

## **SYSTEM PROTEOLITYCZNY BAKTERII KWASU MLEKOWEGO CZĘŚĆ II – WEWNĄTRZKOMÓRKOWE PEPTYDAZY**

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

<sup>1</sup>Institut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa  
monika.garbowska@ibprs.pl

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

### **Streszczenie**

W niniejszej pracy przedstawiono ogólną charakterystykę wewnątrzkomórkowych peptydaz LAB, które biorą udział w degradacji kazeiny. Scharakteryzowano następujące grupy: endopeptydazy (PepO, PepF), główne aminopeptydazy (PepN, PepC), specyficzne aminopeptydazy (PepA, Pcp, PepM, PepL), prolino-specyficzne aminopeptydazy (PepX, PepI, PepR, PepQ, PepP), tripeptydazy (PepT) i dipeptydazy (PepV, PepD). Opisano wiele wewnątrzkomórkowych peptydaz, które zostały wyizolowane, oczyszczone i scharakteryzowane dokładniej pod względem cech biochemicznych.

**Słowa kluczowe:** bakterie kwasu mlekowego, proteoliza, wewnątrzkomórkowe peptydazy

## **THE PROTEOLYTIC SYSTEM OF LACTIC ACID BACTERIA. PART II – INTRACELLULAR PEPTIDASES**

### **Summary**

In this study presents the general characteristics of intracellular peptidases of LAB, which are involved in the degradation of casein. The following groups were characterized: endopeptidases (PepO, PepF), general aminopeptidases (PepN, PepC), a specific aminopeptidases (PepA, Pcp, PepM, PepL), proline-specific aminopeptidases (PepX, PepI, PepR, PepQ, PepP), tripeptidases (PepT) and dipeptidases (PepV, PepD). Described many intracellular peptidases which have been isolated, purified and accurately characterized in terms of biochemical features.

**Key words:** lactic acid bacteria, proteolysis, intracellular peptidases

### **WSTĘP**

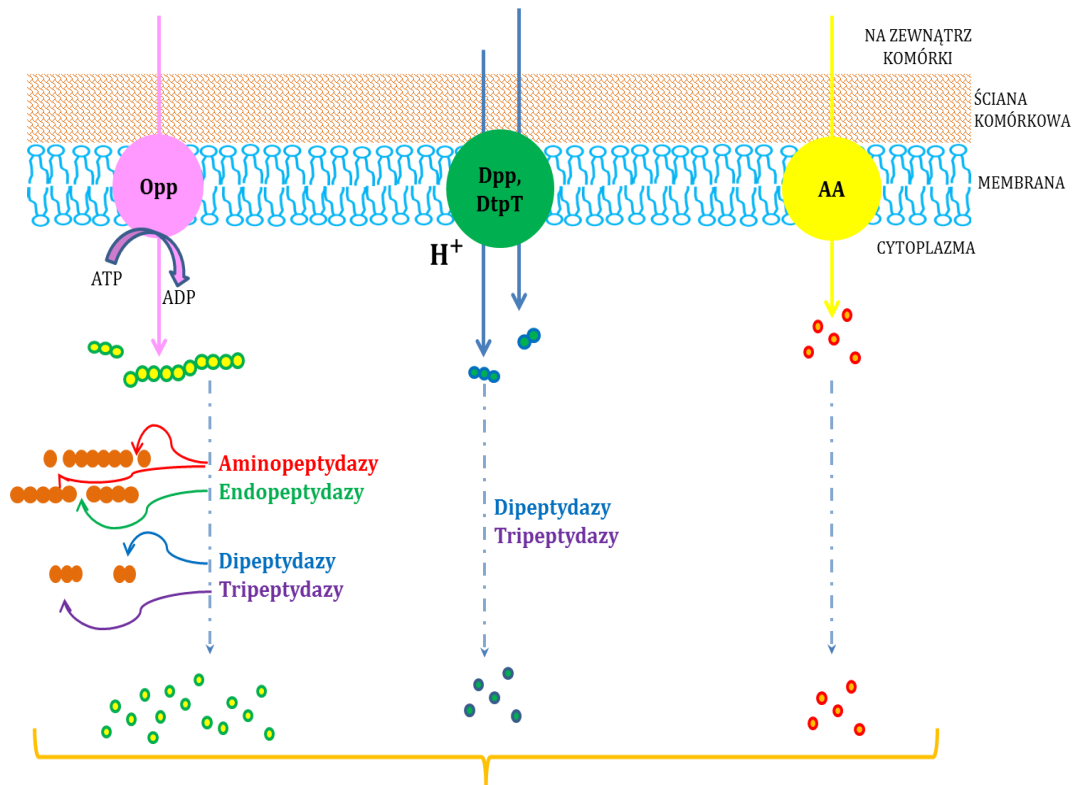
Bakterie kwasu mlekowego (LAB) od lat są wykorzystywane w produkcji wielu mlecznych produktów fermentowanych, takich jak sery czy jogurty. Do głównych funkcji tych bakterii zaliczamy (I) fermentację i wykorzystanie cukru mleka – laktozy, (II) redukcję

