

Katarzyna Skrzypczak^{1*}, Waldemar Gustaw¹, Adam Waśko²

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii

¹ Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów

² Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, ul. Skromna 8, 20-950 Lublin

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Właściwości peptydaz związanych z powierzchnią komórek (CEP) bakterii *Lactobacillus helveticus*. 2.1. Budowa i charakterystyka białek CEP. 2.2. Mechanizm katalitycznego działania CEP's. 2.3. Geny kodujące białka CEP oraz mechanizmy kontrolujące ich biosyntezę. 3. Mechanizm działania systemu proteolitycznego *Lactobacillus helveticus*. 4. Znaczenie i możliwości praktycznego wykorzystania systemu proteolitycznego bakterii *Lactobacillus helveticus*. 5. Podsumowanie

The role and significance of cell – envelope associated proteinases of *Lactobacillus helveticus* bacteria

Abstract: The authors present the current state of knowledge about the proteolytic system of *Lactobacillus helveticus* and compare it with system presents in other lactic acid bacteria (LAB). The proteolytic activity of these bacteria is used in food production, where the degradation of the protein is responsible for flavor, aroma and texture. From all lactic acid bacteria *L. helveticus* have the highest proteolytic activity, which directly involved the cell envelope associated proteinases (CEPs). This also contribute to a formation of bioactive peptides referring to value of health promoting food. *L. helveticus* bacteria seem to be unique in terms of variation of the number of genes CEP proteins of all lactic acid bacteria. This paper review focuses on the genetic basis determining the properties of CEP proteins occurring in *L. helveticus* and possibilities of practical application of these bacterial strains.

1. Introduction. 2. Properties of Cell – Envelope associated Proteinases (CEPs) of *Lactobacillus helveticus*. 2.1. Structure and characterization of CEPs. 2.2. The mechanism of the catalytic activity of CEP's. 2.3. Genes encoding CEPs and their biosynthesis control mechanisms. 3. The mechanism of proteolytic system in *Lactobacillus helveticus*. 4. The importance and possibilities of practical use the proteolytic system of *Lactobacillus helveticus*. 5. Summary

Słowa kluczowe: bakterie mlekowe, *Lactobacillus helveticus*, proteiny związane z powierzchnią komórki (CEPs)

Key words: Lactic Acid Bacteria (LAB), *Lactobacillus helveticus*, Cell – Envelope associated Proteinases (CEPs)

1. Wstęp

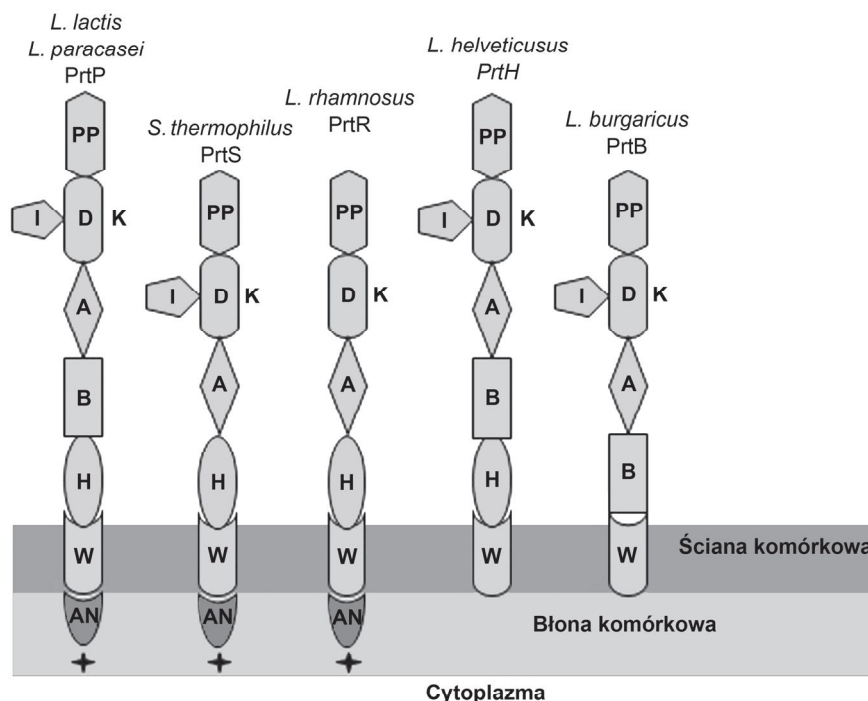
Termofilne bakterie *Lactobacillus helveticus* są Gram-dodatnimi, niesporującymi pałeczkami należącymi do bakterii kwasu mlekowego (Lactic Acid Bacteria-LAB). Te obligatoryjnie homofermentatywne mikroorganizmy są wykorzystywane w przemyśle mleczarskim jako kultury starterowe. Są organizmami auksotroficznymi pozbawionymi zdolności do syntezy większości aminokwasów niezbędnych do wzrostu. Występująca wśród bakterii kwasu mlekowego auksotroficzność dotyczy także zasad purynowych, pirymidynowych oraz witamin. *L. helveticus* do swojego wzrostu wymaga 29 różnych związków organicznych z wymienionych grup [47].

Ze względu na zbyt małą ilość wolnych aminokwasów w mleku, bakterie mlekowe wytworzyły złożony system proteolityczny zdolny do uwalniania tych związków poprzez hydrolizę kazein, albumin czy też globulin [12]. System ten składa się z trzech z podstawowych elementów, w skład których wchodzi proteiny związane z powierzchnią komórki bakteryjnej tzw. białka CEPs (cell envelope associated proteinases). Enzymy te prowa-

dzą hydrolizę kazein do oligopeptydów. Drugim elementem systemu, który pozwala na przyswajanie źródła azotu jest układ transportujący powstałe di- oraz tri peptydy do wnętrza komórki. Mechanizm tego transportu u bakterii *L. helveticus* nie jest jeszcze w pełni poznany. Ostatnim komponentem układu proteolitycznego są wewnątrzkomórkowe peptydazy o zróżnicowanej specyficy substratowej, które przyczyniają się do powstawania wewnątrzkomórkowej puli wolnych aminokwasów [69] (rys. 2 i 3).

Proteiny związane z powierzchnią komórek bakterii rozwijających się w mleku oprócz roli, jaką pełnią w pozyskiwaniu niezbędnych aminokwasów dla wzrostu samych mikroorganizmów, przyczyniają się również do kreowania zapachu, smaku oraz konsystencji mlecznych produktów fermentowanych biorąc udział w procesie proteolizy. Głównymi produktami proteolizy są aminokwasy, alkohole, estry, kwasy, aldehydy, a także związki siarkowe [78]. Ponadto produkty aktywności proteinaz wykazują działanie prozdrowotne. Wpływają na produkcję bioaktywnych peptydów o właściwościach immunomodulujących, hipotensyjnych oraz hamujących aktywność bakterii chorobotwórczych,

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Katedra Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, ul. Skromna 8, 20-950 Lublin; e-mail: k8.skrzypczak@wp.pl



Rys.1. Schematyczne porównanie budowy proteinaz związanych z powierzchnią komórki u różnych bakterii LAB [73]
 PP: preprodomena, DK: domena katalityczna; I: domena insercyjna; A: domena A; B: domena B; H: domena H- helisa (helix domain),
 W: domena W- łącznik; AN: anchor (domena zakotwiczona w błonie). Na podstawie [69] dzięki uprzejmości i za zgodą autorów [73]

zmniejszają także ryzyko wystąpienia raka okrężnicy [21, 72, 81]. Wśród wszystkich bakterii należących do LAB, *L. helveticus* generują peptydy o najwyższej aktywności przeciwnadciśnieniowej [88]. Jednakże proteinazy związane z powierzchnią komórek bakterii *L. helveticus* nie są w pełni poznane i scharakteryzowane. Niniejsza praca koncentruje się na analizie genetycznych podstaw warunkujących właściwości białek CEP występujących u *L. helveticus* oraz możliwościach praktycznego zastosowania szczepów tych bakterii.

