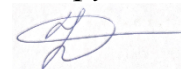


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Климко Алёна Игоревна

**АДАПТАЦИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ МОЛОЧНОКИСЛОЙ БАКТЕРИИ
LACTICASEIBACILLUS RHAMNOSUS КМ МГУ 529 К РОСТУ В
АЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

**Научные
руководители**

- *Нетрусов Александр Иванович*, доктор биологических наук, профессор
Брюханов Андрей Леонидович, кандидат биологических наук, доцент

**Официальные
оппоненты**

- *Градова Нина Борисовна*, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», факультет биотехнологии и промышленной экологии, кафедра биотехнологии, ведущий научный сотрудник
Полуэктова Елена Ульриховна, доктор биологических наук, ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук», отдел генетических основ биотехнологии, лаборатория генетики микроорганизмов, главный научный сотрудник
Николаев Юрий Александрович, доктор биологических наук, ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии имени С.Н.Виноградского, лаборатория выживаемости микроорганизмов, заведующий лабораторией

Защита диссертации состоится «06» июня 2023 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. 389.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2524>

Автореферат разослан «03» мая 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности. Молочнокислые бактерии (МКБ) широко используют в качестве стартовых и пробиотических культур при производстве ферментированных продуктов, а также в профилактике и лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, кожных и слизистых покровов. Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении с пищей в достаточных количествах приносят пользу здоровью организму хозяина (Hill et al., 2014). Пробиотический микроорганизм должен обладать рядом определённых качеств, наиболее важные из которых: способность к адгезии к эпителиальным клеткам кишечника организма хозяина, образование биоплёнок, антимикробные и антиоксидантные свойства (Zawistowska-Rojek et al., 2022).

В ходе некоторых стадий биотехнологических процессов (сепарация, распылительная сушка) МКБ часто подвергаются окислительным стрессам, которые возникают из-за накопления внутри клеток активных форм кислорода (АФК): супероксид-радикала, пероксида водорода или гидроксильного радикала. Синтезируя ферменты защиты от АФК (супероксиддисмутазу, каталазы, различные пероксидазы), пробиотические микроорганизмы способны защитить и организм хозяина от пагубного воздействия АФК, вызывающих повреждения белков, мутации в нуклеиновых кислотах, окисление мембранных фосфолипидов и модификации липопротеинов низкой плотности (Guo et al., 2023). Поиск новых безопасных штаммов МКБ с выраженными пробиотическими свойствами и высокой устойчивостью к условиям технологических процессов является весьма актуальным.

По современным представлениям перспективным способом получения стартовых и пробиотических культур МКБ является культивирование в аэробных или в дыхательных условиях. В последнем случае лактококков выращивают в присутствии экзогенного гемина, а лактобацилл – в присутствии гемина и менахинона (Zotta et al., 2017; Siciliano et al., 2019; Johanson et al., 2020). МКБ, выращенные в аэробных/дыхательных условиях, образуют больше ароматических соединений, демонстрируют повышенную устойчивость к окислительным стрессам, замораживанию, лиофильной сушке и длительному хранению, а в случае дыхательного культивирования обеспечивают более высокий выход биомассы по сравнению с анаэробными культурами. В этой связи аэробное/дыхательное культивирование рассматривают как перспективный подход для получения, хранения и реализации замороженных или лиофилизированных заквасок и пробиотических культур МКБ (Zotta et al., 2017).

МКБ относят к аэротолерантным анаэробам. У МКБ отсутствуют гены полного пути биосинтеза гема, лишь представители некоторых родов, включая *Lactococcus*, синтезируют менахинон (Pedersen et al., 2012). При дыхательном культивировании у некоторых МКБ функционирует электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), состоящая из НАДН-дегидрогеназы, менахинона и хинолоксидазы *bd*.

В связи с вышесказанным механизмы адаптации МКБ к аэробному росту требуют всестороннего изучения. К настоящему времени влияние аэробноза на метаболизм наиболее полно охарактеризовано у *Lactococcus lactis* (Larsen et al., 2016), *Lactiplantibacillus plantarum* (Stevens et al., 2008; Mazzeo et al., 2012) и *Lacticaseibacillus casei* (Siciliano et al., 2019). В данной работе, используя протеомный анализ, впервые исследована адаптация *Lacticaseibacillus rhamnosus* к аэробному росту, а также впервые продемонстрировано функционирование ЭТЦ у МКБ на уровне мембран. Так же было показано наличие ключевых генов антиоксидантной защиты в клетках ряда пробиотических МКБ.

Цель и задачи работы. Целью данной работы являлся поиск штамма МКБ с выраженными пробиотическими свойствами, а также с высокой степенью адаптации к присутствию кислорода.

В соответствии с целью решали следующие задачи:

1. Исследование пробиотических свойств различных видов и штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В.Ломоносова.
2. Изучение влияния аэробных/дыхательных условий культивирования на рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.
3. Изучение механизмов адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях.

Объектами исследования являлись 33 штамма МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В.Ломоносова. Основным объектом служил штамм *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529, выделенный на кафедре микробиологии из фекального образца четырёхмесячного младенца.

Предметом исследования являлось изучение пробиотических свойств МКБ, механизмов адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях, строения и функционирования ЭТЦ данной лактобациллы.

Научная новизна исследования. Были изучены штаммоспецифические пробиотические свойства МКБ (адгезия, способность к образованию биоплёнок, антимикробная и антиоксидантная активности) из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В.Ломоносова. Впервые исследована адаптация *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях.

Протеомный анализ помог выявить некоторые молекулярные механизмы такой адаптации. Для 39 из 57 белков, уровень которых изменялся при аэробном культивировании с перемешиванием по сравнению со статичным ростом, впервые показан O₂-чувствительный синтез у МКБ. Среди белков, уровень которых в клетках вырос, следует выделить следующие: родственный пиридоксин-5'-фосфат-оксидазе белок, шаперонин GroES, универсальный стрессовый белок (USP), белок семейства ThiJ/PfpI, НАДН:флавин-оксидоредуктазу семейства OYE, дегидрогеназу β-гидроксикислот, регулятор транскрипции фактора устойчивости к органическим

гидропероксидам, связывающийся с рибосомой фактор А и тРНК-сульфотрансферазу. Уровень таких ферментов, как аспаратаминотрансфераза, алкилгидропероксидредуктаза С, аденозилкобаламин-зависимая рибонуклеозидтрифосфатредуктаза, дезоксиаденозинкиназа/дезоксигуанозинкиназа, в аэрируемых клетках *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 снижался. Впервые показано повышение уровня ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов при аэробном росте у МКБ.

Впервые была измерена активность ЭТЦ на препаратах мембран МКБ. При этом продемонстрировано *in vitro* свойство экзогенного менахинона переносить электроны от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd* у МКБ.

Были впервые сконструированы вырожденные праймеры для поиска ключевых генов антиоксидантной защиты, кодирующих супероксиддисмутазу (*sod*), каталазу (*cat*), гемовую пероксидазу (*per*) и пероксиредоксин (*prx*) в клетках лактобацилл, а также определены активности соответствующих ферментов в различных клеточных фракциях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Расшифрованы новые молекулярные механизмы адаптации МКБ к условиям аэробного роста, что открывает пути к лучшему пониманию природы аэротолерантности МКБ и клеточного ответа на окислительные стрессы. Факт, что синтез восьми белков с неизвестной функцией чувствителен к аэрации у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, поможет в дальнейшем определить их физиологическую роль в метаболизме МКБ. Демонстрация *in vitro* способности экзогенного менахинона переносить электроны от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd* позволила впервые подтвердить функционирование дыхательной цепи у МКБ на уровне ферментативной активности мембран.

Показано, что важнейшие пробиотические свойства МКБ (гидрофобность клеточной поверхности, образование биоплёнок, антимикробная активность, ингибирование автоокисления аскорбата, наличие генов и ферментов антиоксидантной защиты) являются штаммоспецифичными.

Практическая значимость работы заключается в выявлении штамма МКБ с выраженными пробиотическими свойствами и высокой степенью адаптации к аэробному культивированию, что важно на стадиях биотехнологических процессов получения, хранения и транспортировки пробиотических препаратов. Аэробное выращивание *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 позволит повысить устойчивость биопрепарата на его основе к окислительным стрессам, а аэробное выращивание в присутствии гемина и менахинона может служить перспективным технологическим подходом для повышения выхода биомассы потенциального пробиотика.

