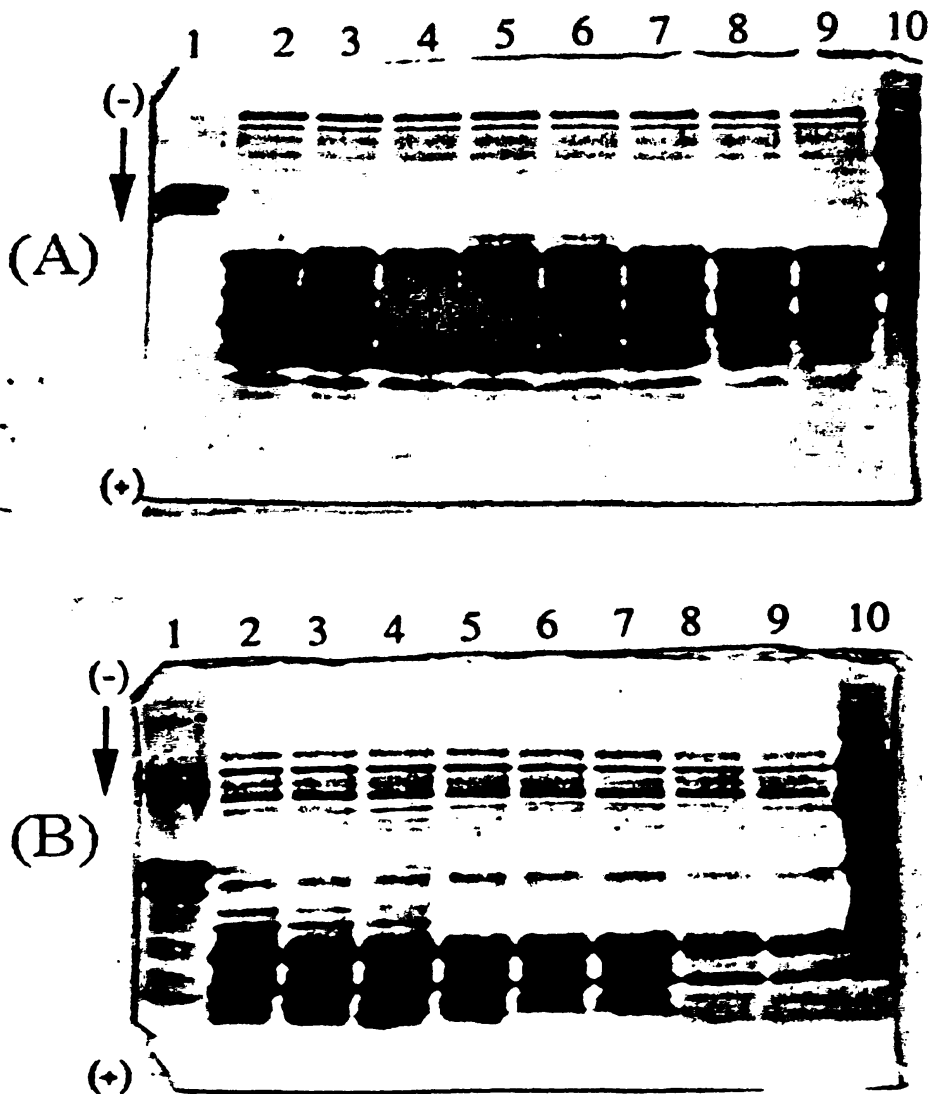
γ→80min,

δ→120min,

ε→480min.







Σχήμα 12. SDS - PAGE ηλεκτροφόρηση υδρόλυσης πεπτιδίων υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού και πρόβειου τυριού από την πρωτεΐνάση του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

(A): υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τυριού από αγελαδινό γάλα,

(B): υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τυριού από πρόβειο γάλα.

Χρόνοι επώασης:

1→καζεΐνη αγελαδινή ή πρόβεια αντίστοιχα (χωρίς ένζυμο)

2→0min

6→4h

3→40min

7→8h

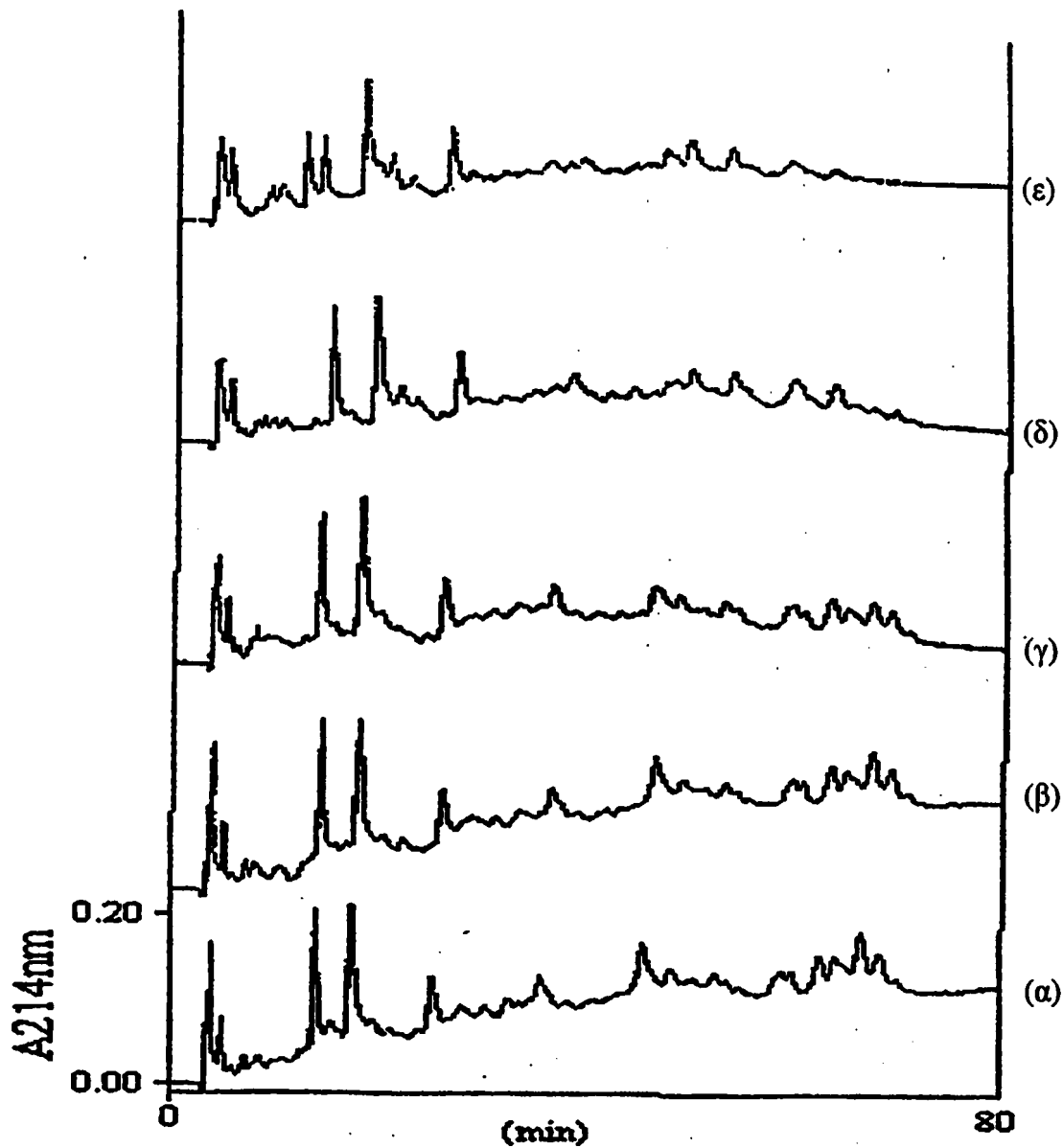
4→80min

8→16h

5→120min

9→24h

10→διάλυμα δεικτών μοριακών βαρών



Σχήμα 13. RP - HPLC χρωματογράφημα υδρόλυσης πεπτιδίων υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού τυριού από την πρωτεΐνάση του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

Χρόνοι επώασης:

α→0min,

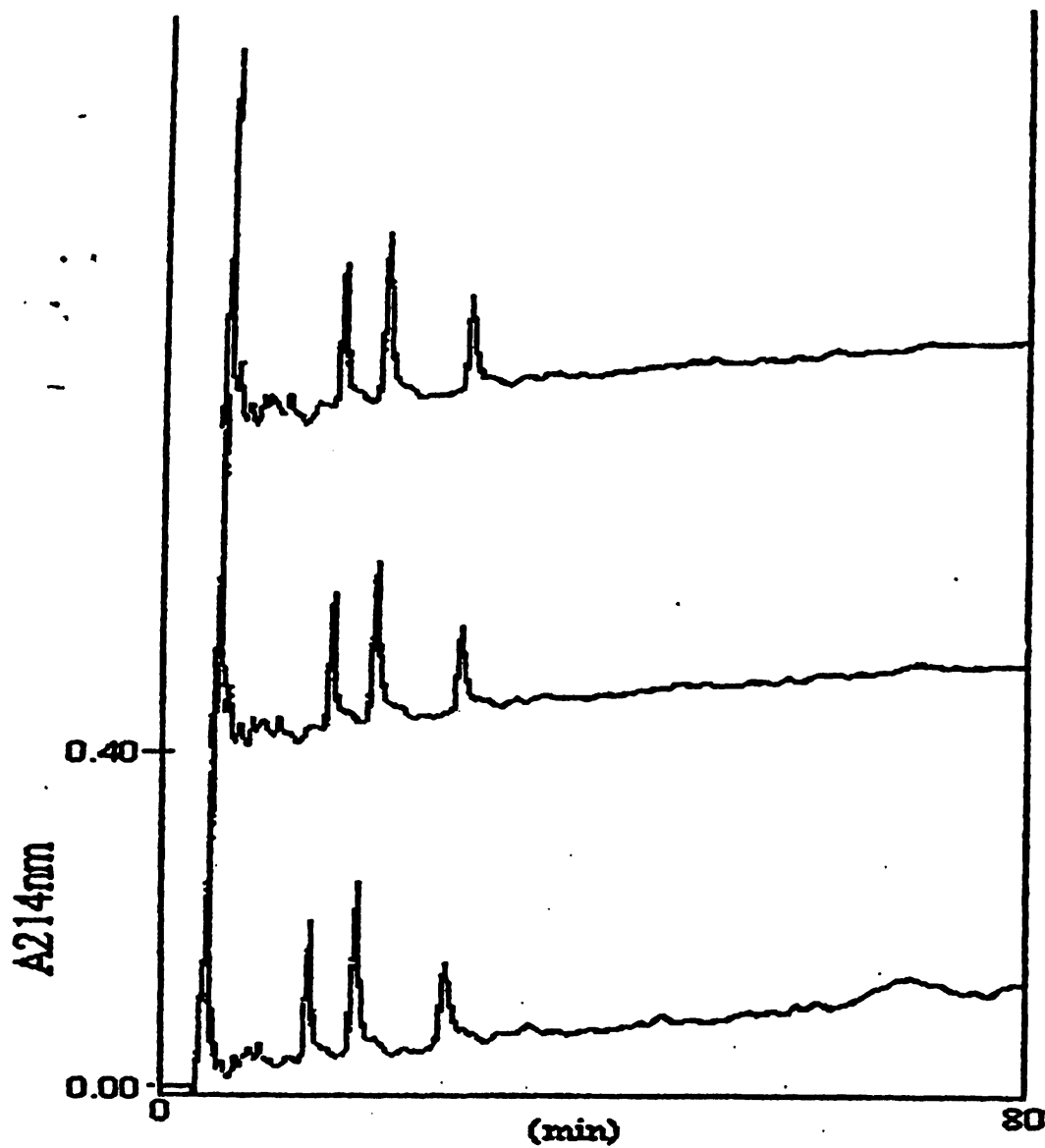
β→40min,

γ→120min,

δ→8h,

ε→24h.





Σχήμα 14. RP - HPLC χρωματογράφημα υδρόλυσης πεπτιδίων υδατικού εκχυλίσματος πρόβειου τυριού από την πρωτεϊνάση του *Pseudomonas fluorescens* TR2.