2. Właściwości peptydaz związanych z powierzchnią komórek (CEP) bakterii *Lactobacillus helveticus*

Wszystkie zidentyfikowane u *L. helveticus* białka CEP należą do proteinaz serynowych, a ich wielkość mieści się w zakresie 170–180 kDa [66]. Poznane sekwencje aminokwasowe wykazują wysokie podobieństwo tych enzymów do białek powierzchniowych *S. Optimalny dla aktywności CEP zakres temperatury mieści się w granicach 37–45°C, natomiast optymalne wartości pH to 6–7 [56]. Najwyższy poziom aktywności proteolitycznej białek CEP odnotowano w ekspotencjalnej fazie wzrostu bakterii [23] i jest ona znacznie wyższa w przypadku hodowli bakterii inkubowanych w mleku niż na pożywce MRS [77]. Ponadto, zaobserwowano, iż dodatek jonów wapnia do podłoża hodowlanego, w zależności od szczepu bakterii *L. helveticus*, może powodować wzrost lub znaczny spadek aktywności*

enzymatycznej [9, 56] Również miejsce cięcia kazeiny przez proteinazy należące do białek CEP jest wysoce specyficzne dla danego szczepu *L. helveticus* [58].

2.1. Budowa i charakterystyka białek CEP

Proteinazy należące do białek CEPs są zazwyczaj syntetyzowane w cytoplazmie bakterii w postaci długich i nieaktywnych form- pre-pro-proteinaz składających się z około 2000 reszt aminokwasowych tworzących kilka odrębnych domen (Rys. 1) funkcjonalnych [8].

Pre-pro-proteinazy na swym N-końcu łańcucha peptydowego posiadają domenę preproproteinową (PP) zawierającą sekwencję sygnałową (S) zbudowaną z 40 aminokwasów, która jest niezbędna do translokacji białka przez błonę cytoplazmatyczną przy udziale białek grupy Sec. Sekwencja ta rozpoznawana jest przez specyficzne peptydazy związane z błoną komórkową. Efektem enzymatycznej hydrolizy wiązania pomiędzy Ala₂₅ i Glu₂₆ jest powstanie nieaktywnej formy pro-proteinazy PrtH, która ulega dalszym modyfikacjom. Prodomena (PP), pełni rolę białka opiekuńczego (chaperonu) i odgrywa istotną rolę w procesie właściwego fałdowania się białka CEP. Domena ta również podlega procesowi autokatalizy, a miejsce przecięcia wiązania znajduje się między Glu₁₇₆ i Ala₁₇₇ w przypadku PrtH, oraz pomiędzy Ala₁₈₄ i Asn₁₈₅ dla PrtH2. Powyższe modyfikacje prowadzą do powstania aktywnej proteinazy składającej się z 1673 reszt aminokwasowych i wykazującej 45% podobieństwo do białek CEP obecnych u laktokoków [13, 58].

Kolejnym elementem budowy opisywanych białek enzymatycznych jest domena katalityczna (PR) (~500 aminokwasów), która należy do proteaz serynowych i jest najbardziej konserwatywną domeną. Za aktywność opisywanych enzymów odpowiedzialne są aminokwasy: kwas asparaginowy (D), histydyna (H) i seryna (S). W obszarze domeny katalitycznej PrtH została zidentyfikowana dodatkowa sekwencja (Rys. 1) tzw. domena inercyjna (I) (~150 reszt aminokwasowych), której rola nie jest do końca poznana. Przepuszczalnie bierze ona udział w procesie fałdowania oraz ogrywa rolę w kształtowaniu się specyfiki substratowej białek enzymatycznych, domena ta nie występuje w PrtH2 [66].

Nieznana jest także funkcja domeny A (~400 aminokwasów). Domena B (~500 aminokwasów) prawdopodobnie bierze udział w stabilizowaniu domeny katalitycznej oraz bierze udział w procesie autokatalizy, jest obecna u większości CEPs, ale nie występuje w PrtS u *Streptococcus thermophilus*. Wchodząca w skład PrtH domena B ma strukturę β -kartki i jest bogata w tyrozynę (11%) oraz lizynę (12%), w budowie tej domeny nie stwierdzono obecności cysteiny oraz metioniny [73].

Struktura drugorzędowa domeny H jest helisą o długości około 200 aminokwasów i jest ona zaangażowana w utrzymywaniu odpowiedniego ustawienia domen A oraz B poza ścianą komórki. Obecność tej domeny stwierdzono jedynie w budowie PrtP (210 reszt aminokwasowych), PrtS (367 aminokwasów) oraz PrtH (72 aminokwasy) (Rys.1). Skład aminokwasowy domeny H stanowią odpowiednio: lizyna (22%), alanina (21%), kwas asparaginowy (17%) oraz leucyna (13%) [73].

Hydrofobowa domena W (~100 aminokwasów) pełni funkcję łącznika kompleksu wszystkich opisanych domen ze ścianą komórki [8]. Interesujące jest 32% podobieństwo składu aminokwasowego C-końcowego fragmentu PrtH (aminokwasy 1538–1639) do C-końcowego fragmentu białka powierzchniowego S bakterii *Lactobacillus acidophilus* [58].

Mechanizm odpowiadający za zakotwiczenie białka CEP w błonie komórkowej *Lactobacillus helveticus* znacząco różni się od tego, jaki powszechnie występuje wśród bakterii LAB. Na C-końcu PrtH oraz PrtH2 nie zidentyfikowano obecności typowej dla białek CEP sekwencji sygnałowej (motyw LPxTG) odpowiedzialnej za kotwiczenie kompleksu domen [13].

Elementem różnicującym budowę białek CEP u poszczególnych bakterii jest domena zakotwiczona w błonie komórkowej (AN) zlokalizowana bezpośrednio za domeną W (Rys. 1). Jest ona fragmentem wchodzącym w skład PrtP oraz PrtS [51, 69].

Proteinazy związane z powierzchnią komórek bakterii *L. helveticus* oraz *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (PrtH, PrtB) nie posiadają domeny kotwiczącej w błonie, są związane ze ścianą komórkową jedynie za pomocą domeny W [58, 69, 73].

Leenhouts przedstawił dwa różne mechanizmy kotwiczenia białek CEP do powierzchni komórek bakterii mlekowych. Pierwszym sposobem przyłączenia białek CEP do bakteryjnej komórki jest wiązanie kowalencyjne pomiędzy motywem LPxTG białka CEP i peptydowymi wiązaniami peptydoglikanu ściany komórki. Drugą możliwością jest elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy dodatnio naładowanym C-końcem białka CEP i ujemnie naładowanymi resztami kwasów techojowych, bakteryjnej ściany komórkowej [38]. PrtH jest prawdopodobnie przymocowane do ściany komórkowej za pomocą podobnego mechanizmu, jaki bierze udział w przytwierdzeniu do powierzchni komórki białek powierzchniowych S (S-layer protein) [38, 58, 69]. Sugeruje się również, iż białka CEP są połączone z komórką bakterii poprzez oddziaływania sił elektrostatycznych [58, 70].

Białka CEP wykazują różną specyfikę substratową w stosunku do kazeiny – białka najobficiej występującego w mleku. Jest to kryterium podziału białek CEP na kilka typów enzymów. Typ P_I – w pierwszej kolejności rozkłada enzymatycznie β -kazeinę, hydrolizując ją na ponad 100 różnych związków (oligo- i polipeptydów) zawierających od 4 do 30 reszt aminokwasowych, enzym ten zdecydowanie słabiej hydrolizuje κ -kazeinę. Typ P_{III} hydrolizuje zarówno α_{s1} -, α_{s2} -, β - jak i κ -kazeinę. Występujące u rodzaju *Lactobacillus* białka CEP zaliczane są zarówno do typu P_I , P_{III} jak i pośredniego P_I/P_{III} [8].

