

УДК 579.6:577.21:637.05

## Полное секвенирование генома выявляет вариабельность метаболических и иммунных систем у изолятов *Propionibacterium freudenreichii*

И. Д. Антипенко<sup>1\*</sup>, С. А. Венедюхина<sup>1</sup>, Н. П. Сорокина<sup>2</sup>, И. В. Кучеренко<sup>2</sup>, Т. С. Смирнова<sup>2</sup>, Г. Н. Рогов<sup>2</sup>, М. Ю. Шкурников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», факультет биологии и биотехнологии, лаборатория исследований молекулярных механизмов долголетия, Москва, 101000 Россия

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Углич, 109316 Россия

\*E-mail: iantipenko@hse.ru

Поступила в редакцию 31.07.2025

Принята к печати 29.09.2025

DOI: 10.32607/actanaturee.27764

**РЕФЕРАТ** Бактерии *Propionibacterium freudenreichii* играют важную роль в производстве сыров швейцарского типа, однако геномная вариабельность штаммов, влияющая на их технологические свойства, остается недостаточно изученной. Охарактеризованы метаболические и генетические различия промышленных штаммов *P. freudenreichii*. Сопоставление фенотипических и геномных данных позволяет выявлять маркеры технологически значимых признаков и использовать их для скрининга новых штаммов. Это создает основу для подбора консорциумов с заданными свойствами и разработки заквасочных культур с улучшенными производственными характеристиками. В работе проведено полногеномное секвенирование и сравнительный анализ пяти промышленных штаммов *P. freudenreichii*. Эти штаммы, несмотря на их высокую геномную идентичность, различались газообразованием и метаболизмом субстратов. Филогенетический анализ показал близость штамма *P. freudenreichii* FNCPS 828 к подвиду *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* ( $z$ -score = 0.99948), который не способен восстанавливать нитраты, но метаболизирует лактозу. Ген *narG*, кодирующий альфа-субъединицу нитратредуктазы, идентифицирован только у одного из пяти проанализированных штаммов – FNCPS 828, а также у 39% ранее описанных штаммов *P. freudenreichii*, что указывает на этот ген как на потенциальный маркер нитратвосстанавливающей активности. Анализ 112 геномов *P. freudenreichii* выявил систему CRISPR-Cas I-G у 74% штаммов, а тип I-E только примерно у 25%. Все пять изученных штаммов содержали систему типа I-G; у FNCPS 3 также обнаружена полноценная система I-E с наибольшим числом CRISPR-спейсеров, включая соответствовавшие геномам ранее опубликованных бактериофагов. Наиболее распространенные антифаговые системы включали RM I и IV, AbiE, PD-T4-6, HEC-06 и ietAS. Таким образом, выявлено генетическое разнообразие штаммов *P. freudenreichii*, имеющее значение для их промышленного применения. Обнаружение *narG* в качестве потенциального маркера восстановления нитратов, а также детальное картирование систем CRISPR-Cas расширяют возможности рационального подбора и инженерной оптимизации заквасочных культур *P. freudenreichii* с заданными метаболическими свойствами и устойчивостью к бактериофагам.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** *Propionibacterium*, полногеномное секвенирование, метаболизм, CRISPR-Cas, бактериофаги.

### ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Propionibacterium* играют важную роль в пищевой промышленности. В частности, штаммы *Propionibacterium freudenreichii* активно

применяются в процессах созревания сыров швейцарского типа [1]. Ключевым метаболическим путем *P. freudenreichii* является цикл Вуда–Веркмана, в котором лактат сначала превращается в пируват,

а затем метаболизируется: одна часть превращается в пропионат, придающий сыру характерный вкус, а другая – в ацетат и углекислый газ, обеспечивающие образование характерных «глазков» [2].

Каждый штамм *P. freudenreichii* характеризуется индивидуальным набором ферментов, определяющим особенности его метаболической активности [3], что влияет на спектр потребляемых углеводов и определяет вкусовые качества конечного продукта [4]. Кроме того, эти бактерии синтезируют витамины B9 и B12, конъюгированную линолевую кислоту, трегалозу, бактериоцины и органические кислоты, а также обладают пробиотическими свойствами [5].

Заражение бактериофагами представляет серьезную проблему для молочной промышленности, поскольку может привести к срыву ферментации и появлению дефектов в продукте. Бактериофаги обнаруживаются примерно в половине сыров швейцарского типа в концентрации как минимум  $10^5$  БОЕ/г, они размножаются по мере роста пропионовокислых бактерий в теплой камере при созревании сыра [6]. Учитывая ключевую роль *P. freudenreichii* в формировании органолептических характеристик сыров, изучение систем их иммунной защиты имеет важное практическое значение для выявления штаммов, устойчивых к фагам, и минимизации риска технологических сбоев на стадии созревания продукции [7].

Несмотря на промышленную значимость *P. freudenreichii*, геномная характеристика промышленных штаммов этого вида весьма ограничена. Полногеномное секвенирование позволяет выявлять межштаммовые вариации и устанавливать связь между генотипом и технологическими свойствами, включая метаболизм, стрессоустойчивость и защитные системы [4].

В настоящем исследовании представлены результаты полногеномного секвенирования пяти штаммов *P. freudenreichii*, используемых в молочной промышленности, а также комплексная геномная характеристика этих штаммов с акцентом на их метаболические особенности, защитные механизмы и вариативность функциональных генов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Штаммы и условия культивирования

В работе использовали пять штаммов *P. freudenreichii*: FNCPS 2 (GCA\_044990475.1), FNCPS 3 (GCA\_044990455.1), FNCPS 4 (GCA\_044990515.1), FNCPS 6 (GCA\_044990495.1) и FNCPS 828 (GCA\_044990435.1), полученные из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института маслоделия и сыроделия молочной промышленности (ВНИИМС – филиал Федерального научного

центра пищевых систем имени В.М. Горбатова РАН). Штаммы FNCPS 2 и FNCPS 3 были выделены из образцов сырого молока, остальные – из образцов сыра. Все штаммы получены из продуктов, произведенных на территории Алтайского края, Россия.