Методология и методы исследования. Автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение экспериментальной и теоретической частей работы с использованием

современных методов микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, молекулярной биофизики и биоинформатики. Полученные результаты были проанализированы, систематизированы и изложены в тексте данной работы, сформулированы выводы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Лактобациллы, хранящиеся в коллекции кафедры микробиологии МГУ, обладают следующими пробиотическими свойствами, выраженными в разной степени и имеющими штаммоспецифичный характер: адгезией, способностью к образованию биоплёнок, а также антимикробной и антиоксидантной активностями.

2. В случае аэробного культивирования в присутствии гемина и менахинона (дыхательные условия) *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 реализует дыхательный метаболизм. При этом выход биомассы увеличивается на 27%. Дыхательная цепь штамма КМ МГУ 529 состоит из НАДН-дегидрогеназы 2, менахинона и хинолоксидазы *bd*, и характеризуется высокой НАДН-оксидазной и хинолоксидазной активностями.

3. *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 обладает высокой степенью адаптации к присутствию кислорода, выражающейся в перестройке углеродного метаболизма, индукции биосинтеза флавиновых оксидаз, ферментов, участвующих в детоксикации АФК, стрессовых белков, ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. При выполнении диссертационного исследования использованы современные и адекватные поставленным задачам микробиологические, биохимические и молекулярные методы. Достоверность представленных данных подтверждается достаточным количеством повторностей (не менее трёх) при проведении экспериментов и использованием методов статистической обработки. При написании обзора литературы и обсуждении результатов использованы современные источники по теме исследования в рецензируемых журналах. Достоверность полученных результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах. Результаты диссертации были представлены на следующих международных конференциях: «Ломоносов-2021» (Москва, 2021), «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019), «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2015 и 2017).

Личный вклад автора. А.И. Климко внесла существенный вклад в планирование и проведение экспериментальной части работы, анализ данных и подготовку публикаций к печати по материалам исследования. Ею написаны диссертация и автореферат к ней.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования,

изложение результатов работы и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 182 страницах, содержит 15 рисунков, 19 таблиц и 1 приложение. Список литературы включает 308 источников, из них 302 на иностранных языках.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность к.б.н., доц. Андрею Леонидовичу Брюханову и д.б.н., проф. Александру Ивановичу Нетрусову за руководство данной работой, всестороннюю методическую и моральную поддержку. Автор также благодарен всем сотрудникам кафедры микробиологии, в первую очередь, к.б.н. Татьяне Юрьевне Динариевой и к.б.н. Татьяне Андреевне Чердынцевой за неоценимую помощь в выполнении экспериментальной части данной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы описаны биохимические характеристики МКБ, дан подробный анализ их важных пробиотических свойств. Особое внимание отведено антиоксидантным свойствам: выживаемости МКБ в условиях окислительных стрессов, отношению к кислороду и его активным формам, описанию ключевых ферментов антиоксидантной защиты, а также практическому использованию антиоксидантных свойств МКБ. Рассмотрены особенности углеродного и энергетического метаболизма МКБ при росте в аэробных условиях.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Штаммы и культивирование. Штаммы МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ выращивали на питательной среде MRS (Merck KGaA, Германия) следующего состава (г/л): гидролизат казеина – 10,0; мясной экстракт – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; глюкоза – 20,0; ацетат натрия – 5,0; цитрат аммония – 2,0; Твин-80 – 1 мл; K_2HPO_4 – 2,0; $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,2; $MnSO_4 \times 4 H_2O$ – 0,05, начальное значение pH 6,5. В случае твердой питательной среды добавляли 2% (вес/об.) агара.

L. rhamnosus КМ МГУ 529 выращивали в статичных, аэробных и дыхательных условиях при 37°C в течение 24–30 ч. Статичные условия: культивирование в закрытых резиновой пробкой и алюминиевым колпачком флаконах объемом 12 мл с 10 мл питательной среды без перемешивания. Аэробные условия: культивирование в колбах объемом 250 мл с 15 мл питательной среды и перемешиванием (200 об./мин). Дыхательные условия: культивирование в колбах объемом 250 мл с 15 мл

питательной среды и перемешиванием (200 об./мин) в присутствии 38 мкМ гема и 18 мкМ витамина К₂ как источника менахинона. Посевным материалом во всех случаях (10% об./об.) служила суточная культура, выращенная в статичных условиях.

Измерение гидрофобности клеточной поверхности. Гидрофобность клеточной поверхности определяли в соответствии с методом микробной адгезии к углеводородам (Vinderola, Reinheimer, 2003), используя гексадекан.

Образование биоплёнок. Образование биоплёнок МКБ изучали в жидкой культуре с помощью тефлоновых блоков, окрашенных кристаллическим фиолетовым, КФ (Мартьянов и др., 2015). Измеряли поглощение раствора КФ в 96%-ном этаноле при λ 590 нм.

Антимикробная активность. Антимикробную активность МКБ изучали на чашках Петри на поверхности агаризованной питательной среды MRS, только что засеянной культурой тестового микроорганизма: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* или *Staphylococcus aureus*, к которым добавляли агаровый блок с культурой МКБ. О степени антагонистической активности исследуемой лактобактерии судили по величине зоны ингибирования роста тест-микроорганизма вокруг агарового блока (Аникиев, Лукомская, 1977).

Ингибирование клетками МКБ автоокисления аскорбата. Анализ проводили по модифицированному методу Мишры и Ковачича (Mishra, Kovachich, 1984).

ПЦР с вырожденными праймерами для поиска генов антиоксидантной защиты в клетках лактобацилл. Выделение ДНК из бактерий проводили при помощи набора «GeneJET Genomic DNA Purification Kit» (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Для поиска ключевых генов антиоксидантной защиты в геномах МКБ использовали сконструированные с помощью с помощью пакетов программ BLASTN и HYDEN вырожденные олигонуклеотидные праймеры. Полученные ПЦР-продукты разделяли в 1,5%-ном агарозном геле.

Определение активностей ферментов антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы. Активность СОД определяли с использованием ксантинооксидазо-цитохромного метода при λ 550 нм (McCord, Fridovich, 1969). Каталазную активность определяли спектрофотометрическим методом измерения поглощения H₂O₂ при λ 240 нм, описанным в работах Бирса и Сайзера (Beers, Sizer, 1952), Нельсона и Кисоу (Nelson, Kiesow, 1972). Пероксидазную активность измеряли с помощью 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты), АБТС. Метод основан на измерении поглощения образующегося окисленного АБТС при λ 405 нм (Gallati, 1979).

Получение мембранных фракций. Мембранные фракции клеток получали по методике, описанной в работе Динариевой и др. (2022).

Полярографический анализ. Скорость поглощения кислорода целыми клетками и препаратами мембран измеряли с помощью кислородного электрода типа Кларка (Rank Brothers Ltd., Великобритания) в ячейке объемом 2 мл при 37°C.

Измерение спектров поглощения. Разностные спектры поглощения мембранных препаратов регистрировали на однолучевом спектрофотометре Specord 50 (Analytik Jena AG, Германия) при комнатной температуре в 50 мМ К-фосфатном буферном растворе (рН 7,0). Измерения проводили в диапазоне длин волн 390–675 нм при длине оптического пути 1 см.

Определение глюкозы. Глюкозу в культуральной жидкости измеряли с помощью ФАД-зависимой глюкозодегидрогеназы из *Aspergillus* sp. при рН 7,0 и 30°C, используя глюкометр Contour TS (Bayer AG, Германия). Культуральные жидкости разводили 100 мМ К-фосфатным буферным раствором (рН 7,0) до конечных концентраций глюкозы 4–20 мМ.

Определение сухой биомассы и белка. Клетки осаждали центрифугированием и трижды отмывали осадки клеток деионизированной водой. Массу центрифужных пробирок, пустых и содержащих биомассу, доводили до постоянного веса при 90°C. Белок определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976), используя бычий сывороточный альбумин (фракция V) в качестве стандарта.