potencjału redox, (III) fermentację cytrynianów oraz (IV) rozkład białek mleka – kazeiny. Rozkład kazeiny przez bakterie kwasu mlekowego odgrywa zasadniczą rolę w tworzeniu zapachu, smaku i tekstury produktów mlecznych. Optymalny wzrost LAB w mleku opiera się na złożonym systemie proteolitycznym bakterii, który składa się z trzech podstawowych elementów: proteinaz związanych ze ścianą komórkową (PrtP), zlokalizowanych w membranie, systemów transportu peptydów (DtpT, Opp, Dpp) oraz różnorodnych wewnątrzkomórkowych peptydaz. Proteinazy związane ze ścianą komórkową rozpoczynają rozkład kazeiny przez bakterie mlekowe w wyniku czego tworzone są peptydy zawierające od 4 do 30 aminokwasów. Produkty rozkładu kazeiny przez zewnątrzkomórkowe proteinazy są następnie przenoszone do wnętrza komórki przez specyficzne transportery. Transporter DtpT odpowiedzialny jest za przenoszenie hydrofilowych di- i tripeptydów. Systemy transportowe Opp i Dpp (DppA, DppP) zaliczane są do rodziny transporterów ABC. Opp odpowiada za transport peptydów zawierających od 4 do 35 aminokwasów, DppA za transport di- i tripeptydów, natomiast DppP za transport peptydów zawierających co najmniej 9 aminokwasów. Peptydy przetransportowane do wnętrza komórki ulegają dalszym przemianom do prostszych związków w wyniku działania wewnątrzkomórkowych peptydaz, których charakterystykę przedstawiono poniżej [Kunji i in. 1996, Savijoki i in. 2006].

### **WEWNĄTRZKOMÓRKOWE PEPTYDAZY**

Produkty rozkładu kazeiny znajdujące się już we wnętrzu komórki ulegają rozkładowi do prostszych związków przez peptydazy wewnątrzkomórkowe. Wiele enzymów zaliczonych do tej grupy zostało obecnie wyizolowanych, oczyszczonych i scharakteryzowanych pod względem cech biochemicznych. Enzymy te pochodziły od różnych szczepów bakterii z rodzaju *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus* [Savijoki i in. 2006].

Wśród peptydaz wewnątrzkomórkowych można wyróżnić aktywność egzo- i endopeptydazową. Pierwsza dotyczy enzymów takich jak aminopeptydazy, di-, tripeptydazy oraz prolino-specyficzne peptydazy, a w wyniku ich aktywności powstają aminokwasy i dipeptydy. Druga aktywność dotyczy endopeptydaz, dzięki którym tworzone są krótkie peptydy, produkty podlegające dalszej hydrolizie (rysunek 1) [Tan i in. 1991, Kunji i in. 1996, Law, Haandrikman 1997].



AA wykorzystywane do tworzenia białek komórki lub przekształcane w inne związki

**Rysunek 1.** Wewnątrzkomórkowe peptydazy LAB  
*The intracellular peptidases of LAB*

Wewnątrzkomórkowe endopeptydazy, aminopeptydazy (PepN i PepC) oraz X-prolilodipeptydylowa aminopeptydaza (PepX) są pierwszymi enzymami biorącymi udział w hydrolizie oligopeptydów [Savijoki i in. 2006, Smit i in. 2005]. Wybrane peptydazy wewnątrzkomórkowe wyizolowane z LAB przedstawiono w tabelach 1, 2, 3 i 4.

Wśród wewnątrzkomórkowych peptydaz wyróżnia się następujące grupy [Kunji i in. 1996, Sousa i in. 2001, McSweeney 2004]:

- I. Endopeptydazy: **PepO**, **PepF**
- II. Główne aminopeptydazy: **PepN** (N-aminopeptydaza), **PepC** (C-aminopeptydaza)
- III. Specyficzne aminopeptydazy: **PepA** (glutaminowa aminopeptydaza)  
**Pep** (pirolidono-karboksyłowa peptydaza), **PepM** (metioninowa aminopeptydaza),  
**PepL** (leucynowa aminopeptydaza)
- IV. Prolino-specyficzne peptydazy: **PepX** (X-prolilodipeptydylowa aminopeptydaza),  
**PepI** (prolino-iminopeptydaza), **PepR** (prolinaza), **PepQ** (prolidaza), **PepP**  
(aminopeptydaza P)
- V. Dipeptydazy: **PepV**, **PepD**
- VI. Tripeptydazy: **PepT**.

### Endopeptydazy

Pierwszą endopeptydazę wyizolowaną z *Lactococcus lactis ssp. cremoris* Wg2 – PepO scharakteryzowali Tan i in. w 1991 roku. Jest to monomeryczna metalopeptydaza o masie 70 kDa, zdolna do rozkładu oligopeptydów, ale niewykazująca zdolności hydrolizy całych miceli kazeiny oraz peptydów krótkołańcuchowych, zawierających mniej niż 4 reszty aminokwasowe (di-, tri- i tetrapeptydy). Najbardziej preferowanym substratem peptydaz pochodzących z kultur starterowych LAB są fragmenty  $\alpha_{s1}$ -kazeiny zawierające aminokwasy z pozycji f1-23 i  $\beta$ -kazeiny f193-209, które określono dla endopeptydazy PepO *Lactobacillus rhamnosus*, jak i PepO2 pochodzącej z *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 [Christensson i in. 2002, Chen i in. 2003]. Analiza sekwencji genomu wykazała, że gen *pepO* u *Lactococcus* jest ostatnim genem wchodzącym w skład operonu kodującego system transportu Opp. Sugeruje to, że te dwa systemy są powiązane fizjologicznie, i tłumaczy, dlaczego peptydaza PepO działa bezpośrednio po przetransportowaniu peptydów do wnętrza komórki [Tan i in. 1991, Tynkkynen i in. 1993, Law, Haandrikman 1997].

