



乳酸菌的 研究与应用

RESEARCH AND
APPLICATION OF
LACTIC ACID BACTERIA

霍贵成 主编



中国轻工业出版社

乳酸菌的研究与应用

霍贵成 主 编



中国轻工业出版社

图书在版编目(CIP)数据

乳酸菌的研究与应用/霍贵成主编. —北京: 中国轻工业出版社, 2007. 7

ISBN 978 - 7 - 5019 - 5958 - 7

I. 乳… II. 霍… III. 乳酸细菌 - 研究 IV. Q939.11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 063420 号

责任编辑: 姚怀芝

策划编辑: 姚怀芝 责任终审: 滕炎福 封面设计: 刘 鹏

版式设计: 马金路 责任校对: 郎静瀛 责任监印: 胡 兵 张 可

出版发行: 中国轻工业出版社(北京东长安街 6 号, 邮编: 100740)

印 刷: 三河市世纪兴源印刷有限公司印刷

经 销: 各地新华书店

版 次: 2007 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 10.75

字 数: 248 千字

书 号: ISBN 978 - 7 - 5019 - 5958 - 7/TS · 3476

定 价: 25.00 元

读者服务部邮购热线电话: 010 - 65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010 - 85119845 65128898 传真: 85113293

网 址: <http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社读者服务部联系调换

70110K1X101ZBW

中国轻工业出版社

前 言

乳酸菌是一类仅次于酵母的重要的工业微生物,在食品、医药和饲料行业应用十分广泛,蕴藏着巨大的经济价值。鉴于乳酸菌的重要性,欧盟、美国和澳大利亚定期举行国际性学术研讨会,就乳酸菌遗传学、代谢和应用等方面的科技进步进行交流。欧洲于1991年,30多家与乳酸菌生产有关的企业、研究所和R&D中心成立了“乳酸菌工业平台”(Lactic Acid Bacteria Industrial Platform, LABIP)。尤其近10年来,随着现代生物技术在理论和研究方法上的重大进步,在乳酸菌基因组学、代谢组学、蛋白质组学、发酵工程和干燥收获方面取得了巨大进步,促进了乳酸菌产业的快速发展。

过去15~20年,欧盟和美国投入了大量资金和人力对乳球菌的生长代谢、生理生化及遗传特性等方面进行了大量研究,在碳氮源代谢、细胞内外的蛋白水解系统、抗菌化合物(如Nisin)的生物合成以及对噬菌体的抗性机制等方面都有专门的报道,研制出一系列的克隆载体和表达载体,并将乳酸乳球菌作为革兰氏阳性菌研究中的模式菌株。目前在基因组文库中已公开了20个具有重要工业应用价值的乳酸菌的全基因组序列,乳酸菌的研究也进入了基因组和后基因组时代。

近年来,我国关于乳酸菌的研究和应用也十分活跃,随着分子生物学研究技术的日益成熟,应用这类技术对乳酸菌的研究更加深入,这些研究加深了人们对于乳酸菌益生作用的认识。乳品科学教育部重点实验室的从事乳酸菌研究的相关人员收集了近5年有关乳酸菌研究的前沿资料,重点涉及基因组学、代谢工程和蛋白质组学方面的研究成果和进展,将这些先进的信息编译成册,供同行参考。书中还包括了有关乳酸菌从实验室研究到工业推广应用的内容。

本书语言简洁明了,内容详实,对近年来的研究进行了专题论述。可作为大专院校、科研机构对乳酸菌进行生物工程研究的有关人员参考。

本书的顺利出版除编辑人员付出的辛勤劳动外,还要感谢乳品科学教育部重点实验室在经费上的支持。

2007 于哈尔滨

目 录

1 乳酸菌简介	1
2 乳酸菌的蛋白水解系统	3
2.1 蛋白水解酶	4
2.2 肽吸收系统	5
2.3 肽酶	6
2.4 乳酸菌与压力相关的蛋白水解系统	8
2.5 蛋白水解系统的调控	9
2.6 蛋白水解系统的生理学角色	10
2.7 蛋白水解技术的研究	11
2.8 活性肽通过蛋白水解被激活	11
2.9 总结	12
参考文献	12
3 乳酸菌的耐酸性机制	14
3.1 质子泵	14
3.2 蛋白质修复	17
3.3 DNA 修复	17
3.4 细胞膜的改变	18
3.5 产生碱	18
3.6 代谢方式的改变	19
3.7 总结	19
参考文献	20
4 乳酸菌的噬菌体及其抗噬菌体感染的机制	21
4.1 乳酸菌噬菌体的一般特性	21
4.2 噬菌体生命周期概述	25
4.3 噬菌体侵染乳酸菌过程	26
4.4 乳酸菌中的宿主防御系统	27
4.5 控制噬菌体的措施	29
参考文献	30
5 益生菌中细菌素的产生	32
5.1 抗微生物物质的产生作为一个益生功能	32
5.2 细菌素分类	33
5.3 细菌素的抑菌谱	35
5.4 对热、酸以及酶的抗性	37