Масс-спектрометрический анализ. Подготовка пептидных проб, разделение пептидных смесей и масс-спектрометрический анализ подробно описаны в опубликованных по теме диссертации работах (Динариева и др., 2022; Dinarieva et al., 2023). Идентификацию мембранных белков проводили с использованием времяпролётной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS/MS) на масс-спектрометре ABI Voyager DE-Pro (Applied Biosystems, США). Для количественного протеомного анализа использовали хроматограф Ultimate 3000, совмещённый с масс-спектрометром Orbitrap Exploris (Thermo Fisher Scientific GmbH, Германия). Для количественного и статистического анализа данных использовали программы MaxQuant v. 2.0.1.0 и SaveQuant v. 2.3.5. Белки с параметром достоверности идентификации (score) > 75, кратностью изменения уровня 1,5 (\log_2 кратности изменения $\geq 0,6$ или $\leq -0,6$) и со значениями p и $q \leq 0,05$ рассматривали как изменившиеся в количестве в ответ на аэрацию относительно статичного роста.

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. Данные представлены как «среднее \pm стандартное отклонение» по результатам, полученным на основе трёх независимых культивирований. Для оценки значимости различий использовали t -критерий Стьюдента. Анализируемые выборки происходили из генеральной совокупности, имеющей нормальное распределение в соответствии с W -критерием Шапиро-Уилка, $p > 0,05$ (Statistica v. 10.0).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

Изучение пробиотических свойств МКБ. Проведён скрининг 33 штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов (КМ) кафедры микробиологии МГУ на гидрофобность клеточной поверхности, ингибирование автоокисления аскорбата, способность к образованию биоплёнок и антимикробную активность по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. В итоге было отобрано 15 штаммов МКБ, которые продемонстрировали лучшие пробиотические свойства (таблица 1). Высокой гидрофобностью клеточной поверхности, выраженной в проценте клеток, связавшихся с неполярным растворителем гексадеканом, обладали всего 5 штаммов МКБ: *Lactobacillus acidophilus* КМ МГУ 146 (89%), *Lactobacillus caucasicus* КМ МГУ 155 (70%), *Lactobacillus delbrueckii* КМ МГУ 571 (57%), *Lacticaseibacillus paracasei* КМ МГУ 527 (85%) и *Lactiplantibacillus plantarum* КМ МГУ 508 (78%).

МКБ, у которых значение ОП₅₉₀ экстракта КФ из биоплёнок было выше 0,5, рассматривались нами как микроорганизмы с высокой способностью к биоплёнкообразованию. Наиболее интенсивное образование биоплёнок продемонстрировали штаммы *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 и *Levilactobacillus brevis* КМ МГУ 521. Следует отметить отсутствие корреляции между высокой гидрофобностью поверхности клеток и интенсивностью образования биоплёнок. Указанные свойства являются штаммоспецифичными даже в пределах одного вида, что может быть обусловлено характером местообитания конкретного штамма, биосинтезом различных поверхностных молекул и секрецией разнообразных метаболитов в зависимости от условий окружающей среды. Все это говорит о необходимости детального и всестороннего анализа биохимических свойств каждого штамма МКБ при подборе оптимальных пробиотических культур.

Антимикробную активность по отношению к *E. coli* КМ МГУ 85, *P. aeruginosa* КМ МГУ 47 и *S. aureus* КМ МГУ 144 в той или иной степени продемонстрировали все изученные штаммы МКБ (таблица 1). Различия могут быть обусловлены тем, что способы подавления роста условно-патогенных микроорганизмов культурами МКБ также штаммоспецифичны и зависят от характеристик осуществляемого ими брожения, в частности, от спектра и концентраций продуцируемых кислот.

Ингибирование автоокисления аскорбата определяется редуцирующими свойствами МКБ. В нашем случае высокий процент ингибирования автоокисления аскорбата продемонстрировал штамм *Lp. plantarum* КМ МГУ 161. Штамм *Lv. brevis* КМ МГУ 521 показал средние результаты. Также, исходя из полученных данных, видно, что практически все исследованные штаммы обладают данным свойством, что свидетельствует о том, что многие МКБ могут противостоять АФК (Zanoni et al., 2008; таблица 1).

По результатам вышеприведённых экспериментов для дальнейшей работы было выбрано 8 штаммов МКБ.

Таблица 1. Пробиотические свойства МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ

№	Микроорганизм	Гидрофобность клеточной поверхности ¹	Ингибирование автоокисления аскорбата Na ²	Образование биоплёнок ³	Антимикробные свойства ⁴		
					<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> КМ МГУ 146	89,2 ± 4,5	0	0,12 ± 0,01	8,3 ± 0,6	17,3 ± 0,6	31,7 ± 0,6
2	<i>Lb. caucasicus</i> КМ МГУ 155	70,1 ± 3,2	0,15 ± 0,01	0,25 ± 0,01	11,3 ± 0,6	16,0 ± 0,0	26,3 ± 0,6
3	<i>Lb. delbrueckii</i> КМ МГУ 571	57,3 ± 2,1	17,01 ± 0,83	0,79 ± 0,04	10,7 ± 0,6	13,3 ± 0,6	25,3 ± 0,6
4	<i>Levilactobacillus brevis</i> КМ МГУ 160	11,1 ± 0,5	4,02 ± 0,19	0,55 ± 0,03	9,0 ± 1,0	13,7 ± 0,6	26,0 ± 1,0
5	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	27,4 ± 1,2	15,51 ± 0,78	1,21 ± 0,05	10,3 ± 0,6	15,3 ± 0,6	28,7 ± 0,6
6	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 535	2,2 ± 0,1	20,72 ± 1,04	1,15 ± 0,04	9,3 ± 0,6	10,3 ± 0,6	30,7 ± 0,6
7	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 542	25,3 ± 1,3	11,21 ± 0,55	0,99 ± 0,05	11,3 ± 0,6	13,0 ± 0,0	25,3 ± 0,6
8	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> КМ МГУ 161	9,2 ± 0,6	43,13 ± 2,13	0,73 ± 0,04	14,0 ± 1,0	14,3 ± 0,6	13,3 ± 0,6
9	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 162	15,1 ± 0,8	0	0,74 ± 0,04	11,7 ± 0,6	16,3 ± 0,6	19,0 ± 0,0
10	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	78,5 ± 3,7	33,03 ± 1,65	0,42 ± 0,02	11,3 ± 0,6	15,3 ± 0,6	13,3 ± 0,6
11	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 520	13,3 ± 0,6	36,64 ± 1,81	0,63 ± 0,03	10,0 ± 0,0	16,7 ± 0,6	20,0 ± 1,0
12	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> КМ МГУ 529	10,9 ± 0,2	0	1,34 ± 0,07	9,3 ± 0,6	15,0 ± 0,0	28,7 ± 0,6
13	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	85,4 ± 4,3	38,12 ± 1,91	0,57 ± 0,03	14,3 ± 0,6	14,0 ± 1,0	13,3 ± 0,6
14	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	4,1 ± 0,1	0,13 ± 0,01	0,68 ± 0,03	8,7 ± 0,6	4,3 ± 0,6	21,7 ± 0,6
15	<i>Lactococcus lactis</i> КМ МГУ 170	15,3 ± 0,8	0	0,61 ± 0,03	12,3 ± 0,6	15,3 ± 0,6	21,3 ± 0,6

Примечания:

¹ – процент клеток, связавшихся с гексадеканом (%);

² – процент ингибирования автоокисления аскорбата Na (%);

³ – поглощение раствора кристаллического фиолетового (КФ) в 96%-ном этаноле при λ 590 нм;

⁴ – диаметр зоны ингибирования роста тестового микроорганизма (мм); диаметры зон подавления роста *E. coli* КМ МГУ 85, *P. aeruginosa* КМ МГУ 47 и *S. aureus* КМ МГУ 144 в присутствии диска с гентамицином (10 мкг) в аналогичных условиях составляли 20,0 ± 1,0, 18,0 ± 1,0 и 19,7 ± 0,6 мм соответственно.

Поиск генов антиоксидантной защиты в геномах лактобацилл с помощью вырожденных ПЦР-праймеров. Не все представленные МКБ содержали гены, кодирующие СОД, каталазу и пероксиредоксин, в отличие от пероксидазы (таблица 2). Наличие тех или иных генов (*sod*, *cat*, *per*, *prx*) зависит от штамма.

