

## SYSTEM PROTEOLITYCZNY BAKTERII KWASU MLEKOWEGO CZĘŚĆ I. – PROTEINAZY ZWIĄZANE ZE ŚCIANĄ KOMÓRKOWĄ ORAZ SYSTEMY TRANSPORTU PEPTYDÓW

Monika Garbowska<sup>1)</sup>, Antoni Pluta<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa, [monika.garbowska@ibprs.pl](mailto:monika.garbowska@ibprs.pl)

<sup>2)</sup>Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Nauk o Żywności, Zakład Biotechnologii Mleka,  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

### Streszczenie

W niniejszej pracy omówiono wyniki opublikowanych aktualnych badań nad systemem proteolitycznym bakterii kwasu mlekowego (LAB), który składa się z trzech podstawowych elementów: (I) proteinaz związanych ze ścianą komórkową (CEPs), (II) systemów transportu peptydów do wnętrza komórki oraz (III) różnorodnych wewnątrzkomórkowych peptydaz rozkładających peptydy do krótszych peptydów i aminokwasów. Scharakteryzowano proteiny związane ze ścianą komórkową bakterii, które rozpoczynają rozkład kazeiny. Omówiono przenoszenie produktów rozkładu kazeiny do wnętrza komórki przez CEPs oraz specyficzne transportery zlokalizowane w membranie, w tym: Opp – transporter peptydów (zawierających od 4 do 35 aminokwasów), Dpp – transporter di-, tri- i tetrapeptydów, DtpT – transporter di- i tripeptydów, a ponadto 10 transporterów aminokwasowych o wysokiej specyficzności względem budowy strukturalnej aminokwasów.

**Słowa kluczowe:** bakterie kwasu mlekowego, proteoliza, proteiny, systemy transportu peptydów

## PROTEOLYTIC SYSTEM OF LACTIC ACID BACTERIA. PART I – CELL ENVELOPE PROTEINASES AND PEPTIDES TRANSPORT SYSTEMS

### Summary

In this paper, discusses the results of published current research about the proteolytic system of lactic acid bacteria (LAB) which consists of three basic components: (I) cell envelope proteinases (CEPs), (II) peptides transport systems into the cell, and (III) a variety of intracellular peptidases degrading peptides to shorter peptides and amino acids. Characterized proteinases associated with the bacterial cell wall which begin breakdown of casein. Discusses transport into the cell, products of casein degradation by CEPs and localized in the membrane specific transporters, in it: Opp - peptides transporter (containing from 4 to 35 amino acids), Dpp - di-, tri- and tetrapeptides transporter, and DtpT - transporter of di- and tripeptides, and furthermore, 10 amino acids transporters, with high specificity for the construction structural of amino acids.