Пропионовокислые бактерии культивировали в жидкой питательной среде следующего состава: пептон – 10 г, дрожжевой экстракт – 10 г, хлористый кобальт – 0.01 г, однозамещенный фосфорнокислый калий – 1 г, 40%-ная молочная кислота – 20 см<sup>3</sup>. Указанные компоненты растворяли в 1 л дистиллированной воды, доводили pH до 7.1 ± 0.1, разливали по пробиркам и стерилизовали при температуре 121 ± 2°C в течение 15 мин. В этой же среде изучали газообразующую активность штаммов *P. freudenreichii*.

Влияние продуктов протеолиза белков молока на газообразование пропионовокислых бактерий изучали, используя питательную среду аналогичного состава, однако компоненты вносили в обезжиренное молоко, предварительно гидролизованное панкреатином и разбавленное дистиллированной водой в соотношении 1 : 2.

Для накопления культур пропионовокислых бактерий среду культивирования инокулировали 1% посевного материала и инкубировали в термостате при температуре 30 ± 1°C в течение 72 ч.

### Фенотипическая характеристика штаммов

Скорость газообразования и объем выделившегося газа определяли при культивировании в градуированных пробирках Дунбара при температуре 30 ± 1°C с дозой инокулята 1%. Объем выделившегося газа фиксировали ежедневно в течение 15 сут. Скорость газообразования рассчитывали как отношение максимального объема газа к числу суток культивирования.

Влияние температуры на газообразующую активность культур оценивали, культивируя клетки в градуированных пробирках Дунбара при температуре 18 ± 1°C, 22 ± 1°C и 30 ± 1°C, с дозой инокулята 1%. Объем газа регистрировали ежедневно в течение 15 сут.

Для идентификации анаэробных бактерий исследовали биохимическую активность культур с использованием тест-системы API 20A (bioMérieux, Франция) в соответствии с инструкцией производителя. Результаты, полученные на тест-стрипах, анализировали с применением онлайн-базы данных APIWEB (bioMérieux).

### Секвенирование и сборка бактериального генома

ДНК для секвенирования генома выделяли с использованием набора ExtractDNA Blood and Cells

(«ЕвроГен», Россия) согласно инструкциям производителя. Библиотеки ДНК готовили с помощью набора MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set V2.0 (Cat. No. 940-001196-00, MGI, Китай) согласно протоколу производителя. Качество библиотек оценивали с использованием набора для анализа ДНК Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (Cat. No. Q33230, Thermo Fisher Scientific, США) и флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific). Длину фрагментов библиотек ДНК оценивали с помощью капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced с использованием набора QX DNA Fast Analysis Kit (Cat. No. 929008, Qiagen, Германия). Секвенирование проводили с использованием проточной ячейки FCS на платформе MGI DNBSEQ-G50 (BGI, Китай) в режиме PE150.

Сборку бактериальных геномов выполняли с использованием SPAdes [8] в режиме «isolate». Для повышения качества итоговой сборки сырье прочтения были выровнены на контиги при помощи Bowtie2 [9], после чего файлы выравнивания были отсортированы и проиндексированы с использованием инструментов SAMtools [10] и переданы в Pilon [11] для исправления неточностей сборки. Качество сборки оценивали с помощью QUAST [12], полноту собранных геномов оценивали с помощью BUSCO [13]. Собранные геномные последовательности размещены в базе данных NCBI (BioProject: PRJNA1184111).

### Анализ геномов

Аннотацию геномов и их функциональный анализ проводили с использованием конвейера аннотации прокариотических геномов NCBI [14] и платформы BV-BRC [15], использующей алгоритм RASTtk [16]. Сравнительный анализ наличия генов у пропионовокислых бактерий осуществляли с помощью платформы BV-BRC на основе высококаче-

ственных общедоступных полных сборок геномов *P. freudenreichii* ( $n = 112$ ).

### Идентификация систем бактериального иммунитета

Поиск систем бактериального иммунитета проводили с использованием программы PADLOC (v2.0.0) [17]. CRISPR-повторы и спейсеры идентифицировали с помощью инструмента CRISPR-Cas Finder v4.3.2 [18], аннотацию белков Cas проводили с использованием PADLOC. Для определения возможных мишней спейсеры выравнивали на геномы фагов бактерий с использованием Bowtie2 v2.5.4 [19]. Нуклеотидные последовательности 575 геномов фагов получены из базы данных NCBI (дата доступа: 04.07.2025).

### Филогенетический анализ

Филогенетическую идентификацию и определение близкородственных штаммов проводили с помощью анализа корреляции тетрануклеотидов через веб-сервис JSpeciesWS [20]. Среднюю нуклеотидную идентичность (ANI) сравнивали с использованием алгоритма OrthoANI [21].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