Χρόνοι επώασης:

α→0min,

β→40min,

γ→80min.



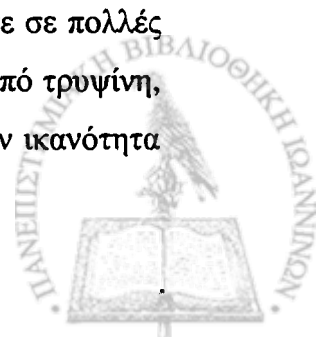
εκχυλίσματος πρόβειου τυριού, ήταν ότι πεπτίδια (μία ζώνη κορυφών) που εκλούονταν στα 64 – 72min υδρολύονταν γρήγορα από την πρωτεΐνάση. Αντίθετα, τα κύρια πεπτίδια του υδατικού εκχυλίσματος που εκλούονταν στα 13 – 32min παρέμεναν ανέπαφα.

Δεδομένου ότι στη χρωματογραφία που χρησιμοποιήθηκε σε μεγάλους χρόνους εκλούονται υδρόφοβα πεπτίδια, μπορεί να λεχθεί ότι η πρωτεΐνάση *P. fluorescens* TR2 υδρολύει υδρόφοβα πεπτίδια που παράγονται κατά την πορεία παρασκευής αγελαδινών και πρόβειων τυριών.

Η ικανότητα και ειδίκευση της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2 για υδρόλυση πεπτιδίων αγελαδινού και πρόβειου τυριού αναφέρεται σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές που ισχύουν σε τυριά. Στη μελέτη της υδρόλυσης πεπτιδίων των υδατικών εκχυλισμάτων τυριών με ηλεκτροφόρηση και υγρή χρωματογραφία, τα υδατικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν χωρίς καμία κατεργασία. Το εκχύλισμα αγελαδινού τυριού προέρχονταν από τυρί τύπου Γραβιέρα και το εκχύλισμα πρόβειου τυριού από Κεφαλογραβιέρα. Έτσι, στο μίγμα της ενζυμικής αντίδρασης υπήρχε 2 – 3% (w/v) NaCl, επίπεδα παρεμφερή με αυτά που συναντώνται σε τυριά.

Η δραστηριότητα αμινοπεπτιδάσης της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2 παρουσιάζεται στον Πίνακα 8. Το ένζυμο δεν υδρόλυε τα π – νιτροανιλίδια που χρησιμοποιήθηκαν, αν και ελάχιστη απορρόφηση παρατηρούνταν με υποστρώματα τα π – νιτροανιλίδια λευκίνης και αλανίνης. Δράση ενδοπεπτιδάσης, χωρίς αμινοπεπτιδασική δραστηριότητα, έχει αναφερθεί για πρωτεΐνάσες στελεχών *P. fluorescens* από άλλους ερευνητές (Mitchell και Marshall 1989a, Margesin και Schinner 1992).

Η πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 παρουσιάζει ικανότητα υδρόλυσης μεγάλης γκάμας υποστρωμάτων. Υδρολύει καζεΐνες, μεγάλα, μικρά και πολύ μικρά πεπτίδια. Οι Mitchell και Marshall (1989b) μελέτησαν την υδρόλυση της οξειδωμένης ριβονουκλεάσης A, από πρωτεΐνάσες τεσσάρων στελεχών *P. fluorescens*, σε σύγκριση με την υδρόλυσή της από τρυψίνη και χυμοτρυψίνη. Η υδρόλυση από τις πρωτεΐνάσες των στελεχών *P. fluorescens*, οδηγούσε σε πολλές μικρές κορυφές στο RP – HPLC χρωματογράφημα, ενώ η υδρόλυση από τρυψίνη, είτε χυμοτρυψίνη σε λίγες και μεγαλύτερες κορυφές. Τούτο δείχνει την ικανότητα



**Πίνακας 8. Δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης της πρωτεΐνάσης του *Pseudomonas fluorescens* TR2.**

Υπόστρωμα	Δραστικότητα, A410nm
π-νιτροανιλίδιο λευκίνης	0,016
π-νιτροανιλίδιο αλανίνης	0,015
π-νιτροανιλίδιο προλίνης	0,000
π-νιτροανιλίδιο γλουταμίνης	0,000



των πρωτεϊνών για υδρόλυση περισσότερων πεπτιδικών δεσμών από τη τρυψίνη και χυμοτρυψίνη. Επιπλέον, οι δύο από τις τέσσερις πρωτεΐνες των στελεχών *P. fluorescens* παρουσίαζαν δυνατότητα υδρόλυσης περισσότερων πεπτιδικών δεσμών σε σύγκριση με τις άλλες δύο.

Η υδρόλυση καζεϊνών και πεπτιδίων τυριών από την πρωτεΐναση του *P. fluorescens* TR2, υποδεικνύει ότι το ένζυμο μπορεί να έχει σημαντική συμμετοχή στην ωρίμανση των τυριών. Μεταξύ των πεπτιδίων που υδρολύει η πρωτεΐναση, είναι το κύριο πεπτίδιο του παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκε. Το παρασκεύασμα προέρχονταν από την υδρόλυση της  $\alpha_1$  – καζεΐνης από πεψίνη, που σύμφωνα με την βιβλιογραφία οδηγεί στην παραγωγή του πεπτιδίου  $\alpha_1$ -CN f 1 – 23 (Shimizu και συν. 1984). Το μοριακό βάρος του κύριου πεπτιδίου του παρασκευάσματος που χρησιμοποιήθηκε, όπως και ο χρόνος έκλουσής του στην υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (εκλούονταν σε παρόμοια συγκέντρωση ακετονιτριλίου με εκείνη που αναφέρεται για το πεπτίδιο  $\alpha_1$ -CN f 1 – 23 στη μελέτη παρασκευής του), υποδεικνύουν ότι το κύριο πεπτίδιο του παρασκευάσματος ήταν το  $\alpha_1$  – CN f 1 – 23 και σε κάθε περίπτωση ανάλογό του.

Το πεπτίδιο  $\alpha_1$  – CN f 1 – 23 παράγεται στα τυριά με την υδρόλυση της  $\alpha_1$  – καζεΐνης από την χυμοζίνη της πυτιάς. Η περαιτέρω υδρόλυσή του πεπτιδίου θεωρείται σημαντική για την παραγωγή αμινοξέων και την ανάπτυξη αρώματος – γεύσης στα τυριά. Η υδρόλυση του πεπτιδίου  $\alpha_1$  – CN f 1 – 23 στα τυριά θεωρείται ότι συμβαίνει κυρίως από πρωτεΐνες κυτταρικού τοιχώματος γαλακτικών βακτηρίων καλλιιεργειών εκκίνησης. Η παρουσία NaCl μειώνει την αποικοδόμηση, ενώ σημαντική μείωση μπορεί να οδηγήσει σε καθυστερημένη υδρόλυση του πεπτιδίου  $\alpha_1$  – καζεΐνης και μικρότερη παραγωγή αμινοξέων (Exerkate και Altin 1995). Από την άλλη πλευρά, αμινοξέα και μικρά πεπτιδία συμβάλλουν στη γεύση των τυριών, ενώ επιπλέον αμινοξέα είναι πρόδρομοι πτητικών αρωματικών ενώσεων (Roudot – Algaron 1996, Urbach 1997).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η ικανότητα της πρωτεΐνασης του *P. fluorescens* TR2 να υδρολύει το παρασκεύασμα μικρών πεπτιδίων που χρησιμοποιήθηκε αναδεικνύει την δυνατότητα του ενζύμου να εμπλέκεται θετικά στην ανάπτυξη αρώματος-γεύσης στα τυριά.



Πολύ σημαντική για τεχνολογία των τυριών είναι η ικανότητα της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2 να υδρολύει κατά προτίμηση υδρόφοβα πεπτιδία τυριών παρουσία λιγότερο υδρόφοβων πεπτιδίων.

Η πικρή γεύση στα τυριά, θεωρείται ότι οφείλεται στην παρουσία υδρόφοβων αμινοξέων, όπως τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και λευκίνη, και υδρόφοβων πεπτιδίων, τα οποία εκλύονται σε μεγάλους χρόνους σε υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (Habibi – Najafi και Lee 1991, Roudot – Algaron 1996).

Έτσι, η ικανότητα της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2 για υδρόλυση υδρόφοβων πεπτιδίων που εκλύονται σε μεγάλους χρόνους σε υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης υποδεικνύει την δυνατότητα του ενζύμου για μείωση της πικρότητας σε τυριά.

Τα περισσότερα πικρά πεπτιδία στα τυριά παράγονται με υδρόλυση των καζεϊνών, κυρίως της  $\alpha_1$  – και  $\beta$  – καζεΐνης, καθ' όσον αυτές περιέχουν πολλά υδρόφοβα αμινοξέα. Η δράση της χυμοζίνης στην  $\alpha_1$  – και  $\beta$  – καζεΐνη, όπως και η δράση πρωτεΐνασών γαλακτικών βακτηρίων καλλιέργειας στη  $\beta$  – καζεΐνη, οδηγεί στην παραγωγή πικρών πεπτιδίων. Ακόμη, πικρά πεπτιδία μπορεί να παράγονται από τη δράση πρωτεΐνασών ψυχροτρόφων βακτηρίων στις καζεΐνες.

Η πικρότητα είναι ένα ελάττωμα που παρατηρείται σε πολλά τυριά, κυρίως αγελαδινά. Η ανάπτυξη μεγαλύτερης πικρότητας στα αγελαδινά τυριά σε σχέση με τα πρόβεια (αλλά και τα γίδινα) τυριά, πιθανόν οφείλεται στην ύπαρξη περισσότερων πικρών αμινοξέων και πεπτιδίων. Πράγματι, σε συγκριτική μελέτη της πικρότητας ενζυμικών υδρολυμάτων αγελαδινής, πρόβειας και γίδινης καζεΐνης, προέκυψε ότι τα υδρολύματα της αγελαδινής καζεΐνης ήταν πιο πικρά από τα υδρολύματα της πρόβειας είτε της γίδινης καζεΐνης (Pelissier και Manchon 1976). Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι παράγοντες αποπίκρασης, όπως πιθανόν η πρωτεΐνάση *P. fluorescens* TR2, απαιτούνται σε μεγαλύτερο βαθμό στην παρασκευή αγελαδινών τυριών.

Τα περισσότερα, αν όχι όλα, τυριά χαμηλής λιποπεριεκτικότητας εμφανίζουν μεγάλη πικρότητα (Lemieux και Simard 1991). Έτσι, η πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 μπορεί να είναι παράγοντας αποπίκρασης στην παρασκευή τυριών χαμηλής λιποπεριεκτικότητας.



Η χρήση της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2 μπορεί, επίσης, να έχει θετικά αποτελέσματα στην επιτάχυνση της ωρίμανσης τυριών.

Η επιτάχυνση της ωρίμανσης των τυριών επιχειρείται κυρίως με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων για αύξηση του ρυθμού σταδίων της πρωτεόλυσης, δεδομένου ότι η πρωτεόλυση είναι πολύ σημαντική για την υφή – δομή και την ανάπτυξη αρώματος – γεύσης στα τυριά (Fox 1988-98, Wilkinson 1993).

Η παραγωγή πεπτιδίων και αμινοξέων είναι πιθανόν το στάδιο το οποίο επιδέχεται επιτάχυνσης. Μικρά πεπτίδια και αμινοξέα θεωρείται ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη των βασικών γεύσεων των τυριών. Επίσης, η αποικοδόμηση αμινοξέων, όπως και ελεύθερων λιπαρών οξέων, οδηγεί στις ιδιαίτερες γεύσεις των διαφόρων ποικιλιών τυριών. Ακόμη, λαμβάνει χώρα συνεργιστική επίδραση μεταξύ αμινοξέων, είτε αμινοξέων και άλλων ενώσεων στην ανάπτυξη αρώματος – γεύσης τυριών (Engels και Visser 1994, Salles και συν. 1995). Η παραγωγή πεπτιδίων και αμινοξέων λαμβάνει χώρα με τη δράση της χυμοζίνης, των ενζύμων των γαλακτικών βακτηρίων καλλιέργειας, όπως και άλλων ενζύμων, είτε επιπρόσθετων καλλιιεργειών. Η αποικοδόμηση των αμινοξέων λαμβάνει χώρα σε μεγάλο βαθμό με τη δράση των μικροοργανισμών της δευτερεύουσας μικροχλωρίδας των τυριών, η σύνθεση της οποίας εξαρτάται σημαντικά από τις ιδιαίτερες συνθήκες της παραγωγής των διαφόρων τυριών.