**Key words:** lactic acid bacteria, proteolysis, proteinases, peptides transport systems

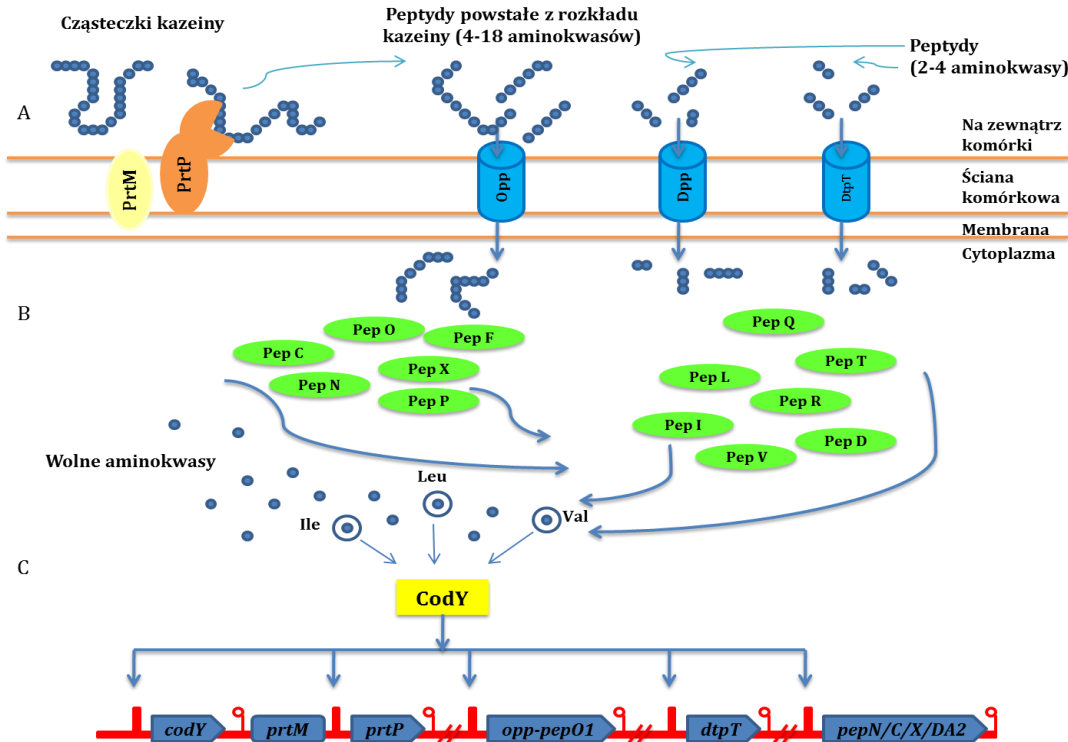
## WSTĘP

Przemysł mleczarski charakteryzuje się dużą różnorodnością produktów fermentowanych do wyrobu których wykorzystywane są kultury bakterii starterowych, w skład których wchodzi głównie bakterie kwasu mlekowego (LAB-lactic acid bacteria). Zgodnie z systematyką, bakterie kwasu mlekowego zaliczane są do typu *Firmicutes*, rzędu *Lactobacillales*. W grupie tej wyróżnia się następujące rodzaje: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Streptococcus*, *Lactococcus* [Usajewicz 2008, Azcarate-Peril, Klaenhammer 2010]. Wśród LAB rodzaje *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* odgrywają kluczową rolę w produkcji żywności fermentowanej. Są to bakterie Gram(+), nieprzetrwalnikujące, katalazo-ujemne, względnie beztlenowe, prowadzące fermentację beztlenową, której głównym produktem jest kwas mlekowy [Molska 1988, Savijoki i in. 2006, Libudzisz i in. 2008].

Proteoliza jest jednym z najważniejszych procesów biochemicznych odgrywających zasadniczą rolę w wytwarzaniu i przechowywaniu wielu mlecznych produktów fermentowanych. W produkcji sera rozkład kazeiny do polipeptydów, peptydów i aminokwasów jest szczególnie istotny, ponieważ powstałe w wyniku proteolizy związki takie jak: aminokwasy, alkohole, aldehydy, kwasy, estry oraz związki siarkowe są prekursorami specyficznych cech smakowo-zapachowych [Smit i in. 2005]. Goryczka, która jest rezultatem nagromadzenia hydrofobowych peptydów (zwłaszcza bogatych w prolinę) o gorzkim smaku jest wskaźnikiem jakości w produkcji sera typu Gouda i Cheddar [Smukowski i in. 2003].

Specyficzność zewnątrzkomórkowych proteinaz (CEPs-cell envelope proteinases) odgrywa zasadniczą rolę w wytwarzaniu gorzkich peptydów [Rodriguez i in. 1996, Broadbent i in. 2002]. Peptydazy kultur LAB takie jak PepN, PepX, PepO2, PepO3 biorą udział w degradacji gorzkich peptydów i są odpowiedzialne za cechy organoleptyczne produktów mlecznych [Meyer, Spahn 1998, Chen, Steele 1998, Chen i in. 2003, Christensen, Steele 2003, Sridhar i in. 2005, O'Sullivan i in. 2009]. Jednak najistotniejsze jest aby proteoliza przebiegała w sposób zrównoważony, co jest szczególnie ważne w tworzeniu odpowiedniego zapachu i zapobieganiu powstawania goryczki w serach wynikającej z nagromadzenia gorzkich polipeptydów i peptydów [Smit i in. 2005].

System proteolityczny bakterii kwasu mlekowego zapewnia optymalny wzrost LAB w mleku, w którym zawartość aminokwasów niezbędna do ich wzrostu nie jest wystarczająca. System ten składa się z trzech podstawowych elementów (I) proteinaz związanych ze ścianą komórkową (CEPs), które rozpoczynają rozkład kazeiny do oligopeptydów, (II) systemów transportu peptydów do wnętrza komórki oraz (III) różnorodnych wewnątrzkomórkowych peptydaz rozkładających peptydy do krótszych peptydów i aminokwasów (Rysunek 1.).



A. PrtP – proteinaza związana ze ścianą komórkową, Opp – transporter oligopeptydów, Dpp – transporter di-, tri- i tetrapeptydów, DtpT – transporter di- i tripeptydów. B. Wewnątrzkomórkowe peptydazy. PepO i PepF – endopeptydazy, PepN/PepC/PepP – główne aminopeptydazy, PepX – X-prolilo-dipeptydylowa aminopeptydaza, PepT – tripeptydaza, PepQ – prolidaza, PepR – prolinaza, PepI – prolino-iminopeptydaza, PepV i PepD – dipeptydazy. C. Represor transkrypcyjny CodY, poziom represji regulowany jest zawartością wewnątrzkomórkowych rozgałęzionych aminokwasów (izoleucyny, leucyny, waliny); wykorzystując te reszty jako kofaktory CodY hamuje ekspresję genów kodujących białka systemu proteolitycznego *Lactococcus*.

