

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 8 / Nº 8 / 2006 / 12-17

CARACTERIZACIÓN DE AMINOPEPTIDASA N DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* TW43

Marguet, Emilio R.; Vallejo, Marisol; Pescuma, Micaela.

Facultad de Ciencia Naturales, Sede Trelew. Universidad Nacional de la Patagonia. Roca 115. (9100)
Trelew. E-Mail: rmarguet@tw.unp.edu.ar

CHARACTERIZATION OF AMINOPEPTIDASE N FROM *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* TW43

ABSTRACT

Biochemical and kinetic characteristics of the general Aminopeptidase N (PepN) from *Streptococcus thermophilus* TW43 were studied. Maximal activity of the enzyme was determined at pH 6.8 and 40°C. Pep N was strongly inhibited by EDTA and o-phenanthroline. Therefore, it was considered to be a metallopeptidase. Imidazole partially inhibited enzyme activity suggesting histidine is one of the amino acids related to metal binding in the active site. Among the bivalent cations only Cu⁺⁺ exhibited slight inhibition while Co⁺⁺ increased enzymatic activity nearly fivefold. PepN remained active under ripening condition (pH 5.0 and 15°C) suggesting that *Streptococcus thermophilus* TW43 may contribute to flavor cheese development through its role in production of free amino acids.

KEYWORDS: Aminopeptidase N, *Streptococcus thermophilus*.

RESUMEN

Se estudiaron las características bioquímicas y cinéticas de Aminopeptidasa N (PepN) de *Streptococcus thermophilus* TW43. La máxima actividad de la enzima fue determinada a pH 6,8 y 40°C. El EDTA y la o-fenantrolina inhibieron fuertemente a PepN, en consecuencia se la consideró una metallopeptidasa. El imidazol inhibió parcialmente la actividad enzimática sugiriendo que la histidina es responsable de la unión del ión metálico en el sitio activo. Dentro de los cationes divalentes solo el Cu⁺⁺ exhibió una leve inhibición, mientras que el Co⁺⁺ aumentó la actividad enzimática aproximadamente cinco veces. La PepN se mantuvo activa bajo las condiciones de maduración sugiriendo que *Streptococcus thermophilus* TW43 puede contribuir al desarrollo del flavor en quesos a través de su función en la producción de aminoácidos libres.

PALABRAS CLAVE: Aminopeptidasa N, *Streptococcus thermophilus*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL), en especial aquellas que se emplean en la elaboración de productos lácteos, exhiben numerosas auxotrofias para aminoácidos, que varían entre 4 y 14 dependiendo de la cepa [1]. Las caseínas, que constituyen más del 80% de las proteínas lácteas, contienen todos los aminoácidos esenciales exigidos por el metabolismo de las BAL, sin embargo, la concentración en forma libre que se encuentra en la leche solo permite alcanzar un 10-15 % de la máxima población [2, 3]. En consecuencia, para lograr en este medio un crecimiento óptimo, este grupo de bacterias depende de la capacidad de su sistema proteolítico para degradar las caseínas y proveerlas de los aminoácidos necesarios [4, 5].

Sobre la base de su función se puede separar al sistema proteolítico de las BAL en 3 componentes estructurales: a) una proteinasa asociada a la pared, responsable de la degradación inicial de las caseínas [6, 7], b) un sistema de transporte que importa al citoplasma los productos de la hidrólisis proteica a través de la membrana [8, 9, 10] y c) un grupo de peptidasas intracelulares [1].

El sistema de peptidasas intracelulares está involucrado en la hidrólisis de los péptidos exógenos derivados de la actividad enzimática de la proteinasa y posteriormente transportados al citoplasma por el sistema Opp [8]. Hasta la actualidad se logró la caracterización bioquímica y/o genética de al menos 16 peptidasas de BAL [1]. Estas enzimas exhiben una variada capacidad catalítica destacándose las aminopeptidasas generales por su amplia especificidad, característica que les permite proveer a la célula de aminoácidos esenciales para su posterior utilización en la síntesis de proteínas, generación de energía metabólica y recuperación de cofactores reducidos. En todas las especies de BAL, la Aminopeptidasa N (PepN) se considera la aminopeptidasa general más importante ya que cataliza más del 90% de la hidrólisis de los aminoácidos del extremo amino de los oligopéptidos que se originan por la degradación de la caseína [11, 12].