2.2. Mechanizm katalitycznego działania CEP's

Miejsce działania białek CEP jest uzależnione od postaci oraz facji białka mleka (α_{s1} -, α_{s2} -, β - lub κ -kazeiny). Ostatnie badania dowiodły, iż zarówno aktywność proteolityczna jak i swoistość względem kazeiny w czystej postaci oraz miceli kazeinowych w mleku jest odmienna u różnych szczepów *L. helveticus*. Mimo dużej, szczepowej specyfiki cięcia kazeiny potwierdzono obecność dwóch specyficznych miejsc działania enzymu: Phe₁₉₀-Leu₁₉₁ oraz Glu₁₇₅-Lys₁₇₆ dla czterech z piętnastu przebadanych szczepów *L. helveticus* [66].

Frakcja α_{s1} -, jest szybciej hydrolizowana w porównaniu do frakcji β -kazeiny. Kinetyka procesu hydrolizy α_{s1} -kazeiny była znacznie większa w przypadku szczepów posiadających dwa białka enzymatyczne należące do CEPs w porównaniu do bakterii posiadających jeden typ proteaz serynowych związanych z powierzchnią własnej komórki. W wyniku enzymatycznej hydrolizy α_{s1} -kazeiny zidentyfikowano od 54 do 74 peptydów przy czym, 22–30% stanowiły peptydy uwolnione przy udziale jedynie PrtH2 podczas gdy 41–49% stanowiły peptydy powstałe w wyniku enzymatycznej aktywności PrtH oraz PrtH2. Długość powstałych peptydów mieściła się w zakresie 6–33 reszt aminokwasowych. Zidentyfikowano również regiony odporne na proteolityczne

działanie białek CEPs zarówno w β - jak i α_{s1} -kazeini [26, 66]. Wzór hydrolitycznej degradacji α_{s1} -kazeiny przez białka CEP *L. helveticus* jest zróżnicowany. Jedynie Ile₆, -Lys₇, Gln₉, -Gly₁₀ oraz Leu₁₄₂, -Ala₁₄₃ są wspólnymi dla większości bakterii *L. helveticus* miejscami enzymatycznego działania proteinaz należących do grupy PrtH. Pozostałe miejsca hydrolitycznego rozpadu α_{s1} -kazeiny są ściśle uzależnione od szczepu [22, 23, 66].

Fragment 1–23 α_{s1} -kazeiny jest głównym substratem hydrolizy α_{s1} -kazeiny przy udziale PrtH *L. helveticus*. W ośmiu badanych szczepach *L. helveticus* zaobserwowano cztery różne wzory trawienia α_{s1} -kazeiny [53]. Hydroliza α_{s1} -kazeiny zachodzi głównie na N-końcu łańcucha peptydowego, pomiędzy pierwszym a czterdziestym aminokwasem oraz we fragmencie znajdującym się pomiędzy 80 i 150 resztą aminokwasową [66]. Degradacja enzymatyczna zachodzi również na C-końcu łańcucha, jednak w znacznie mniejszym stopniu i odnosi się ona do fragmentu sekwencji α_{s1} -kazeiny znajdującego się pomiędzy 170, a 199 aminokwasem. Bakterie *L. helveticus* w zależności od posiadanych typów CEP wykazują odmienne profile produktów powstałych po hydrolizie α_{s1} -kazeiny: PrtH jest odpowiedzialny za uwolnienie fragmentów α_{s1} -CN(1–16), α_{s1} -CN(17–23), α_{s1} -CN(1–17) oraz α_{s1} -CN(18–23), natomiast miejsca specyficznego cięcia PrtH2 dotyczą α_{s1} -CN(1–9), α_{s1} -CN(10–23), α_{s1} -CN(1–16) i α_{s1} -CN(9–23) [58].

Niektóre specyficzne miejsca hydrolitycznego działania białek CEP na α_{s1} -kazeinę są wspólne dla większości szczepów np., Met₄, -Glu₅, Glu₅-His₆, Lys₂₄, -Asn₂₅. Pozostałe regiony są najprawdopodobniej niedostępne dla proteinaz CEP [66].

Fracja κ -kazeiny nie jest hydrolizowana przez CEP należące do *Lb. helveticus*, lub jest ona degradowana jedynie w niewielkim stopniu [22, 70].

2.3. Geny kodujące białka CEP oraz mechanizmy kontrolujące ich biosyntezę

Wiele bakterii kwasu mlekowego posiada unikalne i charakterystyczne dla siebie proteinazy związane z powierzchnią własnej komórki. Wśród białek CEP najlepiej poznane i opisane na poziomach genetycznym i biochemicznym są: PrtP zidentyfikowane u szczepów *Lactococcus lactis* [29,31], PrtS występujące u *Streptococcus thermophilus* [8], PrtB u *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [14] oraz PrtR u *L. rhamnosus* [56, 86]. Bakterie należące do grupy LAB zazwyczaj posiadają tylko jeden typ CEP, jednak u *L. bulgaricus* oraz *L. helveticus* odnotowano obecność dwóch różnych proteinaz związanych z powierzchnią komórki bakterii [58, 80].

W szczepie *L. helveticus* CNRZ32 proteazy PrtH i PrtH2 związane z powierzchnią komórki (kodowane przez geny *prtH* i *prtH2*) przyczyniają się do wysokiej aktywności proteolitycznej tych bakterii [14, 77]. Częś-

ciowe zsekwencjonowanie produktów reakcji PCR ujawniło istnienie różnych alleli zarówno dla genu *prtH2* jak i *prtH*. Pomimo podobnej masy cząsteczkowej białka PrtH i PrtH2, pod względem sekwencji aminokwasowych są jedynie w 22% podobne do siebie [13].

Przeprowadzone ostatnio badania molekularne tego szczepu doprowadziły do wyodrębnienia dodatkowych genów *prtH3* i *prtH4* również kodujących białka CEP [4, 26]. Jednak ich dokładna budowa oraz specyfika działania nie są w pełni poznane i wymagają dalszych analiz.

Wśród szczepów należących do *L. helveticus* stwierdzono możliwość występowania różnych kombinacji genów kodujących CEP: *prtH2/prtH3*, *prtH3/prtH4* lub *prtH/prtH2/prtH3/prtH4*. Najnowsze badania wskazały, iż taka różnorodność zestawień omawianych genów może prowadzić do odmiennych poziomów aktywności białek CEP u poszczególnych szczepów. Niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu określenia procentowego udziału czterech różnych białek CEP u *L. helveticus* i zbadanie ich wzajemnego oddziaływania na poziomie aktywności enzymatycznej oraz specyfiki substratowej [66].

Bakterie *L. helveticus* wydają się być wyjątkowymi pod względem zmienności liczby genów białek CEP wśród wszystkich bakterii kwasu mlekowego [56, 57].

U bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, gen *prtP* poprzedzony jest transkrypcją genu lipoproteiny (*prtM*) związanej z błoną komórkową (PrtM), niezbędnej do autokatalitycznego dojrzewania PrtP [20]. Zarówno gen *prtP* jak i *prtM* *L. lactis* są zlokalizowane na plazmidzie natomiast u termofilnych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* geny kodujące białka CEP znajdują się na chromosomie bakteryjnym [39, 58]. W genie *prtH* bakterii *L. helveticus* ROSELL 5089 stwierdzono obecność mobilnych elementów ILS2 [8].

Regulacja procesu biosyntezy białek CEP u LAB odbywa się na poziomie transkrypcji. W procesie kontrolującym powstawanie proteinaz związanych z powierzchnią komórek bakterii, główną rolę odgrywa represor CodY (Rys. 2), jest on również zaangażowany w kontrolę biosyntezy wielu innych białek. W odpowiedzi na wysoką zawartość wewnątrzkomórkowych aminokwasów (leucyny, izoleucyny i waliny) CodY przyłącza się do odpowiedniego miejsca na łańcuchu DNA, do sekwencji AATTTTCWGAAAATT (tzw. CodY-box) [19, 24, 59]. Miejsce to zlokalizowane jest w regionie promotorowym genów proteolitycznych lub bezpośrednio przed nim. Przyłączenie represora prowadzi do zahamowania ekspresji białek, tym samym uniemożliwiając uwalnianie aminokwasów na drodze enzymatycznej degradacji kazeiny. Jednakże, w przypadku bakterii *L. helveticus* nie stwierdzono obecności genu represora CodY ani żadnego genu homologicznego do *codY*, nie zidentyfikowano także sekwencji odpowiadającej CodY-box. W dalszym ciągu nieznane są mechanizmy odpowia-

dające za kontrolę i regulację proteolizy u *L. helveticus* i innych bakterii z tego rodzaju [3].