**Rysunek 1.** Schemat sytemu proteolitycznego *Lactococcus* istotnego w rozkładzie kazeiny [Savijoki i in. 2006]

*Schematic representation of proteolytic system of Lactococcus significant in casein breakdown [Savijoki et al. 2006]*

Istotną cechą starterów, która jest powiązana z ich systemem proteolitycznym jest autoliza komórek. Stanowi to kolejny ważny element w produkcji serów, ponieważ te zdolności są miarą uwalnianych do masy serowej wewnątrzkomórkowych enzymów, które kolejno rozkładają peptydy do aminokwasów, prekursorów związków smakowo-zapachowych. Między innymi z tego względu prowadzonych jest wiele badań zmierzających do określenia poziomu i możliwości kontroli lizy komórek starterów [Savijoki i in. 2006].

### ZEWNĄTRZKOMÓRKOWE PROTEINAZY

Pierwszym etapem w bakteryjnym rozkładzie kazeiny jest jej hydroliza przez związane ze ścianą komórkową bakterii LAB proteinazy (CEPs).

Wśród CEPs sklonowano i scharakteryzowano 5 różnych typów proteinaz [Gilbert i in. 1996, Pederson i in. 1999, Siezen 1999, Fernandez-Espla i in. 2000, Konings i in. 2000, Pastar i in. 2003, Lortal 2004, Siezen i in. 2005, Altermann i in. 2005, Sadat-Mekmene i in. 2011]:

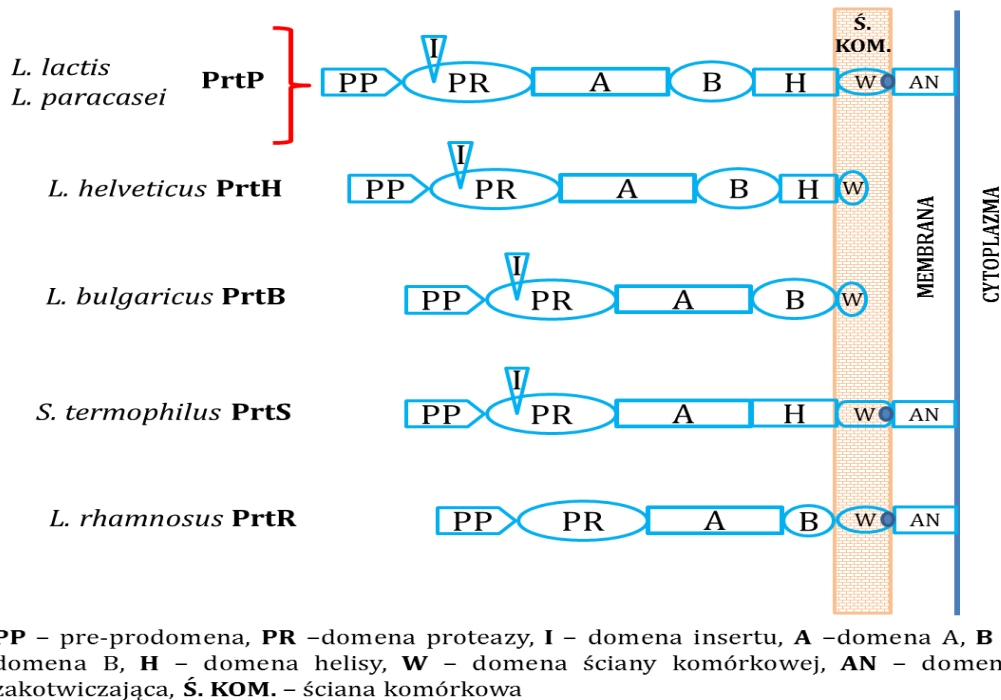
- a) **PrtP** – wyizolowana z *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*,
- b) **PrtH** – wyizolowana z *Lactobacillus helveticus*,
- c) **PrtR** – wyizolowana z *Lactobacillus rhamnosus*,
- d) **PrtS** – wyizolowana z *Streptococcus thermophilus*,
- e) **PrtB** – wyizolowana z *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

CEPs bakterii mlekowych są syntetyzowane jako pre-proteiny posiadające około 2.000 miejsc aminokwasowych i składające się z kilku odmiennych funkcjonalnie domen (Rysunek 2.). Zaczynając od N-końca łańcucha w skład proteiny wchodzi następujące domeny [Siezen 1999, Savijoki i in. 2006, Sadat-Mekmene i in. 2011]:

- **PP** - preprodomena odpowiadająca sekwencji sygnałowej (~40 miejsc) oraz prosekwencji (~150 miejsc).
- **PR** - katalityczna serynowa domena proteazy (~500 miejsc).
- **I** - domena insertu (~150 miejsc), która najprawdopodobniej odpowiada za modyfikowanie specyficzności substratowej CEPs.
- **A** - domena (~400 miejsc), której funkcja nie została jeszcze określona.
- **B** - domena (~500 miejsc), która najprawdopodobniej pełni rolę stabilizującą aktywność i specyficzność CEPs.
- **H** - domena helisy (~200 miejsc) związana z ułożeniem domeny A i B na zewnątrz ściany komórkowej bakterii.
- **W** - domena hydrofilowa ściany komórkowej (~100 miejsc).