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι, η χρήση ενζύμων, είτε επιπρόσθετων καλλιιεργειών με κατάλληλες ενζυμικές δραστηριότητες, μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτερη παραγωγή της ποσότητας των πεπτιδίων και αμινοξέων που απαιτούνται και σε επιτάχυνση της ωρίμανσης των τυριών.

Για την επιτάχυνση της ωρίμανσης τυριών έχουν χρησιμοποιηθεί πρωτεΐνάσες, πεπτιδάσες, αμινοπεπτιδάσες, είτε μίγμα ενζύμων. Η χρήση ενζύμων, όπως και άλλων μεθοδολογιών για επιτάχυνση της ωρίμανσης τυριών, συχνά οδηγεί σε μεγάλη πικρότητα και άλλα ελαττώματα αρώματος – γεύσης (Fox 1988-89, Wilkinson 1993).

Επιτυχής επιτάχυνση της ωρίμανσης τυριού Cheddar με προσθήκη υπερκείμενου καλλιέργειας πρωτεολυτικού στελέχους *P. fluorescens* στο γάλα, έχει αναφερθεί από άλλους ερευνητές (Tye και συν. 1988). Επίσης, έχει αναφερθεί επιτυχής ωρίμανση τυριού Cheddar με προσθήκη στο τυρόπηγμα





παρασκευάσματος πρωτεΐνας - πεπτιδάσης από στέλεχος *P. fluorescens*. Προσθήκη μικρών ποσοτήτων του παρασκευάσματος, οδηγούσε σε ταχύτερη ωρίμανση, ενώ προσθήκη μεγαλύτερων ποσοτήτων οδηγούσε σε πικρότητα (Law 1980).

Έτσι, η κατάλληλη προσθήκη πρωτεΐνας *P. fluorescens* TR2, που υδρολύει καζεΐνες, μεγάλα, μικρά και πολύ μικρά πεπτίδια και παρουσιάζει προτίμηση για υδρόλυση υδρόφοβων πεπτιδίων, μπορεί να έχει θετικά αποτελέσματα στην ανάπτυξη αρώματος - γεύσης και στην επιτάχυνση της ωρίμανσης τυριών.



### Γ 3. Μελέτη παρασκευάσματος εξωκυτταρικής πρωτεΐνάσης *Flavobacterium* spp. MTR3

#### Γ 3.1. Καθαρισμός παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης

Ο καθαρισμός του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3, από το υπερκείμενο καλλιέργειας του στελέχους σε αποβουτυρωμένο γάλα έγινε με καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Αρχικά, γινόταν κλασματική καθίζηση με θειικό αμμώνιο και λαμβανόταν το ίζημα με προσθήκη θειικού αμμωνίου σε 65% κορεσμό. Το παρασκεύασμα εκλούονταν από τη στήλη Sephacryl S – 200, και λαμβάνονταν μία κύρια, διπλή, κορυφή με πρωτεολυτική δραστητικότητα (Σχήμα 15). Τα κλάσματα 20 – 32 που αντιστοιχούσαν στη διπλή κορυφή συγκεντρώνονταν, συμπυκνώνονταν και διαπιδύονταν. Το μερικώς καθαρισμένο αυτό παρασκεύασμα χρησιμοποιήθηκε ως παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3.

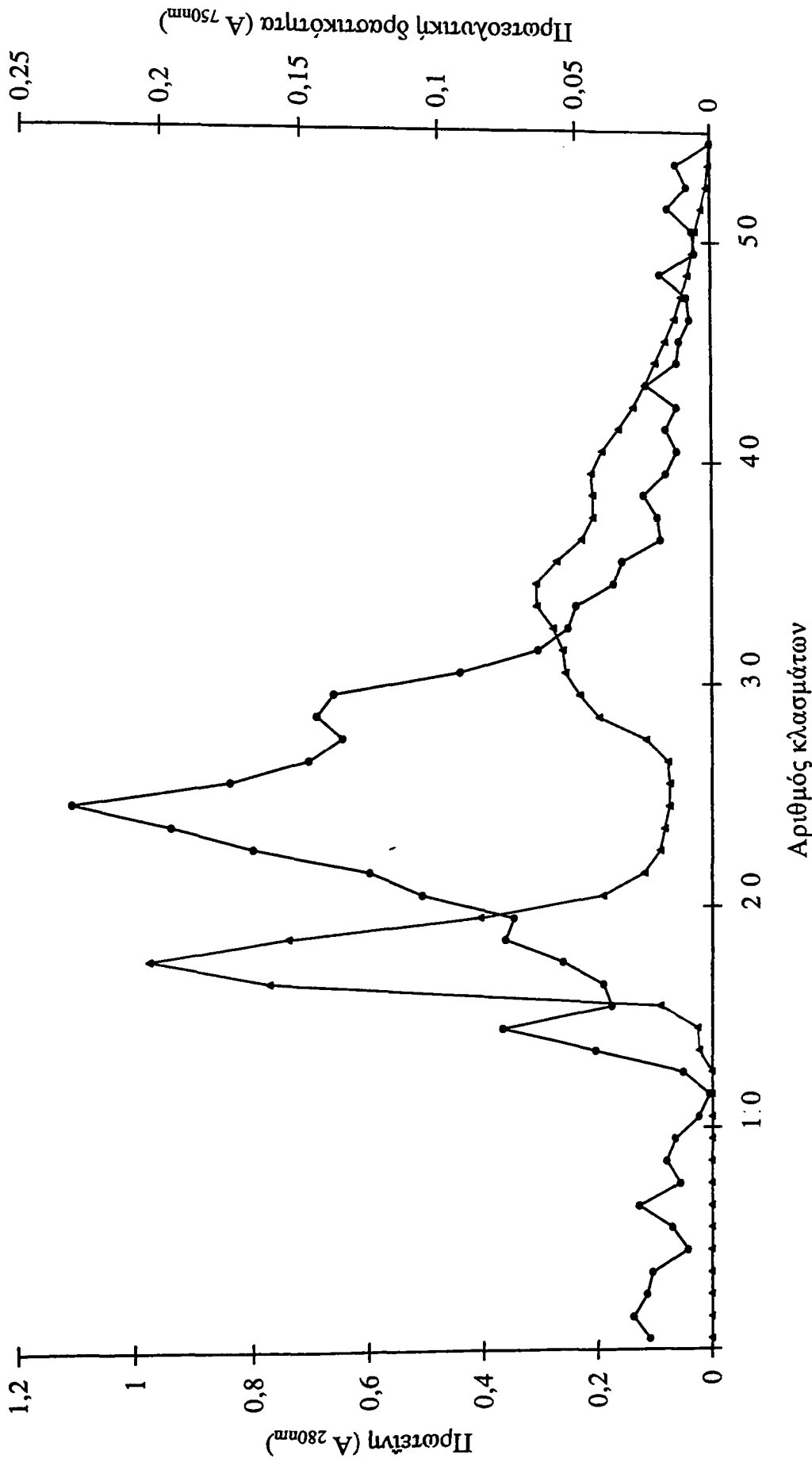
Έγιναν προσπάθειες για καθαρισμό του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης με συνδυασμούς μεθόδων χρωματογραφίας. Όμως, το παρασκεύασμα έχανε πολύ μεγάλο μέρος της δραστητικότητάς του με περαιτέρω καθαρισμό. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω παρασκεύασμα.

Το πρωτόκολλο καθαρισμού του ενζυμικού παρασκευάσματος παρουσιάζεται στον Πίνακα 9. Ο κύριος καθαρισμός επιτεύχθηκε με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, που οφείλεται στο ότι στα κλάσματα της κύριας πρωτεολυτικής κορυφής η πρωτεΐνη ήταν σε χαμηλά επίπεδα.

#### Γ 3.2. Μελέτη ιδιοτήτων παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και του NaCl στη δραστητικότητα του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3. Το παρασκεύασμα εμφάνιζε μεγάλη δραστητικότητα στην περιοχή 32 – 45°C, τη μεγαλύτερη στους 45°C.





Σχήμα 15. Χρωματογράφημα ιζήματος υπερεκτεταμένου καλλιέργειας του στελέχους *Flanobacterium spp.* MTR3 με θετικό σιμόνιο σε στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S - 200



**Πίνακας 9.** Πρωτόκολλο καθαρισμού του παρασκευάσματος πρωτεΐνης του *Flavobacterium* spp. MTR3.

Στάδιο καθαρισμού	Όγκος, ml	Πρωτεΐνη, mg/ml	Ολική δραστηριότητα, U	Ειδική δραστηριότητα, U/mg πρωτεΐνης	Καθαρισμός (φορές)	% απόδοση
Υπερκείμενο ελεύθερο κυττάρων	100	0,9	9.300	103	-	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50	1,1	6.250	114	1	67
Sephacryl S-200	5	0,2	3.350	3.350	32	36



Πίνακας 10. Επίδραση θερμοκρασίας, pH και NaCl στη δραστηκότητα του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* MTR3.

Θερμοκρασία, °C	pH	% δραστηκότητα
7	7,0	25
32	7,0	80
37	7,0	100
45	7,0	110
37	6,0	85
37	6,0 + NaCl	55
37	7,0	100
37	7,0 + NaCl	75
37	8,0	120



Επίσης, παρουσίαζε σημαντική δραστικότητα στους 7°C, το 25 % εκείνης στους 37°C. Η δραστικότητα του παρασκευάσματος ήταν μεγαλύτερη σε pH 8,0 από ό,τι σε ουδέτερο pH, ενώ σε pH 6,0 η δραστικότητά του επίσης ήταν πολύ μεγάλη. Σε pH 6,0 παρουσία 4% (w/v) NaCl ήταν περίπου το 65% εκείνης σε pH 6,0 απουσία NaCl. Άριστο pH και θερμοκρασία δραστικότητας 7,0 και 42°C αντίστοιχα έχουν αναφερθεί από άλλους ερευνητές για πρωτεϊνάση στελέχους *Flavobacterium* (Milliere και Veillet – Poncet 1985).