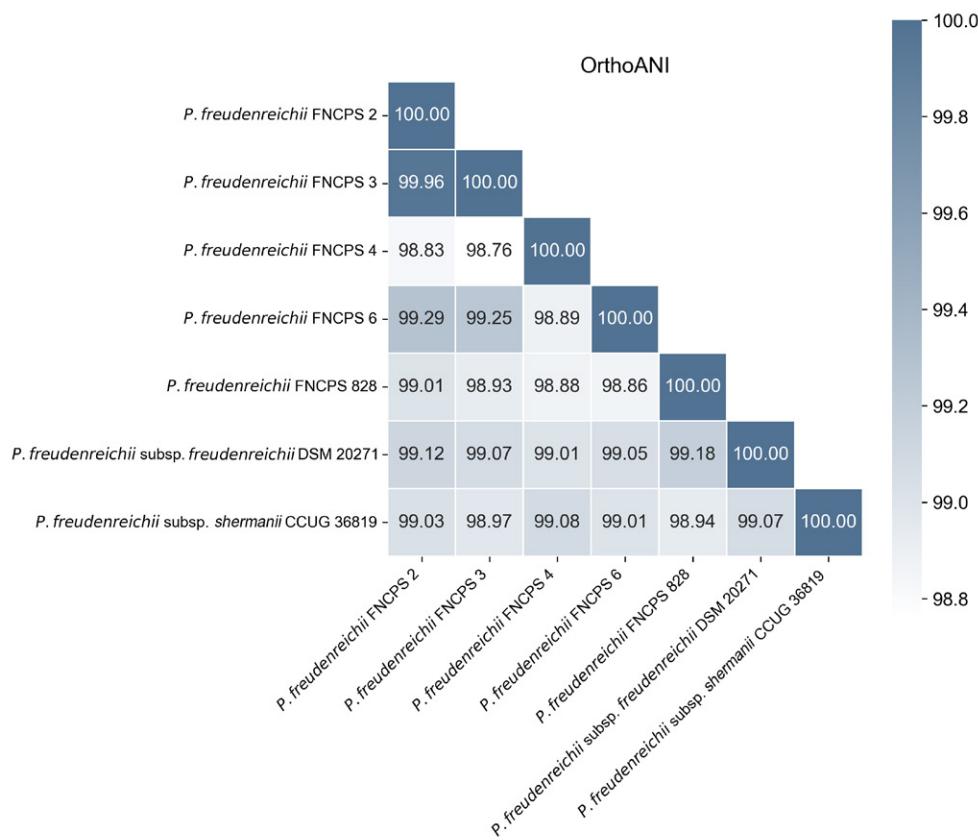
### Общая геномная характеристика

Полногеномное секвенирование считается золотым стандартом генетической характеристики микроорганизмов. Общие характеристики геномных последовательностей пяти штаммов представлены в табл. 1.

Тетракорреляционный анализ показал, что наибольшее сходство с исследуемыми штаммами *P. freudenreichii* FNCPS 828, 2, 6 и 4 имеет типовой штамм *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* CCUG 36819 (z-score: 0.99948, 0.96457, 0.97622, 0.98812 со-

**Таблица 1.** Геномные характеристики исследованных штаммов *P. freudenreichii* по данным полногеномного секвенирования

<i>P. freudenreichii</i>	FNCPS 2	FNCPS 3	FNCPS 4	FNCPS 6	FNCPS 828
Контиги	599	205	159	446	83
GC-контент	65.95	67.04	66.68	66.38	67.24
Контиг L50	9	11	5	11	9
Длина генома, п.н.	2806765	2894278	2649124	2734816	2579802
Контиг N50	101.834	63836	169499	79634	93772
CDS	2.684	2.768	2.497	2.603	2.349
тРНК	48	173	44	58	45
Области повторов	44	48	13	46	38
pРНК	3	3	4	3	4
Гипотетические белки	935	933	790	845	670
Белки с функциональной аннотацией	1.749	1.835	1.707	1.758	1.679



**Рис. 1.** Тепловая карта OrthoANI-выравнивания штаммов *P. freudenreichii*. Значения отражают процент средней нуклеотидной идентичности между ортологичными генами разных штаммов. Значения на диагонали (100%) соответствуют идентичности каждого штамма самому себе

ответственно). Наиболее близким штамму FNCPS 3 оказался *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* DSM 20271 ( $z$ -score = 0.98812). Расчет значений OrthoANI между всеми исследуемыми штаммами и референсными геномами показал высокую филогенетическую близость ( $ANI > 98\%$ ), что указывает на их вероятную принадлежность к одной клonalной группе. Результаты представлены в виде матрицы парных сходств (рис. 1).

### Фенотипирование штаммов

**Газообразование.** Газообразование (продукция  $CO_2$ ) является одной из ключевых технологических характеристик пропионовокислых бактерий, определяющей формирование «глазков» в сырах типа Эмменталь [22]. Основным продуцентом  $CO_2$  в процессе созревания являются *P. freudenreichii*, которые метаболизируют молочную кислоту с образованием пропионата, ацетата и  $CO_2$ .

Для оценки газообразующей активности были проведены эксперименты с использованием двух типов питательной среды – с добавлением и без добавления гидролизата молока. Результаты представлены на рис. 2A,Б.

Штамм *P. freudenreichii* FNCPS 2, растущий на среде без гидролизата молока, характеризовал-

ся наибольшей скоростью и объемом газообразования, тогда как у штаммов FNCPS 3 и FNCPS 4 эти показатели имели низкие значения. При использовании среды с гидролизованным молоком различия между штаммами уменьшились: активность *P. freudenreichii* FNCPS 2 сохранялась на высоком уровне, показатели FNCPS 6 и FNCPS 828 значительно возрастали, тогда как FNCPS 3 демонстрировал низкий объем выделяемого газа. Таким образом, штамм FNCPS 2 характеризуется стабильной и высокой газообразующей способностью, в то время как FNCPS 3 имеет низкую активность независимо от условий культивирования.

Зависимость газообразования штаммами *P. freudenreichii* от температуры представлена на рис. 3. При 18°C наибольшее выделение  $CO_2$  наблюдалось у FNCPS 4, тогда как FNCPS 3 газ не продуцировал. Повышение температуры до 22 и 25°C приводило к увеличению объема образующегося  $CO_2$  у всех штаммов, особенно у FNCPS 6 и FNCPS 828, показавших к 14-м суткам максимальные значения среди всех штаммов.

### Метаболическое профилирование бактерий

Метаболическое профилирование штаммов было выполнено с использованием системы BioMérieux, результаты представлены на рис. 4.