Obecność domeny B była stwierdzana u większości CEPs bakterii mlekowych, jednak nie wykazano jej obecności w PrtS *Streptococcus thermophilus*. Domena W proteiny PrtS posiada typowy dla domeny ściany komórkowej bakterii Gram(+) skład aminokwasowy (bogata w Pro-Gly i Ser-Thr). Występowanie domeny H określono u proteinaz PrtP (210 aa), PrtS (367 aa) oraz PrtH (72 aa). W przypadku proteinaz PrtP i PrtS położenie domeny W jest poprzedzone domeną zakotwiczącą ściany komórkowej, która odpowiedzialna jest za wykonywanie sygnałów sortujących typowych dla wielu białek powierzchniowych Gram(+) bakterii [Savijoki i in. 2006]. Proteiny *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus bulgaricus* nie mają domeny zakotwiczącej i są związane ze ścianą komórkową za pomocą domeny W [Siezen 1999]. W przypadku PrtR *Lactobacillus rhamnosus* domena B jest nieco mniejsza

w porównaniu do domeny B proteinaz PrtP, PrtH, PrtB. Ponadto u PrtR nie stwierdzono obecności domen H i I (Rysunek 2.).



**Rysunek 2.** Proteinazy bakterii kwasu mlekowego związane ze ścianą komórkową [Siezen 1999]

*Cell envelope proteinases of lactic acid bacteria [Siezen 1999]*

CEPs wykazują silne powinowactwo w stosunku do hydrofobowej cząsteczki kazeiny, w tym szczególnie frakcji  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ -kazeiny. Cząsteczka kazeiny zawiera bardzo dużo reszt prolinowych, w związku z czym nie może utworzyć typowej struktury  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -harmonijki i zwykle tworzy przypadkową spiralną lub kulistą strukturę. Struktura drugorzędowa kazeiny sprzyja działaniu CEPs.

Proteinazy PrtP bakterii z rodzaju *Lactococcus* ze względu na ich specyficzność substratową do cząsteczki  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  i  $\kappa$ -kazeiny podzielono na dwa rodzaje PI i PIII. PI w pierwszej kolejności rozkłada  $\beta$ -kazeinę, w wyniku czego tworzy się więcej niż 100 oligopeptydów zawierających od 4 do 30 aminokwasów, ale zdolna jest także do rozkładu  $\kappa$ -kazeiny. Natomiast PIII zdolne są do rozkładu zarówno  $\alpha_{s1}$ ,  $\beta$  jak i  $\kappa$ -kazeiny. Proteinazy PrtP zostały podzielone na 7 grup (a, b, c, d, e, f, g) ze względu na ich specyficzność względem frakcji  $\alpha_{s1}$ -kazeiny [Pritchard, Coolbear 1993, Juillard i in. 1995, Kunji i in. 1996, Savijoki i in. 2006].

Enzymy zaliczane do CEPs to zazwyczaj monomeryczne serynowe proteinazy o masie molekularnej 180-190kDa. Geny *prtP* wykazują wysoką homologię, u niektórych szczepów główne sekwencje mogą być identyczne nawet w 98% (enzymy *Lactococcus*) i 95% (przy porównaniu *Lactococcus* i *Lactobacillus*) [Kunji i in. 1996].

Enzymy PrtP mogą być kodowane zarówno w chromosomach, jak i na plazmidach, jednak przebadane szczepy *Lactobacillus* posiadały gen *prtP* jedynie w obrębie genomu [Siezen 1999, Siezen i in. 2005, Savijoki i in. 2006].

PrtP zostały zlokalizowane na chromosomach bakterii *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* LMD9 oraz na plazmidach u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 [Siezen i in. 2005, Liu i in. 2010].

U *Lactococcus lactis* gen *prtP* jest poprzedzony przez gen kodujący związaną z membraną komórkową lipoproteinę (PrtM), która odgrywa istotną rolę w autokatalitycznej aktywacji PrtP [Haandrikman i in. 1991]. Obecność obu genów stwierdzono między innymi u *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* czy *Lactobacillus acidophilus* NCFM, natomiast u *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* oraz *Streptococcus thermophilus* nie zidentyfikowano genu *prtM*. Aktywacja CEPs u *Lb. bulgaricus* nie wymaga obecności PrtM [Gilbert i in. 1996, Siezen 1999, Fernandez-Espla i in. 2000, Germond i in. 2003]. Mikroorganizmy te dzięki posiadaniu zewnątrzkomórkowych peptydaz są zdolne do pewnego rozkładu białek mleka, w wyniku czego powstają mniejsze peptydy i wolne aminokwasy, które są następnie transportowane do wnętrza komórki [Altermann i in. 2005, Savijoki i in. 2006].