5.5	生物合成条件	37
5.6	作用模式	38
5.7	乳杆菌属的抗微生物潜力	38
5.8	双歧杆菌的抗微生物潜力	39
5.9	异源表达	40
5.10	总结	41
	参考文献	41
6	乳酸菌胞外多糖分离纯化和特性研究	42
6.1	产 EPS 现象的检测	44
6.2	产 EPS 乳酸菌菌株的筛选	45
6.3	EPS 分离方法	46
6.4	EPS 产量的定量	49
6.5	EPS 的初级和三维结构	50
6.6	与黏度强化能力有关的 EPS 分子学参数: 相对分子质量和回转半径	51
	参考文献	52
7	功能性乳制品中的乳酸菌	53
7.1	利用乳酸菌进行乳制品的生产	54
7.2	含益生乳酸菌的乳制品	55
7.3	益生乳酸菌对健康的助益	56
7.4	提高乳酸菌的活性和稳定性	57
7.5	提高乳酸菌的功能性	59
7.6	未来趋势	60
7.7	未来信息和建议的来源	61
	参考文献	61
8	食品中的转基因益生菌	62
8.1	乳酸菌的基因工程分析	63
8.2	发酵剂 LAB 菌株的生产	64
8.3	LAB 的分子鉴定	67
8.4	风险评估与制度限制	68
	参考文献	69
9	食品发酵中乳酸菌的基因组学分析以及生物技术的应用	70
9.1	乳酸菌遗传学	70
9.2	乳酸菌中基因转移和接合因子	71
9.3	<i>S. thermophilus</i> CNRZ368 的公认完整接合因子 ICES _{St1} 的性能描述	71
9.4	<i>S. thermophilus</i> 中胞外多糖合成的水平转移	72
9.5	Nisin 的生物合成	72
9.6	开发乳酸菌作为活疫苗递送载体	73
9.7	结论	75

参考文献	75
10 嗜热乳酸菌的遗传学研究进展	76
10.1 蛋白质水解体系	76
10.2 糖吸收和糖酵解	77
10.3 分解物阻遏	78
10.4 胞外多糖	78
10.5 压力应答	79
10.6 水平基因转移	79
10.7 噬菌体	80
10.8 乳制品应用方面	81
10.9 结论	82
参考文献	82
11 乳球菌质粒——遗传的附属还是必需	83
11.1 质粒的结构、传递和可塑性	85
11.2 质粒编码表型的优势：遗传的附属还是商业上的必需	89
11.3 以质粒为基础的遗传工具的发展	90
11.4 结论	94
参考文献	95
12 乳酸乳球菌代谢工程：基因组学和代谢模型的影响	96
12.1 乳球菌丙酮酸代谢工程	96
12.2 复杂途径工程：乳酸乳球菌胞外多糖的生产	99
12.3 复杂途径工程：乳酸乳球菌叶酸的生产	102
12.4 基因组学和相关技术的影响	105
参考文献	106
13 乳酸菌模拟试验策略在工业中的应用	107
13.1 乳酸菌的工业应用	107
13.2 模拟试验技术在乳酸菌研究中的应用	110
13.3 全局代谢模型与乳酸菌的应用	115
13.4 结论	117
参考文献	117
14 干酪生产中乳酸菌溶解的作用、机制及控制	118
14.1 干酪成熟中乳酸菌发酵剂溶解的作用	118
14.2 乳酸菌溶解的机制	120
14.3 干酪成熟中对乳酸菌溶解的控制	126
14.4 需解决的问题	128
14.5 结论	129
参考文献	129
15 Nisin 控制的基因表达系统的研究进展	131

15.1	作为宿主菌的乳酸乳球菌	131
15.2	Nisin 以及 Nisin 合成的调控	132
15.3	Nisin 控制的基因表达系统	132
15.4	NICE 系统在其他菌中的应用	135
15.5	类似于 NICE 的系统	136
15.6	NICE 系统的应用概述	136
15.7	代谢工程	137
15.8	工业水平上的应用	138
15.9	下一代应用	138
15.10	乳球菌基因表达的瓶颈	138
	参考文献	139
16	制备冻干乳酸菌的相关因素	141
16.1	内在因素	141
16.2	生长因素	142
16.3	非致死处理	145
16.4	干燥保护剂	146
16.5	贮藏和复水	148
16.6	对制备冻干乳酸菌的经验建议	149
16.7	结论	150
	参考文献	150
17	乳酸菌从实验室研究到工业应用的漫长之路	152
17.1	最初的挑战	152
17.2	科学的挑战	153
17.3	经呼吸代谢的乳球菌的工业化生产	154
17.4	食品级遗传修饰生物体的市场化(GMOs)	157
17.5	结论	162
	参考文献	163

