

## 基于肽组学的瑞士乳杆菌酪蛋白水解差异分析

张心怡, 姜 杨, 刘小鸣\*, 赵建新, 陈 卫

(江南大学食品学院 江苏无锡 214122)

**摘要** 为了探究瑞士乳杆菌酪蛋白的水解能力及多肽产物的差异,选取两株瑞士乳杆菌菌株,研究其发酵过程中主要酪蛋白组分的消耗、多肽的动态变化与生物活性肽的生成,以及两株瑞士乳杆菌菌株的蛋白水解基因与胞壁蛋白酶酶活特性。结果表明:两株瑞士乳杆菌对 $\beta$ -酪蛋白和 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的水解有明显差异,而无明显偏好性。肽总量在发酵过程中呈现先增加后减少的趋势,分子质量为2000~10000 u的多肽与总肽含量变化一致,而180~500 u的小分子质量多肽则先消耗后积累。LC-MS/MS结果表明:发酵产物中多肽呈现异质性,7M3产生的特异性肽更多,多来自 $\beta$ -酪蛋白的f78-99区域,并偏好切割 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的C端;而M108则产生更多来源于 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白N端及中间序列的肽段。两株菌株各含不同的胞壁蛋白酶基因及转运系统,发酵前期M108酶活较高。

**关键词** 瑞士乳杆菌;酪蛋白;水解;肽;基因

文章编号 1009-7848(2022)06-0053-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.06.006

瑞士乳杆菌是奶酪的传统发酵剂之一,与其它商业上重要的乳酸菌相比,瑞士乳杆菌具有较强的蛋白水解能力<sup>[1]</sup>。以酪蛋白水解为例,通常乳酸菌的胞壁蛋白酶(CEP)先将其降解为寡肽(2~20个氨基酸),然后通过肽转运系统将其运输到细胞内,在细胞内各种肽酶的协同作用下进一步降解为氨基酸。已知在乳酸菌中,瑞士乳杆菌的蛋白质水解基因最为多样化。首先,瑞士乳杆菌的胞壁蛋白酶基因的数量从1个到4个不等<sup>[2]</sup>,酪蛋白的水解能力也存在差异<sup>[3-4]</sup>。另外,瑞士乳杆菌中肽转运系统的类型也存在差异,如瑞士乳杆菌DPC4571具有3种转运系统,而瑞士乳杆菌H10只有寡肽转运系统Opp和二、三肽转运系统DtpT<sup>[5-6]</sup>。

另外,研究也表明不同瑞士乳杆菌菌株的蛋白水解活性和酪蛋白水解模式存在差异。Mekmene等<sup>[3]</sup>发现瑞士乳杆菌水解酪蛋白时,对于 $\beta$ -酪蛋白的水解速度快于 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白,而菌株间对于 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的水解速度则具菌株特异性。Jensen等<sup>[7]</sup>的研究结果表明:瑞士乳杆菌对牛奶中各酪蛋白组分的水解偏好因菌株而异,且在水解度上有较大差异。同时,研究表明乳酸菌水解乳蛋白后可产生多种

生物活性肽,目前已在发酵乳<sup>[8]</sup>和奶酪<sup>[9]</sup>中鉴定出多种血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽,其中三肽VPP和IPP经临床证明具有抗高血压特性<sup>[10-11]</sup>。研究还表明不同的市售发酵乳的ACE抑制活性有差异<sup>[12]</sup>,这可能与发酵菌株对底物水解的差异有关。

虽然目前对部分瑞士乳杆菌菌株的水解特性有所了解,但是多数研究对于瑞士乳杆菌蛋白水解能力的评价局限于切割位点的差异性,少有研究通过肽组学来表征菌株切割区域的偏好差异。本研究选取两株蛋白水解能力较强的瑞士乳杆菌,研究其在牛脱脂乳中发酵对酪蛋白的水解差异,并通过肽组学来评估酶裂解模式差异及产物特异性,评价其ACE肽的生成情况,解析其蛋白水解基因的差异性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

1.1.1 试验试剂 脱脂乳粉,上海光明乳业有限公司;荧光标记酪蛋白,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒 P0010,上海碧云天有限公司;Pierce 肽定量试剂盒,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Bis-Tris-Propane, BBI 生命科学有限公司;二硫苏糖醇,阿拉丁试剂有限公司;胰蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、乙酸钠、酵母浸粉、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、柠檬酸氢二铵、

收稿日期:2021-06-08

基金项目:国家自然科学基金项目(31871829)

作者简介:张心怡(1996—),女,硕士生

通信作者:刘小鸣 E-mail: liuxm@jiangnan.edu.cn

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、吐温-80、琼脂粉、氯化钠、尿素、柠檬酸钠二水合物、三氯乙酸、盐酸,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;乙腈、三氟乙酸,色谱纯。

1.1.2 试验菌株 本文所使用的两株瑞士乳杆菌保藏于江南大学食品生物技术中心 CCFM 菌库,其基因组信息已经上传至 NCBI,样品编号为 PR-JNA555465。菌株具体信息如表 1 所示。

表 1 试验菌株信息

Table 1 Information of strains used in this study		
菌株编号	文中编号	分离源
DYNDL7-3	7M3	云南大理乳扇
D5A108	M108	四川省阿坝藏族羌族自治州发酵牦牛乳