Streptococcus thermophilus es una BAL que se utiliza, en combinación con cepas del género *Lactobacillus*, en la elaboración de quesos duros, yogur y quesos blandos. La gran velocidad de acidificación de esta especie se considera una característica excluyente, pero posterga la posibilidad de estudiar otras propiedades fisiológicas que se aplican a la elaboración de productos lácteos. Debido a su particular estructura, la proteinasa de esta especie es poco activa [13], pero presenta una alta actividad de peptidasas intracelulares, especialmente de aminopeptidasas generales [14]. Se ha descrito en esta especie la

presencia de aminopeptidasas adicionales cuando se la compara con las exhibidas por el género *Lactococcus*, característica fisiológica que se comienza a estudiar en profundidad debido a la influencia que ejerce en la elaboración de quesos [15]. Se vincula su alta actividad degradativa de péptidos con la aceleración de la maduración [16, 17], la eliminación de sabores amargos [15] y el aumento de aminoácidos libres que actúan como sustratos para la formación de compuestos que influyen en el *flavor* [18].

En los últimos años se hacen intentos por combinar cepas de *St. thermophilus* con cepas de *Lactococcus* en fermentos que se destinan a la elaboración de quesos Cheddar y semiduros, buscando en estas experiencias complementar las características proteolíticas de ambas especies [16, 18, 19]. No obstante haber logrado resultados alentadores, aún falta resolver algunos problemas derivados de usar una combinación de cepas termófilas y mesófilas como la evolución de las poblaciones parciales durante la maduración, y el destino de la galactosa que se origina por el metabolismo de *St. thermophilus* [16].

En este trabajo se determinaron características bioquímicas y cinéticas de PepN de *St. thermophilus* TW43, cepa seleccionada por la alta actividad enzimática de peptidasas intracelulares exhibida [19]. El conocimiento de las características de esta enzima, particularmente en las condiciones de maduración, tiene por objetivo proveer información sobre una cepa que podría ser utilizada para conformar fermentos con cepas mesófilas en la elaboración de quesos semiduros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo y determinación de la actividad enzimática

La cepa de *St. thermophilus* TW43 utilizada en este estudio pertenece al cepario de bacterias ácido lácticas de la Cátedra de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia). Luego de un período de incubación de 18 hs a 35°C en caldo MRS [20], el medio fue sometido a una centrifugación de 5000 g durante 5 min. Las células obtenidas fueron tratadas con cuentas de vidrio y vórtex durante 10 min, con el objeto de liberar su contenido citoplasmático. Luego de este tratamiento se centrifugaron los extractos celulares a 5000 g durante 5 min, y se determinó la actividad enzimática de los sobrenadantes utilizando leucina-*p*-nitroanilina como sustrato [11].

La mezcla de reacción contenía 100 µl de sustrato (10 mg/ml), 100 µl de sobrenadante y 700 µl de buffer fosfato de Na 0,1 M, pH 6,8. Luego del período de incu-

bación, la reacción se detuvo con 100 μ l de ácido acético. La densidad óptica fue determinada en espectrofotómetro a 405 nm y los cálculos se realizaron utilizando una curva patrón de *p*-nitroanilina [12].

Determinación del pH óptimo

La actividad enzimática de los sobrenadantes fue ensayada desde pH 5,0 hasta 8,6 y se utilizó buffer acetato de Na 0,1M en el rango 5,0-6,4; buffer fosfato de Na 0,1M en el rango 6,8-7,6 y buffer Tris-HCl 0,1M en el rango 7,8-8,6.

Determinación de la temperatura óptima

La actividad enzimática de los sobrenadantes fue ensayada, a pH óptimo, a 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45°C.

Determinación de K_m y Velocidad Máxima (V_{max})

El K_m y la V_{max} se determinaron en las condiciones óptimas de pH y temperatura, utilizando la gráfica de Lineweaver-Burk [21]. Los cálculos de los parámetros cinéticos se realizaron utilizando la ecuación de la recta obtenida en la línea de tendencia. La V_{max} se expresó como la cantidad de μ moles de *p*-nitroanilina producidos por minuto por miligramo de proteína.