W innych badaniach wykazano, iż w podłożu hodowlanym bogatym w peptydy obniża się znacznie poziom biosyntezy białek CEP, co stało się podstawą do powstania hipotezy występowania peptydo-zależnego mechanizmu kontroli ekspresji genów *prtH* odbywającego się na poziomie transkrypcyjnym [22].

3. Mechanizm działania systemu proteolitycznego *Lactobacillus helveticus*

Oligopeptydy będące produktem reakcji hydrolizy kazeiny są transportowane do wnętrza komórki bakterii *L. helveticus*. Transfer ten odbywa się przy udziale białka transportowego (DtpT), podobnego do DtpT obecnego u *Lactococcus lactis* [48]. Gen kodujący to białko (*dtpT*) znajduje się w sąsiedztwie genu *pepN* kodującego aminopeptydazę N. Zaobserwowano, iż ekspresja *dtpT* nasila się podczas hodowli drobnoustrojów w pożywce bogatej w peptydy (MRS), zjawisko to nie występuje podczas inkubacji w mleku. DtpT (Rys. 2 i 3) jest proteiną transmembranową z C- i N- końcem zakotwiczonym w cytoplazmie komórki. Transporter ten należy do rodziny PTR i napędzany jest siłą protonomotoryczną [77].

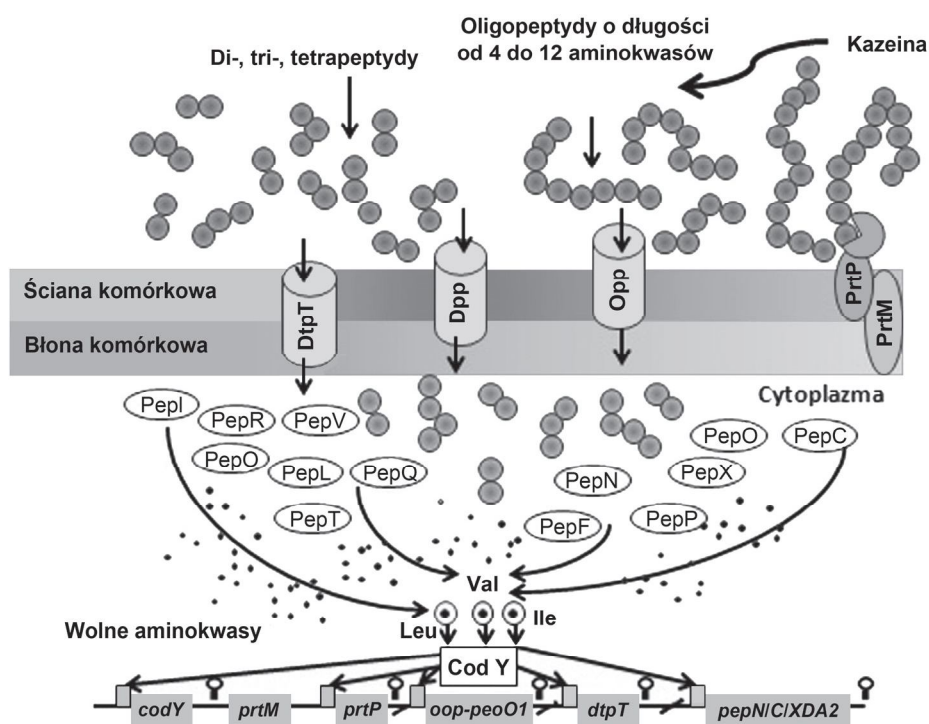
Dokładny mechanizm transportu dużych peptydów generowanych przez CEP *L. helveticus* jest nadal nieznanymi i większość informacji opiera się na mechanizmie analogicznym systemie występującym u *L. lactis*, u których

oligopeptydy (o długości od 4 do 18 aminokwasów) oraz peptydy niskocząsteczkowe wnikają do wnętrza komórek za pośrednictwem systemu transportu aminokwasów, di- i tri-peptydów oraz oligopeptydów (Opp) [46].

Opp składa się z kompleksu pięciu podjednostek białkowych, w skład którego wchodzi: OppA- lipoproteina zbudowana z 35 reszt aminokwasowych, zlokalizowana na ścianie komórkowej i zakotwiczona w błonie komórkowej lipidowym N-końcem- jest odpowiedzialna za przyłączanie substratu [7], dwa integralne białka błonowe (OppB i OppC) oraz dwa białka związane z błoną cytoplazmatyczną zdolne do wiązania z ATP (OppD i OppF). U *L. lactis* geny kodujące ten 5-białkowy kompleks są zlokalizowane w dwóch następujących po sobie operonach *oppDFBC* i *oppA*. Analiza mikromacierzy *L. helveticus* CNRZ 32 wykazała, że ekspresja genów *opp* (tak jak *prtH* i *prtH2*) była wyższa w przypadku hodowli bakterii w mleku, co sugeruje że u *L. helveticus* w transport oligopeptydów zaangażowany jest, opisany u *L. lactis* transporter oligopeptydowy Opp [77].

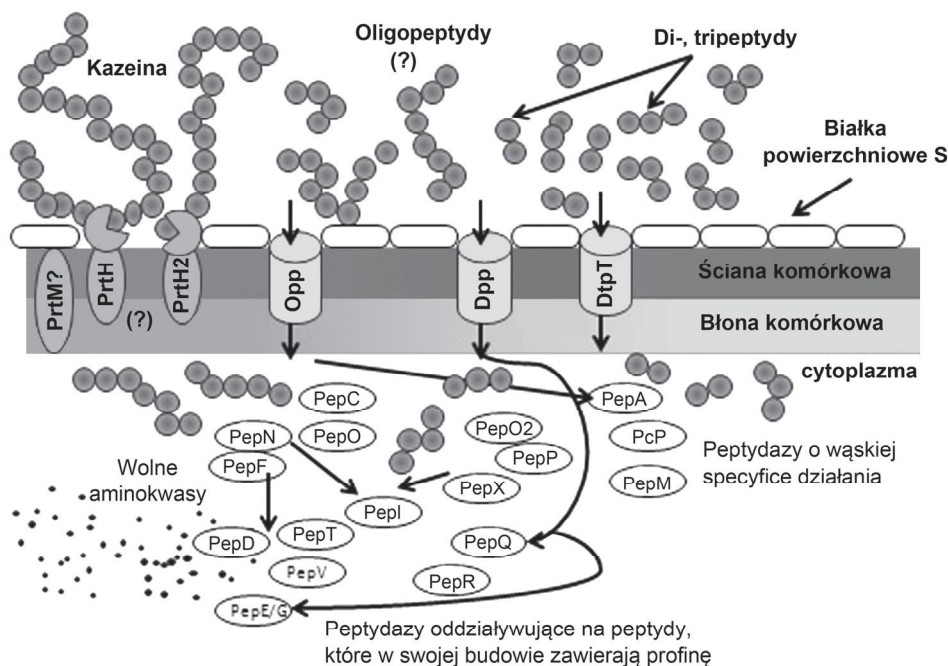
Opp to transporter ABC (ATP-Binding Cassette Transporters) posiadający kasetę wiążącą ATP, a uwalniana w wyniku hydrolizy ATP energia jest wykorzystywana do przemieszczenia oligopeptydów do cytoplazmy komórki [7].

Przypuszcza się iż w transport produktów hydrolytycznego rozkładu kazeiny do wnętrza komórki może być także zaangażowany drugi transporter ABC (Opt). Został on uprzednio zidentyfikowany u *Lactococcus lactis* MG1363 i opisany jako Dpp. Obecność kodonu



Rys. 2. Schemat systemu proteolitycznego oraz regulacji ekspresji genów występujące u bakterii *Lactococcus lactis*.