1 乳酸菌简介

乳酸菌在《伯杰氏系统细菌学手册》第 8 版中被列入真细菌目 (*Eubacteriales*) 下的链球菌科 (*Streptococcaceae*)、芽孢菌科 (*Bacillaceae*)、乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 和放线菌目 (*Actinomycetales*) 下的放线菌科 (*Actinomycetaceae*) 的有关属。随着细菌分类研究的不断深入,也进一步明确了乳酸菌有关属的分类位置,而且陆续发现了不少新属,乳酸菌的范围也日益扩大。目前在自然界已发现的这类菌在细菌分类学上现在划分至少有 23 个属,这些属包括:乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、肉食杆菌属 (*Carnobacterium*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、气球菌属 (*Aerococcus*)、奇异菌属 (*Atopobium*)、漫游球菌属 (*Vagococcus*)、利斯特氏菌属 (*Listeria*)、芽孢乳杆菌属 (*Sporolactobacillus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 中的少数种、环丝菌属 (*Brochothrix*)、丹毒丝菌属 (*Erysipelothrix*)、孪生菌属 (*Gemella*)、糖球菌属 (*Saccharococcus*)、四联球菌属 (*Tetragenococcus*)、酒球菌属 (*Oenococcus*)、乳球形菌属 (*Lactosphaera*)、营养缺陷菌属 (*Abiotrophia*)、魏斯氏菌属 (*Weissella*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)。基于 16S rRNA 序列分析建立的乳酸菌的系统进化树如图 1-1 所示。

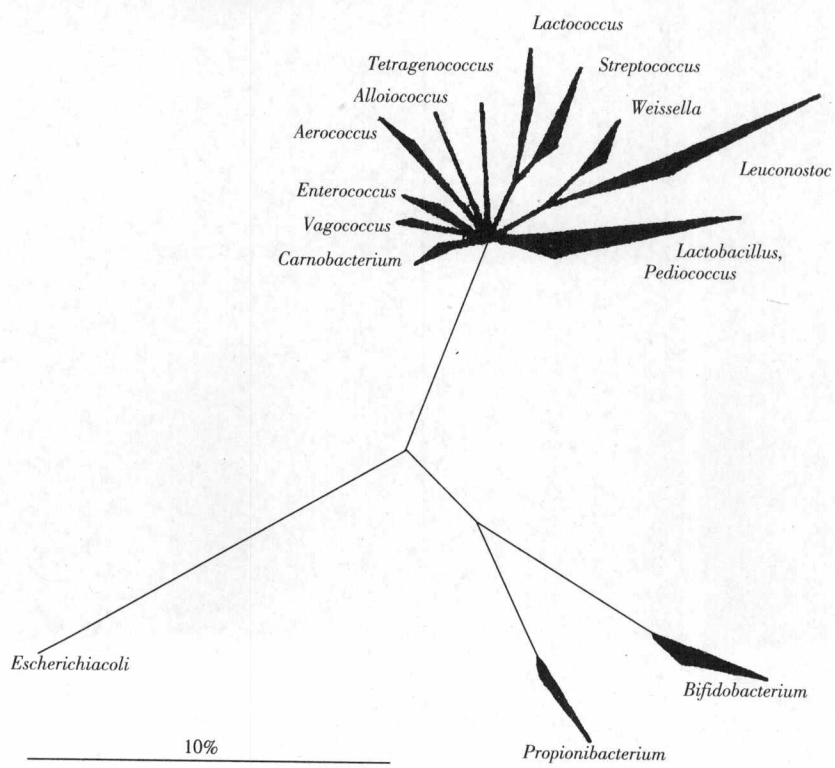


图 1-1 基于 16S rRNA 序列分析建立的乳酸菌的系统进化树

2 乳酸菌的蛋白水解系统

目前乳酸菌已广泛用于发酵食品的生产,许多科学家都在研究乳酸菌在加工过程中的特性。蛋白水解是已知的乳酸菌生理性状中的重要一个。利用蛋白水解系统,不但能将乳中的酪蛋白水解成乳酸菌生长所需的游离氨基酸,还提高了发酵乳制品的感官特性。现在研究最广泛的是乳酸乳球菌,并且已经建立了该菌的酪蛋白水解、转运以及调控的模型。除了能给乳酸菌提供营养,细胞的蛋白水解还可以使一些调控蛋白处于低水平并且在细胞不需要时将这些蛋白排到胞外,这控制了多肽的质量和许多调控回路。作为工业生产的一部分,乳酸菌的生长受一些影响代谢活动(包括蛋白水解)的不同压力条件的挑战。虽然乳酸菌抗胁迫已成为一个研究的热点问题,但目前已知的关于乳酸菌与压力相关的蛋白水解方面的知识几乎完全建立在对乳酸乳球菌的研究上。本章综述了与工业相关的乳酸菌蛋白水解系统的研究现状。

目前乳酸菌已用于发酵食品、饮料以及饲料的生产过程中,此外某些特定的乳酸菌还具有益生作用,比如乳酸杆菌属中的某些种,有些乳酸杆菌可以将乳中的蛋白质分解成对健康有益的生物活性肽;乳酸菌另外一个重要的应用就是作为分子载体用于基因治疗中。在乳酸菌的遗传、生理以及分子生物学研究中,以对乳酸乳球菌的研究最为深入。