Estudios de inhibición

Los sobrenadantes se incubaron durante 10 min a 37°C en presencia de EDTA, *o*-fenantrolina y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) a una concentración final de 1 mM. Luego del período de incubación con los inhibidores, se determinó la actividad enzimática como se describió previamente en un rango de pH 5-8,6.

La influencia de cationes metálicos se estudió bajo las mismas condiciones y a concentraciones finales de 0,1 mM y 1 mM.

El efecto inhibitorio del imidazol se realizó a una concentración de 0,1 M. y la actividad se determinó en el rango de pH 6,4-7,8.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina bovina como estándar [22].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la Figura 1, PepN de *St. thermophilus* TW43 se mantuvo activa dentro del rango de pH 5,0 y 8,6; exhibiendo la máxima actividad a pH 6,8. Este valor revela una leve diferencia con respecto a otros trabajos donde la máxima capacidad catalítica fue deter-

minada a pH 6,5 [23] y 7 [11, 24]. Se observa, en este caso en particular, una marcada reducción de la actividad de la enzima cuando los ensayos se realizan aumentando o disminuyendo levemente el pH óptimo.

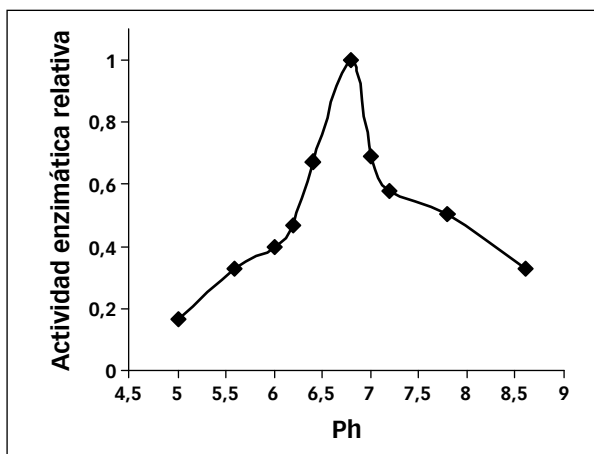


FIGURA 1. Efecto del pH sobre la actividad de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43.

La enzima se mantuvo activa a pH 5, propiedad importante desde el punto de vista biotecnológico ya que esta es una de las condiciones impuestas durante la maduración de quesos. En este proceso, el número de células viables de BAL atrapadas en la masa casearia comienza a declinar y se produce, después de la muerte celular, una autólisis que permite a las peptidasas citoplasmáticas difundir dentro de la estructura del queso y continuar la degradación de los péptidos originados por la acción de las proteinasas [25].

La temperatura óptima de la enzima, determinada a pH 6,8, fue 40°C (Figura 2), este resultado coincidió con lo descrito en trabajos previos [11, 23, 24]. A 15°C, desarrolló una actividad remanente de 16%, lo que significa que PepN puede llevar a cabo su acción degradativa a

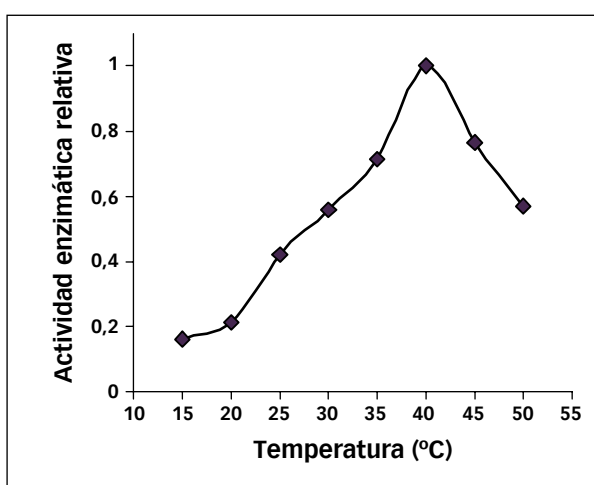


FIGURA 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43.

la temperatura habitualmente seleccionada en la cámara de maduración. La actividad relativa a 50°C superó el 50%, característica significativa teniendo en cuenta que *St. thermophilus* es utilizado en la elaboración de quesos duros; variedad que, luego del desuerado, es sometida a un proceso de cocción a la temperatura citada [26].