Endopeptydazę PepF wyizolowano z *Lactococcus lactis ssp. lactis* NCDO 763 i scharakteryzowano w 1994 roku. Endopeptydaza ta należy do rodziny białek M3, w skład której wchodzi oligopeptydazy o wielkości 70 kDa. Jest monomeryczną metalopeptydazą wykazującą szeroką specyficzność jedynie w stosunku do peptydów o długości łańcucha od 7 do 17 reszt aminokwasowych. Gen *pepF* kodowany jest na plazmidzie o wielkości 55 kbp [Monnet i in. 1994].

**Tabela 1.** Wybrane wewnątrzkomórkowe endopeptydazy LAB  
*Selected intracellular endopeptidases of LAB*

Peptydaza	Typ	Szczep LAB	Źródło literaturowe
<b>Endopeptydazy</b>			
<b>PepO</b>	M	<i>Lactococcus lactis</i> P8-2-47	Mierau i in. 1993
	M	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Chen, Steele 1998
	M	<i>Streptococcus thermophilus</i> A	Chavagnat i in. 2000
	M	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001	Christensson i in. 2002
<b>PepF</b>	M	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403/NCDO763	Nardi i in. 1997
	M	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Sridhar i in. 2005
<b>PepG</b>	C	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> DSM7290	Klein i in. 1997
<b>PepE</b>	C	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Fenster i in. 1997

M – metalopeptydaza; C – cysteinowa peptydaza

Z kolei u bakterii z rodzaju *Lactobacillus* występują endopeptydazy PepE oraz PepG. Endopeptydazę PepE wyizolowano między innymi z *Lactobacillus helveticus* DPC 4571 oraz *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. Bierze ona udział w rozkładzie gorzkich peptydów powstających podczas dojrzewania serów [Fenster i in. 1997, Sridhar i in. 2005, Callanan i in. 2008]. Natomiast PepG to cysteinowa endopeptydaza należąca do grupy enzymów EC 3.4.22, po raz pierwszy wyizolowana z *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290. Zaliczono ją do aminopeptydaz, które charakteryzują się wąską specyficznością substratową, i wykazuje podobieństwo do aminopeptydazy PepC [Klein i in. 1997]. Liu i in. (2010) zaliczają endopeptydazy PepG do peptydaz MEROPS, rodziny C1-B. Większość endopeptydaz to metalopeptydazy, wyjątek stanowi endopeptydaza PepE pochodząca z *Lactobacillus helveticus*, która wykazuje aktywność tiolo-zależną [Fenster i in. 1997].

### 1. Aminopeptydazy

Aminopeptydazy odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu smaku fermentowanych produktów mlecznych dzięki zdolności uwalniania pojedynczych aminokwasów z oligopeptydów powstałych w wyniku działania proteinaz związanych ze ścianą komórkową [Law, Haandrikman 1997]. W obrębie tej grupy wyróżniamy główne aminopeptydazy PepN i PepC oraz specyficzne aminopeptydazy PepA, PepM, PepL oraz Pcp [Upadhyay i in. 2004, Savijoki i in. 2006]. Główne aminopeptydazy działają na aminokwasy na N-końcu łańcucha peptydowego, a ich specyfika zależy zarówno od długości łańcucha oligopeptydowego, jak i od właściwości N-końcowego aminokwasu [Kunji i in. 1996, Christensen i in. 1999].

PepN to metalopeptydaza występująca w postaci monomerycznej lub dimeru o masie molekularnej od 85 do 98 kDa [Kunji i in. 1996, Upadhyay i in. 2004]. Aminopeptydaza

PepN z *Lactobacillus curvatus* DPC2024 występuje w postaci dimeru o masie podjednostek około 32 i 64 kDa, natomiast wyizolowana z *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* B14, *Lactococcus lactis ssp. lactis* MG1363 oraz *Lactococcus lactis ssp. cremoris* Wg2 jest to monomer o masie około 95 kDa [Tan, Konings 1990, Tan i in. 1991, Bockelmann 1995, Magboul, McSweeney 1999].

**Tabela 2.** Wybrane wewnątrzkomórkowe aminopeptydazy LAB  
*Selected intracellular aminopeptidases of LAB*

Peptydaza	Typ	Szczep LAB	Źródło literaturowe
<b>Główne aminopeptydazy</b>			
<b>PepN</b>	M	<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Tan i in. 1992
	M	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> DSM7290	Klein i in. 1993
	M	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Christensen i in. 1995
	M	<i>Streptococcus thermophilus</i> A	Chavagnat i in. 1999
<b>PepC</b>	C	<i>Lactococcus lactis</i> AM2	Chapot-Chartier i in. 1993
	C	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> DSM7290	Klein i in. 1994a
	C	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Fernández i in. 1994
	C	<i>Streptococcus thermophilus</i> A	Chapot-Chartier i in. 1994
<b>Specyficzne aminopeptydazy</b>			
<b>PepA</b>	M	<i>Lactococcus lactis</i> FI1876	I'Anson i in. 1995
<b>PepL</b>	S	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> DSM7290	Klein i in. 1995
<b>PepS</b>	M	<i>Streptococcus thermophilus</i> A	Fernandez-Espla, Rul 1999

M – metalopeptydaza; S – serynowa peptydaza; C – cysteinowa peptydaza

Aminopeptydaza PepN zdolna jest do uwalniania pojedynczych aminokwasów z N-końca łańcucha peptydowego, wykazując szeroką specyficzność zarówno względem oligo-, jak i di- i tripeptydów [Kunji i in. 1996, Law, Haandrikman 1997]. Aminopeptydaza PepN nie hydrolizuje substratów zawierających resztę Glu, Asp, czy Pro na N-końcu łańcucha peptydowego oraz dipeptydów zawierających prolinę [Upadhyay i in. 2004]. Enzym wyizolowany z *Lc. lactis* wykazywał wyraźne preferencje w stosunku do dipeptydów zawierających na N-końcu łańcucha peptydowego argininę, a wzrost aktywności obserwowano wraz ze wzrostem hydrofobowości C-końcowego aminokwasu w dipeptydzie Arg-X [Niven i in. 1995]. Podobną zależność zaobserwowali Miyakawa i in. (1992) w przypadku PepN u *Lactobacillus helveticus* hydrolizujących Ala-X i Leu-X.