乳酸菌(比如嗜热链球菌、乳酸乳球菌、瑞士乳杆菌和德氏乳杆菌保加利亚亚种)的应用主要是作为不同发酵乳制品的发酵剂。在乳制品的发酵过程中,乳酸菌的蛋白水解系统起到了关键的作用,这主要是因为它能使乳酸菌在乳中生长,实现了连续发酵。乳酸菌是一类营养需求复杂的微生物,它的生长需要由酪蛋白水解得到的游离氨基酸和多肽。通常来说,乳酸菌对酪蛋白的利用首先是由细胞膜上的蛋白水解酶(CEP)将蛋白质水解成一些寡肽,然后借助于细胞的特定肽转运系统将寡肽进一步地降解,最后在各种胞内蛋白水解酶的协同作用下水解成游离氨基酸。虽然很多乳酸菌含有 CEP,但有些乳酸菌(比如非发酵剂乳酸菌)就不含有这种酶,因此它们的生长需要发酵剂乳酸菌提供的多肽和氨基酸。这些多肽、氨基酸以及其他的代谢物除了能够维持乳酸菌的生长外,还能赋予发酵乳制品优良的风味和质地,因此这些代谢途径具有重要的工业价值。现在许多科学家正深入研究具有潜在的工业相关特性的代谢途径,并且建立了 *L. lactis* 的酪蛋白水解、转运、酪蛋白来源的多肽的降解和调控的模型。除了这个酪蛋白利用模型,同其他细胞一样,乳酸菌编码了受压力诱导的蛋白水解酶,在体外这些蛋白酶不仅对酪蛋白有活性,还能处理各种异常蛋白质(例如热应激蛋白)。

目前已经公布的乳酸菌的基因组包括 *L. lactis*、*S. thermophilus*、*Lactobacillus sakei*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus acidophilus* 和 *Lactobacillus johnsonii*。其他乳酸菌的基因组序列目前已测完,不久就会发表。对基因组的比较显示不同乳酸菌的蛋白水解系统有差异,这些差异反映了乳酸菌生存条件的不同。例如,在已测完的乳酸杆菌的基因组序列

中,只有 *L. sakei* 和 *L. johnsonii* 能编码 CEPs。同 *L. lactis* 相比,乳酸杆菌胞内合成氨基酸的能力较弱,因此它通过编码大量的肽酶、氨基酸通透酶和多种寡肽转运 (Opp) 系统分解外源蛋白质进行补偿。

2.1 蛋白水解酶

乳酸菌对酪蛋白利用的第一步是通过 CEPs 实现的。目前已经对来源于乳酸菌的五种蛋白水解酶进行了克隆和研究,包括来源于 *L. lactis* 和 *Lactobacillus paracasei* 的 PrtP,来源于 *L. helveticus* 的 PrtH,来源于 *Lactobacillus rhamnosus* 的 PrtR,来源于 *S. thermophilus* 的 PrtS,以及来源于 *L. bulgaricus* 的 PrtB。在乳球菌中,Prp 可由质粒或基因组编码,然而乳酸杆菌的蛋白水解酶只由基因组编码。大多乳酸菌只编码一种蛋白水解酶,只有 *L. helveticus* 和 *L. bulgaricus* 编码了两种蛋白水解酶。

发酵剂乳酸菌典型的 CEPs 是由含有大约 2 000 个氨基酸残基的前蛋白原加工得到的,并且组成了不同的功能域(见图2-1)。从蛋白水解酶的N-端开始包括:前体区[the preprodomain (PP)],是由控制分泌的一条信号序列(大约 40 个氨基酸残基)和一条可由自身催化过程去除的前体序列(大约 150 个氨基酸残基)组成;具有催化功能的丝氨酸蛋白酶功能区(PR)(大约含有 500 个氨基酸残基);一个插入区(I)(大约含有 150 个氨基酸残基),可能用于调控 CEPs 的底物特异性;A 结构域(大约含有 400 个氨基酸残基),功能未知;B 结构域(大约含有 500 个氨基酸残基),可能起着稳定 CEP 活性和特异性的作用;螺旋结构域(大约含有 200 个氨基酸残基),起着在细菌细胞外定位 A 和 B 结构域的作用;亲水的细胞壁间隔区(大约含有 100 个氨基酸残基)。虽然大多数 CEPs 都含有 B 结构域,但是 *S. thermophilus* 的 PrtS 中不含有该结构。PrtS 的 W 结构域包含革兰氏阳性菌细胞壁结构中典型的氨基酸(富含 Pro - Gly 和 Ser - Thr),然而