## 1.2 仪器与设备

Waters 2695 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;多功能酶标仪 Varioskan LUX,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ST3100 型 pH 计,常州奥豪斯仪器有限公司;液相色谱-质谱联用仪(液相型号为 nLC 1200,质谱型号为 Q Exactive),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;HWS-150 型恒温恒湿培养箱,上海森信实验仪器有限公司;SW-CJ-1FD 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;AW500SG 型厌氧工作站,英国依莱泰科公司;5424 R 型冷冻离心机,Eppendorf 仪器有限公司;台式高速冷冻离心机 TGL-16M、台式高速离心机 TG16A,上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 培养条件 菌株在 MRS 培养基 37 °C 连续活化 3 代后,接种于质量分数为 11% 的脱脂乳中再进行 2 轮活化,培养条件为 37 °C。随后用 50 mmol/L Tris-HCl(pH 6.5)洗涤细胞 2 次,并调整活菌数至  $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$  CFU/mL,以 2% 的接种量接种于 11% 的脱脂乳粉,37 °C 培养 24 h 后进行试验培养。MRS 培养基需要 115 °C 高压灭菌 20 min,脱脂乳配制完毕后在 4 °C 放置 12 h 进行水合,随后进行 105 °C 灭菌 10 min 待用。

1.3.2 酪蛋白利用情况测定 参考 Xu 等<sup>[13]</sup>的方法并进行修改。用反向高效液相色谱(RP-HPLC)对瑞士乳杆菌发酵过程中酪蛋白主要成分的利用

情况进行测定。取发酵至 0, 12 和 24 h 的样品,参照以上方法进行预处理后过 0.45  $\mu$ m 的尼龙膜。色谱条件:色谱柱为 Xbridge Peptide BEH C18 为(300 A, 3.5  $\mu$ m),流动相 A 中乙腈:水:三氟乙酸的比率为 100:900:1(V/V/V),流动相 B 中乙腈:水:三氟乙酸的比率为 900:100:0.7(V/V/V),采用梯度洗脱方式。洗脱梯度为 30%~40%B, 0~35 min; 40%~30%B; 35~40 min; 30%B, 保持 5 min。检测器为紫外(UV)检测器,检测波长为 220 nm,上样量为 20  $\mu$ L,流速为 0.8 mL/min,柱温 30 °C,每个样品平行测定 3 次。

1.3.3 多肽分子质量的测定 参照陈嘉琪<sup>[14]</sup>的方法并进行修改。采用尺寸排阻(SEC)色谱的方法测定肽分子质量分布情况。样品预处理:取不同发酵时间的脱脂乳,用 10% 的 TCA 将其 pH 值调至 4.6, 12 000 $\times$ g, 4 °C 离心 10 min,取上清液,用 0.45  $\mu$ m 的尼龙膜过滤。色谱条件参照以上方法。用肽定量试剂盒测定总肽含量,根据前处理浓度变化计算不同样品的肽浓度。每个样品平行测定 3 次。

1.3.4 肽谱的测定 将 1.3.3 节收集的肽用截留分子质量为 10 ku 的超滤膜以 4 000 $\times$ g, 4 °C 离心 15 min,收集滤过液。测定肽浓度后根据 Raveschot 等<sup>[15]</sup>的方法,用 Hypersep C18 微柱对样品进行脱盐处理,纯化后的肽通过蒸发离心在 40 °C 下干燥 2 h,然后在流动相 A(0.1% 甲酸和 2% 乙腈)中重新溶解。色谱条件:流动相 B 为 0.1% 甲酸和 90% 乙腈;色谱柱为 Acclaim PepMap<sup>TM</sup> RSLC(50  $\mu$ m $\times$ 15 cm, C18, 2  $\mu$ m, 100 Å),洗脱梯度为 6%~20% B, 0~40 min; 20%~32% B, 40~52 min; 32%~80% B, 52~56 min,流速为 0.2  $\mu$ L/min。洗脱后的多肽直接电离进行全连续 MS 扫描,然后进行 3 次 MS/MS 扫描。MS 分析采用正离子和数据依赖分析(DDA)模式,MS 光谱采集范围为 m/z 150~2 000,MS/MS 数据收集范围为 m/z 180~2 000,扫描时间为 0.1 s。通过 Maxquant 1.5.2.8 进行数据库检索,使用 Uniprot 中来源于 Bos taurus 的数据库。使用非特定的酶裂解模式,设置了以下参数:质量容许度,0.02 u;从头合成容许度为 0.01%;MS/MS 的脱同位素容许度为 0.007%。蛋白质、肽谱匹配的假发现率(FDR)阈值设置为 1%。根据 Solieri 等<sup>[16]</sup>的方法来量化 P1 和 P1' 位点上某个氨基酸的裂解

概率以及对裂解的正负效应。

**1.3.5 菌株蛋白水解基因的确 定** 使用 Illumina HiSeq×10 平台对瑞士乳杆菌的基因组进行草图测序, 并使用 SOAPdenovo 软件进行基因组组装。之后, 利用 Glimmer 和 GeneMarkS 软件对序列进行编码, 利用 tRNAscan-SE v2.0 和 Barrnap 软件进行 tRNA 和核糖体 RNA 序列预测。利用 blastn 工具对瑞士乳杆菌菌株的氨基酸序列与全基因组菌株 CNR32 的胞壁蛋白酶基因、转运系统基因和肽酶基因进行 BLAST 同一性百分比分析, 同一性截点为 98%。