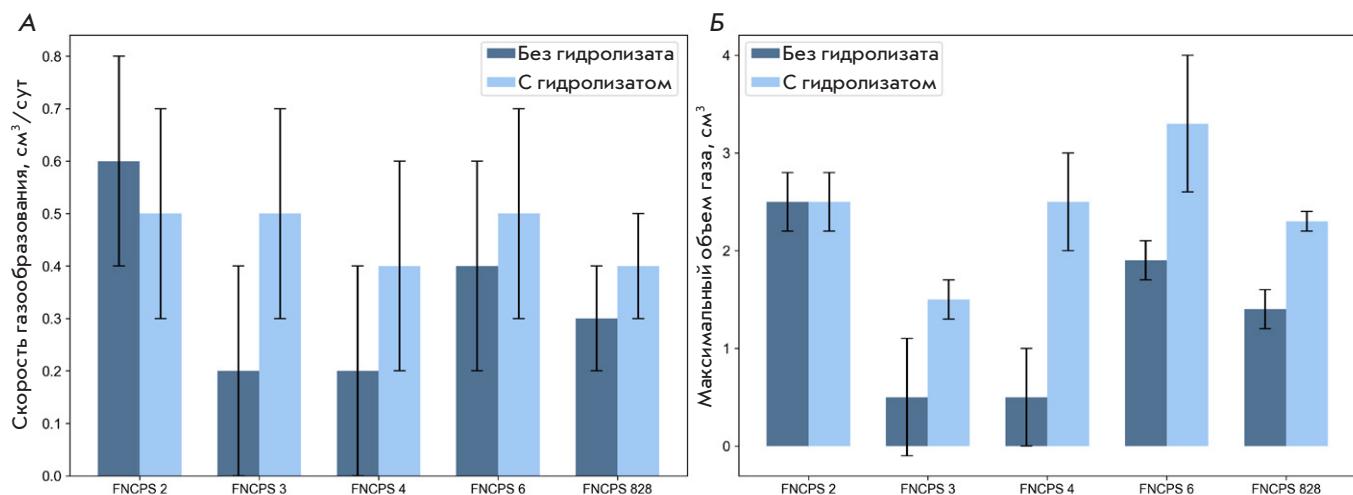


Рис. 2. А – максимальная скорость газообразования пропионовокислых бактерий на различных питательных средах; Б – максимальный объем выделившегося газа. Значения представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение

Согласно полученным данным, единственными субстратами, метаболизируемыми всеми штаммами, были *D*-манноза, *D*-глюкоза и *D*-лактоза. Штамм FNCPS 3, в отличие от остальных штаммов, не утилизировал глицерин и не обладал каталазной активностью. Наиболее широким метаболический профиль (12 из 20 протестированных субстратов) был у *P. freudenreichii* FNCPS 2. Кроме того, штаммы FNCPS 828 и FNCPS 4 обладали способностью разлагать желатин, что было нехарактерно для остальных штаммов.

#### Анализ генома

Анализ кодирующих последовательностей на уровне функциональных категорий (role name) аннотированных биологических функций генов показал, что все штаммы обладали сопоставимым числом уникальных функциональных групп (от 738 до 750), из которых 724 были общими для всех (рис. 5). Наиболее связанными друг с другом оказались штаммы FNCPS 4 и 828, которые имели 16 общих уникальных функциональных групп генов.

Полиморфные варианты ряда генов в исследованных штаммах могут играть ключевую роль в процессе созревания сыров, влияя на органолептические свойства продукции, эффективность метаболических путей и общую пищевую ценность. Так, только у штаммов FNCPS 4 и FNCPS 828 *P. freudenreichii* выявлен полный набор генов, кодирующих ферменты метаболизма 1,2-пропандиола и компоненты пропандиолдегидратазного комплекса (гены *PduA*, *PduB*, *PduJ*, *PduK*, *PduN*, *PduU*, *PduV*), что указывает на способность этих штаммов к анаэробному превращению пропандиола в пропанол и пропионат [23].

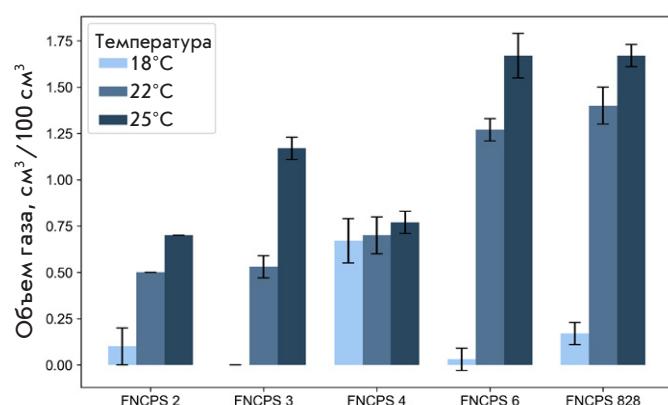


Рис. 3. Влияние температуры на объем газообразования. Значения представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение

Штаммы FNCPS 2, 3 и 6 содержат аспартатрациемазу [EC 5.1.1.13], которая участвует в синтезе *D*-аспартата, а также ген *OrrB*, кодирующий компонент олигопептидного транспортера, обеспечивающего поглощение пептидов из окружающей среды – важного источника азота в условиях ферментативной матрицы.

Единственным отличием на уровне функционального класса стало отсутствие у штамма FNCPS 828 генов, относящихся к классу *Nitrogen Metabolism*.

#### Определение подвида

Вид *P. freudenreichii* традиционно подразделяется на два подвида – *freudenreichii* и *shermanii*. Основными признаками, дифференциирующими эти подвиды, являются способность к восстановлению