Таблица 2. Результаты ПЦР с вырожденными праймерами на ключевые гены антиоксидантной защиты у лактобацилл

№	Микроорганизм	<i>sod</i> (СОД)	<i>cat</i> (каталаза)	<i>per</i> (гемовая пероксидаза)	<i>prx</i> (перокси- редоксин)
1	<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	-	-	+	+
2	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 527	+	+	+	+
3	<i>L. paracasei</i> КМ МГУ 544	+	-	+	+
4	<i>L. caucasicus</i> КМ МГУ 155	-	-	+	-
5	<i>Lb. delbrueckii</i> КМ МГУ 571	-	-	+	-
6	<i>Lv. brevis</i> КМ МГУ 521	-	+	+	+
7	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	+	+	+	+
8	<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 508	-	+	+	+

По результатам проведённых анализов для дальнейших исследований были выбраны два штамма МКБ: *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 и *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Первый штамм продемонстрировал высокий процент ингибирования автоокисления аскорбата Na, однако по результатам других экспериментов он имел средние значения. Второй – не обладал способностью к замедлению автоокисления аскорбата Na, но образовывал мощные биоплёнки и обладал выраженной антимикробной активностью.

Определение активностей ключевых ферментов антиоксидантной защиты в клетках исследуемых МКБ. Штаммы выращивали в аэробных условиях в присутствии гемина. Активности ферментов измеряли в экстрактах клеток и в клеточных фракциях (таблица 3).

Таблица 3. Активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты в клетках МКБ: 1 – экстракт клеток; 2 – растворимая фракция; 3 – мембраны

Штамм	Активность СОД, ед./мг белка			Активность каталазы, ед./мг белка			Активность пероксидаз, ед./мг белка		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Lp. plantarum</i> КМ МГУ 161	1,12 ± 0,05	0,65 ± 0,02	0,16 ± 0,01	52,1 ± 2,82	68,5 ± 3,32	н.о.	11,5 ± 1,34	20,16 ± 2,36	46,62 ± 3,11
<i>L. rhamnosus</i> КМ МГУ 529	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	13,21 ± 1,25	н.о.	14,69 ± 1,54

Примечание: н.о. – не обнаружено.

В аэробных условиях при росте в присутствии гемина у *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 были обнаружены активности всех ключевых ферментов антиоксидантной защиты (что совпадает с данными ПЦР-анализа), но активности СОД и каталаз в экстракте клеток были в несколько раз ниже по сравнению с *Lp. plantarum* LP2, *Lp. plantarum* WCFS1 и *L. casei* N87 (Chen et al., 2019; Liu et al., 2022; Ianniello et al., 2016).

Пероксидазная активность в экстракте клеток у *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 и *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 была в несколько раз выше по сравнению с *Lp. plantarum* C17 (Zotta et al., 2013), *L. casei* N87 и *L. rhamnosus* GG (Ianniello et al., 2015; Ianniello et al., 2016). Стоит отметить, что ген *per*, кодирующий гемовую пероксидазу, был обнаружен в геномах этих двух МКБ из коллекции кафедры микробиологии МГУ (таблица 2).

Несмотря на наличие каталазной и пероксидазной активностей, а также выраженную способность к ингибированию автоокисления аскорбата, аэрация существенно угнетала рост *Lp. plantarum* КМ МГУ 161. Напротив, аэробные условия культивирования не влияли на рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. В этой связи для изучения механизмов адаптации к росту в аэробных условиях был выбран этот штамм.

Изучение влияния аэробных и дыхательных условий культивирования на рост и метаболизм *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Штамм КМ МГУ 529 хорошо рос в аэробных условиях культивирования: выходы биомассы при росте в статичных условиях и при интенсивной аэрации были близки (таблица 4). Для активации дыхательного метаболизма лактобациллу культивировали при интенсивной аэрации в присутствии гемина и витамина К₂ (менахинона). Контролем служили аэробные культуры, выращенные без гемина и менахинона. Добавление в питательную среду гемина или менахинона по отдельности не оказывало существенного влияния на выход биомассы *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 и на значения молярных экономических коэффициентов Y_{P/S} по прошествии 18 ч культивирования. Однако совместное их внесение в питательную среду (дыхательные условия) приводило к увеличению этих

показателей на 27 и 20% по сравнению с контролем (аэробные условия) соответственно.

Более эффективное использование глюкозы лактобациллой, выращенной в присутствии гемина и менахинона, очевидно, связано с получением клетками дополнительной энергии за счёт окислительного фосфорилирования в ЭТЦ (Pedersen et al., 2012). В дыхательных условиях значение рН культуральной жидкости по прошествии 24 ч культивирования *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 было несколько выше по сравнению с контролем (таблица 4). Такое изменение рН, скорее всего, обусловлено тем, что в условиях функционирования ЭТЦ меньше пирувата превращается лактатдегидрогеназой (Ldh) в молочную кислоту. Как следствие этого, больше пирувата может окисляться пируватдегидрогеназой (Pdh) до ацетил-КоА и НАДН. При этом НАДН, который не пошёл на образование лактата, вместе с НАДН, полученным в результате активности Pdh, может впоследствии окисляться в ЭТЦ. В пользу этой гипотезы свидетельствует тот факт, что ингибирование Ldh оксаматом натрия при росте *Lc. lactis* IL1403 в дыхательных условиях сопровождалось стимуляцией аэробного дыхания и повышением выхода биомассы (Arioli et al., 2013).

Таблица 4. Влияние аэрации на рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529

Условия культивирования	Биомасса (18 ч), г сух. кл./л	Y _{P/S} (18 ч), г сух. кл./моль глюкозы	рН (24 ч)
Статичные	1,93 ± 0,04	25,2 ± 0,7	3,92 ± 0,03
Аэрация: контроль	1,92 ± 0,07	20,9 ± 0,2	4,02 ± 0,16
Аэрация: гемин	1,93 ± 0,05	20,7 ± 0,1	4,03 ± 0,13
Аэрация: менахинон (МХ)	2,05 ± 0,04	23,5 ± 0,6	3,94 ± 0,12
Дыхательные: гемин + МХ	2,44 ± 0,04*	25,2 ± 0,4*	4,25 ± 0,03*

Примечание: * – статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$.

Компоненты ЭТЦ *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 исследовали с помощью спектрального анализа и масс-спектрометрии. На рисунке 1 приведены разностные спектры поглощения препаратов мембран, выделенных из клеток, выращенных аэробно в присутствии гемина до конца логарифмической фазы роста. На нижнем спектре, когда цитохромы *b*-типа только частично восстановлены, хорошо виден широкий максимум при 617 нм, скорее всего, соответствующий α -полосе цитохрома *d*-типа. Последующее полное восстановление препаратов мембран дитионитом натрия выявило на верхнем спектре максимум поглощения при 559 нм, плечо при 533 нм и пик при 427 нм, принадлежащие α -, β - и γ -полосам цитохромов *b*-типа соответственно. Полученные спектральные характеристики близки аналогичным значениям для очищенного цитохромного комплекса *bd* из *Bacillus stearothermophilus* (Sakamoto et al., 1999), что свидетельствует в пользу присутствия хинолоксидазы *bd*-типа в мембранах *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

Препараты мембран этого штамма активно окисляли ДТТ/дурохинон, являющийся донором электронов для хинолоксидазы *bd* (таблица 5).