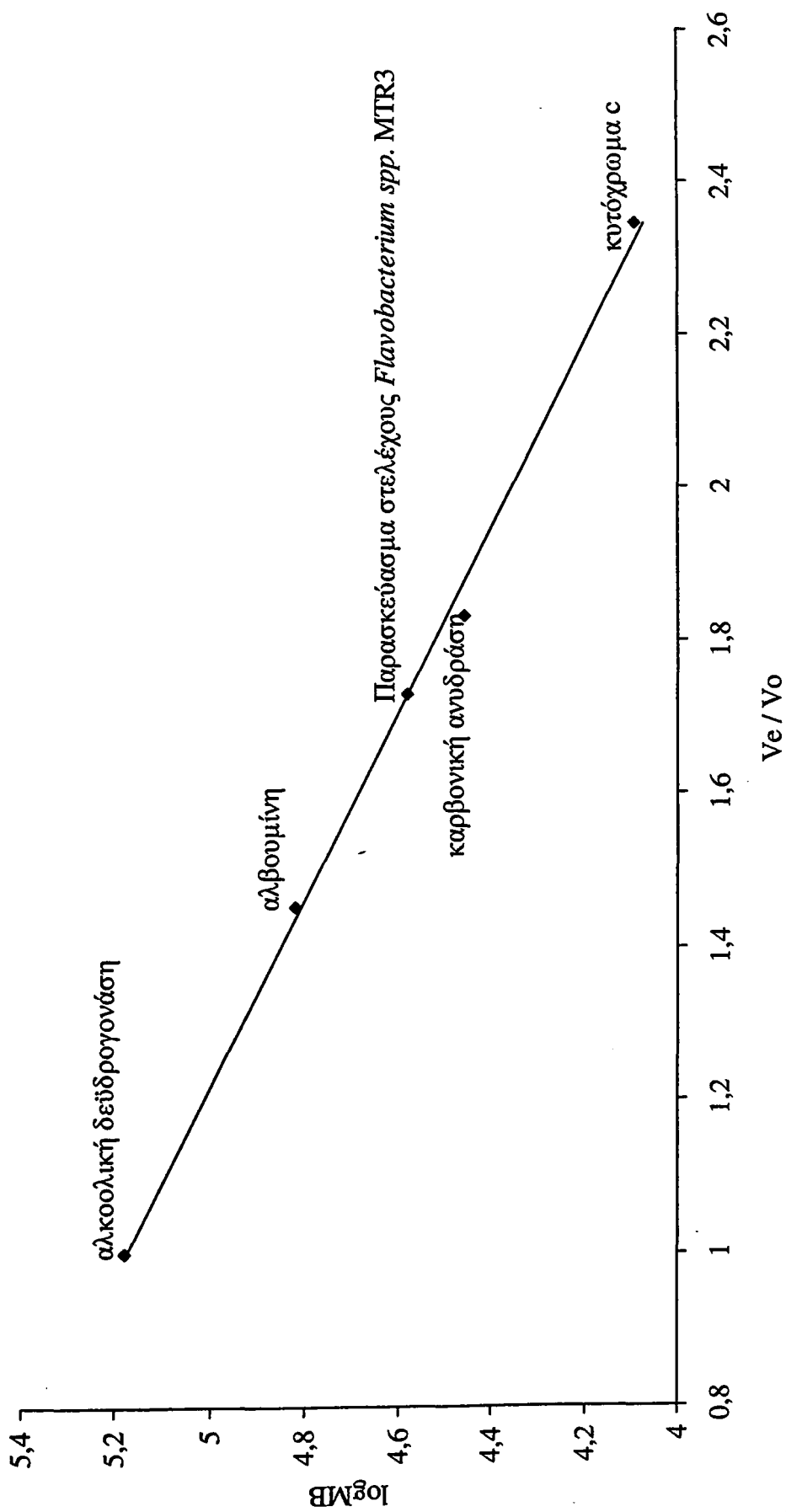
Η μεγάλη δραστικότητα του παρασκευάσματος πρωτεϊνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 σε χαμηλή θερμοκρασία και σε υψηλά επίπεδα NaCl, ακόμη και σε όξινο pH, υποδεικνύουν ότι το παρασκεύασμα μπορεί να είναι δραστικό σε συνθήκες κατεργασίας του γάλακτος και παραγωγής τυριών.

Το παρασκεύασμα πρωτεϊνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 εκλούονταν από τη στήλη μοριακής διήθησης σε κλάσματα που αντιστοιχούσαν σε μοριακό βάρος περίπου 38,0kDa (Σχήμα 16).

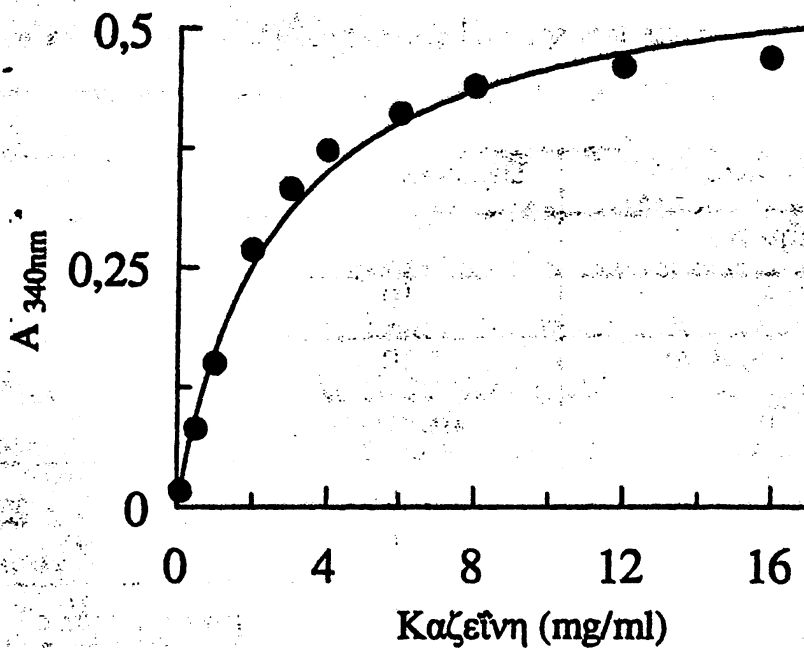
Η δραστικότητα του παρασκευάσματος πρωτεϊνάσης εμφανίστηκε να υπακούει σε κινητική Michaelis – Menten (Σχήμα 17). Η τιμή  $K_m$  προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ολική αγελαδινή καζεΐνη ως υπόστρωμα. Η τιμή  $K_m$  ήταν 1,3mg/ml (0,06mM), χρησιμοποιώντας μέσο μοριακό βάρος για την καζεΐνη 23,0kDa. Η μικρή τιμή της  $K_m$  δείχνει τη μεγάλη συγγένεια του παρασκευάσματος πρωτεϊνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 με την ολική καζεΐνη ως υπόστρωμα.

Το παρασκεύασμα πρωτεϊνάσης δεν ήταν ομογενές και πιθανόν αποτελούνταν από παραπάνω από ένα ένζυμα. Τούτο καθιστά πολύ δύσκολη την προσέγγιση του μηχανισμού δράσης με χρησιμοποίηση διαφόρων αναστολέων πρωτεϊνών. Όμως, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων αναστολέων στη δραστικότητα του παρασκευάσματος πρωτεϊνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 (Πίνακας 11). Η δραστικότητα του παρασκευάσματος μειωνόταν σημαντικά, μέχρις το 5%, με προσθήκη EDTA, το οποίο υποδεικνύει ότι η δραστικότητά του εξαρτάται από την παρουσία μετάλλων. Η 1,10 φαιναιθρολίνη, επίσης, μείωνε μέχρις περίπου μηδενισμού τη δραστικότητα του παρασκευάσματος, υποδεικνύοντας τη σημασία του ψευδαργύρου για τη δραστικότητά του. Από την άλλη πλευρά, η ενζυμική δραστικότητα του παρασκευάσματος δεν μειωνόταν παρουσία των αναστολέων πρωτεϊνών κυστεΐνης, όπως PHMB, ιωδοακεταμίδιο





Σχήμα 16. Διάγραμμα προσδιορισμού του μοριακού βάρους του παρασκευάσματος πρωτεΐνης του *Flanobacterium* spp. MTR3.



Σχήμα 17. Διάγραμμα υδρόλυσης ολικής καζεΐνης από το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3.



**Πίνακας 11.** Επίδραση τροποποιητών στη δραστικότητα του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3.

Τροποποιητής	Συγκέντρωση, mM	% δραστικότητα
Ακατέργαστο		100
EDTA	10	5
1,10-φαινανθρολίνη	10	2
PHMB	κορεσμού	95
Ιωδοακεταμίδιο	10	105
DTB	10	95
Hg <sup>2+</sup>	10	10
Hg <sup>2+</sup> , 2-μερκαπτοαιθανόλη	10, 100	15
PMSF	10	85



και DTB. Ακόμη δεν επανακτούσε την δραστικότητα του με 2 - μερκαπτοαιθανόλη μετά από την μείωσή της κατά 90% με ιόντα υδραργύρου. Η δραστικότητα του παρασκευάσματος, επίσης, δεν μειωνόταν σε μεγάλο βαθμό παρουσία του αναστολέα πρωτεϊνών σερίνης PMSF. Από τη δράση των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν μπορεί να λεχθεί ότι το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 είχε συμπεριφορά μεταλλοπρωτεΐνάσης. Από την άλλη πλευρά, το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης μόνο μερικώς επανενεργοποιούνταν μετά από μείωση της δραστικότητάς του με κατεργασία με EDTA στο 5%. Με προσθήκη  $Zn^{2+}$  είτε  $Ca^{2+}$  η δραστικότητα του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 έφτανε μόνο στο 35% της αρχικής. Εξωκυτταρική πρωτεΐνάση σερίνης από στέλεχος *F. arborescens* έχουν αναφέρει άλλοι ερευνητές (Boguslawzki και συν. 1983).

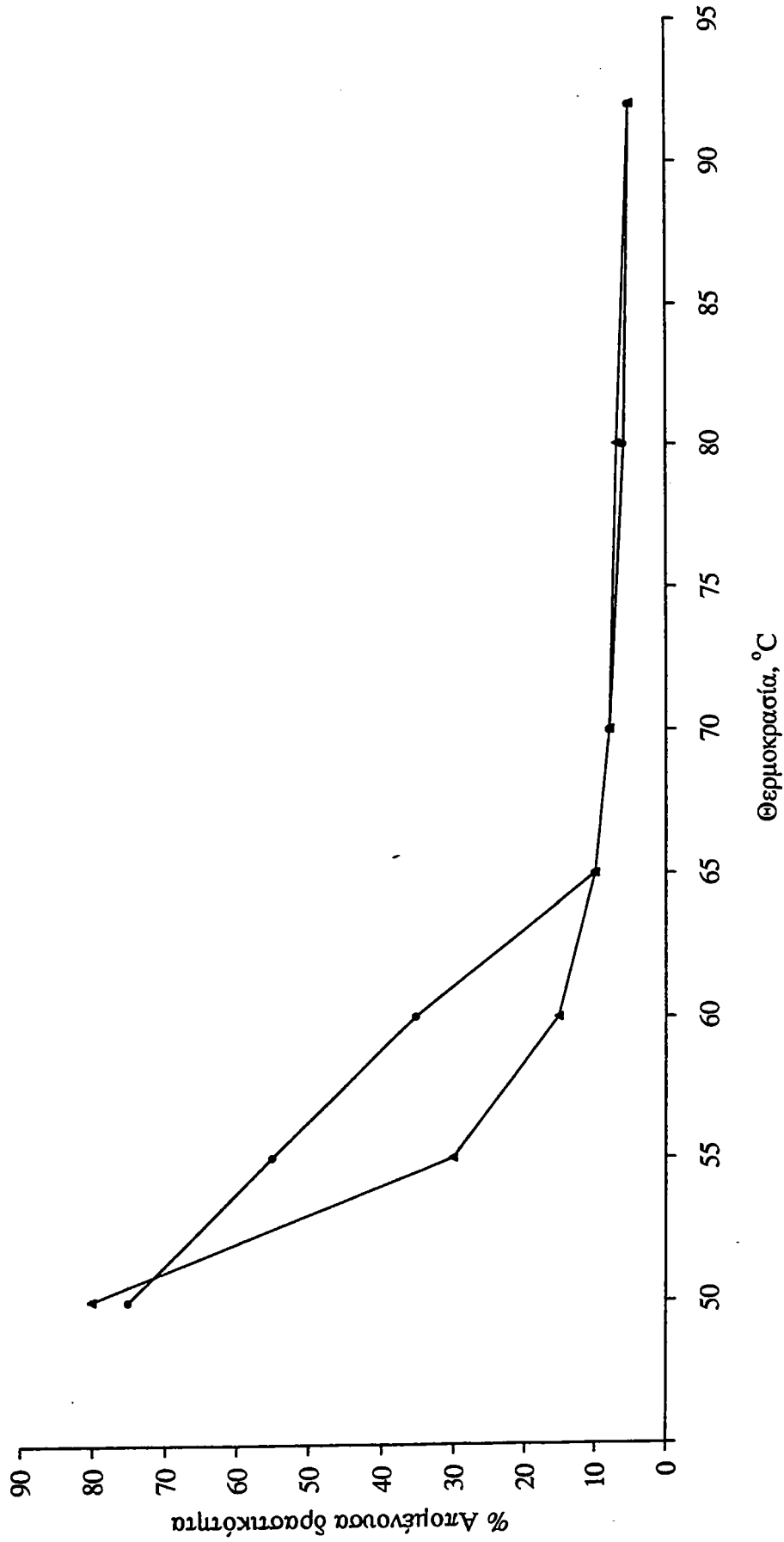
Το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης έχανε σχεδόν πλήρως τη δραστικότητά του μετά από την κατεργασία 120°C, 40s. Επίσης, η παρουσία  $Ca^{2+}$  στο ρυθμιστικό διάλυμα της θέρμανσης δεν είχε καμία επίδραση στη θερμοανθεκτικότητά του.