**1.3.6 发酵过程中菌株生长及产酸的测定** 在 0, 3, 9, 12, 15, 24 h 取样测定 pH 值, 并对样品 10 倍梯度稀释至合适数量级, 采用平板点样计数法测定菌株的活菌数。每个菌株相同时间点测定 3 次。

**1.3.7 发酵过程中蛋白酶活测定** 细胞悬浮液的制备: 参考 Miyamoto 等<sup>[17]</sup>的方法并进行修改。取 0, 6, 12, 24 h 的发酵脱脂乳 30 mL, 按 1:10 的比例加入质量分数为 2% 的柠檬酸钠溶液洗涤, 10 000×g, 4 °C 离心 15 min, 用 10 倍体积含有 5 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的 NaCl 溶液洗涤 3 次, 完成后, 用 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) 重悬至 OD<sub>560</sub>=10 备用。胞壁蛋白酶活测定: 参照 Stefanovic 等<sup>[18]</sup>的方法并进行修改。用荧光酪蛋白进行胞壁蛋白酶活力的测定。在荧光专用 96 孔板中加入 100 μL 样品以及 100 μL 工作液, 37 °C 放置 1 h, 测定激发/吸收波长为 485/538 nm 处的荧光强度。同时用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。菌株的胞壁蛋白酶活每毫克蛋白增加的荧光强度表示, 每个样品重复 3 次。

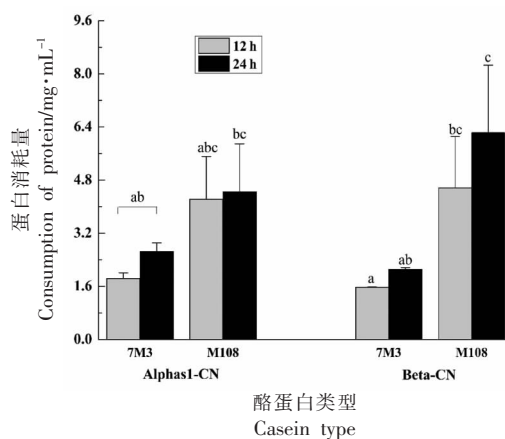
**1.3.8 统计分析及数据处理** 本文中所有图形均采用 Origin Pro 8.5 软件绘制; 采用 SPSS 22.0 通过单因素方差分析 (ANOVA) 和 95% 置信区间的 Duncan 检验对数据进行分析, 显著性水平为  $P < 0.05$ 。Upset 图采用 TBtools 绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 发酵过程中瑞士乳杆菌菌株对 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白和 $\beta$ -酪蛋白的利用情况

两株瑞士乳杆菌菌株发酵脱脂乳 12, 24 h 样

品中  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白的利用情况如图 1 所示。随着发酵时间从 12 h 延长到 24 h,  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白的利用量逐渐增加。两株菌株对  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白的利用上并未出现显著的偏好性差异。唯一的显著性差别在于 M108 对  $\beta$ -酪蛋白的利用度略高于 7M3, 在 24 h 内利用了 6.33 mg/mL 的  $\beta$ -酪蛋白 (约为 7M3 利用量的 3 倍); 在发酵过程中, 这两株菌株对  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的水解情况无明显差异。



注: 不同字母表示不同菌株的蔗糖消耗量存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 1 7M3 和 M108 发酵过程中对  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白的利用率

Fig.1 The  $\alpha_{s1}$ -CN and  $\beta$ -CN utilization of *Lactobacillus helveticus* 7M3 and M108 during fermentation

### 2.2 发酵过程中肽分子质量分布情况

试验菌株发酵 12 h 和 24 h 后的肽分子质量分布及其含量如图 2 所示, 两株瑞士乳杆菌无论是在肽含量还是不同分子质量肽的分布上都有明显差异。脱脂乳中的肽质量浓度为 (4.75±0.10) mg/mL, 发酵过程中两株瑞士乳杆菌的总肽浓度都呈现先增加后降低的趋势, M108 在 12 h 的总肽含量为 (5.99±0.60) mg/mL, 随后在 24 h 内下降到 (5.04±0.40) mg/mL, 而在 24 h 时 7M3 的样品中肽含量低于脱脂乳。

除了含量变化外, 发酵还导致了样品中不同分子质量肽的比例发生了动态变化。脱脂乳中的肽分子质量在 2 000 u 以上和 2 000 u 以下的多肽含量大致相等, 主要以 180~500 u 和 2 000~10 000 u 的肽片段为主。但在发酵过程中, 不同发酵时间下 7M3 和 M108 样品中多肽分布存在差异性。发

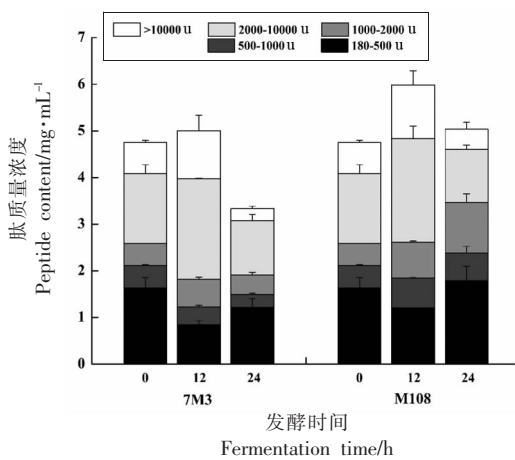


图2 菌株 7M3 和 M108 发酵过程中不同分子质量肽的分布和浓度

Fig.2 Distribution and concentration of varying molecular weight peptides with strains 7M3 and M108