Aminopeptydaza PepC wyizolowana z *Lactococcus lactis ssp. cremoris* AM2 ma formę heksameru składającego się z 6 identycznych podjednostek o masie 50 kDa. Jest ona tiolową

aminopeptydazą charakteryzującą się szeroką specyficznością substratową, także wobec di-, tripeptydów, poza substratami zawierającymi resztę proliny na N-końcu łańcucha peptydowego [Neviani i in. 1989]. Dla *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* B14 najodpowiedniejszymi substratami są di-, tripeptydy, a najwyższe aktywności stwierdzono w stosunku do substratu Leu-Gly [Bockelmann 1995].

Enzymy zakwalifikowane do PepC, występujące w postaci tetramerycznej lub heksamerycznej, wykazują szczególnie wysoką aktywność wobec substratów zawierających aminokwasy hydrofobowe. Stwierdzono pewne preferencje PepC do dipeptydów zawierających alaninę, leucynę i lizynę na N-końcu łańcucha peptydowego [Neviani i in. 1989, Kunji i in. 1996, Upadhyay i in. 2004].

Poza głównymi aminopeptydazami wyróżniono aminopeptydazy wykazujące wąską specyficzność substratową. Do grupy tej zaliczono glutaminową metalopeptydazę (PepA), uwalniającą z N-końca łańcucha peptydowego kwas glutaminowy (Glu) oraz kwas asparaginowy (Asp) [Kunji i in. 1996, Upadhyay i in. 2004]. PepA wyizolowana z *Lactococcus lactis ssp. cremoris* AM2 o masie molekularnej 240 kDa i budowie heksamerycznej składa się z identycznych podjednostek o masie 39,8 kDa. Najintensywniej hydrolizuje dipeptydy posiadające reszty kwasu asparaginowego, glutaminowego lub seryny na N-końcu łańcucha, wykazując także zdolność rozkładu tripeptydów i oligopeptydów zawierających do 10 aminokwasów [Niven 1991, Bacon i in. 1994]. Z kolei aminopeptydazę PepS cechuje silne powinowactwo do peptydów złożonych z od 2 do 5 aminokwasów zawierających argininę lub aromatyczne aminokwasy na N-końcu łańcucha peptydowego [Fernandez-Espla, Rul 1999]. Specyficzną aminopeptydazą jest również peptydaza PepL, wyizolowana z *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* i *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Wykazuje ona wysoką specyficzność w stosunku do di- i tripeptydów zawierających N-końcową resztę leucyny, a wybiórczo w stosunku do proliny [Wohlrab, Bockelman 1994, Klein i in. 1995]. Aminopeptydaza leucynowa (PepL) zaliczana jest do rodziny peptydaz S33 wraz z PepR i PepI [Liu i in. 2010].

Aminopeptydaza PepM, działając na substrat, odcina N-końcową resztę metioniny. W przypadku wszystkich badanych przez Liu i in. (2010) szczepów bakterii kwasu mlekowego stwierdzono występowanie pojedynczego genu *pepM*, z wyjątkiem *Lactobacillus brevis* ATCC 367, u którego opisano dwie aminopeptydazy PepM.

Inną omawianą aminopeptydazą jest pirolidono-karboksylowa peptydaza Pcp, którą po raz pierwszy wyizolowano z *Pseudomonas fluorescens*, ale potwierdzono jej obecność także u bakterii LAB. Wykazuje specyficzność w stosunku do reszt kwasu piroglutaminowego,

które uwalnia z N-końca łańcucha peptydów i białek. Reszty piroglutaminianowe zlokalizowano w gorzkich peptydach pochodzących z rozkładu  $\beta$ -kazeiny przez proteiny [Exterkate 1977, Visser i in. 1988, Law, Haandrikman 1997].

## 2. Prolino-specyficzne peptydazy

Wysoka zawartość proliny w kazeinie (11,7% w  $\alpha$ -kazeinie i 16,7% w  $\beta$ -kazeinie) powoduje, że enzymy prolino-specyficzne są szczególnie ważne dla prawidłowego wzrostu bakterii kwasu mlekowego i proteolizy w produktach mlecznych [Law, Haandrikman 1997].

X-prolino-dipeptydylowa aminopeptydaza PepX (EC 3.4.14.5), zdolna do uwalniania dipeptydów o składzie X-Pro z N-końca łańcucha peptydowego, jest najlepiej poznana wśród peptydaz prolino-specyficznych. Zaliczana jest do peptydaz serynowych, które izolowano z różnych bakterii mlekowych takich jak: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus* [Yan i in. 1992, Meyer-Barton i in. 1993, Habibi-Najafi, Lee 1994, Yüksel, Steele 1996, Varmanen i in. 2000a, Anastasiou i in. 2002]. Wśród aminopeptydaz PepX występują różnice w masie molekularnej monomerów i strukturze czwartorzędowej, które mogą wynikać ze stosowania różnych metod do określenia ich wielkości [Kunji i in. 1996].