Το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης έχανε, επίσης, περίπου το 90% της δραστικότητάς του μετά από κατεργασίες στην περιοχή θερμοκρασιών 65 - 92°C (Σχήμα 18). Η παρουσία  $Ca^{2+}$  στο ρυθμιστικό διάλυμα της θέρμανσης δεν είχε καμία επίδραση στη δραστικότητα της πρωτεΐνάσης. Αντίθετα, η παρουσία  $Ca^{2+}$  είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της μείωσης της πρωτεολυτικής δραστικότητας μετά από κατεργασίες στους 55°C και 60°C.

Θερμοευαίσθητες πρωτεΐνάσες από στέλεχη *F. arborescens* και *Flavobacterium* spp. έχουν αναφέρει, επίσης, άλλοι ερευνητές (Boguslawzki και συν. 1983, Milliere και Veillet - Poncet 1985).

Η πολύ μεγάλη μείωση πρωτεολυτικής δραστικότητας του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 μετά από κατεργασίες υψηλών θερμοκρασιών ακόμη και παρουσία  $Ca^{2+}$  υποδηλώνει ότι το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης δεν θα παραμένει δραστικό μετά από τις θερμικές κατεργασίες του γάλακτος που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία.





**Σχήμα 18.** Διάγραμμα αδρανοποίησης του παρασκευάσματος πρωτεΐνης του *Flavobacterium spp.* MTR3 σε ρυθμιστικό 0,1M Tris - HCl pH 7,0, παρουσία είτε όχι  $Ca^{+2}$  στην περιοχή 50 - 92°C

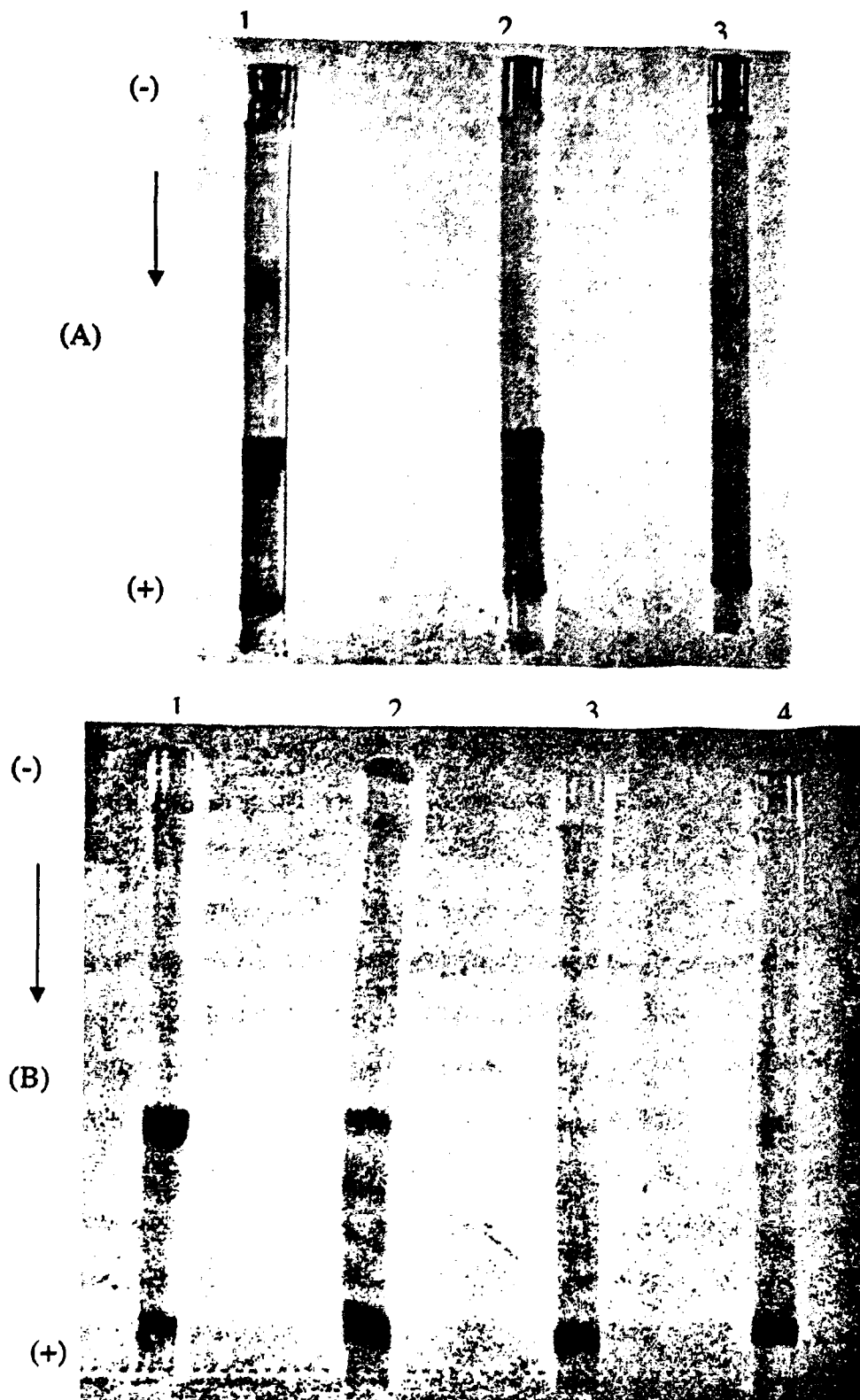
Μελετήθηκε η υδρόλυση της α – και β – καζεΐνης, όπως και της ολικής αγελαδινής και πρόβειας καζεΐνης από το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flanobacterium* spp. MTR3. Επίσης, αποτιμήθηκε η δυνατότητά του για υδρόλυση πεπτιδίων αγελαδινού και πρόβειου τυριού και ελέγχθηκε η αμινοπεπτιδασική δράση του παρασκευάσματος.

• Στο Σχήμα 19 παρουσιάζεται το SDS – PAGE ηλεκτροφόρημα υδρόλυσης της α – και β – αγελαδινής καζεΐνης από το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης. Το παρασκεύασμα υδρόλυε και τις δύο καζεΐνες, ταχύτερα όμως την β – καζεΐνη. Από την υδρόλυση της α – και β – καζεΐνης παράγονταν συγκεκριμένα πεπτίδια σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους. Ορισμένα από τα παραγόμενα πεπτίδια υδρολύονταν επίσης περαιτέρω. Η υδρόλυση των δύο καζεϊνών σε πεπτίδια και η περαιτέρω υδρόλυση παραγομένων πεπτιδίων δείχνει ότι το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης παρουσιάζει συμπεριφορά ενδοπεπτιδάσης, και υδρολύει πρωτεΐνες αλλά και μεγάλα πεπτίδια. Υδρόλυση της β – και της αs – καζεΐνης από στελέχη *Flanobacterium* έχουν αναφέρει, επίσης, άλλοι ερευνητές (Cousin και Marth 1977, Yanagiya και συν. 1977, Milliere και Veillet – Poncet 1979, Guamis και συν.1987).

• Στο Σχήμα 20 παρουσιάζεται το Urea – PAGE ηλεκτροφόρημα υδρόλυσης αγελαδινής και πρόβειας καζεΐνης από το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flanobacterium* spp. MTR3. Το παρασκεύασμα υδρόλυε τις αs – και β – καζεΐνες, με την ολική ως υπόστρωμα. Η προτίμηση για υδρόλυση της β – έναντι της αs – καζεΐνης προκύπτει και από αυτό το ηλεκτροφόρημα, ιδιαίτερα στην περίπτωση της αγελαδινής καζεΐνης. Οι πρόβειες αs – και β – καζεΐνες ήταν πιο ανθεκτικές στη δράση του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης από ό,τι οι αντίστοιχες αγελαδινές.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζεται η υδρόλυση ολικής αγελαδινής καζεΐνης, παρασκευάσματος μικρών πεπτιδίων και πεπτιδίων του υδατικού εκχυλίσματος τυριού από το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flanobacterium* spp. MTR3. Το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης υδρόλυε μόνο σε μικρό βαθμό το παρασκεύασμα μικρών πεπτιδίων. Από την άλλη πλευρά, το ενζυμικό παρασκεύασμα υδρόλυε πεπτίδια του υδατικού εκχυλίσματος τυριού, διαπιδυμένου είτε όχι.



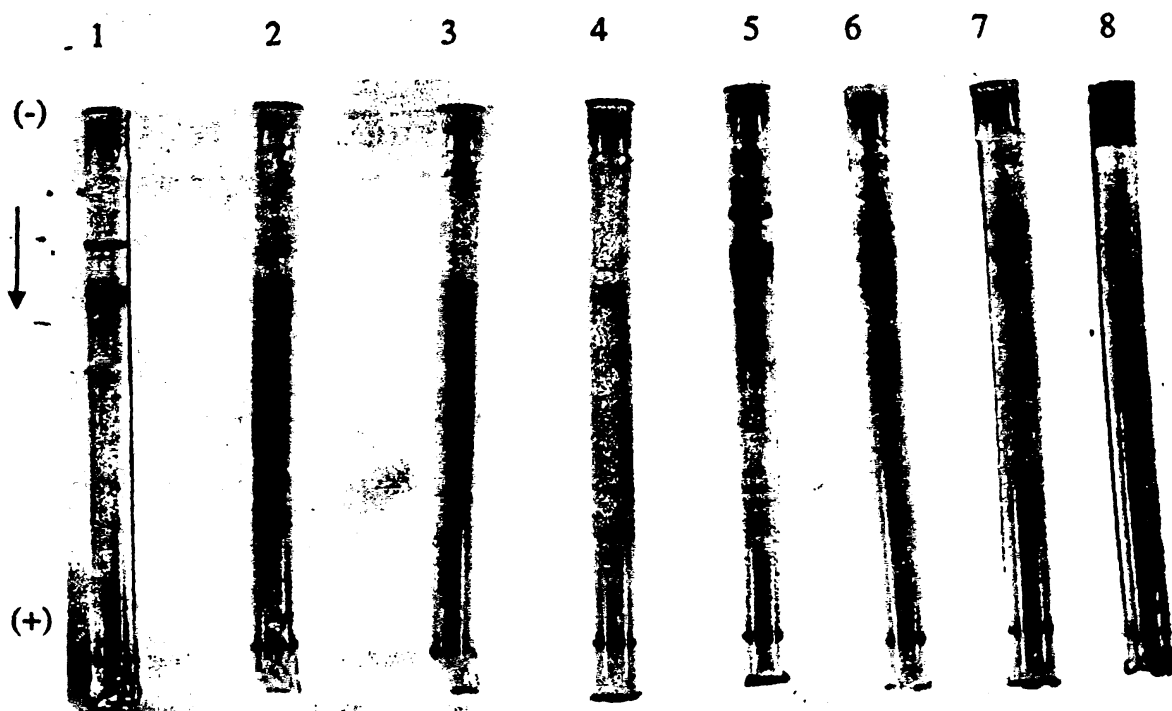


**Σχήμα 19.** SDS - PAGE ηλεκτροφόρηση υδρόλυσης α- και β-καζεΐνης από το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3.

(A): α-καζεΐνη: χρόνοι επώασης: 1→0min, 2→10min, 3→20min

(B): β-καζεΐνη: χρόνοι επώασης: 1→0min, 2→5min, 3→10min, 4→15min





**Σχήμα 20.** Urea - PAGE ηλεκτροφόρημα υδρόλυσης ολικής καζεΐνης αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος από την πρωτεΐνάση του *Flavobacterium* spp. MTR3.

1, 2, 3, και 4: καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος,

5, 6, 7, και 8: καζεΐνη πρόβειου γάλακτος.