Większość bakterii kwasu mlekowego posiada pojedynczą proteinazę CEP na powierzchni komórki, natomiast u *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ACA DC235 stwierdzono obecność dwóch proteinaz CEPs [Stefanitsi i in. 1995, Kunji i in. 1996, Pederson i in. 1999].

Liu i in. [2010] po przebadaniu 18 szczepów *Lactococcus lactis* wykazali różnice w występowaniu proteinaz PrtP i PrtM. Większość genów kodujących te enzymy zlokalizowanych jest na plazmidach [Siezen i in. 2005]. U *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 geny *prtP* jak i *prtM* znajdują się na plazmidzie. Występowanie lub brak tych genów u innych szczepów *Lactococcus lactis* może w dużej mierze zależeć od występowania lub braku plazmidu, na którym zlokalizowane są te geny. Liu i in. [2010] określili, że proteinazy PrtP wraz z PrtM występują głównie wśród szczepów *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, ale także u nielicznych *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* geny te są obecne. W przeciwieństwie do *Lactobacillus*, brak tych genów u niektórych *Lactococcus* nie wpływa na zdolność wzrostu tych bakterii w mleku [Sadat-Mekmene i in. 2011].

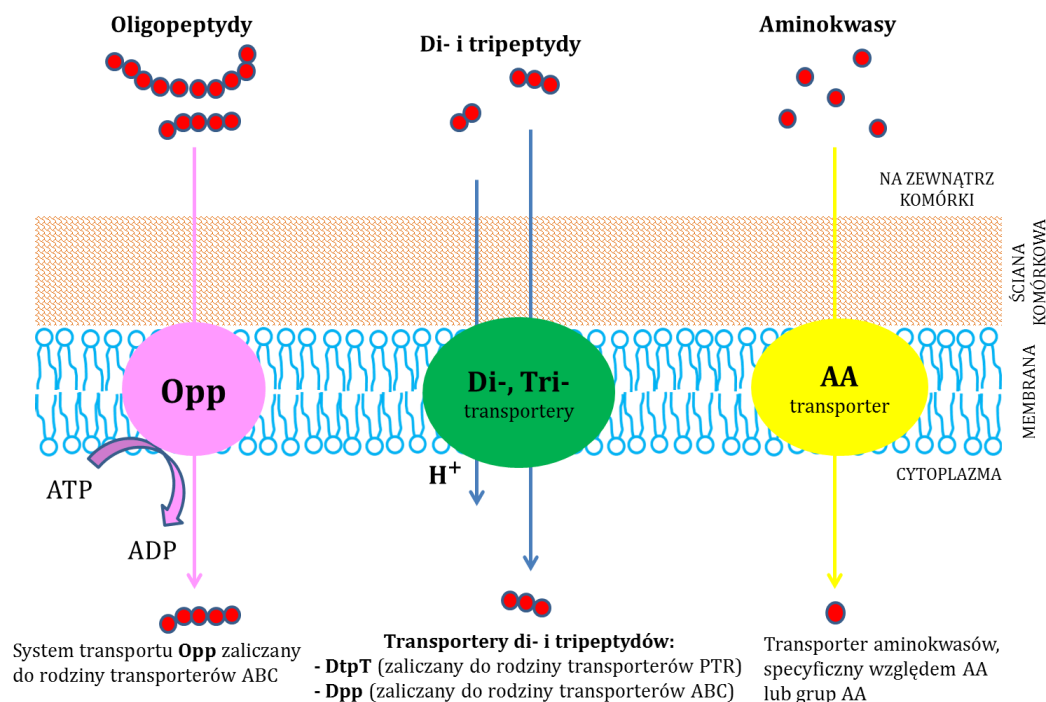
Reasumując, proteinazy związane ze ścianą komórkową pochodzące od różnych bakterii kwasu mlekowego są bardzo podobne pod względem właściwości biochemicznych (większość z nich to proteinazy serynowe podobnej wielkości), chociaż ich obecność nie jest stwierdzana u wszystkich bakterii kwasu mlekowego. Produktami hydrolizy kazeiny powstającymi w wyniku działania proteinaz zewnątrzkomórkowych są peptydy (zawierające  $\geq 30$  reszt aminokwasowych), oligopeptydy (zawierające od 4 do 10 reszt aminokwasowych), a także wolne aminokwasy [Kunji i in. 1996, Parente, Cogan 2004].