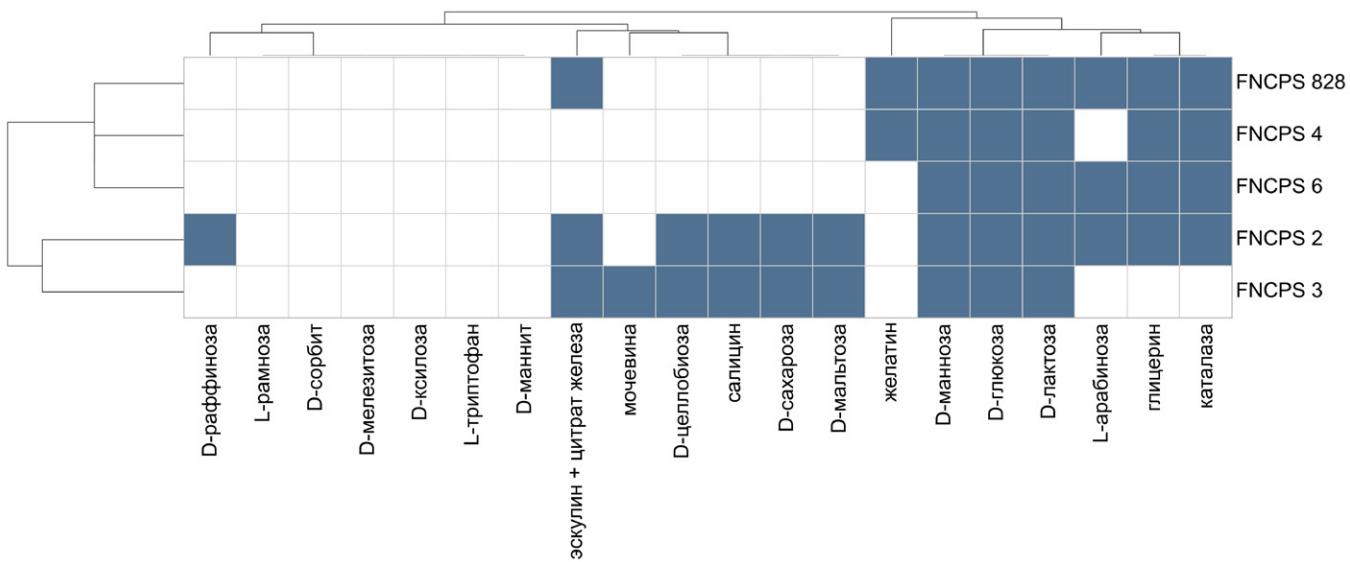


Рис. 4. Термальная карта ферментативного и биохимического профиля штаммов *P. freudenreichii*. Цветовая шкала отражает наличие положительной реакции (синий цвет) или ее отсутствие (белый цвет) на соответствующий субстрат. Штаммы сгруппированы по сходству биохимической активности; результаты кластеризации отображены в виде дендрограммы

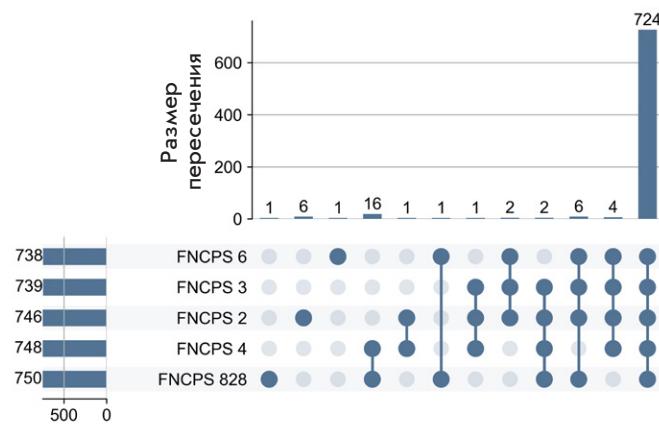


Рис. 5. Пересечения функциональных групп между штаммами *P. freudenreichii*. Высота столбцов отражает количество функциональных групп, встречающихся в одной или нескольких комбинациях штаммов; в нижней части показано, в каких штаммах представлены соответствующие функциональные роли

нитратов и ферментации лактозы [4]. Как правило, штаммы *ssp. freudenreichii* восстанавливают нитраты, но не метаболизируют лактозу, тогда как *ssp. shermanii* способны ферментировать лактозу, но не восстанавливают нитраты [24].

Ключевым ферментом, вовлеченым в восстановление нитратов, является комплекс дыхательной нитратредуктазы [EC 1.7.99.4]. Этот фермент функционирует как конечный акцептор электронов в анаэробных условиях, участвуя в генерации энергии. Геномный анализ показал, что у штам-

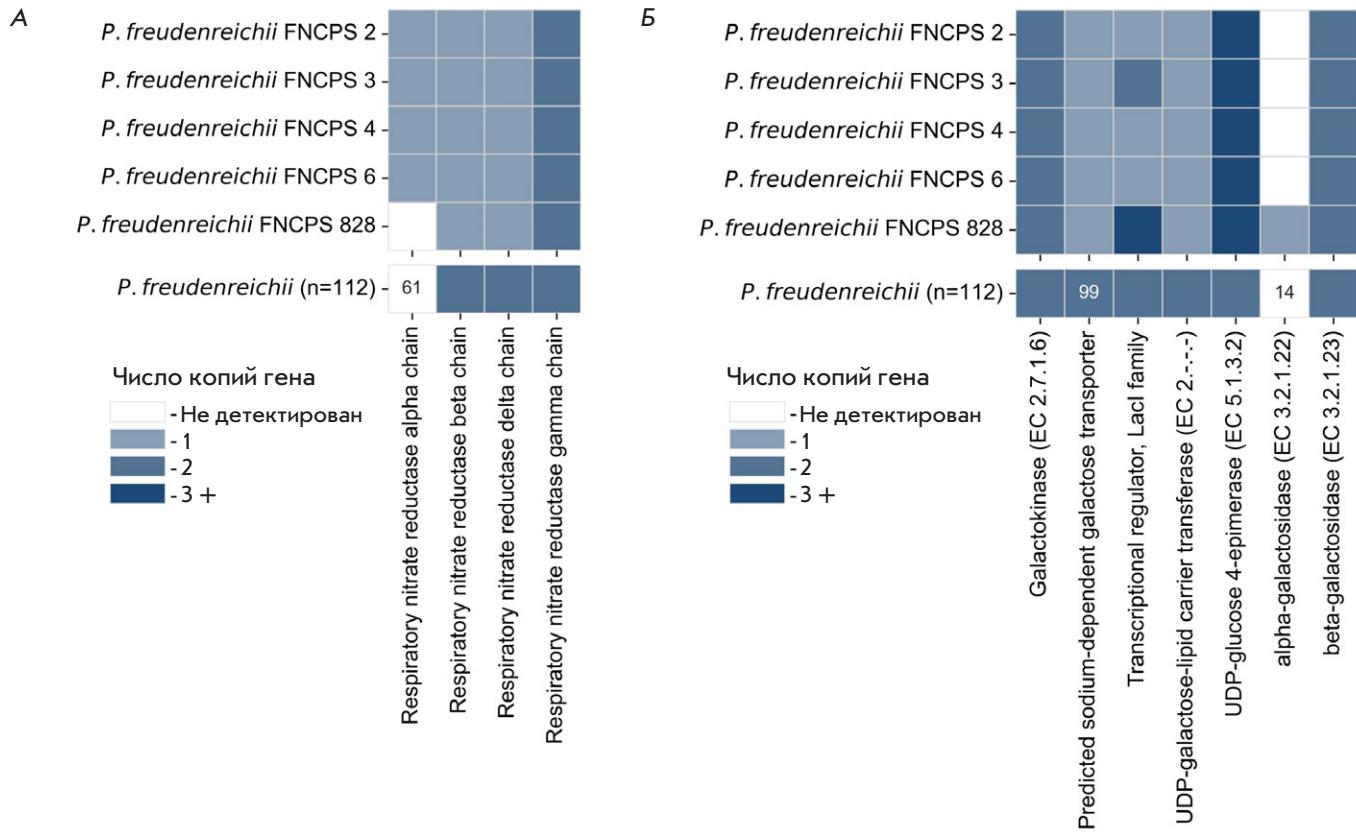
ма FNCPS 828 отсутствует ген *narG*, кодирующий альфа-цепь дыхательной нитратредуктазы, в которой осуществляется непосредственное восстановление нитрата до нитрита [25]. Отсутствие этого гена выявлено у 44 из 112 (39%) проанализированных геномов *P. freudenreichii* (рис. 6А). При этом среди штаммов, содержащих ген *narG*, не найдено ни одного, ранее отнесенного к подвиду *shermanii*.