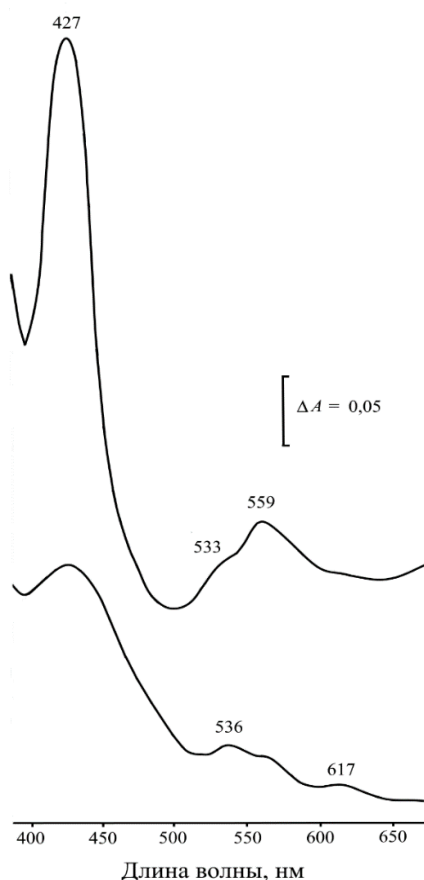


Рисунок 1. Разностные спектры поглощения (восстановление дитионитом натрия минус окисление персульфатом аммония) мембранных фракций из *L. rhamnosus* KM MGY 529, выращенной в присутствии гемина. Нижний спектр – неполное восстановление цитохромов *b*-типа, верхний – полное восстановление. Мембраны суспендированы (2,0 мг белка/мл) в 50 мМ К-фосфатном буферном растворе (рН 7,0)

Таблица 5. Поглощение кислорода препаратами мембран, выделенных из клеток *L. rhamnosus* KM MGY 529

Субстрат	Поглощение кислорода, нмоль O ₂ /мин × мг белка
ДТТ + дуροхинон	256,4 ± 19,7
НАДН	89,4 ± 5,1
НАДН + менахинон	411,9 ± 24,8

НАДН-оксидазную активность мембран *L. rhamnosus* KM MGY 529 изучали на препаратах из клеток, выращенных аэробно в присутствии гемина. Мембраны окисляли 1 мМ НАДН с относительно высокой скоростью (таблица 5). Последующее внесение в реакционную смесь 0,2 мМ витамина K₂ (менахинона) сопровождалось увеличением скорости потребления кислорода препаратами мембран в 4,6 раза. По всей вероятности, экзогенный менахинон переносит электроны от НАДН-

дегидрогеназы к хинолоксидазе *bd*, которая, в свою очередь, непосредственно восстанавливает кислород.

Ферменты, участвующие в окислении мембранами НАДН, были идентифицированы с помощью MALDI-TOF тандемной масс-спектрометрии: пиридиннуклеотид-дисульфид-оксидоредуктаза (Nox-2), НАДН дегидрогеназа 2 (Ndh-2) и субъединица I хинолоксидазы *bd* (CydA). Nox-2, характерная для представителей подгруппы *L. casei*, переносит электроны и протоны от НАДН непосредственно на кислород с образованием воды (Averina et al., 2021). Ndh-2 передаёт электроны и протоны от НАДН на хинон, который затем окисляется хинолоксидазой *bd*-типа с образованием протондвижущей силы (Marreiros et al., 2016). Из соотношения скоростей этих процессов можно заключить, что при окислении мембранами НАДН 80% транспорта электронов от НАДН к кислороду поступает через Ndh-2, менахинон и хинолоксидазу, и только 20% – через Nox-2.

Изучение механизмов адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к аэробному росту с помощью MALDI-TOF MS/MS. Для изучения молекулярных механизмов адаптации *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к росту в аэробных условиях использовали протеомный анализ лизатов клеток, выращенных статично и при интенсивной аэрации. Аэрация оказывала существенное влияние на протеом штамма КМ МГУ 529. Из 57 белков, количество которых изменялось при интенсивной аэрации по сравнению со статичным ростом, уровень 43 белков повышался, а 14 – понижался. Проведена филогенетическая классификация белков на основании сходства их последовательностей с тем или иным кластером ортологических групп, COG (таблица 6).

Таблица 6. Белки *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, уровень которых изменялся при аэробном культивировании по сравнению со статичным ростом согласно данным безметочной количественной масс-спектрометрии

Идентифицированные белки	AC ¹	Ген	log ₂ A/C ²
КЛЕТОЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ И СИГНАЛИНГ			
[D] Контроль клеточного цикла, деление клетки			
Белок клеточного деления SepF	K8QLA2	<i>sepF</i>	0,6
[O] Посттрансляционная модификация, обмен белков, шапероны			
Тиоредоксин	K8Q3Z2	<i>trxA, trxA_2</i>	1,2
Тиолпероксидаза	K8QQU7	<i>tpx</i>	1,6
10 кДа шаперон	K8QSC4	<i>groES, groS</i>	0,9
[T] Механизмы передачи сигнала			
Универсальный стрессовый белок	K8QLD2	LRHMDP2_1718	0,7
[V] Защитные механизмы клетки			

Таблица 6 (продолжение)

Белок семейства ThiJ/PfpI	K8QE31	<i>yfkM, pfpI</i>	0,7
Алкилгидропероксидредуктаза С	K8QI55	<i>ahpC</i>	-0,9
ХРАНЕНИЕ ИНФОРМАЦИИ И ПРОЦЕССИНГ			
[J] Трансляция, структура и биогенез рибосом			
Связывающийся с рибосомой фактор А	K8QHI9	<i>rbfA</i>	0,7
Предполагаемая тРНК-сульфотрансфераза	K8QLD7	<i>thiI</i>	0,6
Белок, содержащий домен β -лактамазы	K8QEJ1	<i>vicX</i>	0,9
[K] Транскрипция			
Регулятор транскрипции фактора устойчивости к органическим гидропероксидам	K8QM79	<i>ohrR</i>	0,8
Регулятор транскрипции, семейство MarR	K8QLH4	LRHMDP2_405	-0,6
МЕТАБОЛИЗМ			
[C] Получение и преобразование энергии			
НАДН-дегидрогеназа	K8Q7J1	LRHMDP2_2182	1,0
Дигидролипоилдегидрогеназа (Е3)	K8QFD2	<i>pdhD, lpdA</i>	1,2
НАДН:флавиноксидоредуктаза, семейство OYE	K8Q900	<i>namA, yqiG</i>	1,3
Предполагаемая НАД(ФАД)-зависимая дегидрогеназа	K8QIY4	<i>nox_2</i>	1,7
L-лактатоксидаза	K8Q6V5	<i>lctO</i>	1,2
НАДН-пероксидаза	K8QQ66	<i>npx, npr</i>	2,5
Пируватоксидаза [С/Н/Р]	K8QGX3	<i>ydaP, cidC</i>	2,2
Алкогольдегидрогеназа	K8QNN2	<i>xylB_1, xylB_3</i>	-1,6
Пируватформиатлиаза	K8QD01	<i>pflB</i>	-1,4
[E] Транспорт и метаболизм аминокислот			
Малая цепь карбамоилфосфатсинтазы [E/F]	K8Q6G7	<i>carA</i>	0,9
Большая цепь карбамоилфосфатсинтазы [E/F]	K8QCB0	<i>carB</i>	1,5
Катаболическая ацетолактатсинтаза [E/H]	K8QB15	<i>alsS</i>	2,9
АВС транспортёр, периплазматический олигопептид-связывающий белок OppA	K8QLE7	<i>oppA, oppA_2</i>	1,0
Нейтральная эндопептидаза	K8Q9I4	<i>pepO</i>	0,6
Н-белок системы расщепления глицина	K8QLC1	<i>gcvH</i>	0,6
Цистеинсинтаза	K8QQD2	<i>cysK</i>	0,7
Регулятор транскрипции, домен семейства GntR/аспартатаминотрансфераза [E/K]	K8Q1F8	<i>avtA</i>	-0,9
Аргининосукцинатсинтаза	K8QAT7	<i>argG</i>	-0,7
АВС-транспортёр клеточного деления, АТФ-связывающий белок FtsE	K8QCV1	<i>glnQ</i>	-0,7
[F] Транспорт и метаболизм нуклеотидов			
Оротатфосфорибозилтрансфераза	K8Q3P7	<i>pyrE</i>	2,3
Дигидрооротаза	K8Q3Q2	<i>pyrC</i>	1,8
Аспартаткарбамоилтрансфераза	K8QFX4	<i>pyrB</i>	1,4

Таблица 6 (продолжение)