PepX pochodząca z *Lactococcus lactis ssp. lactis* H1 posiada masę molekularną około 150 kDa. Składa się z podjednostek o masie około 82–83 kDa [Lloyd, Pritchard 1991]. Z kolei PepX izolowana z *Lactobacillus sakei* CECE charakteryzuje się masą około 170 kDa, której podjednostki mają około 88 kDa. Najwyższą aktywność tego enzymu zaobserwowano w przypadku, kiedy prolina znajdowała się na przedostatniej pozycji od N-końca łańcucha peptydowego, natomiast gdy w tej pozycji była alanina, aktywność ta wynosiła jedynie 10% wartości maksymalnej [Sanz, Toldra 2001]. W wyniku działalności PepX na oligopeptydy uwalniane są dipeptydy zawierające C-końcową prolinę. Peptydy te mogą być następnie degradowane przez prolidazy hydrolizujące tylko i wyłącznie dipeptydy zawierające C-końcową prolinę [Law, Haandrikman 1997].



**Tabela 3.** Wybrane wewnątrzkomórkowe prolino-specyficzne peptydazy LAB  
*Selected intracellular proline-specific peptidases of LAB*

Peptydaza	Typ	Szczep LAB	Źródło literaturowe
<b>Prolino-specyficzne peptydazy</b>			
<b>PepQ</b>	M	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> AM2	Booth i in. 1990b
	M	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	Stucky i in. 1995b
	M	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CNRZ397	Morel i in. 1999
<b>PepI</b>	S	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	Klein i in. 1994b
	S	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CNRZ397	Gilbert i in. 1994
	S	<i>Lactobacillus helveticus</i> 53/7	Varmanen i in. 1996a
	M	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> HP	Baankreis, Exterkate 1991
<b>PepR</b>	S	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Shao i in. 1997
	S	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1/6	Varmanen i in. 1998
<b>PepX</b>	S	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> nTR	Yan i in. 1992
	S	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	Meyer-Barton i in. 1993
	S	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Yüksel, Steele 1996
	S	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1/6	Varmanen i in. 2000a
	S	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> LLG	Habibi-Najafi, Lee 1994
	S	<i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC4	Anastasiou i in. 2002
<b>PepP</b>	M	<i>Lactococcus lactis</i>	Matos i in. 1998

M – metalopeptydaza; S – serynowa peptydaza

Prolidaza (PepQ, EC 3.4.13.9) to metalopeptydaza o wysokiej specyficzności w stosunku do dipeptydów typu X-Pro, z wyjątkiem Pro-Pro oraz Gly-Pro. Jest to enzym prolino-specyficzny, hydrolizujący dipeptydy zawierające prolinę w drugiej pozycji od N-końca łańcucha peptydowego [Law, Haandrikman 1997, Morel i in. 1999, Savijoki i in. 2006]. Kolejną prolino-specyficzną peptydazą jest prolinaza (PepR, EC 3.4.13.8), specyficzna wobec dipeptydów o składzie Pro-X. Wyzolowana została z *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus rhamnosus* [Dudley, Steele 1994, Varmanen i in. 1996b, Varmanen i in. 1998]. Wykazuje ona silne powinowactwo do dipeptydów typu Pro-X, a także wysoką aktywność względem dipeptydów takich jak: Thr-Leu, Pro-Met, Pro-Leu, Met-Ala, Leu-Ser oraz Pro-Phe. Wskazuje to na wysokie powinowactwo w stosunku do dipeptydów złożonych z aminokwasów obojętnych i niepolarnych, a także w stosunku do niektórych dipeptydów zawierających aminokwasy obojętne, polarne (treonina) na N-końcu łańcucha dipeptydowego [Shao i in. 1997]. Obecność tego enzymu stwierdzana jest głównie u *Lactobacillus* [Liu i in. 2010].

Aminopeptydaza PepP (EC 3.4.11.9) należy do grupy metalopeptydaz uwalniających z N-końca łańcucha pojedyncze aminokwasy wówczas, gdy prolina znajduje się na przedostatnim miejscu. W szczególności hydrolizuje oligopeptydy zawierające do 10 aminokwasów i prolinę w pozycji  $X\downarrow\text{Pro-Pro-(X)}_n$  i  $X\downarrow\text{Pro-(X)}_n$ . Enzym ten należy do rodziny M24 i wykazuje wysoką homologię z aminopeptydazami PepM. W przeciwieństwie do PepX, aminopeptydaza PepP nie odgrywa istotnej roli w metabolizmie azotu u bakterii [Matos i in. 1998].

Iminopeptydaza prolinowa (PepI, EC 3.4.11.5) katalizuje uwalnianie reszty proliny z N-końca łańcucha di-, tri- oraz oligopeptydów, co pozwala na usunięcie proliny blokującej łańcuch peptydowy, czyniąc go dostępnym dla innych enzymów [Klein i in. 1994b]. PepI jest charakterystyczna dla pałeczek mlekowych, natomiast w przypadku *Lactococcus* wyizolowana została jedynie z *Lactococcus lactis subsp. cremoris* HP [Upadhyay i in. 2004]. U *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CNRZ397 występuje jako trimeryczna peptydaza serynowa z podjednostkami o masie około 33 kDa, co łącznie daje masę około 100 kDa. Charakteryzuje się silną hydrolizą dipeptydów typu Pro-X i tripeptydów Pro-Gly-Gly, a wykazuje niższą aktywność w stosunku do Ala-X, Gly-X i Leu-X [Gilbert i in. 1994]. Liu i in. (2010) przypuszczają, że PepI, PepR i PepL mogą specyficznie wspomagać zdolności proteolityczne bakterii *Lactobacillus*, działając wobec peptydów zawierających prolinę.