## SYSTEMY TRANSPORTU OLIGOPEPTYDÓW I AMINOKWASÓW

Kolejnym etapem w degradacji kazeiny jest transport peptydów otrzymanych w wyniku działalności CEPs do wnętrza komórki, gdzie znajdują się peptydazy LAB, powodujące dalszą hydrolizę peptydów [Parente, Cogan 2004, Savijoki i in. 2006].

Bakterie z rodzaju *Lactococcus* posiadają trzy systemy transportu peptydów [Doeven i in. 2005, Picon i in. 2010], które przedstawiono na Rysunku 3.:

- I. **Opp** – transporter peptydów (zawierających od 4 do 35 aminokwasów),
- II. **Dpp** – transporter di-, tri- i tetrapeptydów,
- III. **DtpT** – transporter di- i tripeptydów.



**Rysunek 3.** Systemy transportu oligopeptydów i aminokwasów LAB  
*Oligopeptide and amino acids transport systems of LAB*

Poza wymienionymi systemami w literaturze opisano 10 transporterów aminokwasowych o wysokiej specyficzności względem budowy strukturalnej aminokwasów [Doeven i in. 2005, Kunji i in. 1996, Sanz i in. 2001].

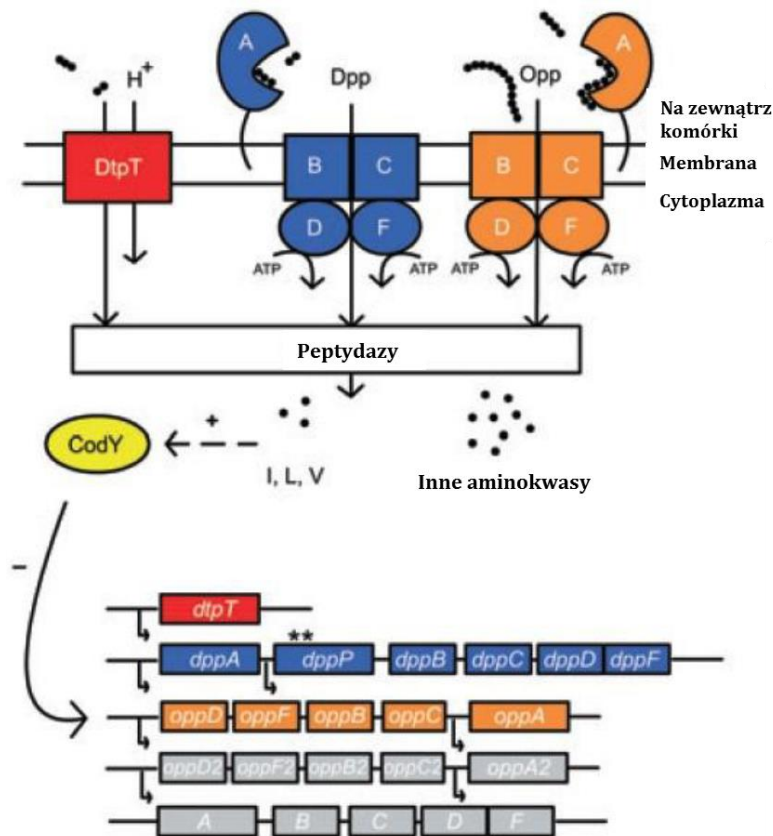
System transportu Opp zaliczany do rodziny transporterów ABC (Rysunek 4.) składa się z pięciu protein [Konings i in. 2000, Bolotin i in. 2001, Doeven i in. 2005]:

- I. Białka wiążącego oligopeptydy – **OppA**,
- II. Dwóch integralnych białek membranowych – **OppB/OppC**,
- III. Dwóch białek wiążących ATP – **OppD/OppF**.

Gen kodujący wszystkie te białka u *Lactococcus lactis* MG1363 znajduje się na operonie [Tynkkynen i in. 1993]. W przypadku innych LAB system Opp nie został jeszcze

tak dobrze poznany, ale określono, że u *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus* skład systemu Opp jest podobny do systemu bakterii z rodzaju *Lactococcus* [Gerault i in. 2002, Peltoniemi i in. 2002].

Kolejnym systemem transportu jest DtpT należący do rodziny białek transportowych PTR, dla których transport wymuszony jest gradientem protonów po obu stronach membrany. Systemem tym transportowane są głównie di- i tripeptydy o charakterze hydrofilowym [Hagting i in. 1994, Kunji i in. 1996].