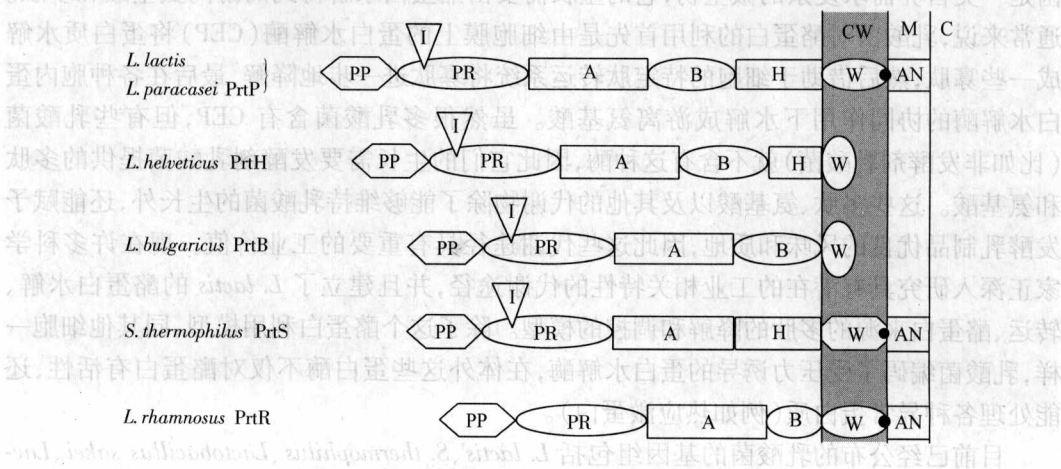


图 2-1 不同乳酸菌的蛋白水解酶的图示

CW—细胞壁 M—细胞膜 C—细胞质 PP—前体区 PR—催化区 I—插入区 A— α -结构
B— β -结构 H—螺旋结构 W—细胞壁间隔区 ●—分拣信号 AN—锚定区

同 CEPs 或者数据库中的其他蛋白质没有同源性。相比较, H 结构域只存在于 PrtP (210 aa)、PrtS (367 aa)、PrtH (72 aa) 中。在 PrtP 和 PrtS 中, W 结构域后面同细胞壁的锚定区(AN)相连, 这个锚定区携带有革兰氏阳性菌许多表面蛋白的分拣信号。 *L. helveticus* 和 *L. bulgaricus* 的 CEPs 不含有锚定区, 因此它们可能通过 W 结构域自身同细胞壁相连。在 *L. helveticus* 中, PrtH 同细胞壁可能的连接机制同 S-层蛋白的利用机制类似。 *L. rhamnosus* BGT10 的 PrtR 的性质同发酵剂乳酸菌的 CEPs 的性质显著不同。由于 PrtR 缺少螺旋和插入区, 它的 B 结构域相对较小且有差异。 PrtR 的 W 结构域同口腔或阴道中的链球菌表达的某些表面抗原的同源性较高。它的 AN 结构区包含一个非典型的分拣信号。

在 *L. lactis* 中, *prpP* 基因位于一个编码膜结合脂蛋白 (PrtM) 的趋异转录基因之后, 这有利于 PrtP 的自身催化成熟。在 *L. paracasei* 中也发现了类似的基因结构。然而在 *L. helveticus*、*L. bulgaricus* 或 *S. thermophilus* 中, 并没有在编码 CEPs 的基因两侧发现 *prtM* 基因。有报告指出, 在 *L. bulgaricus* 的 CEPs 成熟过程中并不需要类似 PrtM 的伴侣蛋白。

CEPs 的最适作用底物是疏水的酪蛋白。酪蛋白分为 α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -和 κ -酪蛋白, 每一种都含有大量的脯氨酸残基, 这可以阻止 α -螺旋、 β -折叠的形成, 增加不规则卷曲的形成。这种二级结构容易暴露出 CEPs 的活性位点。根据对 α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -和 κ -酪蛋白作用特异性的不同, 乳球菌的 PrtPs 分为 P I - 和 P III - 类型。P I - 类型主要水解 β -酪蛋白, 得到 100 种以上含 4~30 个氨基酸的寡肽, 对 κ -酪蛋白作用较弱。然而 P III - 类型对 α_{s1} -、 β -、 κ -酪蛋白的作用等同。 *L. lactis* 的 PrtP 还可以水解自溶素。因此, 细胞的自溶程度取决于 PrtPs 的数量、位置和特异性。对于乳酸杆菌, 已经报道了 CEPs 的 P I -、P III -、中间产物 P I -/P III - 类型, 以及一些新类型的底物特异性。在 *S. thermophilus* 中纯化了一种显示 P I -/P III - 类型特异性的 CEP (PrtS)。