Na podstawie [66] dzięki uprzejmości i za zgodą wydawnictwa Elsevier [69], dzięki uprzejmości i za zgodą autorów



Rys. 3. Schematyczny systemu proteolitycznego występującego u *L. helveticus*, na podstawie systemu proteolitycznego obecnego u dotychczas poznanych bakterii mlekowych. Sposób wiązania się białek PrtH do powierzchni komórek bakterii i, obecność białka PrtM jak i wielkość transportowanych przez błonę oligopeptydów w dalszym ciągu pozostają niewyjaśnionymi kwestiami u bakterii *L. helveticus*.

Na podstawie [66] za zgodą wydawnictwa Elsevier [69], dzięki uprzejmości i za zgodą autorów]

stop w genie *dppP* ogranicza specyficzność substratową Dpp do di- i tripeptydów. Transporter ten składa się z dwóch białek wiążących oligopeptydy (OptA i OptS), jednak tylko OptA uczestniczy w transporcie pozakomórkowych oligopeptydów [36]. Przypuszczenie Opt występuje także u *L. helveticus* [39].

Najprawdopodobniej obecność dwóch systemów wychwytu oligopeptydów może zwiększyć wydajność transportu, a w konsekwencji zwiększyć możliwość przyswajania produktów rozpadu kazeiny przez bakterie, co z kolei sprzyja ich rozwojowi w mleku [66].

Obecne w cytoplazmie wewnątrzkomórkowe peptydazy (Rys. 3): tripeptydazy (PepT), dipeptydazy (PepV, PepD, PepDA), peptydazy prolinowe (PepX, PepI, PepR, PepQ, PepP), aminopeptydazy (PepN, PepC, PepA, PepS, PepL, PCP) endopeptydazy (PepO, PepF) rozkładają pobrane peptydy do wolnych aminokwasów. Mogą one ulegać dalszym przemianom biochemicznym m.in. reakcjom dehydrogenacji, redukcji, transaminacji, czy dekarboksylacji z jednoczesnym wytworzeniem takich produktów jak: kwasy tłuszczowe, aldehydy, ketony, laktony, estry, alkohole i innych związków [44].

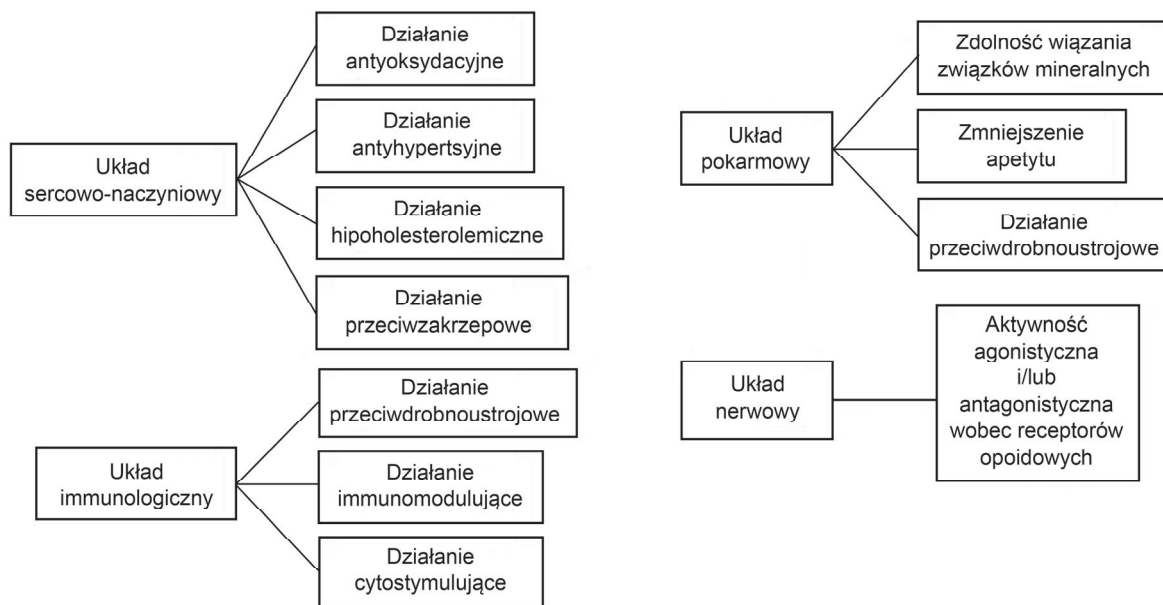
4. Znaczenie i możliwości praktycznego wykorzystania systemu proteolitycznego bakterii *Lactobacillus helveticus*

Obecnie co raz częściej bakterie *L. helveticus* są stosowane w produkcji wyrobów mleczarskich jako kultury starterowe, głównie dzięki wysokiej tolerancji na niskie

pH oraz szybkość z jaką ukwaszają mleko. Są w stanie obniżyć wartość pH mleka do 3,5 podczas gdy *Lactococcus lactis* i *S. thermophilus* hamują swój rozwój i zdolność do jego zakwaszania przy pH 4,3 [52].

Procesy proteolityczne mają szczególne znaczenie w technologii produkcyjnej żywności, są kluczowym etapem zachodzącym podczas dojrzewania serów, wpływają na teksturę oraz smak [78]. Rodzime proteiny mleka np. plazmina (E.C.3.4.21.7) oraz enzymy koagulujące np. podpuszczka, chymozyna (rennina, E.C. 3.4.23.4) dodawane podczas procesu technologicznego wstępnie hydrolizują cząsteczki kazeiny. Jednakże to właśnie proteiny CEP są uważane za główny czynnik odpowiedzialny za zachodzące podczas dojrzewania sera procesy proteolityczne [46].

Spośród wszystkich bakterii kwasu mlekowego *L. helveticus* charakteryzują się najwyższą aktywnością proteolityczną [68]. Ponadto, duża zdolność tych bakterii do proteolizy białek mleka przyspiesza proces dojrzewania sera [6, 40]. *L. helveticus* jest często stosowany w połączeniu z *Lactococcus lactis* oraz *L. paracasei*. Obecność w składzie zakwasu serowarskiego *L. helveticus* w produkcji serów typu szwajcarskiego, czy też Mozzarella wpływa na ich właściwości technologiczne, takie jak rozciągliwość i topliwość. Rozciągliwość pod koniec dojrzewania serów typu szwajcarskiego w rzeczywistości jest 2,5 razy większa w przypadku produktów wytwarzanych z udziałem *L. helveticus* niż z *L. delbrueckii* subsp. *lactis* [61]. Jest to związane z aktywnością i specyfiką białek CEP oraz innych bakteryjnych pep-



Rys. 4. Prozdrowotne efekty biopeptydów uwalnianych z białek mleka na drodze bakteryjnej proteolizy. Na podstawie [45].

tydaz wpływających na powstawanie peptydów o zróżnicowanych właściwościach [23, 54, 66].

Degradacja kazeiny przez peptydazy, jest źródłem powstawania składników wpływających na rozwój smaku, aromatu oraz tekstury produktu. W wyniku omawianego procesu enzymatycznego zostają uwolnione aminokwasy, aldehydy, kwasy, alkohole, substancje lotne, estry i inne składniki odpowiadające za cechy sensoryczne wyrobu. Na charakterystykę zachodzących procesów wpływa aktywność enzymatyczna i specyficzność substratowa enzymów proteolitycznych poszczególnych szczepów bakteryjnych [9]. Efektem hydrolitycznego rozkładu kazeiny jest także uwolnienie i nagromadzenie hydrofobowych peptydów bogatych w prolinę, odpowiadających za powstawanie niepożądanego gorzkiego smaku [79]. Ze względu na wysoką aktywność proteolityczną, szczepy *L. helveticus* mogą hydrolizować hydrofobowe peptydy takie jak peptyd β -CN (193–209) i w znacznym stopniu zredukować gorzki smak sera [66]. Dotyczy to zastosowania kultur starterowych zawierających zarówno żywe jak i atenuowane bakterie *L. helveticus* [30].