Единственным отличием в генетическом профиле штамма FNCPS 828 от остальных исследованных штаммов было отсутствие гена, кодирующего  $\alpha$ -галактозидазу – фермента, расщепляющего  $\alpha$ -D-галактоолигосахариды и полисахариды, включая мелибиозу, раффинозу, стахиозу и вербаскозу. Ген  $\alpha$ -галактозидазы выявлен только в 14% геномов *P. freudenreichii* и не найден у всех типовых представителей *ssp. freudenreichii* (рис. 6Б).

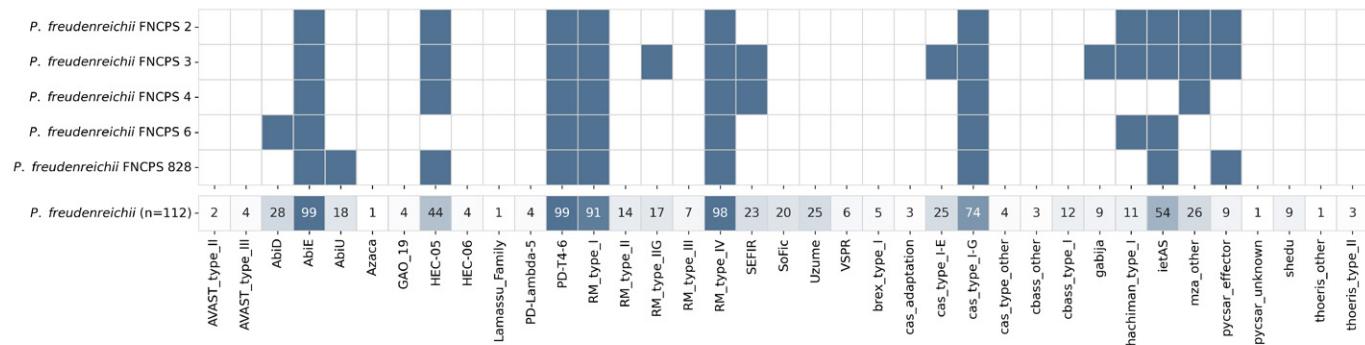
#### Характеристика систем бактериальной защиты

**Общая характеристика.** Бактериофаги представляют серьезную угрозу для пропионовокислых бактерий, поскольку заражение ими приводит к снижению метаболической активности клеток, что особенно критично в условиях промышленного производства [26]. В ходе эволюции бактерии выработали разнообразные системы защиты от заражения бактериофагами.

Анализ 112 ранее опубликованных геномов *P. freudenreichii* показал, что наиболее распространеными системами бактериального иммуни-



**Рис. 6.** Распределение генов метаболизма нитратов и лактозы у представителей *P. freudenreichii* ( $n = 112$ ) и исследуемых штаммов. *А* – гены дыхательной нитратредуктазы; *Б* – гены, ассоциированные с метаболизмом лактозы. Верхняя панель: матрица наличия/отсутствия генов (синий – присутствие; белый – отсутствие; числа обозначают число копий); нижняя панель – процентное распределение каждого гена в популяции. Второй ключевой метаболический маркер – способность к ферментации лактозы. Фенотипический анализ показал, что все пять исследованных штаммов обладают способностью метаболизировать лактозу (рис. 4). Результаты геномного анализа подтвердили наличие полного набора генов, ответственных за утилизацию лактозы, в том числе ключевого фермента  $\beta$ -галактозидазы (*lacZ*)



**Рис. 7.** Системы бактериального иммунитета *P. freudenreichii* ( $n = 112$ ) и пяти штаммов, полученных из коллекции ВНИИМС. На верхней части рисунка изображена бинарная матрица: синий цвет указывает на наличие системы, белый цвет – на ее отсутствие. На нижней панели указан процент представленности каждого гена в популяции

тета, представленными более чем в 90% геномов, являются системы abortивной инфекции (AbiE, PD-T4-6) и рестрикции-модификации (RM) типов I и IV. Достаточно часто встречалась также система CRISPR-Cas типа I-G, обнаруженная в 74% штам-

мов (83 из 112) (рис. 7). Все перечисленные защитные механизмы выявлены и у пяти штаммов, проанализированных в нашей работе.

Помимо широко распространенных систем, в пяти проанализированных геномах найдены и менее из-

Таблица 2. Характеристика систем CRISPR-Cas у исследуемых штаммов *P. freudenreichii*

Штамм <i>P. freudenreichii</i>	Система CRISPR-Cas, тип	Белки Cas, число	Уникальные спайсеры, число	Уникальные CRISPR, число
FNCPS 2	I-G	6	44	2
FNCPS 3	I-G, I-E	14	170	5
FNCPS 4	I-G	6	13	3
FNCPS 6	I-G	6	62	4
FNCPS 828	I-G	5	37	2