Χρόνοι επώασης:

1 και 5→0min,

2 και 6→10min,

3 και 7→20min,

4 και 8→30min.

**Πίνακας 12.** Υδρόλυση πεπτιδίων τυριού και ολικής καζεΐνης από το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3.

Υπόστρωμα	Πρωτεόλυση, $\mu\text{M}$ γλυκίνης
Ολική καζεΐνη	538
Υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τυριού	123
Διαπυμένο υδατοδιαλυτό εκχύλισμα τυριού	179
Παρασκεύασμα μικρών πεπτιδίων	45



Από την υδρόλυση των υποστρωμάτων προκύπτει ότι το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 υδρολύει τις καζεΐνες και σε κάποιο βαθμό μικρά και μεγάλα πεπτίδια τυριών.

Η δραστηριότητα αμινοπεπτιδάσης της πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 παρουσιάζεται στον Πίνακα 13. Το παρασκεύασμα υδρόλυε σημαντικά το π - νιτροανιλίδιο λευκίνης, ενώ παρουσίαζε επίσης δραστηριότητα και στα άλλα π - νιτροανιλίδια.

Το εξωκυτταρικό παρασκεύασμα του στελέχους *Flavobacterium* spp. MTR3 υδρολύει τις β - και αs - καζεΐνες αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος. Επίσης, έχει αμινοπεπτιδασική δραστηριότητα, ενώ ακόμη υδρολύει σε κάποιο βαθμό μεγάλα και μικρά πεπτίδια τυριών. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την σημαντική δραστηριότητα του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης παρουσία NaCl, υποδεικνύει ότι μπορεί να έχει αξιόλογη συμμετοχή στην πρωτεόλυση των τυριών.

Αντίθετα, από την πρωτεΐνάση του στελέχους *P. fluorescens* TR2, το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 παρουσιάζει μόνο πολύ μικρή δραστηριότητα μετά από θερμικές κατεργασίες. Τούτο υποδεικνύει ότι δεν θα παραμένει δραστικό μετά τις θερμικές κατεργασίες του γάλακτος.

Από την άλλη πλευρά, το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης φαίνεται να μπορεί να δρα στο ψυχόμενο γάλα και να δημιουργεί προβλήματα υποβάθμισης σε προϊόντα γάλακτος.





**Πίνακας 13.** Δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3.

Υπόστρωμα	Δραστικότητα, 410nm
π-νιτροανιλίδιο λευκίνης	0,231
π-νιτροανιλίδιο αλανίνης	0,065
π-νιτροανιλίδιο προλίνης	0,075
π-νιτροανιλίδιο γλουταμίνης	0,070



## Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εξωκυτταρική πρωτεϊνάση του στελέχους *P. fluorescens* TR2 είναι τυπική μεταλλοπρωτεϊνάση που περιέχει ενεργό ψευδάργυρο στο καταλυτικό της κέντρο, που πιθανόν συμπλέκεται με ιστιδίνη στο ενεργό κέντρο. Η πρωτεϊνάση είναι σταθερή σε κατεργασίες υψηλών θερμοκρασιών παρουσία ασβεστίου, ενώ στους 60°C υφίσταται αυτόλυση.

Η θερμοανθεκτικότητα του ενζύμου, μαζί με την ικανότητά του να δρα σε χαμηλή θερμοκρασία, παρουσία NaCl ακόμη και σε όξινο pH, υποδεικνύουν ότι μπορεί να είναι δραστικό σε συνθήκες κατεργασίας γάλακτος και παραγωγής τυριών και συνεπώς να δημιουργεί προβλήματα αλλοίωσης.

Η πρωτεϊνάση του *P. fluorescens* TR2 υδρολύει καζεΐνες, μεγάλα, μικρά και πολύ μικρά πεπτίδια αγελαδινών και πρόβειων τυριών. Επίσης, παρουσιάζει προτίμηση για υδρόλυση υδρόφοβων πεπτιδίων παρουσία λιγότερο υδρόφοβων πεπτιδίων.

Η προτίμηση του ενζύμου για υδρόλυση υδρόφοβων πεπτιδίων αγελαδινών και πρόβειων τυριών, υποδεικνύει ότι η πρωτεϊνάση πιθανόν μπορεί να επιφέρει αποπίκραση σε τυριά.

Η παραπάνω προτίμηση, μαζί με την υδρόλυση μεγάλης γκάμας υποστρωμάτων και ιδιαίτερα μικρών πεπτιδίων τυριών, υποδηλώνει ότι η πρωτεϊνάση του *P. fluorescens* TR2 πιθανόν μπορεί να επιφέρει επιτάχυνση της ωρίμανσης τυριών.

Το εξωκυτταρικό παρασκεύασμα πρωτεϊνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 παρουσιάζει σημαντική δραστικότητα, ικανό μέρος της οποίας διατηρεί σε χαμηλή θερμοκρασία και παρουσία NaCl ακόμη και σε όξινο pH. Αυτά υποδεικνύουν την πιθανή δράση του ενζυμικού παρασκευάσματος σε συνθήκες κατεργασίας γάλακτος και παραγωγής τυριών.

Η θερμική αστάθεια του παρασκευάσματος πρωτεϊνάσης, ακόμη και παρουσία ιόντων ασβεστίου υποδηλώνει ότι πιθανόν δεν θα παραμένει δραστικό μετά την θερμική κατεργασία του γάλακτος.



Το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 υδρολύει τις β – και αs – καζεΐνες αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, όπως και σε κάποιο βαθμό μεγάλα και μικρά πεπτίδια αγελαδινών και πρόβειων τυριών. Επιπλέον, παρουσιάζει αμινοπεπτιδασική δράση.

Η υδρόλυση μεγάλης γκάμας υποστρωμάτων, μαζί με τη μεγάλη δραστικότητα σε χαμηλή θερμοκρασία και παρουσία NaCl, υποδεικνύει ότι το ενζυμικό παρασκεύασμα πιθανόν θα υδρολύει καζεΐνες σε ψυχόμενο γάλα και μπορεί να συμμετέχει στην πρωτεόλυση τυριών.

Έτσι, το εξωκυτταρικό παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3, και πιθανό κατ' επέκταση άλλων στελεχών *flavobacteria*, μπορεί να δημιουργεί προβλήματα αλλοίωσης στο γάλα και τυριά.



**Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Αβαν, Ρ., Βιλαφάφιλα, Α., Φριάς, J.D. and Ροδρίγουεζ - Φερνάνδεζ, C. Extracellular lipolytic activity from *Pseudomonas fluorescens* biovar I (*Pseudomonas fluorescens* NC1). *Milchwissenschaft*, 48, 680, 1993.
2. Αδάμς, D. M., Βαράχ, J. T. and Σπέκ, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. *J. Dairy Science*, 59, 823, 1976.
3. Αλιχανιδίς, Ε. and Άνδρους, Α. T. Some properties of the extracellular protease produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain AR - 11. *Bioch. Biophys. Acta*, 485, 424, 1977.
4. Αλιχανιδίς, Ε. and Πολυχρονιάδου, Α. Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. *International Dairy Federation. Seminar 19 - 21, 21, 1995.*
5. Άνδρους, Α.Τ. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Research*, 50, 45, 1983.
6. Αζκονά, J.I., Μάρτιν, R., Ασένσιο, M.A., Χερνάνδεζ, P.E. and Σάντς, Β. Heat stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AH-70: purification by affinity chromatography on cyclopeptide antibiotics. *J. Dairy Research*, 55, 217, 1988.
7. Βάνκς, J. The quality of milk in relation to cheese manufacture. *J. Society Dairy Technol.*, 43, 35, 1990.



8. Barach, J.T., Adams, D.M. and Speck, M.L. Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultrahigh temperature. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 875, 1976a.
9. Barach, J.T., Adams, D.M. and Speck, M.L. Low temperature inactivation in milk of heat – resistant proteases from psychrotrophic bacteria. *J. Dairy Science*, 59, 391, 1976b.
10. Barach, J.T. and Adams, D.M. Thermostability at ultrahigh temperatures of thermolysin and a protease from a psychrotrophic *Pseudomonas*. *Bioch. Biophys. Acta* 485, 417, 1977.
11. Barach, J.T., Adams, D.M. and Speck, M.L. Mechanism of low temperature inactivation of a heat – resistant bacterial protease in milk. *J. Dairy Science*, 61, 523, 1978.
12. Blakesley, R.W. and Boezi, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G 250. *Anal. Biochem.*, 82, 580, 1977.
13. Bloquel, R. and Veillet – Poncet, L. Evolution et détermination de la flore bactérienne d' un lait cru réfrigère paucimicribien en fonction du temps. *Le Lait*, 60, 474, 1982.
14. Boguslawski, G., Shultz, J.L. and Yehle, C.O. Purification and properties of an extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. *Anal. Biochem.*, 132, 41, 1983.
15. Bozoglu, F., Swaisgood, H.E. and Adams, D.M. Isolation and characterization of an extracellular heat – stable lipase produced by *Pseudomonas fluorescens* MC 50. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 2, 1984.



16. Brandl, E. and Zizer, T. Hydrolysis of aromatic esters by microbial preparations with lipolytic and proteolytic activity. *Ostezeichische Milchwirtschaft*, 28, 15, 1973.
17. Braun, P. and Fehlhaber, K. Combined effect of temperature,  $a_w$ , and pH on enzymatic activity of spoilage – causing bacteria. *Milchwissenschaft*, 57, 134, 2002.
18. Bucky, A.R., Hayes, P.R. and Robinson, D.S. Enhanced inactivation of bacterial lipases and proteinases in whole milk by a modified ultra high temperature treatment. *J. Dairy Research*, 55, 373, 1988.
19. Chen, L., Daniel, R.M. and Coolbear, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Intern. Dairy J.*, 13, 255, 2003.
20. Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. and Gatignani, G.L. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Science*, 66, 1219, 1983.
21. Cousin, M. A. and Marth, E. H. Changes in milk proteins caused by psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft*, 32, 337, 1977a.
22. Cousin, M. A. and Marth, E. H. Cheddar cheese made from milk that was precultured with psychrotrophic bacteria. *J. Dairy Science*, 60, 1048, 1977b.
23. Cousin, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products; a review. *J. Food Protect.*, 45, 172, 1982.
24. Cousin, M.A. Physical and biochemical effects on milk components. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. McKellar, R.C. editor. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 1989.



25. Champagne, C.P. Inhibition of psychrotrophic bacteria in raw milk by immobilized lactic acid bacteria. *Biotechnology Letters*, 12, 771, 1990.
26. Champagne, C.P., Laing, R.R., Roy, D. and Mafu, A.A. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 34, 1, 1994.
27. Creamer, L.K. Preparation of  $\alpha$ s1-casein A. *J. Dairy Science*, 57, 341, 1974.
28. Dalglish, D.G. The enzymatic coagulation of milk. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Volume 1 General aspects. Second edition.* Fox, P.F. editor. Chapman & Hall. London.1993.
29. Deeth, H. C. and Fitz – Gerald, C. H. Lipolysis in dairy products: a review. *Australian J. Dairy Technology*, 32, 53, 1976.
30. Diermayr, P. and Klostermeyer, H. A new metalloproteinase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I. *Hoppe – Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 365, 1345, 1984.
31. Diermayr, P., Kroll, S. and Klostermeyer, H. Mechanisms of heat inactivation of a proteinase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I. *J. Dairy Research*, 54, 51, 1987.
32. Engels, W.J.M. and Visser, D. Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavor of different type of cheese. *Netherlands Milk Dairy J.*, 48, 127, 1994.
33. Exerkate, F.A. and Alting, A.C. The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acids in Gouda cheese. *Intern. Dairy J.*, 5, 15, 1995.