Eksperymenty *in vitro* wykazały, że mniejsza ilość gorzkich peptydów generowana jest podczas hydrolizy kazeiny przez szczepy posiadające proteinazy typu P_{III} , czyli większość szczepów *L. helveticus*. Proteinazy typu P_{III} początkowo rozszczepiają duże fragmenty kazeiny od C-końca w przeciwieństwie do proteinaz typu P_I , których aktywność i specyfika enzymatyczna bezpośrednio prowadzą do powstawania bardzo krótkich, gorzkich peptydów [84].

Bakteryjna proteoliza generuje również zestaw peptydów związanych z efektem prozdrowotnym. Łańcuchy oligopeptydowe powstałe dzięki aktywności

proteolitycznej enzymów związanych z powierzchnią komórek bakterii są źródłem bioaktywnych peptydów powstających przy udziale wewnątrzkomórkowych peptydaz bakterii kwasu mlekowego. Peptydy bioaktywne wywołują m.in. efekty: hipoholesterolemiczny, antyoksydacyjny, przeciwzakrzepowy, immunomodulacyjny, antagonistyczny względem opioidów (Rys. 4), oraz efekt antibakteryjny [17, 21, 28, 32, 33, 42]. W przetwórstwie żywności, oprócz bezpieczeństwa zdrowotnego, niezwykle istotne jest posiadanie aktywności antagonistycznej wobec bakterii gnilnych i chorobotwórczych. Bakterie z gatunku *Lactobacillus rhamnosus* hamują wzrost *Micrococcus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* i *E. coli* [60]. U tych bakterii PrtR generuje oligopeptydy, z których w wyniku enzymatycznej aktywności wewnątrzkomórkowych peptydaz uwalniane są peptydy o właściwościach prozdrowotnych [64].

Bioaktywne peptydy zostały również zidentyfikowane w mleku fermentowanym przez *L. helveticus* pozytywny efekt zdrowotny tych specyficznych fragmentów białkowych zależy od ich składu i sekwencji aminokwasowej. Rozmiar bioaktywnych sekwencji jest zróżnicowany i może wynosić od dwóch do dwudziestu aminokwasów. Część peptydów wykazuje wielofunkcyjne właściwości [42, 71, 72, 75].

Najskuteczniejszym sposobem na zwiększenie zawartości bioaktywnych peptydów w fermentowanych produktach mlecznych (Tab.I) jest fermentowanie lub współfermentowanie produktu z zastosowaniem wysoko proteolitycznych szczepów LAB. Wybór szczepu ma istotne znaczenie dla skuteczności uwalniania tych krótkich łańcuchów peptydowych. Jeżeli zastosowany szczep posiada zbyt wysoką aktywność proteolityczną, wówczas następuje enzymatyczna hydroliza peptydów

Tabela I

Bioaktywne peptydy zidentyfikowane w fermentowanych produktach mlecznych (na podstawie [34] za zgodą wydawnictwa Elsevier)

Produkt	Przykład zidentyfikowanego bioaktywnego peptydu	Bioaktywne działanie	Piśmiennictwo
Typ sera Parmigiano-Reggiano	β -cn f(8-16), β -cn f(58-77), α_{s2} -cnf(83-33)	Powstawanie fosfopeptydów	[1]
Cheddar	Fragmety α_{s1} i β -cn	Powstawanie fosfopeptydów	[74]
Mozzarella	β -cn f(58-72)	inhibitor ACE	[76]
Crescenza, Italic, Gorgonzola, Gouda	α_{s1} -cn f(1-9), β -cn f(60-68)	inhibitor ACE	[67]
Festivo	α_{s1} -cn f(1-9), α_{s1} -f(1-7), α_{s1} -f(1-6)	inhibitor ACE	[65]
Emmental	Fragmety α_{s1} i β -cn	Powstawanie fosfopeptydów, immunomodulujące, przeciwdrobnoustrojowe	[11]
Manchego	Fragmety owczej α_{s1} i β -cn	inhibitor ACE	[18]
Mleko fermentowane Zsiadłe mleko	β -cn f(74-76), β -cn f(84-86), κ -cn f(108-111)	antyhypertensyjne	[49]
Dahi	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	inhibitor ACE	[2]

Legenda: α_{s1} -cn: α_{s1} -kazeina, α_{s2} -cn: α_{s2} -kazeina, β -cn: β -kazeina, κ -cn: κ -kazeina

Tabela II

Przykłady bioaktywnych peptydów uwalnianych z białek mleka przez różne mikroorganizmy i ich enzymy (na podstawie [34] za zgodą wydawnictwa Elsevier)

Mikroorganizm	Białko prekursorowe	Sekwencja peptydu	Działanie bioaktywne	Piśmiennictwo
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	β -cn κ -cn	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	inhibitor ACE antyhypertensyjne	[49, 50]
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	β -cn	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly Pro-Ile	inhibitor ACE	[2]
<i>Streptococcus thermophilus</i> + <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	β -cn	Ser-Lys-Val-Tyr-Pro	inhibitor ACE	[2]
<i>L. helveticus</i> ICM 1004 Ekstrakt komórkowy	Hydrolizat odtłuszczonego mleka	Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro	inhibitor ACE	[56]
enzymy <i>Lactobacillus GG</i> + trypsyna i pepsyna	α_{s1} -cn β -cn	Tyr-Pro-Phe-Pro, Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg, Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp	inhibitor ACE immuno stymulujące anagoni styczna wobec receptorów opioidowych	[64]
Proteinaza <i>L. helveticus</i> CP90	β -cn	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-(Glu)	inhibitor ACE	[41]
<i>L. helveticus</i> CPN 4	białka serwatkowe	Tyr-Pro	inhibitor ACE	[89]
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> IFO13953	κ -cn	Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu- -Ser-Phe-Met	Antyoksydacyjne	[35]
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SS1 <i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FT4	β -cn κ -cn	Wiele fragmentów	inhibitor ACE	[17]

bioaktywnych. Z tego też powodu, kluczowym elementem pozwalającym uzyskać wysokie stężenia peptydów bioaktywnych jest i dobór szczepu o znanej aktywności i specyfice enzymatycznej, posiadającego odpowiednie właściwości proteolityczne (Tab. II).

Większość badań koncentruje się na przeciwnadciśnieniowym wpływie peptydów wytwarzanych przez szczep *L. helveticus* [10, 27]. Wykazano, iż spożywanie mleka fermentowanego przez *L. helveticus* wpływało na

obniżenie ciśnienia krwi u pacjentów z nadciśnieniem [71, 72]. Powyższy efekt był wynikiem obecności inhibitorów konwertazy angiotensyny (*Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, ACEI*) pochodzących głównie z β -kazeiny (Rys.5) [10, 63]. Wśród nich peptydy, Val-Pro-Pro (VPP) i Ile-Pro-Pro (IPP) wykazują najwyższe właściwości antyhypertensyjne [49, 50], a ich obecność zidentyfikowano w mleku fermentowanym przez szczep *L. helveticus* i *Saccharomyces cerevisiae* (Tab. II).

Działanie peptydaz jest uzależnione w dużej mierze od warunków wzrostu bakterii, co pozwala do pewnego stopnia na kontrolowanie powstawania bioaktywnych peptydów. W zależności od użytego szczepu jak również temperatury, pH stężenia soli oraz rodzaju i dostępności źródła węgla i azotu w podłożu hodowlanym można uzyskać różne produkty procesu hydrolyzy białka [87].

Stężenie inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE-inhibitors) w produkcie zależy od równowagi pomiędzy szybkością powstawania tych peptydów, a procesami ich enzymatycznej inaktywacji, co z kolei jest uzależnione od bakteryjnych systemów proteolitycznych oraz czasu i warunków podczas dojrzewania sera [34]. Stężenie bioaktywnych peptydów w serze wzrasta podczas jego dojrzewania, ale zaczyna spadać, gdy zachodzące procesy proteolityczne przekroczą pewien poziom. Aktywność biopeptydów (inhibitorów ACE) jest zdecydowanie mniejsza w produktach o niskim stopniu proteolizy np. twaróg, jogurt czy też świeży ser (Tab. I). Zauważono, iż omawiane peptydy pojawiają się stopniowo podczas dojrzewania sera, a ich stężenie w serze typu Gouda jest najwyższe w 13 tygodniu dojrzewania, po czym powoli maleje [65].