酵 12 h 的样品中以 2 000~10 000 u 的肽片段为主,而发酵 24 h 后,样品中 180~500 u 的多肽含量逐渐增大。

### 2.3 发酵样品的肽异质性

选取发酵 24 h 后的样品进行肽组分析,肽种类及特异性肽在相应蛋白序列上的分布情况如图 3、图 4 所示。在 7M3 和 M108 发酵 24 h 的样品中,分别共鉴定出 432 个和 353 个多肽,大部分肽来源于酪蛋白中最丰富的组分: $\alpha_{s1}$ -酪蛋白(34%)和 $\beta$ -酪蛋白(45%),其中 7M3 积累的多肽组成更多样化。在鉴定到的多肽中,33%的多肽为特异性肽,包括 45 种来自 7M3、16 种来自 M108 的源于 $\beta$ -酪蛋白的特异性肽;21 种来自 7M3、25 种来自 M108 的源于 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的特异性肽;而来源于 $\kappa$ -酪蛋白和 $\alpha_{s2}$ -酪蛋白的肽较少(图 3)。

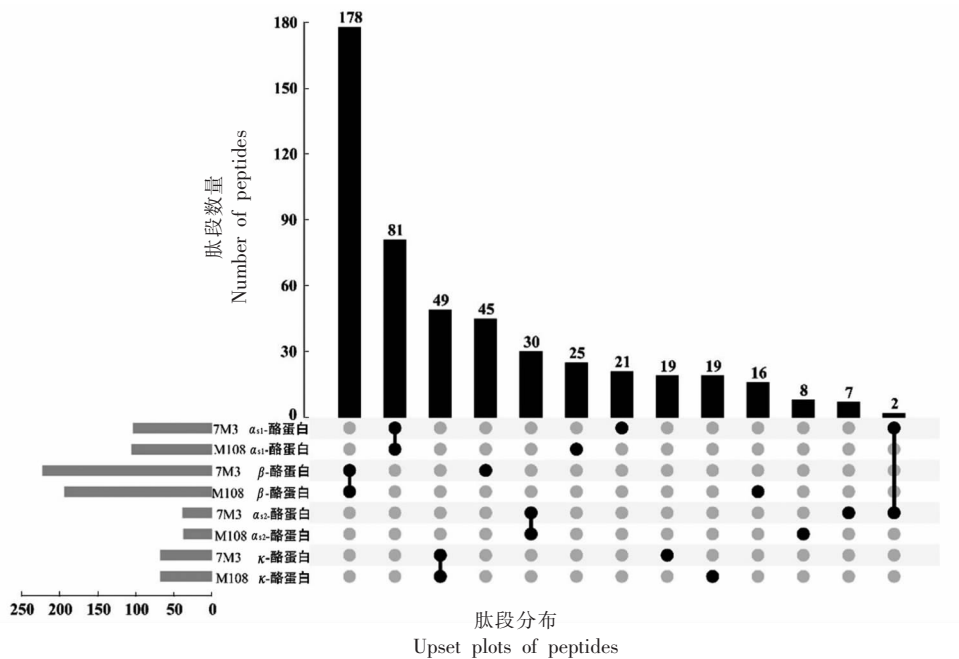


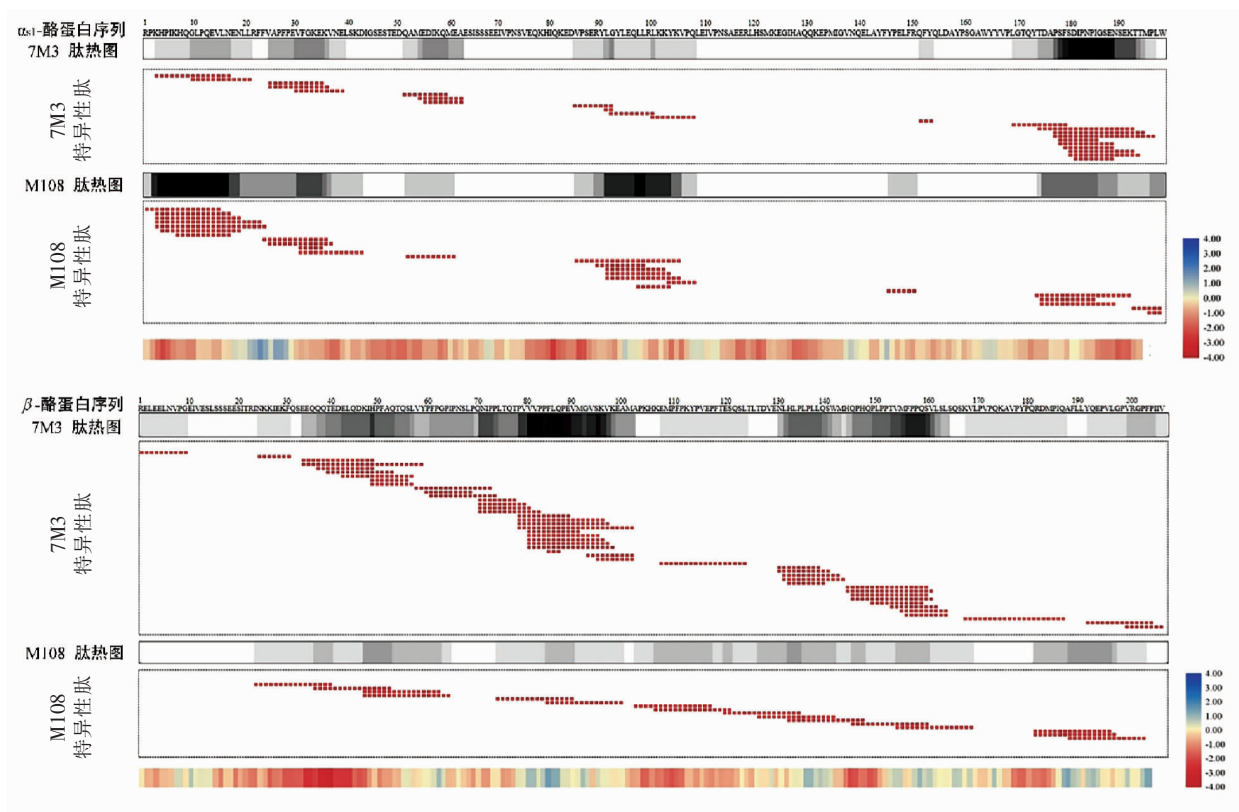
图3 24 h 菌株 7M3 和 M108 发酵乳中鉴定到的肽段数量

Fig.3 Number of peptides identified from strains 7M3 and M108 in 24 h fermented milk

两株瑞士乳杆菌的源于 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白和 $\beta$ -酪蛋白的多肽异质性解析如图 4 所示,其偏好水解区域(热图上的深灰色区域)呈现显著性差异。两株瑞士乳杆菌对 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的裂解产物具有一定的重叠度,但 7M3 主要水解 $\alpha_{s1}$ -酪蛋白 C 端的 f176~193 区域(呈现无规卷曲结构),而 M108 的

水解区域集中于 f2~22 和 f85~106 等疏水性区域。7M3 和 M108 对于 $\beta$ -酪蛋白的水解位点偏好差异更大,7M3 的样品中含有丰富的来自 f40~55、f78~99、f131~142 和 f144~163 区域的多肽,与以往研究中产 ACE 抑制活性肽的区域重合(f58~90、130~140)<sup>[19]</sup>。





注:肽用红色显示,肽上面的热图表示氨基酸出现的频率;每个氨基酸的颜色从白色(不存在)到黑色(高出现频率)不等;肽下面的热图表示该位点对应氨基酸的亲水性,蓝色为亲水性,红色为疏水性。

图 4 24 h 发酵乳中来源于  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白(上)和  $\beta$ -酪蛋白(下)的特异性肽及其在蛋白序列上的分布

Fig.4 Distribution of specific peptides derived from alphas1-CN and beta-CN in the 24 h fermentation milk of two strains

与已有报道比对发现,7M3 和 M108 样品中分别含有 13 和 11 种 ACE 抑制肽,其中有 9 种二者共有(表 2)。7M3 的特异性 ACE 抑制肽中 TPVVPPFLQP 和 VPP 来源于 7M3 偏好切割的区域 f78-99,其中 VPP 已被证实具有体内降血压功能。于洋等<sup>[12]</sup>对 4 种市售发酵乳中的 ACE 抑制肽进行鉴定,发现 ACE 抑制活性最高的发酵乳含有 4 种 ACE 抑制肽,其中 TPVVPPFLQP 在我们的发酵物中也被鉴定到。