2.2 肽吸收系统

酪蛋白利用的第二步是通过 Opp 系统将由 CEPs 水解得到的寡肽转运到细胞内。Opp 蛋白属于高度保守的 ATP 结合盒式运载蛋白的超家族中的一员, 调节酪蛋白来源的肽的吸收。在 *L. lactis* MG1363 中编码寡肽结合蛋白 (OppA)、两个嵌膜蛋白 (OppB 和 OppC)、核苷酸结合蛋白 (OppD 和 OppF) 的基因存在于一个操纵子上。 *L. lactis* 的 Opp 系统转运的寡肽可达到 18 个氨基酸残基, 这些肽的结构极大地影响了转运动力学。其他乳酸菌的 Opp 系统还没有广泛的研究, 但是也有研究报道 *S. thermophilus* 和 *L. bulgaricus* 的 Opp 系统同 *L. lactis* 的相似。应当注意的是, *S. thermophilus* 携带有三个能够编码 OppA 蛋白的旁系同源体基因, 每一种都参与了寡肽的内化。 *L. lactis* MG1363 和 IL1403 菌株中已被证实的肽转运体还包括质子驱动力 (PMF) 的二肽/三肽 (DtpT) 和 ATP - 驱动的 Dpp 系统。Dpp 能够转运含有疏水性支链氨基酸的二肽、三肽和四肽, 并且对三肽有着较高的亲和性。DtpT 对亲水的和带电荷的三肽的亲性和较高。 *L. helveticus* 含有能够编码 PMF 驱动的 DtpT 基因, 它的转运特异性同乳球菌中对应物类似。

2.3 肽 酶

目前已经对 *S. thermophilus*、一些 *Lactococcus* 和 *Lactobacillus* 菌株的肽酶进行了分离纯化,并研究了它们的生理特性,并且大多数肽酶的基因已经被克隆和测序(见表 2-1)。到目前为止,还没有在乳酸菌中发现具有羧肽酶活性的酶存在。

酪蛋白来源的多肽被 LAB 细胞吸收后,在不同的肽酶的协调作用下进一步降解(见图 2-2)。首先作用于寡肽的酶是胞内内肽酶、一般氨肽酶(PepN 和 PepC)和 X-脯氨酰-二肽酰基-氨基肽酶。一些乳酸菌的内肽酶已被鉴定和命名(表 2-1)。除了 *L. helveticus* 的 PepE 以外,内肽酶都是金属肽酶。PepE 的活性依赖巯基的存在。内肽酶一个基本的特征是不能水解完整的酪蛋白,只能水解酪蛋白来源的肽。例如,发酵剂乳酸菌中的内肽酶的最适作用底物是对应于 α_{s1} -酪蛋白 f_{1-23} 或者 β -酪蛋白 $f_{193-209}$ 的肽段。*L. lactis* 中的 PepF 除了能够水解含有 7~17 个氨基酸的寡肽,还在氮缺乏时的蛋白质转换中起着重要的作用。

表 2-1 乳酸菌中的肽酶

肽 酶	LAB 菌株	类型 e ^a	底物特异 ^b
内肽酶			$NH_2-X_n \downarrow X_n-COOH$
PepO	<i>L. lactis</i> P8 -2 -47	M	
	<i>L. lactis</i> SSL135	M	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
	<i>L. rhamnosus</i> HN001	M	
PepO2	<i>L. lactis</i> IL1403/NCDO763	M	
PepF1	<i>L. lactis</i> NCDO763	M	
PepF2	<i>L. lactis</i> IL1403 /NCDO763	M	
PepO2	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
PepO3	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
PepE	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	C	
PepE2	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	C	
PepF	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
PepG	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	C	
PepO	<i>S. thermophilus</i> A	M	
氨肽酶			$NH_2-X \downarrow X_n-COOH$
PepN	<i>L. lactis</i> Wg2	M	
	<i>L. lactis</i> MG1363	M	
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	M	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	M	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	M	
	<i>S. thermophilus</i> A	M	
PepC	<i>L. lactis</i> AM2	C	$NH_2-X \downarrow X_n-COOH$
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	C	

续表

肽 酶	LAB 菌株	类型 e ^a	底物特异 ^b
氨基酶	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	C	NH ₂ —Glu/Asp ↓ X _n —COOH
	<i>L. helveticus</i> 53/7	C	
	<i>S. thermophilus</i> A	C	
	<i>S. thermophilus</i> A	M	
	<i>L. lactis</i> FI1876	M	
PepS			
PepA			
PepL	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	S	
三肽酶			
PepT	<i>L. lactis</i> MG1363	M	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	M	
二肽酶			
PepD	<i>L. helveticus</i> 53/7	C	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	C	
PepV	<i>L. lactis</i> MG1363	M	
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM 7290	M	
脯氨酸特异性酶			
PepQ	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	M	NH ₂ —X ↓ Pro—COOH
	<i>L. bulgaricus</i> B14	M	
	<i>L. bulgaricus</i> CNRZ 397	M	
PepI	<i>L. bulgaricus</i> CNRZ397	S	NH ₂ —Pro ↓ X _n —COOH
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> DSM7290	S	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	S	
PepR	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	S	NH ₂ —Pro ↓ X—COOH
	<i>L. helveticus</i> 53/7	S	
	<i>L. rhamnosus</i> 1/6	S	
PepX	<i>L. lactis</i> NCD0763	S	NH ₂ —X—Pro ↓ X _n —COOH
	<i>L. delbrueckii</i> DSM7290	S	
	<i>L. helveticus</i> CNRZ32	S	
	<i>L. helveticus</i> 53/7	S	
	<i>L. rhamnosus</i> 1/6	S	
	<i>S. thermophilus</i> ACA - DC4	S	
PepP	<i>L. lactis</i>	M	NH ₂ —X ↓ Pro—X _n —COOH