### 3. Dipeptydazy

Hydroliza dipeptydów może być prowadzona przez szereg różnych enzymów, do których zaliczone są ogólne aminopeptydazy oraz aminopeptydazy prolinowe. Występuje jednak grupa enzymów – dipeptydaz odpowiedzialnych za hydrolizę jedynie dipeptydów [Law, Haandrikman 1997].

Dipeptydy tworzone w wyniku działalności endopeptydaz, głównych aminopeptydaz i PepX stanowią substrat dla di- i tripeptydaz. Wśród dipeptydaz wyróżniamy dipeptydazy PepV oraz PepD. Generalnie wykazują one silne powinowactwo do substratów zawierających hydrofobowe aminokwasy takie jak: leucyna, metionina, glicyna i fenyloalanina [Savijoki i in. 2006].

Dipeptydazy PepV izolowano z *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* i *Lactobacillus helveticus*, natomiast PepD z *Lactobacillus helveticus*. Pomimo podobnej wielkości podjednostek i specyficzności, dipeptydazy PepV i PepD różnią się optymalnym pH ich działania, strukturą czwartorzędową (PepV-monomer, PepD-oktomer) i właściwościami katalitycznymi (PepV-metalopeptydaza, PepD-tiolowa peptydaza)

[Vongerichten i in. 1994, Kunji i in. 1996, Dudley i in. 1996, Hellendoorn i in. 1997].

**Tabela 4.** Wybrane wewnątrzkomórkowe di- i tripeptydazy LAB  
*Selected intracellular di- and tripeptidases of LAB*

Peptydaza	Typ	Szczep LAB	Źródło literaturowe
<b>Dipeptydazy</b>			
<b>PepD</b>	C	<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	Dudley i in. 1996
<b>PepV</b>	M	<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Hellendoorn i in. 1997
	M	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> DSM7290	Vongerichten i in. 1994
<b>Tripeptydazy</b>			
<b>PepT</b>	M	<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Mierau i in. 1994
	M	<i>Lactobacillus helveticus</i> 53/7	Savijoki, Palva 2000

M – metalopeptydaza; C – cysteinowa peptydaza

Dipeptydazy PepV wyizolowano między innymi z *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. Enzymy te należą do metalo-zależnych dipeptydaz o masie molekularnej około 50 kDa, zdolnych do hydrolizy dipeptydów o różnym składzie, posiadających relatywnie hydrofobowe aminokwasy. Dipeptydaza PepV nie wykazuje działania wobec dipeptydów, które w swoim składzie zawierają prolinę, kwas glutaminowy i asparginowy, a także wobec dłuższych peptydów, takich jak tri- i oligopeptydy. Optimum działania PepV określono przy pH 8,0 i temperaturze 55°C. Stwierdzono pewne różnice w specyficzności enzymów PepV u różnych mikroorganizmów. Dipeptydazy pochodzące z bakterii rodzaju *Lactococcus* hydrolizują substraty Ala-Ala i Ala-Gly, natomiast dipeptydazy *Lactobacillus helveticus* nie hydrolizują, z kolei odwrotną zależność określono dla His-Leu [Tan i in. 1995].

Dipeptydaza PepD wyizolowana została między innymi z *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 [Dudley i in. 1996]. Jest to peptydaza cysteinowa, posiadająca masę około 53,5 kDa i optimum działania przy pH 6,0. Gen *pepDA* wykazuje niską konserwatywność w obrębie badanego szczepu. Dodatkowo, nie stwierdzono różnic w aktywności pomiędzy szczepem dzikim a szczepem z usuniętym genem *pepDA*, co wskazuje na to, że zakres aktywności innych peptydaz pokrywa się z zakresem aktywności dipeptydazy PepD [Dudley i in. 1996, Kunji i in. 1996].

Hydroliza dipeptydów jest prowadzona przez wiele różnych enzymów nie tylko przez dipeptydazy, lecz także przez główne aminopeptydazy i prolino-imidopeptydazy, które mogą wykazywać powinowactwo do tych samych substratów [Law, Haandrikman 1997].

#### 4. Tripeptydazy

Tripeptydaza PepT wyizolowana przez Savijoki, Palva [2000] z *Lactobacillus helveticus* 53/7 jest trimeryczną metalopeptydazą o masie podjednostki około 47 kDa. Enzym ten

hydrolizował wszystkie badane przez autorów tripeptydy, przy czym najwyższą aktywność wykazywał w stosunku do Met-Gly-Gly, a minimalną w stosunku do dipeptydów. Nie stwierdzili jego aktywności w stosunku do substratów zawierających więcej niż 3 reszty aminokwasowe.