Los parámetros cinéticos, determinados a pH y temperatura óptimos, dieron como resultados para K_m y V_{max} valores de 1,49 mM y 1.31 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ respectivamente. El valor de K_m obtenido es comparable con los hallados por otros autores y denota una afinidad más baja por el sustrato utilizado que la manifestada por otros representantes de BAL [12, 19]. Sin embargo la V_{max} bajo las mismas condiciones de ensayo, resultó superior a las determinadas en otras cepas de *St. thermophilus* y especies de BAL [19].

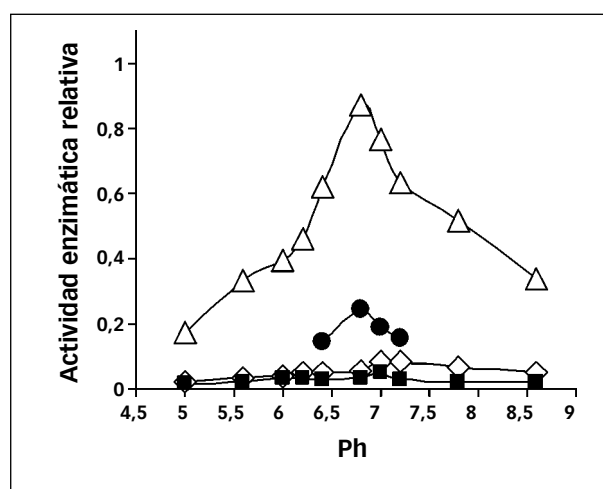


FIGURA 3. Efecto de inhibidores sobre la actividad de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43. Referencias: ■ = EDTA, ● = Imidazol, △ = PMSF, ◇ = o-Fenantrolina.

La actividad enzimática no fue alterada en el rango de pH 5-8,6 cuando los ensayos se realizaron en presencia de PMSF (Figura 3), resultado que indica que no se trata de una serino-proteasa. Por el contrario o-fenantrolina y EDTA, ambos agentes quelantes, inhibieron la capacidad catalítica de la enzima en el rango de pH ensayado y, en consecuencia, PepN puede clasificarse como aminopeptidasa metalodependiente.

También se estudió la influencia de imidazol sobre PepN, a pesar de no ser considerado un inhibidor específico de proteasas o peptidasas. La experiencia se realizó entre pH 6,4-7,2, rango cercano al pKa (6,95) y como se observa en la Figura 3 se produce un descenso significativo de la actividad enzimática. Este fenómeno se debe a que el imidazol se comporta como un análogo de la histidina y, en consecuencia, interfiere en la función de este aminoácido que, como sucede en otras metaloenzimas, está comprometido con la unión de Zn^{++} en el

sitio activo.

La influencia de los cationes divalentes se estudió a concentraciones 0.1 mM y 1 mM, en condiciones óptimas de pH y temperatura. Como se observa en la Tabla 1, el Cu^{++} fue el único catión que exhibió una inhibición parcial de la capacidad catalítica, resultado que coincide con lo expuesto por otros autores, aunque en estos casos el efecto se manifestó en forma más evidente [11, 23, 24]. Los cationes Zn^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} , Mn^{++} y Ca^{++} cuando la experiencia se realizó a 0,1 mM, aumentaron la actividad enzimática de PepN, este fenómeno se repitió, a excepción de Ca^{++} , cuando los ensayos se llevaron a cabo a 1mM.

TABLA N° 1: Efecto de cationes divalentes sobre la actividad de Aminopeptidasa N de *Streptococcus thermophilus* TW43.

Cación	Actividad Relativa (%)	
	0,1 mM	1 mM
Control	100	100
Zn^{++}	143,2	99,7
Co^{++}	472,2	540,1
Mg^{++}	111,5	105,6
Cu^{++}	80,1	79,4
Fe^{++}	126,9	120,1
Mn^{++}	120,2	111,2
Ca^{++}	115,9	83,38

El Co^{++} exhibe resultados contradictorios según los distintos autores; mientras que para Motoshima y col. [23] actúa aumentando levemente la actividad enzimática, para Rul y col. resulta un potente inhibidor [24]. En el caso particular de PepN de *St. thermophilus* TW43, el Co^{++} aumentó la actividad de la enzima aproximadamente 5 veces en las 2 concentraciones ensayadas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que PepN de *St. thermophilus* TW43 se trata de una enzima con características bioquímicas similares a las descritas por otros autores [11, 23, 24]. Sin embargo, su alta actividad enzimática, comparada con la obtenida en otras cepas y especies [19], resulta un rasgo de interés para su aplicación en la elaboración de quesos. Además manifiesta, en las condiciones de maduración (pH 5,0 y 15 °C), una actividad remanente suficiente como para continuar con el proceso degradativo de sustratos específicos e influyendo en la calidad final del producto.