a: 按照肽酶的序列和生化特性分类; b: 箭头表示酶切位点; M: 金属肽酶; C: 半胱氨酸肽酶; S: 丝氨酸肽酶。

乳酸菌中其他能够作用于寡肽的酶是专一性要求较低金属肽酶 PepN 和半胱氨酸肽酶 PepC, 在表 2-1 中也列举了它们的性质。总的来说, 这些酶可以切下肽的 N-端氨基酸, 酶的活性取决于肽的长度和 N-端氨基酸的性质。由内肽酶、一般氨基酶和 PepX 水解得到的二肽或三肽进一步地被一些二肽酶 (PepV 和 PepD) 和三肽酶 (PepT) 水解。

这些酶作用于含有疏水性氨基酸(亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸或甘氨酸)的肽。已对 *L. bulgaricus* 中专一作用于 *N*-端含有亮氨酸残基的二肽/三肽和作用于含有脯氨酸的二肽的酶的生化特性进行了研究。其他特异性相对较低的肽酶包括: PepA(能够水解含有 3~9 个氨基酸的肽的 *N*-端氨基酸)、PepP(能够水解中间是脯氨酸的三肽)、PepR 和 PepI(能够水解第一位是脯氨酸的二肽)、PepQ(能够水解第二位是脯氨酸的二肽)、PepS(能够水解含有 3~5 个氨基酸且末端是精氨酸或芳香族氨基酸的肽)。

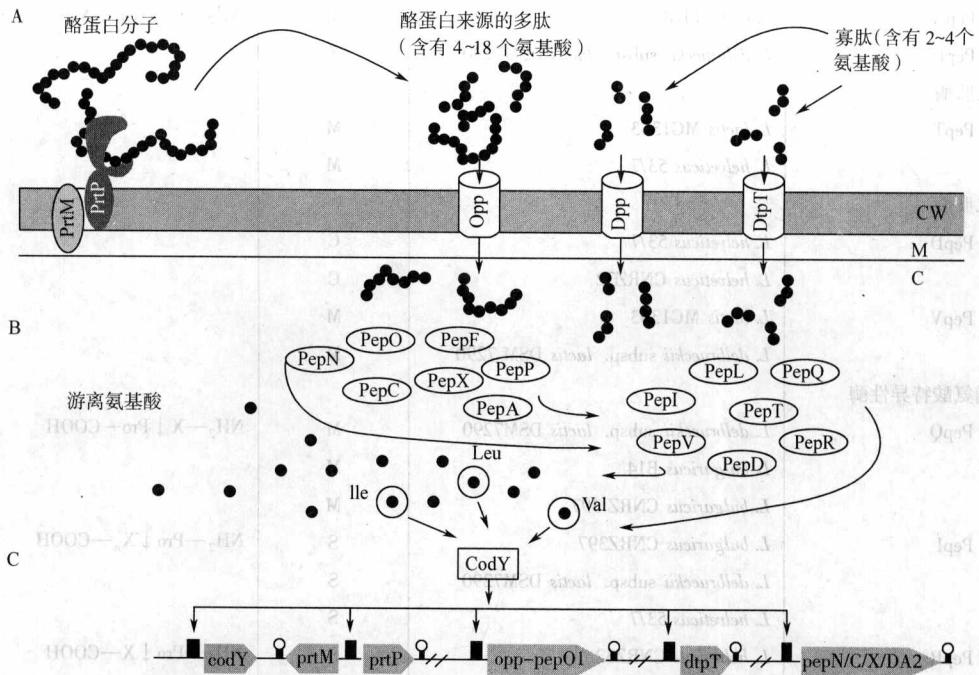


图 2-2 在酪蛋白分解过程中,乳球菌蛋白水解系统的功能及调控

A: PrtM 膜结合脂蛋白; PrtP 蛋白水解酶, Opp 寡肽通透酶, DtpT 结合铁的三肽和二肽转运体, Dpp 转运含有 2~9 个氨基酸残基的 ABC 转运体。B: 细胞内的肽酶, PepO 和 PepF 是内肽酶, PepN/PepC/PepP 属于一般的氨肽酶, PepX 是 X-脯氨酰-二肽酰基-氨基肽酶, PepT 是三肽酶, PepQ 是氨酰基脯氨酸二肽酶, PepR 是脯氨酰氨基酸二肽酶, PepI 是脯氨酸亚氨基肽酶, PepL 是亮氨酸氨基肽酶, PepD 和 PepV 是二肽酶 D 和 V。C: 转录抑制因子 CodY 能够感应(细胞)内部的支链氨基酸(异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸)池浓度的变化,利用这些氨基酸作为辅助因子抑制 *L. lactis* 中编码蛋白水解系统的基因的表达。