## PIŚMIENNICTWO

1. Anastasiou R., Papadelli M., Georgalaki M.D., Kalantzopoulos G., Tsakalisou E. (2002). Cloning and sequencing of the gene encoding X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase (PepX) from *Streptococcus thermophilus* strain ACA-DC4. *J. Appl. Microbiol.*, 93, 52-59
2. Baankreis R., Exterkate R. (1991). Characterization of a peptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP that hydrolyses di- and tripeptides containing proline or hydrophobic residues as the aminoterminal amino acid. *Syst. Appl. Microbiol.*, 14, 317-323
3. Bacon C.L., Jennings V.P., Fhaolain I.N., O'Cuinn G. (1994). Purification and characterization of an aminopeptidase A from cytoplasm of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Intern. Dairy J.*, 4, 503-519
4. Bockelmann W. (1995). The proteolytic system of starter and non-starter bacteria: components and their importance for cheese ripening. *Intern. Dairy J.*, 5, 977-994
5. Booth M., Jennings P.V., Fhaoláin I.N., O'Cuinn G. (1990b). Prolidase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2: partial purification and characterization. *J. Dairy Res.*, 57, 245-254
6. Callanan M., Kaleta P., O'Callaghan J., O'Sullivan O., Jordan K., McAuliffe O., Sangrador-Vegas A., Slattery L., Fitzgerald G.F., Beresford T., Ross R.P. (2008). Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J. Bacteriol.*, 190, 727-735
7. Chapot-Chartier M.P., Nardi M., Chopin M.C., Chopin A., Gripon J.C. (1993). Cloning and sequencing of pepC, a cysteine aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AM2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 330-333
8. Chapot-Chartier M.P., Rul F., Nardi M., Gripon J.C. (1994). Gene cloning and characterization of PepC, a cysteine aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus*, with sequence similarity to the eukaryotic bleomycin hydrolase. *Europ. J. Biochem.*, 224, 497-506
9. Chavagnat F., Casey M.G., Meyer J. (1999). Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and over expression of aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3001-3007
10. Chavagnat F., Meyer J., Casey M.G. (2000). Purification, characterization, cloning and sequencing of the gene encoding oligopeptidase PepO from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Microbiol. Lett.*, 191, 79-85
11. 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

12. 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
13. Christensen J., Lin D., Palva A., Steele J. (1995). Sequence analysis, distribution and expression of an aminopeptidase gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Gene*, 155, 89-93
14. 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
15. Christensson C., Bratt H., Collins L.J., Coolbear T., Holland R., Lubbers M.W., O'Toole P.W., Reid J.R. (2002). Cloning and expression of an oligopeptidase, PepO, with novel specificity from *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20). *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 254-262
16. Dudley E.G., Steele J.L. (1994). Nucleotide sequence and distribution of the *pepPN* gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *FEMS Microbiol. Lett.*, 119, 41-46
17. Dudley E.G., Husgen A.C., He W., Steele J.L. (1996). Sequencing, distribution, and inactivation of the dipeptidase A gene (*pepDA*) from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.*, 178, 701-704
18. Exterkate F.A. (1977). Pyrrolidone carboxyl peptidase in *Streptococcus cremoris*: dependence on an interaction with membrane components. *J. Bacteriol.*, 129, 1281-1288
19. Fenster K.M., Parkin K.L., Steele J.L. (1997). Characterization of an thiol-dependent endopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.*, 179, 2529-2533
20. Fernández L., Bhowmik T., Steele J. (1994). Characterization of the *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 *pepC* gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 333-336
21. Fernandez-Espla M.D., Rul F. (1999). A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *Europ. J. Biochem.*, 263, 502-510
22. Gilbert C., Atlan D., Blanc B., Portalier R., Germond J.E., Lapierre L. i Mollet B. (1994). Proline iminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CNRZ397: purification and characterization. *Microbiology*, 140, 537-542
23. Habibi-Najafi M.B., Lee B.H. (1994). Purification and characterization of X-prolyl dipeptidyl peptidase from *Lactobacillus casei subsp. casei* LLG. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42, 280-286
24. Hellendoorn M.A., Franke-Fayard B.M., Mierau I., Venema G., Kok J. (1997). Cloning and analysis of the *pepV* dipeptidase gene of *Lactococcus lactis* MG1363. *J. Bacteriol.*, 179, 3410-3415
25. I'Anson K., Movahedi S., Griffin H., Gasson M., Mulholland F. (1995). A non-essential glutamyl aminopeptidase is required for optimal growth of *Lactococcus lactis* MG3163 in milk. *Microbiology*, 141, 2873-2881
26. Klein J., Klein U., Schad M., Plapp R. (1993). Cloning, DNA-sequence and partial characterization of *pepN*, a lysyl aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* DSM 7290. *Europ. J. Biochem.*, 217, 105-114
27. Klein J., Henrich B., Plapp R. (1994a). Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* DSM7290 cysteine aminopeptidase gene *pepC*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 124, 291-300

28. Klein J., Schmidt U., Plapp R. (1994b). Cloning, heterologous expression, and sequencing of a novel proline iminopeptidase gene, *pepI*, from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290. *Microbiology*, 140, 1133-1139
29. Klein J., Dick A., Schick J., Matern H., Henrich B., Plapp R. (1995). Molecular cloning and DNA sequence analysis of *pepL*, a leucyl aminopeptidase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290. *Europ. J. Biochem.*, 228, 570-578
30. Klein J.R., Schick J., Henrich B., Plapp R. (1997). *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290 *pepG* gene encodes a novel cysteine aminopeptidase. *Microbiology*, 143, 527-537
31. 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
32. Law J., Haandrikman A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. Review article. *Intern. Dairy J.*, 7, 1-11
33. 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
34. Lloyd R.J., Pritchard G.G. (1991). Characterization of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *J. General Microbiol.*, 137, 49-55
35. Magboul A.A.A., McSweeney P.L.H. (1999). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024. *Food Chem.*, 67, 233-240
36. Matos J., Nardi M., Kumura H., Monnet V. (1998). Genetic characterization of *pepP*, which encodes an aminopeptidase P whose deficiency does not affect *Lactococcus lactis* growth in milk, unlike deficiency of the X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4591-4595
37. McSweeney P.L.H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *Intern. J. Dairy Technol.*, 57, 127-144
38. Meyer-Barton E.C., Klein J.R., Imam M., Plapp R. (1993). Cloning and sequence analysis of the X-prolyl-dipeptidyl-aminopeptidase gene (*pepX*) from *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* DSM7290. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 82-89
39. Mierau I., Tan P., Haandrikman A., Mayo B., Kok J., Konings W., Venema G. (1993). Cloning and sequencing of the gene for a lactococcal endopeptidase, an enzyme with sequence similarity to mammalian enkephalinase. *J. Bacteriol.*, 175, 2087-2096
40. Mierau I., Haandrikman A., Velterop O., Tan P., Leenhouts K., Kok J., Venema G. (1994). Tripeptidase gene (*pepT*) of *Lactococcus lactis*: molecular cloning and nucleotide sequencing of *pepT* and construction of a chromosomal deletion mutant. *J. Bacteriol.*, 176, 2854-2861
41. Miyakawa H., Kobayashi S., Shimamura S., Tomita M. (1992). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511. *J. Dairy Sci.*, 75, 27-35
42. Monnet V., Nardi M., Chopin A., Chopin M.C., Gripon J.C. (1994). Biochemical and genetic characterization of *PepF*, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 269, 32070-32076
43. Morel F., Frot-Coutaz J., Aubel D., Portalier R., Atlan D. (1999). Characterization of a prolidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CNRZ 397 with an unusual regulation of biosynthesis. *Microbiology*, 145, 437-446