Бифункциональный белок PyrR	K8QCB4	<i>pyrR</i>	1,6
Дезоксирибозофосфатальдолаза	K8QGF6	<i>deoC</i>	1,1
Аденозилкобаламин-зависимая рибонуклеозидтрифосфатредуктаза	K8Q4T0	<i>rtpR, nrdJ</i>	-2,0
Дезоксиаденозинкиназа/дезоксигуанозинкиназа	K8QBP7	LRHMDP2_1731	-1,1
[G] Транспорт и метаболизм углеводов			
Предполагаемая фосфокетолаза	K8Q7D7	<i>xfp, xpkA</i>	1,2
Белок биосинтеза гликогена GlgD, семейство глюкозо-1-фосфат-аденилилтрансфераз	K8QJ10	<i>glgD</i>	0,9
Пируватоксидаза [G/H/R]	K8Q595	<i>spxB, pox</i>	1,0
Субстрат-связывающий белок ABC-транспортёра	K8QJU7	LRHMDP2_357	-1,1
β -Цепь цитратлиазы	K8Q549	<i>citE</i>	-2,9
[H] Транспорт и метаболизм коферментов			
Липоатпротеинлигаза	K8Q5G3	<i>lplJ, lplA</i>	0,9
[I] Транспорт и метаболизм липидов			
Дегидрогеназа β -гидроксикислоты, родственная 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназе	K8QD39	LRHMDP2_2289	1,3
[P] Транспорт и метаболизм неорганических ионов			
Фосфат-связывающий белок	K8QH56	<i>pstS</i>	-0,8
[Q] Биосинтез, транспорт и катаболизм вторичных метаболитов			
Оксидоредуктаза семейства альдо/кеторедуктаз, подгруппа 1	K8Q5E9	<i>dkgA, yqhE</i>	0,7
α -Ацетолактатдекарбоксилаза	K8QD20	<i>budA, alsD</i>	1,2
НЕДОСТАТОЧНО ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫЕ БЕЛКИ			
[R] Предсказана только общая функция			
Флавиннуклеотид-связывающий белок, родственный пиридоксин-5'-фосфат-оксидазе V	K8Q7A0	LRHMDP2_2560	2,9

Примечания:

¹ – идентификатор белка в базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org>);² – $\log_2 A/C$, \log_2 изменения кратности уровня белка при аэробнозе по сравнению со статическими условиями.

Жирным шрифтом выделены значения \log_2 для белков, значительно отличающихся (относительно статических условий) по своему уровню; красным цветом показано увеличение уровня соответствующих белков, а голубым цветом – их снижение; белки с неизвестной функцией не приведены.

При интенсивной аэрации увеличивался синтез фосфокетолазы (Xfp) – ключевого фермента пентозофосфатного пути (рисунок 2). Напротив, уровни ферментов, участвующих в образовании оксалоацетата – цитратлиазы (CitE) и

аспартатаминотрансферазы (AvtA) – снижались в аэробных условиях. Таким образом, у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 при аэробном культивировании происходит сдвиг в путях образования пирувата с цитрат-зависимого на пентозофосфатный по сравнению со статичным ростом. Пируват является центральным интермедиатом молочнокислого брожения и может быть далее преобразован лактатдегидрогеназой (Ldh) в лактат, пируватформиатлиазой (PflB) в формиат и ацетил-КоА, пируватоксидазой (Pox) в ацетилфосфат и CO₂, пируватдегидрогеназой (Pdh) в ацетил-КоА и НАДН, а ацетолактатсинтазой (AlsS) в α-ацетолактат и CO₂. Отметим, что α-ацетолактат может декарбоксилироваться ацетолактатдекарбоксилазой (AlsD) в ацетоин или превращаться в диацетил путём неферментативного декарбоксилирования в присутствии O₂. Содержание Pox, PdhD, AlsS и AlsD увеличивалось в клетках *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 при аэробном росте, в то время как уровень PflB снижался. Таким образом, образование ацетил-КоА было в основном обусловлено активностью PflB при статичном росте и активностями Pdh, Pox/фосфатацетилтрансферазы (Pta) и Xfp/Pta при аэробном росте. Ацетилфосфат, образованный Pox и Xfp, может далее превращаться ацетаткиназой (AckA) в ацетат и молекулу АТФ.

В аэрируемых клетках наблюдали повышение уровня O₂-зависимых ферментов, активность которых сопровождается образованием H₂O₂: пируватоксидазы (Pox), лактатоксидазы (LctO) и белка, родственного пиридоксин-5'-фосфат-оксидазе (ПФО). LctO окисляет лактат до пирувата, снова вовлекая конечный продукт молочнокислого брожения в углеродный и энергетический обмен. Если в случае Pox и LctO индукция их синтеза кислородом хорошо известна, то для ПФО, окисляющей пиридоксин-5'-фосфат до пиридоксаль-5'-фосфата, такой эффект у МКБ показан впервые. *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 содержит две тиол-специфичные пероксидазы: TrxA-зависимую тиолпероксидазу (Trx) и НАДН-зависимую алкилгидропероксидредуктазу С (AhpC), синтез которых активировался и подавлялся аэрацией соответственно. Повышенный уровень Trx в аэробных клетках коррелирует с увеличением содержания тиоредоксина (TrxA), небольшого дитиол/дисульфид-содержащего белка – донора электронов для Trx. В свою очередь, роль TrxA-редуктазы у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 может выполнять НАДН-дегидрогеназа (K8Q7J1) с характерным для дисульфидредуктаз ФАД/НАД(Ф)⁺-связывающим доменом, синтез которой индуцировался в аэробных условиях.