#### 2.4 酪蛋白裂解位点特异性分析

P1 和 P1' 位点氨基酸残基对试验菌株裂解概率的影响如图 5 所示。7M3 和 M108 对两种酪蛋白组分表现出不同的切割偏好性。在  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白中,当 P1 位点为 D、R、F、P、I、Q、L 等氨基酸时,菌株对裂解概率的影响为正,其中 M108 主要对带负电荷的 D、R、F 和疏水性的 P 表现出更多的裂解偏好(图 5a)。C 端含有疏水氨基酸 F、P、L 被认

为是有效的 ACE 抑制肽的特征<sup>[20]</sup>,同时带正电氨基酸 R 的存在可以增加 ACE 抑制活性<sup>[20]</sup>。P1' 位点的氨基酸 R 对裂解具有最强的正向作用,氨基酸 G、D、K、H 和 F 也表现出正向作用,但作用裂解影响较低(图 5b)。

$\beta$ -酪蛋白的裂解模式与  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白有显著差异。多肽在 P1 位点含有氨基酸 W 时被裂解的概率最高,而对  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白裂解有负效应的氨基酸 M、N、T 对  $\beta$ -酪蛋白有轻微的正效应(图 5c)。在 P1' 位点,氨基酸 T、D、H 和 W 均对裂解有积极作用,不同的是 D 对 M108 的裂解表现出更积极的作用,而 7M3 更倾向于裂解 P1' 位点含 T 的肽(图 5d)。

综合上述分析得知,7M3 和 M108 对  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋白表现出不同的偏好切割模式,这可能与由其蛋白酶、肽转运系统、肽酶等特性有关。

表 2 24 h 发酵乳中的 ACE 抑制肽

Table 2 ACE-inhibitory peptides generated from bovine casein in the 24 h fermentation milk of two strains

序列	片段	来源蛋白	菌株	
			7M3	M108
RPKHPIKHQ	1~9	$\alpha_{s1}$ -酪蛋白	+	+
FFVAPFPEVFGK	23~34	$\alpha_{s1}$ -酪蛋白	+	+
YL	91~92/94~95	$\alpha_{s1}$ -酪蛋白/ $\alpha_{s2}$ -酪蛋白	+	-
TTMPLW	194~199	$\alpha_{s1}$ -酪蛋白	-	+
FALPQYLK	174~181	$\alpha_{s2}$ -酪蛋白	-	+
VYFPFGPIPN	59~68	$\beta$ -酪蛋白	+	-
TPVVVPPFLQP	80~90	$\beta$ -酪蛋白	+	-
VPP	84~86	$\beta$ -酪蛋白	+	-
AIPPKKNQD	113~121	$\beta$ -酪蛋白/ $\kappa$ -酪蛋白	+	+
NLHLPLPLL	132~140	$\beta$ -酪蛋白	+	+
RDMPIQAF	183~190	$\beta$ -酪蛋白	+	+
LLYQEPVLGPPVIRGPFPIIV	191~209	$\beta$ -酪蛋白	+	+
YQEPVLGPPVIRGPFPIIV	193~209	$\beta$ -酪蛋白	+	+
QEPVLGPPVIRGPFPIIV	194~209	$\beta$ -酪蛋白	+	+
EPVLGPPVIRGPFPIIV	195~206	$\beta$ -酪蛋白	+	+