2.4 乳酸菌与压力相关的蛋白水解系统

细胞的应激反应包括快速并暂时的诱导产生蛋白水解活性来处理由环境条件变化引起的异常折叠蛋白的积累。在工业生产过程中,发酵剂微生物不断地暴露在一些压力条件下。在最近的一些报道中,在成熟的艾蒙塔尔干酪中鉴定出了乳酸菌的几种压力应激蛋白,认识到这几种压力应激蛋白体外具有降解酪蛋白的能力,由此可以推测这些蛋白在

发酵过程中的自溶阶段起着重要作用。虽然在 *Escherichia coli* 中 Lon 是主要的降解外源蛋白质的蛋白水解酶,但是在 LAB 中并没有发现 Lon 的同系物。乳酸菌中与压力相关的蛋白水解酶包括 FtsH、HtrA 和 Clp - 蛋白酶;应该注意的是,所有这些蛋白酶对 *L. lactis* 在不同压力条件下的生长是必需的。同时需要注意,编码 *L. lactis* 的 Clp - 蛋白酶的蛋白水解亚基的 *clpP* 基因在胞内错折叠蛋白的水解和调整关键调控蛋白的含量上起着核心作用。此外,在一项抑制 *clpP* 的热敏感表型的突变研究中发现,调控蛋白 TrmA 的突变刺激了 *L. lactis* 中外源蛋白的水解。

2.5 蛋白水解系统的调控

乳酸菌通过调控蛋白水解系统的活性来保证细胞内固有氮的平衡,这样就可以适应氮供给的变化。有研究指出含有疏水残基的二肽/三肽可作为 Opp 系统转录调控的效应因子,因此影响到 *L. lactis* 中整个的蛋白水解系统。在最近的一项研究中发现:将含有 80% 的多肽和 20% 的游离氨基酸的酪蛋白水解物加入到菌种生长培养基中,7 个转录单位(包括 *prtP*、*prtM*、*opp - pepO1*、*pepD*、*pepN*、*pepC* 和 *pepX*)的表达被抑制了 5 ~ 150 倍,只有当培养基中氮的含量缺乏时它们才开始表达。同样的,蛋白组学方法显示,当在缺少游离氨基酸和多肽的培养基中生长时,*L. lactis* 中的 Opp、PepO1、PepN、PepC、PepF,以及一个假定的次级寡肽 ABC 转运系统的底物结合蛋白(OptS)都被增量调节。很明显的转录调节因子 CodY 负调控 *L. lactis* 中几个蛋白水解系统组件的表达,并且通过调控细胞内支链氨基酸(包括异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸)池加强了阻遏过程。体外实验显示 CodY 结合到 *opp* - 操纵子的上游序列并且支链氨基酸增强了这个结合。最近通过全基因组表达谱和生物信息学技术结合传统的 DNA - 蛋白质相互作用的研究发现了 CodY 保守靶序列——CodY 框(AATTTTCWGAAAATT)。该研究进一步地证实 CodY 调节它自身的合成并且需要异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸结合到启动子的 CodY 框上。概括来说,在富氮培养基中,蛋白水解系统被 CodY 抑制;当支链氨基酸供应不足时,水解系统中各组件开始表达。

培养基中的碳源也能影响 *L. lactis* 中 *pepP* 的表达。该基因位于几个可能引起分解代谢的基本单元之后,受类似 CcpA 的调控因子的直接控制。虽然热应激反应会调控 *E. coli* 中一些蛋白酶的表达,然而在 *L. lactis* 中热应激并不影响蛋白水解系统中组件的表达。在压力诱导产生的蛋白酶中,Clp 蛋白酶的蛋白水解亚单元、*clpP* 以及一些调控亚单元(*clpC*、*clpE* 和 *clpB*)的表达受压力反应调节器(CtsR)的调控,CtsR 结合在一段位于靶基因上游的正向重复序列上。此外,通过刺激外源蛋白不依赖于 Clp 蛋白酶的降解,*trmA* 基因的失活部分弥补了 *clpP* 的突变。这显示 *trmA* 的基因产物是 *L. lactis* 中蛋白水解系统的又一个负调节因子。因此,至少三个调控因子 CodY、CtsR 和 TrmA 参与了 *L. lactis* 中蛋白水解系统活性的调控。

关于乳酸杆菌蛋白水解系统调节机制方面的研究较少。培养基中肽的含量控制了 *L. helveticus* 中 *PrtH* 和 *L. rhamnosus* 中 *PrtR* 的生物合成。在一种富肽培养基中,*L. helveticus* CRL 1062 种 *PrtH* 的活性被抑制了 11 ~ 32 倍,同时由亮氨酸和脯氨酸组成的