La presencia del ión Co^{++} ejerce una gran influencia en la actividad de la enzima estudiada. La alta afinidad de la proteína por el catión y/o la influencia que este ejerce en el sitio activo sugiere algunos cambios en su secuencia de aminoácidos [23].

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto

PICTR 2002 n° 00063 financiado por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Christensen, J. E.; Dudley, E. G.; Pedersen J. A.; Steele, J. L. 1999. Peptidases and catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 76:217–246.
2. Juillard, V.; Guillot, A.; Le Bars D.; Gripon, J. C. 1998. Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1230–1236.
3. Juillard, V.; Le Bars, D.; Kunji, E. R. S.; Konings, W. N.; Gripon, J. C.; Richard, J. 1995a. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3024–3030.
4. Poolman, B.; Kunji, E. R. S.; Hagting, A.; Juillard, V.; Konings, W. N. 1995. The proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 79:65–75.
5. Pritchard, G. G.; Coolbear, T. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:179–2.
6. Kok, J.; de Vos, W. M. 1994. The proteolytic system of lactic acid bacteria en: Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. M. J. Gasson y W. M. de Vos (ed.), Chapman & Hall, Ltd., London. P. 169–210.
7. Kok, J. 1990. Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87:15–42.
8. Kunji, E. R. S.; Hagting, A.; de Vries, C. J.; Juillard, V.; Haandrikman, A. J.; Poolman, B. 1995. Transport of β -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 270:1569–1574.
9. Kunji, E. R. S.; Smid E. J.; Plapp, R.; Poolman, B.; Konings, W. N. 1993. Di-tripeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175:2052–2059.
11. Chavagnat F.; Casey, M. G.; Meyer J. 1999. Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and overexpression of Aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3001–3007.
12. Niven G.; Holder, S. A.; Stroman, P. 1995. A study of substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Wg2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:100–105.
13. Fernandez-Espla M.; Garault P.; Monnet; V.; Rul, F. 2000. *Streptococcus thermophilus* cell-wall anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4772–4778.
14. Letort C.; Nardi, M.; Garault, P.; Monnet, V.; Juillard, V. 2002. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3162–3165.
15. Rul F.; Monnet, V. 1997. Presence of additional peptidase in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared with *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 82:695:704.
16. Michel V.; Martley, F. 2001. *Streptococcus thermophilus* in Cheddar cheese. Production and fate of galactose. *J. Dairy Res.* 68:317–325.
17. Wilkinson, M. G. 1996. Acceleration of cheese ripening en: Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol. 1, P. F. Fox ed. London. P. 523–555.
18. Gomez, M. J.; Gaya, P.; Nunez, M; Medina, M. 1998. *Streptococcus thermophilus* as adjunct culture for a semi-hard cows' milk cheese. *Lait* 78:501–511.
19. Marguet. E. R. 2004. Actividad enzimática de proteinasas lácticas sobre caseínas ovinas. Tesis doctoral.
20. De Man J.; Rogosa, M; Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Applied Bact.* 23:130–135.
21. Philips, A. T. 1994. Enzymatic activity en *Methods for general and molecular bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg ed. Washington D. C., P.555–605.
22. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
23. Motoshima H.; Shiraishi, T.; Tsukasaki, F.; Kaminogawa, S. 2003. Purification, characterization, and gene cloning of lisyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* YRC001. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(4):772–782.
24. Rul F.; Monnet, V.; Gripon, J. C. 1994. Purification and characterization of a general aminopeptidase (St-PepN) from *Streptococcus*

salivarius ssp. *thermophilus* CNRZ 302. J. Dairy Sci. 77:2880–2889.

25. McSweeney P.; Sousa, J.

2000. Biochemical pathway for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review.

Lait 80:293-324.

26. Battistotti, B.; Corradini, C.

1996. Italian cheese en Cheese: chemistry, physics and microbiology, vol. 2, P. F. Fox ed. London, p. 221-245.