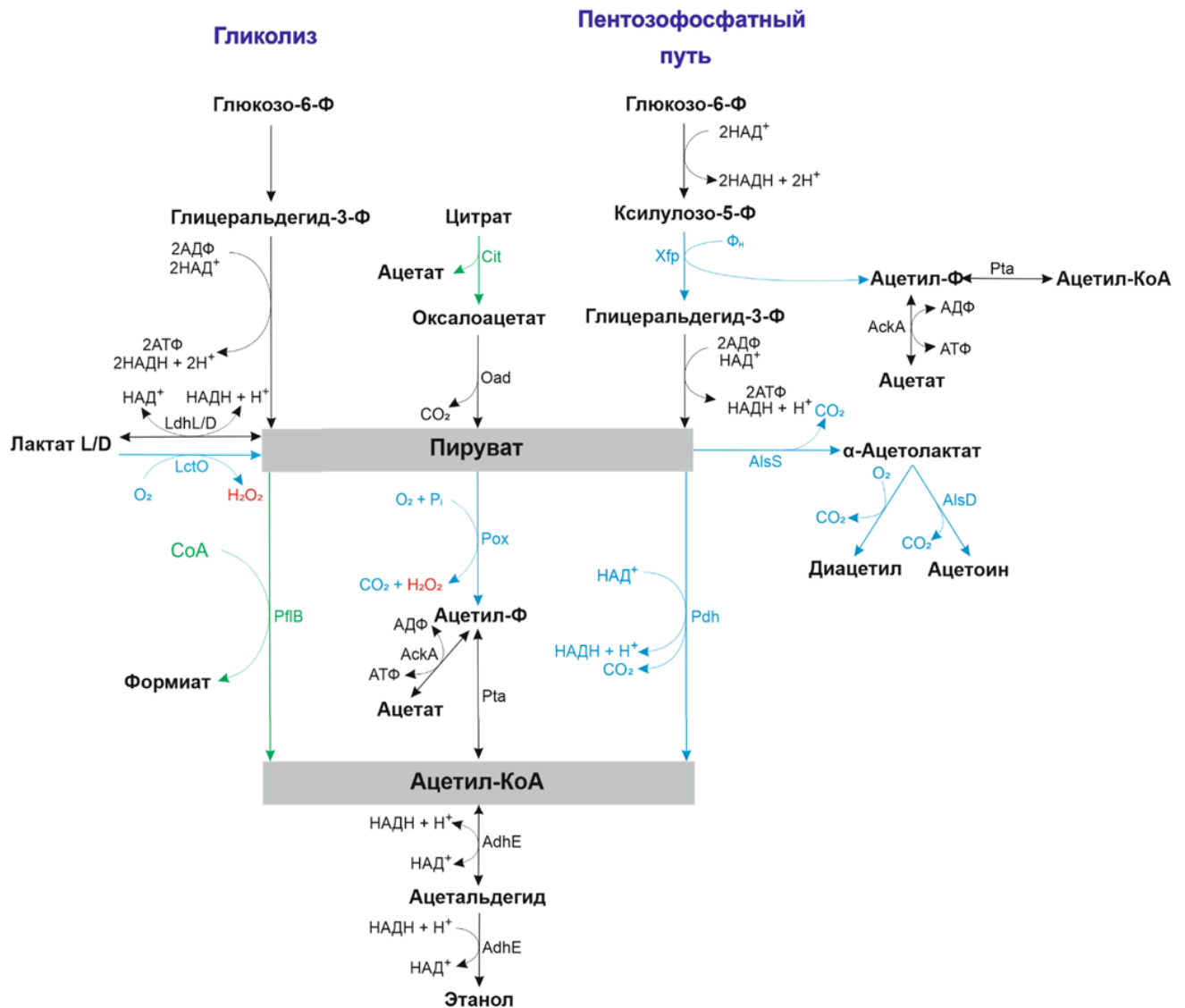


Рисунок 2. Пути превращения пирувата у *L. rhamnosus* KM МГУ 529. LdhL/D – лактатдегидрогеназа; LctO – лактатоксидаза; Cit – цитратлиаза; Xfp – фосфокетотлаза; AckA – ацетаткиназа; Oad – оксалоацетатдекарбоксилаза; Pox – пируватоксидаза; PflB – пируватформиатлиаза; Pta – фосфатацетилтрансфераза; Pdh – пируватдегидрогеназный комплекс; AlsS – α-ацетолактатсинтаза; AlsD – α-ацетолактатдекарбоксилаза; AdhE – ацетальдегид/алкогольдегидрогеназа. Ферменты, уровень которых возрастает в ответ на аэрацию культуры, выделены синим цветом, а уровень которых понижается — зелёным (таблица б), другие идентифицированные ферменты отмечены черным цветом

В дополнение к уровню Trx в аэробных условиях в клетках значительно увеличивался уровень НАДН-пероксидазы (Npr). Обе пероксидазы, очевидно, играют ключевую роль в элиминировании пероксида водорода, образуемого под действием флавиновых оксидаз (LctO, Pox и ПФО) в аэробных условиях. В статичных условиях у *L. rhamnosus* KM МГУ 529 эту функцию выполняет главным образом AhpC. У данного штамма отсутствуют гены, кодирующие

супероксиддисмутазу и каталазу (таблица 2). При интенсивной аэрации в клетках наблюдали повышение уровня цистеинсинтазы (CysK), что хорошо согласуется с активацией биосинтеза TrxA и Trx, содержащих цистеиновые остатки в активных центрах. Кроме того, цистеин сам по себе является сильным антиоксидантом (Averina et al., 2021). Сверхсинтез ПФО в условиях аэробноза, скорее всего, призван обеспечить кофактором пиридоксаль-5'-фосфат-зависимую CysK.

В аэрируемых клетках *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 повышался биосинтез стрессовых белков: GroES, универсального стрессового белка USP, PfpI, YqiG и дегидрогеназы β -гидроксикислот. Известно, что синтез предполагаемого белка теплового шока GroES индуцируется в ответ на кислотный стресс у лактобацилл (Lorca et al., 2002; Fernandez et al., 2008). До сих пор неясны роль и механизмы действия белка USP у грамположительных бактерий, хотя есть данные в пользу его участия в клеточном ответе на кислотный стресс у *Lp. plantarum* (Gury et al., 2009). Представители семейства белков ThiJ/PfpI разнообразны по структуре и функциям: белок теплового шока Hsp31 идентифицирован у *E. coli* (Sastru et al., 2004), паралог Hsp31 с глиоксалазной активностью участвует в защите клеток *Saccharomyces cerevisiae* от окислительных стрессов (Bankaralli et al., 2015), а YhbO синтезируется в ответ на гиперосмотический и кислотный стрессы также у *E. coli* (Weber et al., 2006). ФМН-зависимая оксидоредуктаза YqiG как представитель семейства белков ОУЕ изменяет активированные связи C=C в α -, β -ненасыщенных карбонильных соединениях, восстанавливая их до насыщенных аналогов и, таким образом, участвует в клеточном ответе на различные стрессы. Белок YqiG, по-видимому, важен для поддержания внутриклеточного редокс-баланса у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в условиях интенсивной аэрации. Функция НАДФ⁺-зависимой дегидрогеназы β -гидроксикислот, восстанавливающей полуальдегид янтарной кислоты и глиоксилат до γ -гидроксибутирата и гликолата соответственно, заключается в детоксикации обоих альдегидов при реакции бактериальной клетки на различные стрессы (Meuer et al., 2015; Kumsab et al., 2020).

Увеличение синтеза RbfA и связывающегося с РНК белка VicX, очевидно, важно для созревания и стабилизации 30S и 70S рибосомных субъединиц в условиях аэробноза. Повышенный уровень сульфотрансферазы ThiI, участвующей в биосинтезе тиаминпирофосфата (ТПФ), необходим для обеспечения индукции синтеза ТПФ-зависимых ферментов (Pox, CidC, AlsS) при аэробном росте.

У *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 функционируют два регулятора транскрипции семейства MarR, чувствительные к кислороду. Уровень репрессора генов-активаторов регулонов гидропероксидного стресса OhrR несколько возрастает при аэрации, а регулятор транскрипции, гомологичный продукту гена LRHMDP2_405, преобладает в статичной культуре.

Белок GcvH является компонентом клеточной системы катаболизма глицина, катализирующей обратимое окислительное расщепление глицина до метиленовой

группы, аммония и CO_2 . Таким образом, повышенный уровень GcvH может поддерживать гомеостаз pH у *L. rhamnosus* KM МГУ 529 в условиях аэробноза. Другим механизмом, предотвращающим внутриклеточное закисление при аэрации, является активация ферментов пути образования вторичных продуктов молочнокислого брожения (диацетила и ацетоина) – AlsS и AlsD.

Синтез лигазы LpA, ответственной за АТФ-зависимое липоилирование белков экзогенным путем, также активировался у *L. rhamnosus* KM МГУ 529 в условиях аэрации. Этот факт хорошо согласуется с повышенным уровнем липоат-зависимых белков (GcvH и PdhD) в аэрируемых клетках.

Содержание карбамоилфосфатсинтазы (CarAB) увеличивалось в клетках при культивировании в аэробных условиях по сравнению со статичным ростом, тогда как уровень аргининосукцинатсинтазы (ArgG) снижался при интенсивной аэрации. Пути биосинтеза аргинина и пиримидинов имеют общий предшественник – карбамоилфосфат. Это означает, что у *L. rhamnosus* KM МГУ 529 в аэробных условиях происходит сдвиг от синтеза L-аргинина к синтезу пиримидиновых нуклеотидов. Более высокие уровни белков PycECBR, участвующих в биосинтезе пиримидинов, в аэробных условиях по сравнению со статичным ростом подтверждают этот вывод. Синтез карбамоилфосфата и уридин-5'-монофосфата (УМФ) зависит от концентрации растворенного CO_2 (HCO_3^-) в питательной среде (Bringel, Hubert, 2003). Таким образом, активация CO_2 -образующих ферментов (Pox, AlsS, AlsD и GcvH) должна способствовать биосинтезу пиримидиновых нуклеотидов у *L. rhamnosus* KM МГУ 529 при аэробном росте. Следует отметить, что индукция синтеза CarAB и PycECBR, наблюдаемая в аэробных условиях у исследуемого штамма, не характерна для МКБ. Интересно, что при этом не происходит увеличения выхода биомассы. Напротив, повышение уровня белка GlgD свидетельствует в пользу активации процесса биосинтеза гликогена в аэрируемых клетках *L. rhamnosus* KM МГУ 529.

Дезоксирибозофосфатальдозаза (DeoC) расщепляет 2-дезоксид-рибозо-5-фосфат до D-глицеральдегид-3-фосфата и ацетальдегида, обеспечивая катаболизм нуклеозидов. При этом D-глицеральдегид-3-фосфат может поступать в центральные пути углеродного метаболизма в качестве источника углерода и энергии (рисунок 2). Аденозилкобаламин-зависимая рибонуклеозидтрифосфатредуктаза (RtpR) катализирует восстановление нуклеозидов до соответствующих дезоксинуклеозидов на уровне НДФ и НТФ. Повышение уровня DeoC, снижение уровней RtpR и дезоксиаденозинкиназы/дезоксигуанозинкиназы негативно сказываются на синтезе ДНК при аэробном росте *L. rhamnosus* KM МГУ 529. В тоже время повышение уровня НДФ/НТФ как результат снижения уровня RtpR способствует синтезу РНК, необходимой для обеспечения накопления в клетке индуцируемых аэрацией ферментов.