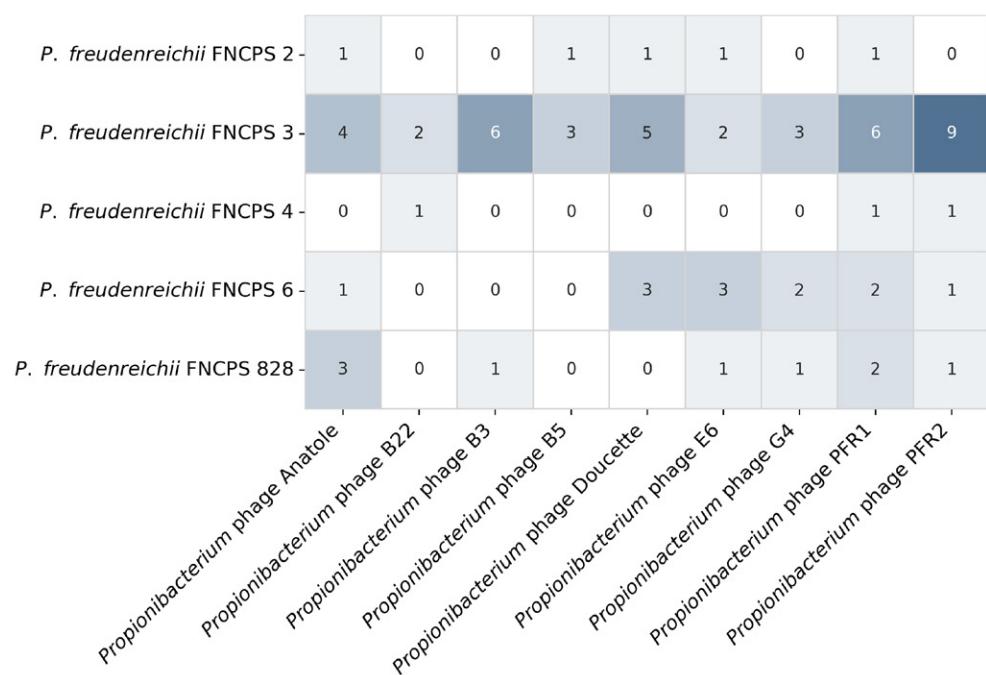


Рис. 8. Термическая карта совпадений спайсеров с геномами протестированных фагов. Цифры в ячейках обозначают количество спайсеров из каждого бактериального штамма, выровненных на соответствующий геном фага

ученные антифаговые механизмы. Так, система HEC-05, задействующая нуклеазы для распознавания и разрушения модифицированной фаговой ДНК [27], обнаружена у всех штаммов, за исключением FNCPS 6. В популяции *P. freudenreichii* она встречается в 44% геномов. Система ietAS, характерная для 54% штаммов данного вида, представлена во всех исследованных геномах, кроме FNCPS 4. Несмотря на то что ее механизм действия пока не раскрыт полностью, предполагается, что она может функционировать в синергии с другими защитными системами [28].

Интересно, что, несмотря на сравнительно высокую частоту обнаружения таких систем, как SoFic (20%) и Uzume (25%), в штаммах *P. freudenreichii*, они отсутствовали во всех пяти исследованных геномах. В то же время менее распространенные в популяции системы – Hachiman I (11%) и Pycsar (9%) – обнаружены в трех из пяти штаммов.

### CRISPR-Cas

CRISPR-Cas является одной из наиболее известных адаптивных систем защиты, обеспечивающая иммунитет к ранее встреченным фагам за счет интеграции фрагментов их ДНК в геном бактерии [29]. Проведен анализ наличия и состава систем CRISPR-Cas в пяти исследуемых штаммах *P. freudenreichii* (табл. 2).

У штаммов FNCPS 2, FNCPS 4 и FNCPS 6 обнаружена полная система типа I-G, включающая все необходимые белки: Cas1, Cas2, Cas3, Cas5, Cas6, Cas7 и Cas8, что свидетельствует о ее потенциальной функциональности. Штамм FNCPS 3 содержит две системы CRISPR-Cas: полные кластеры типа I-G и I-E (Cas1, Cas2, Cas3, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas11), что может обеспечивать повышенную устойчивость к инородной ДНК.

У штамма FNCPS 828 идентифицирована неполная система CRISPR-Cas типа I-G: отсутствует бе-

лок Cas2, участвующий во встраивании новых спайсеров в CRISPR-массив. При этом присутствуют остальные ключевые компоненты.

Всего в пяти штаммах *P. freudenreichii* идентифицировано 326 уникальных спайсеров. Для поиска возможных мишеней систем CRISPR-Cas проведено выравнивание выявленных спайсеров на ранее опубликованные геномы 575 бактериофагов, заражающих бактерии, используемые в молочной промышленности. В результате анализа обнаружены совпадения 69 спайсеров (21%) с геномами девяти различных фагов, все из которых инфицируют пропионовокислые бактерии (рис. 8).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты анализа пяти филогенетически близких штаммов *P. freudenreichii*, имеющих выраженные фенотипические различия. Так, несмотря на высокую степень геномной идентичности ( $\text{orthoANI} > 99.9$ ), штаммы *P. freudenreichii* FNCPS 2 и FNCPS 3 существенно различались по ряду фенотипических признаков. *P. freudenreichii* FNCPS 2 отличался стабильной и высокой газообразующей активностью как в стандартной среде, так и при добавлении молочного гидролизата, в то время как FNCPS 3 образовывал газ только в присутствии гидролизата. Оба штамма группировались в один кластер по метаболическому профилю, что указывает на адаптацию к среде их общего происхождения. Однако FNCPS 3 не утилизировал *L*-арabinозу, *D*-раффинозу и глицерин – соединения, потенциально присутствующие в молочной среде, тогда как FNCPS 2 метаболизировал наибольшее число субстратов, что согласуется с его выраженной газообразующей активностью. Ранее было показано, что интенсивность газообразования у *P. freudenreichii* напрямую связана с доступностью метаболитов, прежде всего лактата: при исчерпании питательных источников уровень ферментации и выделение  $\text{CO}_2$  снижаются [30]. Кроме того, использование таких углеродных субстратов, как лактоза сыворотки и глицерин, влияет на ферментацию и газообразование *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*, что подтверждает зависимость данного процесса от типа и разнообразия источников питания [31, 32]. Таким образом, различия в метаболизме легкоусвояемых источников углерода, вероятно, могут объяснить наблюдаемые различия в уровне газообразования между штаммами [33].