注：“+”指该序列在菌株发酵乳中鉴定到。

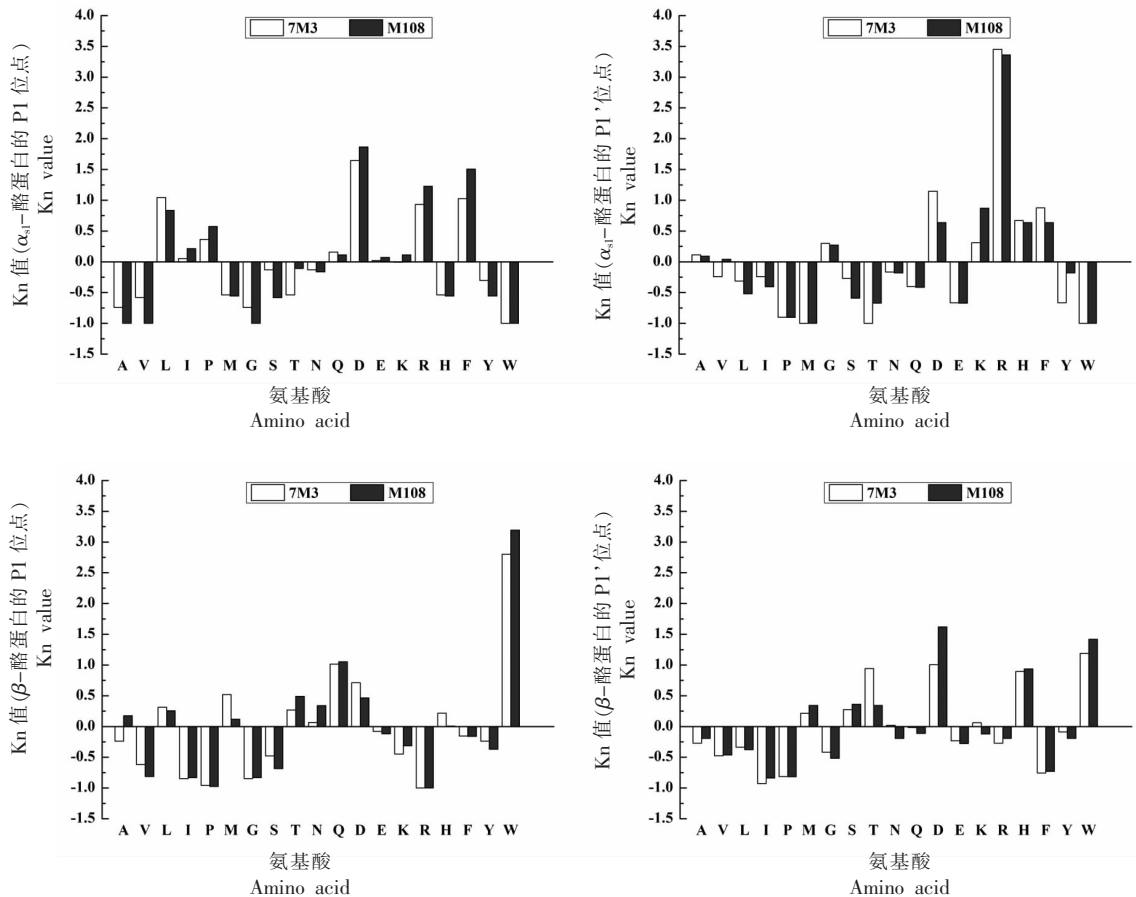


图 5 瑞士乳杆菌 7M3 和 M108 对 P1 和 P1' 位点氨基酸的裂解偏好

Fig.5 Cleavage preferences of two strains for amino acids at the P1 and P1' subsites

## 2.5 菌株的蛋白水解相关基因鉴定

两株瑞士乳杆菌的蛋白水解相关基因如表 3 所示。结果显示瑞士乳杆菌 7M3 和 M108 在蛋白酶、肽转运系统、肽酶等相关基因分布上存在差异性。7M3 和 M108 都拥有单一的胞壁蛋白酶基因,但其分别为 *prtH2* 和 *prtH3*。另外,在两株瑞士乳杆菌中都鉴定到了寡肽转运系统 Opp; 但是转运长度为 2~9 个氨基酸残基的肽的 Dpp 仅存在于 M108 中,而二、三肽离子转运系统 DtpT 只存在于 7M3 中。对于肽酶而言,除了 *pepL* 外,其余 14 种肽酶都存在于这两株瑞士乳杆菌中,这证实了肽酶相对保守的说法<sup>[2]</sup>。