**Rysunek 4.** Schemat funkcji, regulacji i genetycznej organizacji systemów transportu na przykładzie *Lactococcus lactis* [Doeven i in. 2005]

*Schematic representation of the function, regulation and genetic organization of transport systems on example of Lactococcus lactis [Doeven et al. 2005]*

System Dpp transportuje di-, tri- oraz tetrapeptydy względnie hydrofobowe o rozgałęzionych łańcuchach, wykazując większe powinowactwo w stosunku do tripeptydów [Foucaud i in. 1995, Sanz i in. 2003]. W przypadku niektórych szczepów *Lactococcus lactis* (IL403 i SKM6) z powodu braku białka OppA, system Dpp wykorzystywany jest do transportu zarówno di-, tripeptydów (DppA), jak i oligopeptydów (z wykorzystaniem białka DppP). Zaliczany jest do rodziny białek transportowych ABC, a 6 genów *dpp*, w obrębie 2 operonów (*dppA* oraz *dppPBCDF*) koduje następujące białka [Doeven i in. 2005, Liu i in. 2010]:



- I. Białka wiążące di-, tri- i oligopeptydy – **DppA/DppP**,
- II. Dwa integralne białka membranowe – **DppB/DppC**,
- III. Dwa białka wiążące ATP – **DppD/DppF**.

U *Lactococcus lactis ssp. lactis* MG1363 gen *dppP* kodujący drugie białko wiążące nie funkcjonuje wskutek nonsensownej mutacji punktowej i zmiany ramki odczytu, natomiast u *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403 w tym samym genie nie stwierdzono tych mutacji [Bolotion i in. 2001, Sanz i in. 2001].

System transportu Opp i Dpp zaliczane są do tej samej grupy transporterów ABC i są zależne od ATP, który stanowi siłę sprawczą i źródło energii, natomiast DtpT jest systemem jono-zależnym [Kunji i in. 1996, Doeven i in. 2005, Savijoki i in. 2006]

Liu i in. [2010] stwierdzili, że pałeczki mlekowe *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus casei* ATCC 334, *Lactobacillus rhamnosus* GG są wyposażone we wszystkie 3 opisane u *Lactococcus* systemy transportu peptydów - Dpp, DtpT oraz Opp. Poza tym, nie tylko systemy transportu peptydów są podobne u ziarniaków i pałeczek mlekowych, ale także systemy transportu aminokwasów u *Lactobacillus helveticus* są zbliżone do tych występujących u *Lactococcus lactis* [Kunji i in. 1996].

Źródła literaturowe wskazują na konieczność występowania systemów transportu oligopeptydów Opp i proteinaz związanych ze ścianą komórkową PrtP jako elementów niezbędnych do wzrostu komórek bakterii w środowisku zawierającym kazeinę jako jedyne źródło aminokwasów. Natomiast występowanie transporterów di-, tripeptydów nie jest bezpośrednio konieczne z uwagi na znikome ilości tworzonych w wyniku hydrolizy kazeiny przez CEPs di-, tripeptydów i wolnych aminokwasów [Tynkkyne i in. 1993, Kunji i in. 1996, Christensen i in. 1999, Parente, Cogan 2004].

## PIŚMIENNICTWO

1. Altermann E., Russell W.M., Azcarate-Peril M.A., Barrangou R., Buck B.L., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R., Klaenhammer T.R. (2005): Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS, 102, 3906-3912
2. Azcarate-Peril M.A., Klaenhammer T.R. (2010): Genomics of Lactic acid bacteria: the post-genomics challenge-from sequence to function. W: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, Novel Applications, pod red. Mozzi F., Raya R.R., Vignolo G.M., Wiley-Blackwell, Danvers, 35-56
3. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarne K., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Sorokin A. (2001): The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403. Genome Res., 11, 731-753

4. Broadbent J.R., Barnes M., Brennand C., Strickland M., Houck K., Johnson M.E., Steele J.L. (2002): Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1778-1785
5. Chen Y.S., Steele J.L. (1998): Genetic characterization and physiological role of endopeptidase O from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3411-3415
6. Chen Y.S., Christensen J.E., Strickland M., Steele J.L. (2003): Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1276-1282
7. Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A., Steele J.L. (1999): Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 217-246
8. Christensen J.E., Steele J.L. (2003): Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *J. Bacteriol.*, 185, 3297-3306
9. Doeven M.K., Kok J., Poolman B. (2005): Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiol.*, 57, 640-649
10. Fernandez-Espla M.D., 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
11. Focaud C., Kunji E.R., Hagting A., Richard J., Konings W.N., Desmazeaud M., Poolman B. (1995): Specificity of peptide transport system in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J. Bacteriol.*, 177, 4652-4657
12. Gerault P., Le Bars D., Besset C., Monnet V. (2002): Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, 277, 32-39
13. Germond J.E., Delley M., Gilbert C., Atlan D. (2003): Determination of the domain of the *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* cell surface proteinase PrtB involved in attachment to the cell wall after heterologous expression of the prtB gene in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3377-3384
14. Gilbert C., Atlan D., Blanc B., Portalier R., Germond J.E., Lapiere L., Mollet B. (1996): A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the prtB gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *J. Bacteriol.*, 178, 3059-3065
15. Haandrikman A.J., Meesters R., Laan H., Konings W.N., Kok J., Venema G. (1991): Processing of the Lactococcal extracellular serine proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1899-1904
16. Hagting A., Kunji E., Leenhouts K., Poolman B., Konings W. (1994): The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J. Biol. Chem.*, 269, 11391-11399
17. Juillard V., Laan H., Kunji E.R.S., Jeronimus-Stratingh C.M., Bruins A.P., Konings W.N. (1995): The extracellular P<sub>1</sub>-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes

- beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. *J. Bacteriol.*, 177, 3472-3478
18. Konings W. N., Kok J., Kuipers O. P., Poolman B. (2000): Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology*, 3, 276-282
  19. Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B., Konings W.N. (1996): The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187-221
  20. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (2008): *Mikrobiologia techniczna tom II. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności.* Wydawnictwo naukowe PWN, 25-58
  21. Liu M., Bayjanov J.R., Renckens B., Nauta A., Siezen R. (2010): The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, 11-36
  22. Lortal S. (2004): Cheese made with thermophilic lactic starters. W: *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, pod red. Hui Y.H., Hansen Å.S., Josephsen J., Nip W-K., Stanfield P.S., Toldrá F., Marcel Dekker Inc., New York, 340-359
  23. Meyer J., Spahni A. (1998): Influence of X-prolyl-dipeptidylaminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* on proteolysis and taste of Swiss Gruyère cheese. *Milchwissenschaft*, 53, 449-453
  24. Molska I. (1988): *Zarys Mikrobiologii Mleczarskiej.* PWRiL, Warszawa
  25. O'Sullivan O., O'Callaghan J., Sangrador-Vegas A., McAuliffe O., Slattery L., Kaleta P., Callanan M., Fitzgerald G. F., Ross R.P., Beresford T. (2009): Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiology*, 9:50, 1-9
  26. Parente E., Cogan T. M. (2004): Starter Cultures: General Aspects. W: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* Wydanie 3, tom 1: General Aspects, pod red. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P., Elsevier Academic Press, 124-136
  27. Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., van Kranenburg R., Kleerebezem M., Topisirovic L., Jovanovic G. (2003): Identification and genetic characterization of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5802-5811
  28. Pederson J. A., Mileski G.J., Weimer B.C., Steele J. L. (1999): Genetic characterization of a cell envelope-associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.*, 181, 4592-4597
  29. Peltoniemi K., Vesanto E., Palva A. (2002): Genetic characterization of an oligopeptide transport system from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Arch. Microbiol.*, 177, 457-467
  30. Picon A., García-Casado M.A., Nuñez M. (2010): Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Intern. Dairy J.*, 20, 156-162
  31. Pritchard G.G., Coolbear T. (1993): The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 179-206

32. Rodriguez J., Requena T., Goudéranche H., Maubois J.L., Juárez M. (1996): Accelerated ripening of reduced fat semi-hard cheese from a mixture of cow's, goat's and ewe's ultrafiltrated milk by using a Lac-Prt-strain of lactococci. *Lait*, 76, 513-522
33. Sadat-Mekmene L., Genay M., Atlan D., Lortal S., Gagnaire V. (2011): Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Intern. J. Food Microbiol.*, 146, 1-13
34. Sanz Y., Lanfermeijer F.C., Renault P., Bolotin A., Konings W.N., Poolman B. (2001): Genetic and functional characterization of *dpp* genes encoding a dipeptide transport system in *Lactococcus lactis*. *Archiv. Microbiol.*, 175, 334-343
35. Sanz Y., Toldrá F., Renault P., Poolman B. (2003): Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of *Lactococcus lactis* IL1403. *FEMS Microbiol. Lett.*, 227, 33-38
36. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006): Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71, 394-406
37. Siezen R. J. (1999): Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 139-155
38. Siezen, R. J., Renckens B., van Swam I., Peters S., van Kranenburg R., Kleerebezem M., de Vos W.M. (2005): Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* *subsp. cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8371-8382
39. Smit G., Smit B.A., Engels W.J.M. (2005): Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29, 591-610
40. Smukowski M., Wendorff W. L., Ping Y., Rao R. D. (2003): Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *J. Dairy Sci.*, 86, 364
41. Sridhar V. R., Hughes J.E., Welker D. L., Broadbent J.R., Steele J.L. (2005): Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3025-3032
42. Stefanitsi D., Sakellaris G., Garel J. R. (1995): The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 128, 53-58
43. Tynkkynen S., Buist G., Kunji E., Kok J., Poolman B., Venema G., Haandrikman A. (1993): Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 175, 7523-7532
44. Usajewicz I. (2008): Mikrobiologia mleka i jego przetworów. W: *Mleczarstwo 1*, pod red. Ziajka S., Wydawnictwo UWM w Olsztynie, 152-204