34. Fairbairn, D. J. and Law, B. A.. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Science*, 53, 139, 1986a.
35. Fairbairn, D. and Law, B. A. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Pseudomonas fluorescens* NCDO2085. *J. Dairy Research*, 53, 457, 1986b.
36. Fernandez – Garcia, E., Lopez – Fandino, Olans, A. and Ramos, M. Comparative study of the proteolytic activity of a *Bacillus subtilis* neutral protease preparation during early stages of ripening of cheese made of cow and ewe milk. *Milchwissenschaft*, 45, 428, 1990.
37. Fox, P.F. Acceleration of cheese ripening. *Food Biotechn.*, 2, 133, 1988-89.
38. Fox, P.F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Science*, 72, 1379, 1989.
39. Fox, P.F., Power, P. and Cogan, T.M. Isolation and molecular characteristics. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. McKellar, R.C. editor. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 1989.
40. Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H. and Wallace, J. Biochemistry of cheese ripening. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Volume 1 General aspects. Second edition. Fox, P.F. editor. Chapman & Hall. London. 1993.
41. Frias, J.D., Villafafila, A., Abad, P. and Rodriguez – Fernandez, C. Characterization of a thermoresistant metallo-proteinase from *Pseudomonas fluorescens* biovar I. *Milchwissenschaft*, 49, 81, 1994.
42. Gasincova, E., Stepaniak, L. and Sorhaug, T. Low temperature inactivation of lipase from *Pseudomonas*. *Italian J. Food Science*, 6, 449, 1994.





43. Garcia – Carreno, F.L. Protein inhibitors. Trends Food Science Technol., 7, 297-204, 1996.
44. Gebre – Egziaher, A., Hunbert, E.S. and Blankenagel, G. Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. J. Food Protect., 43, 709, 1980.
45. Griffiths, M.W., Phillips, J.D. and Muir, D.D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychrotrophic bacteria of dairy origin. J. Appl. Bacteriol., 50, 289, 1981.
46. Guamis, B., Huerta, T. and Garay, E. SDS – PAGE study of milk proteolysis by selected psychrotrophs from raw-milk. Milchwissenschaft, 42, 89, 1987.
47. Habibi – Najafi, M.B. and Lee, B.H. Bitterness in cheese: a review. Critical Reviews Food Science, 36, 397, 1996.
48. Haque, Z. and Kinsella, J.E. Interaction between heated  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin: predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. J. Dairy Research, 55, 67, 1988.
49. Harrigan, W.E. and McCance, M.E. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Second edition. Academic Press. London. 1976.
50. Hill, R.D. The preparation of  $\kappa$ -casein. J. Dairy Research, 30, 101, 1963.
51. Holt, C. and Sowyer, L. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation proteins of primary and secondary structures of the  $\alpha$ s1-,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -caseins. J. Chemistry Society Faraday Transaction, 89, 2683, 1993.
52. International Dairy Federation (IDF). Psychrotrophs in milk and milk products. IDF E-Doc 68. Brussels. 1976.



53. Jackman, D.M., Bartlett, F.M. and Patel, T.R. Heat-stable proteases from psychrotrophic pseudomonads: comparison of immunological properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 6, 1983.
54. Jooste, P.J. and Britz, T.J. The significance of flavobacteria as proteolytic psychrotrophs in milk. *Milchwissenschaft*, 41, 618, 1986.
55. Juffs, H. S. Influence of proteinases produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* on manufacture and quality of Cheddar cheese. *Australian J. Dairy Technol.*, 29, 74, 1974.
56. Kohlmann, K.L., Nielsen S.S. and Ladisch, M.R. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *J. Dairy Science*, 74, 4125, 1991.
57. Kalogridou – Vassiliadou, D. Lipolytic activity and heat – resistance of extracellular lipases of some Gram – negative bacteria. *Milchwissenschaft*, 39, 601, 1984.
58. Kalogridou – Vassiliadou, D. and Alichanidis, E. Effect of refrigerated storage of milk on the manufacture and quality of Teleme cheese. *J. Dairy Research*, 51, 629, 1984.
59. Koka, R. and Weimer, B.C. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 280, 2000.
60. Konstantinou, P. and I. G. Roussis. Changes in apparent hydrophobicity of *Pseudomonas* lipases after heat treatments. *Intern. Dairy J.*, 3, 747-753, 1993.
61. Konstantinou, P. and I.G. Roussis. Some properties of extracellular lipase from *Pseudomonas* 92. *Milchwissenschaft*, 53 (11), 622, 1998.



62. Kroll, S. and Klostermeyer, H. Heat Inactivation of Exogenous Proteinases from *Pseudomonas fluorescens*. I) Possibility of Inactivation in milk. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 179, 288. 1984
63. Kroll, S. Thermal stability. In: Enzymes of psychrotrophs in raw food. McKellar, R.C. editor. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 1989.
64. Kuchroo, C.N. and Fox, P.F. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft, 37, 331, 1982.
65. Kumura, H., Mikawa, K. and Saito, Z. Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* No. 33. J. Dairy Research, 60, 229, 1993.
66. Kumura, H., Murata, S., Hoshino, T., Mikawa, K. and Schimazaki, K. Autolysis of the proteinase from *Pseudomonas fluorescens*. J. Dairy Science, 82, 2078, 1999.
67. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680, 1970.
68. Lalos, G., L.P. Voutsinas, C.P. Pappas and I.G. Roussis. Effect of a sub – pasteurization treatment of cold stored ewe's milk on the quality of Feta cheese. Milchwissenschaft, 51, 78, 1996.
69. Lalos, G. and I.G. Roussis. Quality of a graviera-type cow cheese and a low-fat cow+ewe cheese from raw and refrigerated cow's milk. Milchwissenschaft, 54, 674, 1999.
70. Lalos, G. and I.G. Roussis. Quality of full-fat and low-fat kefalograviera cheese from raw and refrigerated ewe's milk. Milchwissenschaft, 55, 24, 2000.



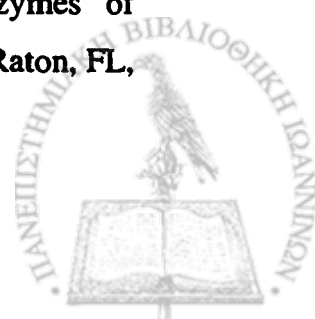
71. Lalos, G.T., A.-M. Vlachou, E. Kondyli and I.G. Roussis. Proteolysis and lipolysis in full - fat and low - fat Kefalograviera cheese from raw and refrigerated ewe's milk. *Milchwissenschaft*, 56, 133, 2001.
72. Lalos, G.T. and I.G. Roussis. Quality of semi-hard goat cheese from raw and refrigerated milk. *Milchwissenschaft*, 57, 319, 2002.
73. Law, B.A., Sharp, M.E., and Chapman, H.R. The effect of lipolytic Gram - negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. *J. Dairy Research*, 43, 459, 1976.
74. Law, B. A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *J. Dairy Research*, 46, 573, 1979.
75. Law, B.A., Cousins, C.M., Sharp, M.E. and Davies, E.L. Psychrotrophs and their effects on milk and dairy products. In: Cold tolerant microbes in spoilage and the environment. Russell, A.D. and Fuller, R. editors. Academic Press, London. 1979a.
76. Law, B. A., Andrews, A. T., Cliffe, A. J., Sharpe, M. E. and Chapman, H. P. Effect of proteolytic raw milk psychrotrophs on Cheddar cheese making with stored milk, *J. Dairy Research*. 46, 497, 1979b.
77. Law, B.A. Accelerated ripening of cheese. *Dairy Industry Intern.*, 45, 15, 1980.
78. Law, B.A. Flavour development in cheeses. In: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milks. Davies, F.L. and Law, B.A. editors. Elsevier applied science publishers Ltd. London and New York. 1984.



79. Lemieux, L. and Simard, R.E. Bitter flavor in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Le Lait*, 71, 599, 1991.
80. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biolog. Chem.*, 193, 265, 1951.
81. Malik, R.K. and Mathur, D.K. Purification and characterization of a heat – stable protease from *Pseudomonas* sp. B – 25. *J. Dairy Science*, 67, 522, 1984.
82. Maraganore, J.M. and Heinrikson, R.L. Which class of serine is involved in the lipase mechanism? . *Trends Biochemical Sciences*, 11, 497, 1986.
83. Margesin, R. and Schinner, F. A comparison of extracellular proteases from three psychrotrophic strains of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38, 200, 1992.
84. Matselis, E. and I. G. Roussis. Influence of culture conditions and hydrogen peroxide on growth and extracellular enzyme production by *Pseudomonas* UICD31. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 25, 433, 1992.
85. Matselis, E. and I.G. Roussis. Proteinase and lipase production by *Pseudomonas fluorescens*. Proteolysis and lipolysis in thermized ewe's milk. *Food Control*, 9, 251, 1998.
86. McKellar, R. C. Development of off – flavors in ultra – high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *J. Dairy Science*, 64, 2138, 1981.
87. McKellar, R.C. Regulation and control of synthesis. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. McKellar, R.C. editor. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 1989.



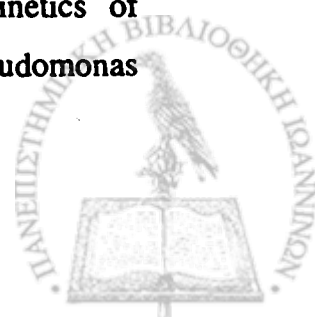
88. Mikolajcik, E.M. Psychrotrophic bacteria of dairy product quality. I. Major organisms involved and defects produced. *Cultured Dairy Prod. J.*, 14, 6, 1979.
89. Milliere, J.B. and Veillet - Poncet, L. Caractérisation des systèmes enzymatique protéolytiques de deux souches psychrotrophes isolées de laits crus réfrigères. *Le Lait*, 59, 269, 1979.
90. Milliere, J.B. and Veillet-Poncet, L. An inventory of peptide hydrolases and acrylamidases in *Flavobacterium Iib*. *J. Appl. Bacteriol.*, 59, 459, 1985.
91. Mitchell, G.E. and Ewings, K.N. Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UHT - treated milk. *New Zealand J. Dairy Science Technol.*, 20, 65, 1985.
92. Mitchell, S.L. and Marshall, R.T. Properties of heat - stable proteases of *Pseudomonas fluorescens*: characterization and hydrolysis of milk proteins. *J. Dairy Science*, 72, 864, 1989a.
93. Mitchell, S.L. and Marshall, R.T. Specificity of heat - stable pseudomonal proteases: peptide mapping by reverse - phase high performance liquid chromatography. *J. Dairy Science*, 72, 875, 1989b.
94. Mistry, V.V. and Kosikowski, F.V. Influence of potassium sorbate and hydrogen peroxide on psychrotrophic bacteria in milk. *J. Dairy Science*, 68, 605, 1985.
95. Mottar, J.F. Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncoded storage. *Milchwissenschaft*, 36, 87, 1981.
96. Mottar, J.F. Effect on the quality of dairy products. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. McKellar, R.C. editor. CRC Press. Boca Raton, FL, USA, pp. 227-244. 1989.



97. Patel, T.R., Jackman, D.M. and Bartlett, F.M. Heat – stable protease from *Pseudomonas fluorescens* T16: purification by affinity column chromatography and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 333, 1983a.
98. Patel, T.R., Bartlett, F.M. and Hamid, J. Extracellular heat – resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads. *J. Food Protect.*, 46, 90, 1983b.
99. Patel, T.R., Jackman, D.M., Williams, G.J. and Bartlett, F.M. Physicochemical properties of heat – stable proteases from psychrotrophic pseudomonads. *J. Food Protect.*, 49, 183, 1986.
100. Pelissier, J.P. and Manchon, P. Comparative study of the bitter taste of enzyme hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. *J. Food Science*, 41, 231, 1976.
101. Phillips, J.D. and Griffiths, M.W. Pasteurized dairy products. The constraints imposed by environmental contamination. In: *Food contamination from environmental sources*. Nriagu, J.O. and Simmons, M.S. editors. Jogh Wiley and sons. New York 1990.
102. Reimerdes, E. H. Changes in the proteins of raw milk during storage. In: *Developments in Dairy Chemistry – 1. Proteins*. Fox, P.F. editor. London: Applied Science Publishers. 1982.
103. Richardson, B.C. and Te Whaiti, I.E. Partial characterization of heat – stable extracellular proteases of some psychrotrophic bacteria from raw milk. *New Zealand J. Dairy Science Technol.*, 13, 172, 1978.
104. Richardson, B.C. The purification and characterization of a heat – stable protease from *Pseudomonas fluorescens* B52. *New Zealand J. Dairy Science Technol.*, 16, 195, 1981.