有研究提出 CEP 差异会带来菌株蛋白质水解能力的不同,当菌株含有 *prtH* 和 *prtH2* 两个胞壁蛋白酶时,其蛋白水解活性显著高于仅含有 *prtH* 的菌株<sup>[3]</sup>。CEP 差异带来的分解模式的多样性也已被证实,含有 *prtH2* 和 *prtH3* 基因的菌株与含有 *prtH1* 菌株发酵后的产物有明显差异<sup>[15]</sup>。转运系统的差异也代表着菌株的吸收多样性,二、三肽和寡肽转运系统的特异性在乳酸乳球菌中已被证实<sup>[21]</sup>,而目前对于瑞士乳杆菌中转运系统的特异性还少有研究。因此推测上述肽的异质性是由于 7M3 和 M108 胞壁蛋白酶及转运系统差异。而特定胞壁蛋白酶对酪蛋白的切割效率和位点及不同转运系统的转运特异性还需要更多的试验去验证,这可能帮助我们筛选出高蛋白水解效率的基因组合,并从产物角度评估其对产品的潜在价值。

## 2.6 发酵过程中瑞士乳杆菌菌株的蛋白酶活性和生长特性

在发酵过程中两株瑞士乳杆菌菌株的生长特性和胞壁蛋白酶酶活如图 6 所示。发酵过程中两株瑞士乳杆菌胞壁蛋白酶酶活特性显著不同,而生长呈现相似趋势。在 12 h 内,7M3 和 M08 呈现相似的生长速率,但是在 12~24 h 内 M108 的生长速率大于 7M3。M108 在对数前期(6 h)达到酶活最高点(2 120 荧光/mg 蛋白),随后酶活显著下降。相反,7M3 在整个发酵过程中保持相对较低但稳定的酶活。胞壁蛋白酶作为蛋白水解的第一步,M108 的高酶活可能促进了菌株对  $\beta$ -酪蛋白的水解。但是胞壁蛋白酶的切割特异性是否会对菌株生长代谢产生影响并表现出酶活差异还需要进一

表 3 试验菌株中蛋白酶、肽转运系统和肽酶的分布情况

Table 3 Distribution of proteinase, peptide transporters and peptidases of the proteolytic system in experimental strains

菌株	基因	7M3	M108
胞壁蛋白酶	<i>prtH1</i>	-	-
	<i>prtH2</i>	+	-
	<i>prtH3</i>	-	+
	<i>prtH4</i>	-	-
转运系统	Opp	+	+
	Dpp	-	+
	DtpT	+	-
肽酶	<i>pepC</i>	+	+
	<i>pepM</i>	+	+
	<i>pepA</i>	+	+
	<i>pepE</i>	+	+
	<i>pepO</i>	+	+
	<i>pepF</i>	+	+
	<i>pepDA</i>	+	+
	<i>pepV</i>	+	+
	<i>pepT</i>	+	+
	<i>pepX</i>	+	+
	<i>pepI</i>	+	+
	<i>pepR</i>	+	+
	<i>pepL</i>	-	-
	<i>pepP</i>	+	+
<i>pepQ</i>	+	+	

注:“+”指该基因被鉴定到;“-”指该基因未被鉴定到。

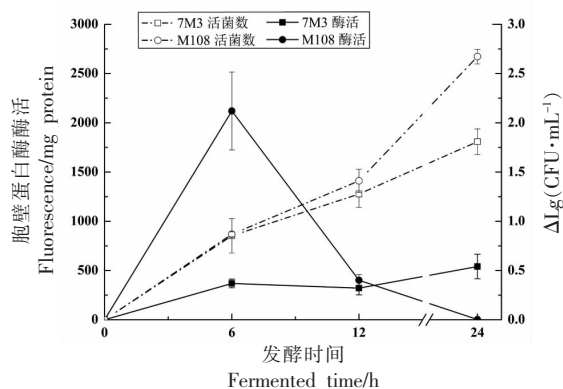


图 6 发酵过程中菌株生长和胞壁蛋白酶活性的变化

Fig.6 Growth and cell-envelope protease activity during fermentation of the strains 7M3 and M108

步去验证。

## 3 结论

研究表明瑞士乳杆菌对  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白和  $\beta$ -酪蛋

白的水解无显著偏好,但 M108 对  $\beta$ -酪蛋白具有更强的蛋白水解和产肽能力。不同肽分子质量的肽浓度在发酵过程中呈动态变化,分子质量在 180~500 u 的小肽先消耗后积累,而分子质量为 2 000~10 000 u 的肽段变化趋势则完全相反。对 24 h 的发酵乳的肽谱表明 7M3 和 M108 表现出肽的异质性,前者产生更多特异性肽,其中大部分来自  $\beta$ -酪蛋白的 f78-99 区域,如 ACE 抑制肽 VPP。二者来源于  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的特异性肽也分布于序列的不同区域,7M3 偏好切割 C 端,而 M108 产生的肽主要来源于 N 端和中间区域。对鉴定到的肽进行 P1 和 P1' 位点的氨基酸切割偏好分析,7M3 和 M108 对不同酪蛋白表现出差异切割模式,其中 M108 对  $\alpha_{s1}$ -酪蛋白的切割特点暗示其可能产生一些潜在 ACE 抑制肽。两株菌株的蛋白水解相关基因分布也存在差异,两者含有不同的胞壁蛋白酶及差异转运系统,但其肽酶基因相对保守。发酵前期 M108 呈现了较高胞壁蛋白酶酶活。