44. Nardi M., Renault P., Monnet F. (1997). Duplication of the *pepF* gene and shuffling of DNA fragments on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol., 179, 4164-4171
45. Neviani E., Boquien C.Y., Monnet V., Thanh L.P., Gripon J.C. (1989). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2. Appl. Environ. Microbiol., 55, 2308-2314
46. Niven G.W. (1991). Purification and characterization of aminopeptidase A from *Lactococcus lactis subsp. lactis* NCDO712. J. General Microbiol., 137, 1207-1212
47. Niven G.W., Holder S.A., Strømman P. (1995). A study of the substrate specificity of aminopeptidase N from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 100-105
48. Sanz Y., Toldra F. (2001). Purification and Characterization of an X-Prolyl-Dipeptidyl Peptidase from *Lactobacillus sakei*. Appl. Environ. Microbiol., 67, 1815-1820
49. Savijoki K., Palva A. (2000). Purification and molecular characterization of tripeptidase (PepT) from *Lactobacillus helveticus*. Appl. Environ. Microbiol., 66, 794-800
50. Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol., 71, 394-406
51. Shao W., Yuksel G.U., Dudley E.G., Parkin K.L., Steele J.L. (1997). Biochemical and molecular characterization of PepR, a dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. Appl. Environ. Microbiol., 63, 3438-3443
52. 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
53. Sousa M.J., Ardö Y., McSweeney P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. Intern. Dairy J., 11, 327-345
54. 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
55. Stucky K., Klein J., Schüller A., Matern H., Henrich B., Plapp R. (1995b). Cloning and DNA sequence analysis of *pepQ*, a prolidase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290 and partial characterization of its product. Molecular and General Genetics MGG, 247, 494-500
56. Tan P.S.T., Konings W.N. (1990). Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol., 56, 526-532
57. Tan P.S.T., Pos K.M., Konings W.N. (1991). Purification and characterization of an endopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol., 57, 3593-3599
58. Tan P., van Alen-Boerringter I., Poolman B., Siezen R., de Vos W., Konings W. (1992). Characterization of the *Lactococcus lactis pepN* encoding an aminopeptidase homologous to mammalian aminopeptidase N. FEMS Lett., 306, 9-16
59. Tan P.S.T., Sasaki M., Bosman W., Iwasaki T. (1995). Purification and characterization of a dipeptidase from *Lactobacillus helveticus* SBT 2171. Appl. Environ. Microbiol., 61, 3430-3435

60. 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
61. Upadhyay V.K., McSweeney P.L.H., Magboul A.A.A., Fox P.F. (2004). Proteolysis in Cheese during Ripening. 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, 391-415
62. Varmanen P., Rantanen T., Palva A. (1996a). An operon from *Lactobacillus helveticus* composed of a proline iminopeptidase gene (*pepI*) and two genes coding for putative members of the ABC transporter family of proteins. Microbiology, 142, 3459-3468
63. Varmanen P., Steele J., Palva A. (1996b). Characterization of a prolinase gene and its products and an adjacent ABC transporter gene from *Lactobacillus helveticus*. Microbiology, 142, 809-816
64. Varmanen P., Rantanen T., Palva A., Tykkynen S. (1998). Cloning and characterization of a prolinase gene (*pepR*) from *Lactobacillus rhamnosus*. Appl. Environ. Microbiol., 64, 1831-1836
65. Varmanen P., Savijoki K., Åvall S., Palva A., Tykkynen S. (2000a). X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene (*pepX*) is part of the *glnRA* operon in *Lactobacillus rhamnosus*. J. Bacteriol., 182, 146-154
66. Visser S., Slangen C.J., Exterkate F.A., de Veer G.J.C.M. (1988). Action of a cell wall proteinase (P<sub>1</sub>) from *Streptococcus cremoris* HP on bovine  $\beta$ -casein. Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, 61-66
67. Vongerichten K.F., Klein J.R., Matern H., Plapp R. (1994). Cloning and nucleotide sequence analysis of *pepV*, a carnosinase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290 and partial characterization of the enzyme. Microbiology, 140, 2591-2600
68. Wohlrab Y., Bockelman W. (1994). Purification and characterization of a new aminopeptidase from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* B14. Intern. Dairy J., 4, 409-427
69. Yan T.R., Ho S.C., Hou C.L. (1992). Catalytic properties of X-prolyl dipetidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* nTR. Biosci. Biotechnol. Biochem. BBB, 56, 704-707
70. Yüksel G.U., Steele J.L. (1996). DNA sequence analysis, expression, distribution, and physiological role of the Xaa-prolyl dipetidyl aminopeptidase gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 766-773