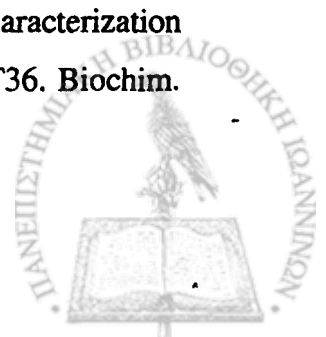


105. Roudot – Algaron, F. Le goût des acides amines, des peptides et des protéines: exemple de peptides sapides dans les hydrolysats de caséines. *Le Lait*, 76, 313, 1996.
106. Roussis, I.G., I. Karabalis, C. Papadopoulou and C. Drinas. Some properties of extracellular lipase from a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 21, 188, 1988a.
107. Roussis, I.G., E.K. Voudouris and M.G. Kontominas. Influence of lipolytic and proteolytic *Pseudomonas fluorescens* strain GR83 on the quality of Feta cheese. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 21, 131, 1988b.
108. Roussis, I.G., C. Drinas and E. Alichanidis. Some properties of extracellular protease from a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 23, 106, 1990.
109. Rowe, M.T., Dunstall, G., Kilpatrick, D. and Wisdow, G.B. A study of changes in the psychrotrophic microflora of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft*, 56, 247, 2001.
110. Salles, C., Septier, C., Roudot – Algaron, F., Guillot, A. and Etievan, P.X. Sensory and chemical analysis of fractions obtained by gel permeation of water – soluble Comte cheese extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1659, 1995.
111. Schokker, E.P. and vanBoekel, M.A.J.S. Production, purification and partial characterization of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F. *Intern. Dairy J.*, 7, 265, 1997.
112. Schokker, E.P. and vanBoekel, M.A.J.S. Mechanism and kinetics of inactivation at 40 – 70°C of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F. *J. Dairy Research.*, 65, 261, 1998.





113. Seyderhelm, I., Boguslawski, S., Michaelis, G., and Knorr, D.L. Pressure inactivation of selected enzymes. *J. Food Science*, 61, 308, 1996.
114. Shah, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*, 49, 432, 1994.
115. Shimizu, M., Lee, S.W., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. Emulsifying properties of an N-terminal peptide obtained from the peptic hydrolysate of  $\alpha$ s1-casein. *J. Food Science*, 49, 1117, 1984.
116. Skura, B.J. Standards, control, and future outlook. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. McKellar, R.C. editor. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 1989.
117. Sorhaug, T. and Stepaniak, L. Microbial enzymes in the spoilage of milk and dairy products. In: *Food Enzymology. Volume 1*. Fox, P.F. editor. Elsevier Applied Science, London. 1991.
118. Sorhaug, T. and Stepaniak, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Food Science Technol.*, 8, 35, 1997.
119. Stead, D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *J. Dairy Research*, 53, 481, 1986.
120. Stead, D. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. *J. Dairy Research*, 54, 535, 1987.
121. Stepaniak, L., Fox, P.F. and Daly, C. Isolation and general characterization of a heat – stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT36. *Biochim. Biophys. Acta*, 717, 376, 1982.



122. Stepaniak, L. and Fox, P.F. Thermal stability of an extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 36. *J. Dairy Research*, 50, 171, 1983.
123. Stepaniak, L. and Fox, P.F. Isolation and characterization of heat – stable proteinases from *Pseudomonas* isolate AFT21. *J. Dairy Research*, 52, 77, 1985.
124. Stepaniak, L. and Sorhaug, T. Biochemical classification. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. McKellar, R.C. editor. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 1989.
125. Stepaniak, L. Factors affecting quality and possibilities of predicting shelf – life of pasteurized and ultra – high temperature heated milks. *Italian J. Food Science*, 4, 11, 1991.
126. Stepaniak, L., Zakrzewski, E. and Sorhaug, T. Inactivation of heat – stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* P1 at pH 4.5 and 55-degrees-C. *Milchwissenschaft*, 46, 139, 1991.
127. Stepaniak, L. and Abrahamsen, R.K. Effect of sampling and storage temperature on microbial quality of pasteurized milk. *Milchwissenschaft*, 50, 22, 1995.
128. Swang, R.T. and Munkres, K.D. Molecular weigh analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Analyt. Biochem.*, 39, 462, 1971.
129. Suhren, G. Producer microorganisms. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. McKellar, R.C. editor. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 1989.



130. Thomas, S.B., Druce, R.G. and Jones, M. Influence of production on the bacteriological quality of refrigerated farm bulk tank milk-a review. *J. Appl. Bacteriol.*, 34, 659, 1971.
131. Torrie, J.P., Cholette, H., Roehlich, D.A. and Mckellar, R.C. Growth of an extracellular proteinase – deficient strain of *Pseudomonas fluorescens* on milk and milk proteins. *J. Dairy Research*, 50, 365. 1983
132. Tye, T.M., Haard, N.F. and Patel T.R. Effects of bacterial protease on the quality of Cheddar cheese. *Can. Inst. Food Science Technol.*, 21, 373, 1988.
133. Triantafyllidou, M. and I.G. Roussis. Changes in the apparent hydrophobicity of *Pseudomonas* 31 proteinase after heat treatments. *Milchwissenschaft*, 54, 434, 1999.
134. Uceda, R., Guillen, A.M., Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M. Effect of *Pseudomonas fluorescens* growth in ewe milk on casein breakdown, peptide formation and coagulation characteristics. *Milchwissenschaft*, 48, 619, 1993.
135. Uceda, R., Picon, A., Guillen, A.M., Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M. Characteristics of Manchego cheese manufactured from ewe raw milk preserved by addition of carbon dioxide or by activation of the lactoperoxidase system. *Milchwissenschaft*, 49, 678, 1994.
136. Urbach, G. The chemical and biochemical basis of cheese and milk aroma. In: *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*. Second edition. Law, B.A. editor. Blackie academic and professional. London. 1997.
137. Van Den Berg, G. and Exerkate, V.A. Technological parameters involved in cheese ripening. *Intern. Dairy J.*, 3, 245, 1993.



138. Vercet, A., Burgos, J. and Lopez – Buesa, P. Manothermosonication of heat – resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens*: effect of pH and sonication parameters. *J. Dairy Research*, 69, 243, 2002.
139. Wilkinson, M.G. Acceleration of cheese ripening. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology. Volume 1 General aspects. Second edition.* Fox, P.F. editor. Chapman & Hall. London. 1993.
140. Whitaker, J.R. *Principles of enzymology for the food sciences. Second edition.* Marcel Dekker, Inc. New York. 1994.
141. White, C.H. and Marshall, R.T. Reduction of shelf – life of dairy products by a heat – stable protease from *Pseudomonas fluorescens* P26. *J. Dairy Science*, 56, 849, 1973.
142. Yan, L., Langlois, B.E., O’Leary, J. and Hicks, C.L. Purification and characterization of four extracellular proteases isolated from raw milk psychrotrophs. *J. Dairy Science*, 68, 1323, 1985.
143. Yanagiya, T., Mikami, M. and Miura, H. Changes in milk protein by psychrotrophic organisms. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 47, 259, 1973.
144. Zahram, A.S., Zayed, G. and Hunter, J. Production of extracellular protease by immobilized and free cells of *Flavobacterium* sp. R23. *Milchwissenschaft*, 48, 18, 1992.
145. Ανυφαντάκης, Ε.Μ. Χημεία και ανάλυση του γάλακτος. Εκδόσεις Καραμπερόπουλος Α.Ε. Αθήνα. 1986.
146. Ρούσσης, Ι.Γ. Ανάπτυξη αρώματος – γεύσης στα τυριά. *Επιστήμη και Τεχνολογία γάλακτος*, 1, 49, 1996.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η εξωκυτταρική πρωτεΐνάση του στελέχους *Pseudomonas fluorescens* TR2 και το εξωκυτταρικό παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του στελέχους *Flavobacterium* spp. MTR3, ψυχρότροφα στελέχη που απομονώθηκαν από νωπό γάλα..

Η εξωκυτταρική πρωτεΐνάση του στελέχους *P. fluorescens* TR2 καθαρίστηκε σε επίπεδο ηλεκτροφορητικής ομοιογένειας . Είχε μοριακό βάρος 43,5kDa και περιείχε 1grat Zn ανά mole. Το ένζυμο αναστελλόταν με EDTA και 1,10 φαινανθρολίνη, ενώ το αποένζυμο επανενεργοποιούνταν με προσθήκη  $Zn^{2+}$ . Η πρωτεΐνάση παρουσίαζε μεγαλύτερη δραστικότητα στους περίπου 37°C και pH 7,0, ενώ ήταν δραστική στους 7°C και σε pH 6,0 παρουσία 4% (w/v) NaCl.

Το ένζυμο ήταν ασταθές σε υψηλές θερμοκρασίες (>90 – 100°C ), ενώ ήταν πολύ θερμοανθεκτικό σε αυτές τις θερμοκρασίες παρουσία  $Ca^{2+}$ . Με θέρμανση στους 60°C, κατά την οποία παρατηρούνταν αύξηση στη φαινόμενη υδροφοβία, το ένζυμο αυτολύοταν. Κατά την θέρμανση στους 60°C παρουσία καζεΐνης παρατηρήθηκε μια αναστολή της αυτόλυσης, ενώ η πρωτεΐνάση ήταν δραστική και υδρόλυε την καζεΐνη.

Η τιμή  $K_m$  της πρωτεΐνάσης του *P. fluorescens* TR2 με υπόστρωμα την ολική καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος ήταν 1,7mg/ml. Παρουσίαζε δραστικότητα αυστηρά ενδοπεπτιδάσης, χωρίς αμινοπεπτιδασική δραστικότητα. Το ένζυμο υδρόλυε τις β – και αs – καζεΐνες αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, ταχύτερα την β – καζεΐνη. Επίσης, υδρόλυε το πεπτίδιο αs<sub>1</sub> – CN f 1 – 23 (είτε τουλάχιστον ανάλογό του) αλλά και πεπτίδια που προέκυπταν με την υδρόλυσή του.

Όπως παρακολουθήθηκε ηλεκτροφορητικά, η πρωτεΐνάση υδρόλυε μεγάλα πεπτίδια υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού και πρόβειου τυριού. Επίσης, όπως παρακολουθήθηκε με υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, το ένζυμο υδρόλυε κατά προτίμηση υδρόφοβα πεπτίδια υδατικού εκχυλίσματος αγελαδινού και πρόβειου τυρού.

Με βάση την υδρόλυση των υποστρωμάτων προκύπτει ότι η πρωτεΐνάση του *P. fluorescens* TR2 είναι πιθανόν κατάλληλη για αποπίκραση και επιτάχυνση ωρίμανσης τυριών.



Το εξωκυτταρικό παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 καθαρίστηκε μόνο μερικώς.

Το ενζυμικό παρασκεύασμα παρουσίαζε μεγαλύτερη δραστικότητα στους 45°C και pH 8,0, ενώ ήταν επίσης πολύ δραστικό στους 7°C και σε pH 6,0 παρουσία 4% (w/v) NaCl.

Το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης έχανε πάνω από το 90% της δραστικότητάς του με θερμικές κατεργασίες πάνω από τους 65°C, ακόμη και παρουσία Ca<sup>2+</sup>.

Η τιμή K<sub>m</sub> του παρασκευάσματος πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 με υπόστρωμα την ολική καζεΐνη αγελαδινού γάλακτος ήταν 1,3mg/ml. Το παρασκεύασμα υδρόλυε τις β - και αs - καζεΐνες αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, ταχύτερα την β - καζεΐνη. Επίσης, σε κάποιο βαθμό υδρόλυε πεπτίδια αγελαδινών και πρόβειων τυριών. Το παρασκεύασμα πρωτεΐνάσης του *Flavobacterium* spp. MTR3 παρουσίαζε δραστικότητα αμινοπεπτιδάσης, ιδιαίτερα αμινοπεπτιδάσης λευκίνης.