Количество белка OppA (компонента транспортной системы олигопептидов из окружающей среды внутрь клетки) и нейтральной эндопептидазы PerO увеличивалось в клетках при аэрации, в то время как количество АТФ-связывающего белка GlnQ, участвующего в транспорте глутамина, уменьшалось, что свидетельствует о переключении углеродного метаболизма *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 с аминокислот на олигопептиды в условиях аэробнобиоза. Подобный эффект был показан ранее для МКБ на уровне экспрессии соответствующих генов (Vido et al., 2004; Pedersen et al., 2008; Eikmeyer et al., 2015).

Аэрация благоприятно сказывается на редокс-гомеостазе (НАДН/НАД⁺) *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. В аэробных условиях регенерацию НАД⁺ обеспечивают повышенные уровни НАДН-зависимых ферментов: НАДН-дегидрогеназы (ген LRHMDP2_2182), НАДН:флавин-оксидоредуктазы (YqiG), НАДН-оксидазы (Noh-2) и НАДН-пероксидазы (Npr). В статичных условиях эту функцию выполняют главным образом НАДН-зависимые лактатдегидрогеназа (Ldh) и бифункциональная ацетальдегид/алкогольдегидрогеназа (AdhE).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате скрининга 33 штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В.Ломоносова в качестве потенциального пробиотика был выбран штамм с наиболее выраженной способностью к биоплёнкообразованию и относительно высокой антимикробной активностью по отношению к *S. aureus*: *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. С целью изучения механизмов адаптации этого штамма к присутствию кислорода исследовали влияние аэробных/дыхательных условий культивирования на его рост.

Показано, что у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 выход биомассы не снижался в ответ на интенсивную аэрацию. При этом в случае аэробного культивирования в присутствии гемина и менахинона (дыхательные условия) выход биомассы увеличивался на 27% по сравнению со статичными и аэробными (без гемина и менахинона) условиями за счёт функционирования дыхательной цепи, состоящей из НАДН-дегидрогеназы 2, менахинона и хинолоксидазы *bd*. Всё это свидетельствует в пользу высокой степени адаптации исследуемого штамма к аэробнобиозу. Для изучения молекулярных механизмов такой адаптации использовали протеомный анализ. Установлено, что адаптация *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к аэробному росту в периодической культуре на питательной среде MRS заключается в перестройке углеродного метаболизма: снижении потребления цитрата и увеличении потребления ксилулозо-5-фосфата. При этом в метаболизме пирувата происходит снижение роли пируватформиатлиазы, повышение роли пируватоксидазы и пируватдегидрогеназного комплекса, а также индукция синтеза ферментов пути, ведущего к образованию летучих продуктов ацетоина/диацетила.

Кроме того, в аэробных условиях происходила индукция биосинтеза O₂-зависимых ферментов, ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов, а также подавление синтеза ДНК и переключение питания с аминокислот на олигопептиды. В клетках *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, выращенных аэробно, повышалось содержание ферментов, участвующих в детоксикации H₂O₂ (тиоредоксин, тиолпероксидаза, НАДН-пероксидаза), а также стрессовых белков по сравнению с клетками, выращенными статично. Однако данный штамм лишен супероксиддисмутазной и каталазной активностей, в его геноме также не были обнаружены соответствующие гены *sod* и *cat*.

Таким образом, аэробное культивирование можно рассматривать как перспективный методологический подход для повышения устойчивости *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 к окислительным стрессам, что, в свою очередь, благоприятно сказывается на антиоксидантных свойствах и аэротолерантности данной бактерии. Культивирование этого штамма в дыхательных условиях позволило повысить выход биомассы почти на 30% по сравнению со статичными и аэробными условиями культивирования. При этом молярный экономический коэффициент Y_{P/S} совпадал по значению с таковым в условиях статичного роста. Полученные данные позволяют заключить, что *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 является потенциальной пробиотической культурой с высокой степенью адаптации к аэриобиозу.

ВЫВОДЫ

1. В результате скрининга пробиотических свойств 33 штаммов МКБ из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ имени М.В.Ломоносова для изучения адаптации к аэробному росту был выбран штамм с наиболее выраженной способностью к биоплёнкообразованию и относительно высокой антимикробной активностью по отношению к *S. aureus* – *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

2. С помощью сконструированных вырожденных ПЦР-праймеров обнаружены гены, кодирующие ключевые ферменты антиоксидантной защиты (СОД, каталазу, гемовую пероксидазу, пероксиредоксин) у ряда представителей лактобацилл из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Измерены активности соответствующих ферментов антиоксидантной защиты во фракциях клеток *Lp. plantarum* КМ МГУ 161 и *L. rhamnosus* КМ МГУ 529.

3. Показано, что у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 выход биомассы не снижается при аэробном культивировании в периодической культуре на питательной среде MRS. На основании данных протеомного анализа установлены возможные механизмы адаптации к аэробному росту данного штамма, которые заключаются в перестройке углеродного метаболизма, индукции синтеза флавиновых оксидаз, образующих H₂O₂, и ферментов, участвующих в его детоксикации, а также индукции синтеза стрессовых белков. Впервые показано

повышение уровня ферментов пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов у МКБ в ответ на аэробноз.

4. Установлено, что у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 при росте в присутствии гемина и менахинона функционирует дыхательная цепь, состоящая из НАДН-дегидрогеназы 2, менахинона и хинолоксидазы *bd*. Впервые продемонстрирована *in vitro* способность экзогенного менахинона переносить электроны от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd* у МКБ.

5. Культивирование *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в дыхательных условиях позволило повысить выход биомассы на 27% по сравнению со статичными и аэробными условиями. При этом молярный экономический коэффициент $Y_{P/S}$ был близок по значению к таковому в условиях статичного роста ($25,2 \pm 0,4$ г сух. кл./моль глюкозы).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI:

1. Dinarieva T.Yu., **Klimko A.I.**, Kahnt J., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Adaptation of *Lacticaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529 to aerobic growth: a proteomic approach // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11. № 2. P. 313–327. DOI: 10.3390/microorganisms11020313. IF (SJR) = 0,862. Q2. Вклад автора в печатных листах: (0,88/0,31) (здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. Динариева Т.Ю., **Климко А.И.**, Чердынцева Т.А., Брюханов А.Л., Нетрусов А.И. Витамин К₂ является медиатором транспорта электронов от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd*-типа у *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529 // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2022. Т. 77. № 3. С. 188–194. IF РИНЦ = 0,630. [Dinarieva T.Yu., **Klimko A.I.**, Bryukhanov A.L., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I. Vitamin K₂ mediates electron transport from NADH dehydrogenase 2 to *bd*-type quinol oxidase in *Lacticaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529 // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2022. Vol. 77. № 3. P. 172–177. DOI: 10.3103/S0096392522030038. IF (SJR) = 0,189]. Q3. (0,38/0,17)

3. Брюханов А.Л., **Климко А.И.**, Нетрусов А.И. Антиоксидантные свойства молочнокислых бактерий // *Микробиология*. 2022. Т. 91. № 5. С. 519–536. EDN: ZBTFXFD DOI: 10.31857/S0026365622100329. IF РИНЦ = 1,550 [Bryukhanov A.L., **Klimko A.I.**, Netrusov A.I. Antioxidant properties of lactic acid bacteria // *Microbiology*. 2022. Vol. 91. № 5. P. 463–478. DOI: 10.1134/s0026261722601439. IF (SJR) = 0,341]. Q3-Q4. (1,06/0,53)

4. **Климко А.И.**, Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И., Брюханов А.Л. Ингибирование автоокисления аскорбата новыми штаммами молочнокислых бактерий // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2021. Т. 76.

№ 4. С. 278–282. IF PИHЦ = 0,630 [**Klimko A.I.**, Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I., Bryukhanov A.L. Inhibition of ascorbate autoxidation by new strains of lactic acid bacteria // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2021. Vol. 76. № 4. P. 249–252. DOI: 10.3103/S0096392521040052. IF (SJR) = 0,189]. Q3. (0,18/0,15)

5. **Klimko A.I.**, Cherdyntseva T.A., Bryukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains // Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2020. Vol. 12. № 3. P. 1139–1148. DOI: 10.1007/s12602-019-09599-6. IF (SJR) = 0,812. Q2. (0,56/0,39)