### 参 考 文 献

- [1] SAVIJOKI K, INGMER H, VARMANEN P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(4): 394-406.
- [2] BROADBENT J R, CAI H, LARSEN R L, et al. Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(9): 4313-4328.
- [3] SADAT-MEKMENE L, JARDIN J, CORRE C, et al. Simultaneous presence of PrtH and PrtH2 proteinases in *Lactobacillus helveticus* Strains improves breakdown of the pure alphas1-casein[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(1): 179-186.
- [4] SKRZYPCZAK K W, GUSTAW W Z, WAŚKO A D. Distribution of cell envelope proteinases genes among polish strains of *Lactobacillus helveticus* [J]. Polish Journal of Microbiology, 2018, 67(2): 203-211.
- [5] PRITCHARD G. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1993, 12(1/2/3): 179-206.
- [6] LIU M, BAYJANOV J, RENCKENS B, et al. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1):36.
- [7] JENSEN M P, VOGENSEN F K, ARDÖ Y. Variation in caseinolytic properties of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(11): 661-668.
- [8] PAN D, GUO Y. Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate[J]. International Dairy Journal, 2010, 20(7): 472-479.
- [9] STUKNYTĖ M, CATTANEO S, MASOTTI F, et al. Occurrence and fate of ACE-inhibitor peptides in cheeses and in their digestates following in vitro static gastrointestinal digestion[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 27-33.
- [10] FEKETE Á A, GIVENS D I, LOVEGROVE J A. Casein-derived lactotriptides reduce systolic and diastolic blood pressure in a meta-analysis of randomised clinical trials[J]. Nutrients, 2015, 7(1): 659-681.
- [11] TURPEINEN A M, JÄRVENPÄÄ S, KAUTIAINEN H, et al. Antihypertensive effects of bioactive tripeptides—a random effects meta-analysis[J]. Annals of Medicine, 2013, 45(1):51-56.
- [12] 于洋, 于文皓, 晏嘉泽, 等. 基于 LC-MS/MS 的酸乳肽谱及 ACE 抑制活性[J]. 食品科学, 2017, 38(5): 208-212.  
YU Y, YU W H, YAN J Z, et al. Peptide profiling of yogurts identified by LC-MS/MS and their ACE inhibitory activities[J]. Food Science, 2017, 38(5): 208-212.
- [13] XU Y, LIU D, YANG H, et al. Effect of calcium sequestration by ion-exchange treatment on the dissociation of casein micelles in model milk protein concentrates[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 60: 59-66.
- [14] 陈嘉琪. 基于基因组学及乳清蛋白水解特性的德式乳杆菌保加利亚亚种差异性分析[D]. 无锡: 江南大学, 2020.  
CHEN J Q. Diversity analysis of *Lactobacillus Delbrueckii Subsp. bulgaricus* based on genomics and whey proteolysis characteristics [D]. Wuxi: Jiangnan



- University, 2020.
- [15] CYRIL R, BENOIT C, BARBARA D, et al. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from Mongolian traditional dairy products: A multiparametric analysis [J]. *Food Chemistry*, 2020, 304: 125415.
- [16] SOLIERI L, VERO L D E, TAGLIAZUCCHI D. Peptidomic study of casein proteolysis in bovine milk by *Lactobacillus casei* PRA205 and *Lactobacillus rhamnosus* PRA331 [J]. *International Dairy Journal*, 2018, 85: 237–246.
- [17] MIYAMOTO M, UENO H M, WATANABE M, et al. Distinctive proteolytic activity of cell envelope proteinase of *Lactobacillus helveticus* isolated from airag, a traditional Mongolian fermented mare's milk [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 197: 65–71.
- [18] STEFANOVIC E, KILCAWLEY K N, REA M C, et al. Genetic, enzymatic and metabolite profiling of the *Lactobacillus casei* group reveals strain biodiversity and potential applications for flavour diversification [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122 (5): 1245–1261.
- [19] SØREN DRUD NIELSEN, ROBERT L. BEVERLY, YUNYAO QU, et al. Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization [J]. *Food Chemistry*, 2017, 232: 673–682.
- [20] MARTIN M, DEUSSEN A. Effects of natural peptides from food proteins on angiotensin converting enzyme activity and hypertension [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59 (8): 1264–1283.
- [21] KUNJI E R, SMID E J, PLAPP R, et al. Dipeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(7): 2052–2059.

### Comparative Analysis of Casein Hydrolysis in *Lactobacillus helveticus* Based on Peptidomics

Zhang Xinyi, Jiang Yang, Liu Xiaoming\*, Zhao Jianxin, Chen Wei  
(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu)

**Abstract** In order to investigate the hydrolysis capacity of *Lactobacillus helveticus* casein and the discrepancy of the peptides in the fermented products, the consumption of the two major caseins, peptide dynamic change and peptidomics were studied, as well as the hydrolysis genes of the two *Lactobacillus helveticus* strains and the cell-envelope protease activity during fermentation. The results showed that the hydrolysis of  $\beta$ -casein and  $\alpha_{s1}$ -casein by the two *Lactobacillus helveticus* strains was significantly different with no obvious preference. The total contents of peptides increased initially during fermentation. The peptides with molecular weights of 2 000–10 000 u showed similar trends, while the peptides with molecular weights of 180–500 u gradually accumulated in the late stage of fermentation. The analysis by LC-MS/MS indicated that the peptides showed heterogeneity after 24 h of fermentation, with 7M3 generating more specific peptides, mostly from the f78–99 region of  $\beta$ -casein from the C-terminus of  $\alpha_{s1}$ -casein, whereas M108 produced more peptides derived from the N-terminal and intermediate sequences of  $\alpha_{s1}$ -casein. The two strains displayed different single cell-envelope proteinase gene and transport systems. The higher enzyme activity of M108 in the early stage of fermentation was observed.

**Keywords** *Lactobacillus helveticus*; casein; hydrolysis; peptide; gene