Bioaktywne peptydy mogą powstawać także w przewodzie pokarmowym po spożyciu sera. Wyniki badań sugerują, iż generacja inhibitorów ACE podczas trawienia w przewodzie pokarmowym zależy od masy cząsteczkowej peptydów prekursorowych obecnych w spożywanym serze [25].

Przy doustnym podawaniu mleka fermentowanego przez szczep *L. helveticus* R385 stwierdzono wystąpienie innych korzystnych właściwości w tym np. stymulację układu odpornościowego, poprzez zwiększenie liczby przeciwciał IgA oraz limfocytów B w jelicie cienkim [37, 82]. Szczepy *L. helveticus* hamowały również wzrost włóknia mięsaka u myszy (wzrost liczby komórek apoptotycznych w obwodzie guzu) i rozwój *Salmonella enterica* Typhimurium [66]. Hydrolizaty białek mleka oraz serwatki pochodzące z proteolitycznego rozkładu kazeiny poprawiały funkcjonowanie układu odpornościowego poprzez zwiększenie proliferacji limfocytów oraz przeciwciał, jak również syntezę cytokin [15]. Szczególnie interesujące są peptydy uwalniane podczas fermentacji mleka w obecności bakterii kwasu mlekowego, które regulują wytwarzanie cytokin i stymulują aktywność fagocytarną makrofagów [45].

Większość zidentyfikowanych peptydów bioaktywnych, będących produktem proteolizy α_1 -kazeiny przy udziale bakterii LAB, ma zdolność do hamowania peroksydacji lipidów [62].

Jednakże, zarówno peptydy biorące udział w tych działaniach, jak i wszystkie enzymy proteolityczne uczestniczące w ich produkcji w większości nie są zidentyfikowane i w pełni poznane [66, 83].

5. Podsumowanie

Spośród wszystkich bakterii kwasu mlekowego, *Lactobacillus helveticus* charakteryzuje się najwyższą aktywnością proteolityczną, która jest związana z występowaniem wyspecjalizowanego systemu proteolitycznego. Jego zasadniczym elementem są proteiny związane z powierzchnią komórki (CEP). Szczepy bakterii tego gatunku wydają się być wyjątkowymi pod względem zmienności liczby genów białek CEP wśród wszystkich bakterii kwasu mlekowego. Ze względu na wysoką aktywność proteolityczną oraz unikalne właściwości, szczepy *L. helveticus* znajdują zastosowanie w przemyśle mleczarskim. Procesy proteolityczne prowadzone przez te bakterie mają szczególne znaczenie w technologii produkcji żywności, w znacznym stopniu kształtują smak aromat oraz teksturę produktów mlecznych. Ponadto, bakterie *L. helveticus* przyczyniają się do powstawania bioaktywnych peptydów nadających żywności walory prozdrowotne. Regulacja procesu biosyntezy białek CEP bakterii *L. helveticus* jak również dokładna charakterystyka tych enzymów wciąż stanowi przestrzeń do dalszych badań i analiz.

6. Piśmiennictwo

1. Addeo F., Chianes L., Salzano A., Sacchi R., Cappuccio V., Ferranti P., Malorni A.: Characterization of the 12% trichloroacetic acid insoluble oligopeptides of Parmigiano Reggiano cheese. *J. Dairy Res.* **59**, 401–411 (1992)
2. Ashar M. N., Chand R.: Fermented milk containing ACE inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects. *Milchwissenschaft*, **59**, 363–366 (2004)
3. Azcarate-Peril M. A., Mc Auliffe O., Altermann E., Lick S., Russell W.M., Klaenhammer T. R.: Microarray analysis of a two-component regulatory system involved in acid resistance and proteolytic activity in *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5794–5804 (2005)
4. Broadbent J. R., Altermann E. i wsp.: Comparative genome analysis of the obligately homofermentative lactic acid bacterium *Lactobacillus helveticus*. 9th Int. Symp. Lactic Acid Bacteria. The Netherlands. Poster A 063. (2008)
5. Christensen J.E., Steele J.L.: Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. Bacteriol.* **185**, 3297–3306 (2003)
6. Courtin P., Nardi M., Wegmann U., Joutsjoki V., Ogier J.C., Gripon J.C., Palva A., Henrich B., Monnet V.: Accelerating cheese proteolysis by enriching *Lactobacillus lactis* proteolytic system with lactobacilli peptidases. *Int. Dairy J.* **12**, 447–454 (2002)
7. Detmers F.J.M., Kuni E.R.S., Lanfermeijer F.C., Poolman B., Konings W.N.: Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, **37**, 16671–16679 (1998)
8. Fernandez-Espla M.D., Garault P., Monnet V., Rul F.: *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4772–4778 (2000)

9. Fira M., Kojic A., Banina I., Spasojevic I., Strahinic L., Topisirovic D.: Characterization of cell envelope-associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 123–130 (2001)
10. Fuglsang A., Rattray F.P., Nilsson D., Nyborg N.C.B.: Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Anton. Leeuw. Internat. J.G.* **83**, 27–34 (2003)
11. Gagnaire V., Molle D., Herrouin M., Leonil J.: Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4402–4413 (2001)
12. Gajewska J., Błaszczak M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Mikrobiol.* **51**, 55–65 (2012)
13. Genay M., Sadat L., Gagnaire V., Lortal S.: prtH2, not prtH, is the ubiquitous cell wall proteinase gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3238–3249 (2009)
14. Gilbert C., Blanc B., Frot-Coutaz J., Portalier R., Atlan D.: Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *J. Dairy Res.* **64**, 561–571 (1997)
15. Gill H. S., Doull F., Rutherford K. J., Cross, M. L.: Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.* **84** (suppl. 1), 111–117 (2000).
16. Gobetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F., Addeo F.: Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3898–3904 (2000)
17. Gobetti M., Minervini F., Rizzello C. G.: Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.* **57**, 173–188 (2004)
18. Gomez-Ruiz, J. A., Ramos, M., Recio, I.: Angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.* **12**, 697–706 (2002)
19. Guédon E., Renault P., Ehrlich S.D., Delorme C.: Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J. Bacteriol.* **183**, 3614–3622 (2001)
20. Haandrikman A., Kok J., Venema G.: Lactococcal proteinase maturation protein PrtM is a lipoprotein. *J. Bacteriol.* **173**: 4517–4525 (1991)
21. Hartmann R., Meisel H.: Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 163–169 (2007)
22. Hebert E.M., Raya R.R., De Giori G.S.: Nutritional requirements and nitrogendependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL 1062. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5316–5321 (2000)
23. Hebert E.M., Mamone G., Picariello G., Raya R.R., De Giori G.S., Ferranti P., Addeo F.: Characterization of the pattern of a s1- and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3682–3689 (2008)
24. Hengst C.D., Sacha A.F.T., Geurts, J.M.W., Nauta A., Kok J., Kuipers O.P.: The *Lactococcus lactis* CodY Regulon: identification of a conserved cis-regulatory element. *J. Biol. Chem.* **280**, 34332–34342 (2005)
25. Hernandez-Ledesma B., Amigo L., Ramos M., Recio I.: Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1504–1510 (2004)
26. Jensen M.P., Vogensen F.K., Ardo Y.: Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *Int. Dairy J.* **19**, 661–668 (2009)
27. Kilpi E.E.R., Kahala M.M., Steele J.L., Pihlanto A.M., Joutsjoki V.V.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Int. Dairy J.* **17**, 976–984 (2007)
28. Kitts D.D., Weiler K.: Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 1309–1323 (2003)
29. Kiwaki M., Ikemura H., Shimizu-Kadota M., Hirashima A.: Molecular characterization of a cell wall-associated proteinase gene from *Streptococcus lactis* NCDO763. *Mol. Microbiol.* **3**, 359–369 (1989)
30. Klein N., Lortal S.: Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening. a review. *Int. Dairy J.* **9**, 751–762 (1999)
31. Kok J., Leenhouts K., Haandrikman A.J., Ledebor A., Venema G.: Nucleotide sequence of the cell wall proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 231–238 (1988)
32. Korhonen H., Pihlanto-Leppälä, A.: Milk protein-derived bioactive peptides-novel opportunities for health promotion. *IDF Bulletin*, **363**, 17–26 (2001)
33. Korhonen H., Pihlanto A.: Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 1297–1308 (2003)
34. Korhonen H., Pihlanto A.: Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* **16**, 945–960 (2006)
35. Kudoh Y., Matsuda S., Igoshi K., Oki T.: Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Jpn. J. Soc. Food Sci.* **48**, 44–50 (2001)
36. Lamarque M., Charbonnel P., Aubel D., Piard J.C., Atlan D., Juillard V.: A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. *J. Bacteriol.* **186**, 6492–6500 (2004)
37. Leblanc J.G., Matar C., Valdez J.C., Leblanc J., Perdigon G.: Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* **85**, 2733–2742 (2002)
38. Leenhouts K., Buist G., Kok J.: Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 367–376 (1999)
39. Liu M., Bayjanov J. R., Renckens B., Nauta A., Siezen R.J.: The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. **2010 BMC Genomics**, 11 (2010)
40. Luoma S., Peltoniemi K., Joutsjoki V., Rantanen T., Tamminen M., Heikkinen I., Palva A.: Expression of Six Peptidases from *Lactobacillus helveticus* in *Lactococcus lactis* *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1232–1238 (2001)
41. Maeno M., Yamamoto N., Takano T.: Isolation of an anti-hypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* **79**, 1316–1321 (1996)
42. Matar C., Valdez J.C., Medina M., Rachid M., Perdigon G.: Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J. Dairy Res.* **68**, 601–609 (2001)
43. Matar C., LeBlanc J. G., Martin L., Perdigon G.: Biologically active peptides released in fermented milk: Role and functions. In: E.R. Farnworth. Editor. Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceuticals series. CRC Press. Florida, USA, s. 177–201 (2003)
44. McSweeney P.L.H.: Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* **57**, 127–144 (2004)
45. Meisel H., Fitz Gerald R.J.: Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 1289–1295 (2003).

46. Misk-Krajnik M. H.: Rola paciorkowców mlekowych i pałeczek propionowych w procesie dojrzewania sera typu szwajcarsko-holandzkiego. *Zywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **1**, 45–59 (2012)
47. Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakarai T., Yura S.: Multiple nutritional requirements of *Lactobacilli*: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.* **148**, 64–71 (1981)
48. Nakajima H., Hagting A., Kunji E.R.S., Poolman B., Konings W.N.: Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the di- and tripeptide transport protein of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2213–2217 (1997)
49. Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S., Takano T.: Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* **78**, 777–783 (1995a)
50. Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Takano T.: Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.* **78**, 1253–1257 (1995b)
51. Navarre W.W., Schneewind O.: Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **14**, 115–121 (1994)
52. Nielsen M.S., Martinussen T., Flambard B., Sorensen K.I., Otte J.: Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *Int. Dairy J.* **19**, 155–165 (2009)
53. Oberg C.J., Broadbent J.R., Strickland M., McMahon D.J.: Diversity in specificity of the extracellular proteinases in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**, 455–460 (2002)
54. Oomme, B.S., McMahon D.J., Oberg C.J., Broadbent J.R., Strickland M.: Proteolytic specificity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* influences functional properties of mozzarella cheese. *J. Dairy Sci.* **85**, 2750–2758 (2002)
55. Pan D., Luo Y., Tanokura M.: Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chem.* **91**, 123–129 (2004)
56. Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., Kranenburg R., Kleerebezem M., Topisirovic L., Jovanovic G.: Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5802–5811 (2003)
57. Pastar I., Fira D., Strahinic I., Krstic K., Begovic J., Topisirovic L., Jovanovic G.: Analysis of the presence of prtR proteinase gene in natural isolates of *Lactobacillus rhamnosus*. *Folia Microbiol.* **51**, 535–541 (2006)
58. Pederson J.A., Mileski G.J., Weimer B.C., Steele J.L.: Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* **181**, 4592–4597 (1999)
59. Petranovic D., Guédon E., Sperandio B., Delorme C., Ehrlich S.D., Renault P.: Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol. Microbiol.* **53**, 613–621 (2004)
60. Polak-Berecka M., Waško A., Koston D.: Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. *Ann Univ Mariae Curie-Sklodowska, Sectio C*, **64**, 15–24 (2009)
61. Richoux R., Aubert L., Roset G., Kerjean J.R.: Impact of the proteolysis due to *Lactobacilli* on the stretchability of Swiss-type cheese. *Dairy Sci. Technol.* **89**, 31–41 (2009)
62. Rival S.G., Fornaroli S., Boeriu C.G., Wichers H.J.: Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *J. Agric. Food Chem.* **4**, 287–294 (2001)
63. Robert M.C., Razaname A., Mutter M., Juillerat M.A.: Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 6923–6931 (2004)
64. Rokka T., Syväoja, E.-L., Tuomine, J., Korhonen H.: Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GG fermented UHT-milk. *Milchwissenschaft*, **52**, 675–678 (1997)
65. Ryhänen E. L., Pihlanto-Leppälä A., Pahkala, E.: A new type of ripened; low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* **11**, 441–447 (2001)
66. Sadat-Mekmene L., Genay M., Atlan D., Lortal S., Gagnaire V.: Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review *Int. J. Food Microbiol.* **146**, 1–13 (2011)
67. Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh, T.: Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* **83**, 1434–1440 (2000)
68. Sasaki M., Bosman B.W., Tan P.S.T.: Comparison of proteolytic activities in various *Lactobacilli*. *J. Dairy Res.* **62**, 601–610 (1995)
69. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P.: Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 394–406 (2006)
70. Scolari G., Vescovo M., Zacconi C., Vescovi F.: Extraction and partial characterization of proteolytic activities from the cell surface of *Lactobacillus helveticus* Zuc2. *J. Dairy Sci.* **89**, 3800–3809 (2006)
71. Seppo L., Kerojoki O., Suomalainen T., Korpela R.: The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16H fermented milk on hypertension, a pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, **57**, 124–127 (2002)
72. Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T., Korpela R.: A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 326–330 (2003)
73. Siezen R.J.: Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 139–155 (1999)
74. Singh T.K., Fox P.F., Healy A.: Isolation and identification of further peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **64**, 433–443 (1997)
75. Singh B., Chand R.: Antioxidative activity of bovine milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Milchwissenschaft*, **61**, 63–65 (2006)
76. Smacchi E., Gobbetti M.: Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria; *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 687–694 (1998)
77. Smeianov V.V., Wechter V.P., Broadbent J.R., Hughes J.E., Rodriguez B.T., Christensen T.K., Ardo Y., Steele J.L.: Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2661–2672 (2007)
78. Smit G., Smit B., Engels W.: Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 591–610 (2005)
79. Smukowski M., Wendroff W.L., Ping, Y., Rao R.D.: Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J. Dairy Sci.* **86** (suppl. 1), 364 (2003)
80. Stefanitsi D., Sakellaris G., Garel J.R.: The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 53–58 (1995)

81. Takano T.: Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 333–340 (2002)
82. Vinderola G., Matar C., Palacios J., Perdigon G.: Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 180–186 (2007)
83. Vinderola G., Matar C., Perdigon G.: Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar typhimurium infection in mice. *Immunology*, **212**, 107–118 (2007b)
84. Visser S.: Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. *J. Dairy Sci.* **76**, 329–350 (1993)
85. Wakai T., Yamamoto N.: Antihypertensive peptides specific to *Lactobacillus helveticus* fermented milk. *Biotechnology – Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life* 2012, s. 159–172 (2012)
86. Waśko A., Kieliszek M., Targoński Z.: Purification and characterization of a Proteinase from the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Oxy. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **42**, 476–488 (2012)
87. Williams A.G., Noble J., Tammam J., Lloyd D., Banks J.M.: Factors affecting the activity of enzymes involved in peptide and amino acid catabolism in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* **12**, 841–852 (2002)
88. Yamamoto N., Akino A., Takano T.: Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 776–778 (1994)
89. Yamamoto N., Maeno M., Takano T.: Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.* **82**, 1388–1393 (1999)