Последние исследования показывают, что традиционное разделение *P. freudenreichii* на подвиды *freudenreichii* и *shermanii*, основанное на способности ферментировать лактозу и восстанавливать нитраты, не отражает фактического генетическо-

го и фенотипического разнообразия этого вида. Описаны штаммы с различными комбинациями указанных признаков [24, 34], а филогенетический анализ методом MLST не выявил четкой кластеризации, соответствующей существующей классификации на подвиды [34]. Недавняя переклассификация на основе фенотипа показала, что более 45% исследованных штаммов не могут быть отнесены ни к одному из подвидов [24]. Кроме того, вероятно, некоторые штаммы ошибочно классифицированы как не восстанавливающие нитрат вследствие недостаточной длительности инкубации [24]. В этой связи актуальной становится разработка генетических маркеров для корректного разграничения подвидов и предсказания фенотипа.

Штамм FNCPS 828 демонстрировал высокую филогенетическую близость к типовому штамму *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* CCUG 36819 (ESK = 0.99948), был способен к метаболизму лактозы, но при этом не обладал полным набором генов, необходимых для восстановления нитратов. Единственным вариабельным геном, связанным с этой способностью у штаммов *P. freudenreichii*, оказался *narG*, кодирующий альфа-субъединицу дыхательной нитратредуктазы, что делает его потенциальным маркером для определения подвида.

На данный момент системам защиты *P. freudenreichii* посвящено ограниченное число исследований. Наиболее распространенным защитным механизмом у бактерий является система рестрикции-модификации [35], выявленная также у *P. freudenreichii* [36]. Ранее сообщалось, что у этих бактерий наиболее распространена система CRISPR-Cas типа I-G, встречается также тип I-E [37]. Анализ 112 штаммов *P. freudenreichii*, проведенный в нашем исследовании, подтвердил преобладание системы типа I-G, в то время как тип I-E представлен примерно у 25% штаммов. Кроме того, установлено, что системы *AbiE*, *PD-T4-6* и системы рестрикции-модификации типа I и IV встречаются более чем у 90% исследованных штаммов.

Все пять штаммов, проанализированных в нашем исследовании, содержали систему CRISPR-Cas типа I-G. У штамма FNCPS 828 эта система оказалась неполной – отсутствовал ген, кодирующий белок Cas2. Штамм FNCPS 3, помимо системы типа I-G, имел также дополнительную систему CRISPR-Cas типа I-E. Этот штамм также отличался наибольшим числом спайсерных последовательностей, включая максимальное количество спайсеров, мишени которых соответствовали ранее описанным фагам пропионовокислых бактерий. Ранее сообщалось, что штаммы *P. freudenreichii* содержат спайсеры к фагам B22, Anatole, E1, Doucette, E6, G4 и B3

[38]. В нашем исследовании только штамм FNCPS 3 имел спайсеры ко всем ранее описанным фагам, за исключением E1, а также содержал дополнительные спайсеры к фагам B5, PFR1 и PFR2, что отражает значительное вирусное давление в процессе коэволюции штамма с бактериофагами. Кроме систем CRISPR-Cas, у всех штаммов были выявлены наиболее распространенные у *P. freudenreichii* защитные механизмы, а также менее изученные комплексы НЕС-05 и ietaS, что свидетельствует о многоуровневой системе антивирусной защиты у представителей данного вида.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе проанализированы как общие черты, так и внутривидовое разнообразие штаммов *P. freudenreichii*, что имеет непосредственное значение для молочной промышленности. Различия в газообразующей активности, спектре метаболизируемых субстратов и системах бактериальной защиты отражают адаптацию штаммов к различным технологическим условиям и подчеркивают необхо-

димость их целенаправленного подбора для оптимизации заквасочных культур. Выявление гена *narg* как потенциального маркера восстановления нитратов, а также описание разнообразия защитных систем, включая CRISPR-Cas, открывают перспективы для более точной типизации штаммов и прогнозирования их технологических свойств. Эти результаты формируют основу для разработки заквасок с повышенной стабильностью, предсказуемыми характеристиками и устойчивостью к бактериофагам, что в конечном счете способствует созданию более надежных и функциональных промышленно значимых культур, адаптированных к специфике конкретных процессов ферментации. ●

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (грант № 075-15-2024-483).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- de Rezende Rodovalho V, Rodrigues DLN, Jan G, Le Loir Y, de Carvalho Azevedo VA, Guédon E. Propionibacterium freudenreichii: General characteristics and probiotic traits. *Prebiotics and Probiotics-From Food to Health*. Published online 2021.
- Turgay M, Falentin H, Irmler S, et al. Genomic rearrangements in the *aspA-dcuA* locus of *Propionibacterium freudenreichii* are associated with aspartase activity. *Food Microbiol*. 2022;106:104030.
- Loux V, Mariadassou M, Almeida S, et al. Mutations and genomic islands can explain the strain dependency of sugar utilization in 21 strains of *Propionibacterium freudenreichii*. *BMC Genomics*. 2015;16(1):296.
- Piwowarek K, Lipińska E, Hać-Szymańczuk E, Kieliszek M, Kot AM. Sequencing and analysis of the genome of *Propionibacterium freudenreichii* T82 strain: Importance for industry. *Biomolecules*. 2020;10(2):348.
- Coronas R, Zara G, Gallo A, et al. Propionibacteria as promising tools for the production of pro-bioactive scotta: A proof-of-concept study. *Front Microbiol*. 2023;14:1223741.
- Gautier M, Rouault A, Sommer P, Briandet R. Occurrence of *Propionibacterium freudenreichii* bacteriophages in Swiss cheese. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(7):2572-2576.
- Cheng L, Marinelli LJ, Grosset N, et al. Complete genomic sequences of *Propionibacterium freudenreichii* phages from Swiss cheese reveal greater diversity than *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) acnes phages. *BMC Microbiol*. 2018;18(1):19.
- Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Krobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020;70(1):e102.
- Langdon WB. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min*. 2015;8:1-7.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079.
- Walker BJ, Abeel T, Shea T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. 2014;9(11):e112963.
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075.
- Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Gene Prediction: Methods and Protocols*. Published online 2019:227-245.
- Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(14):6614-6624. doi:10.1093/nar/gkw569
- Olson RD, Assaf R, Brettin T, et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(D1):D678-D689. doi: 10.1093/nar/gkac1003
- Brettin T, Davis JJ, Disz T, et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep*. 2015;5(1):8365. doi: 10.1038/srep08365
- Payne LJ, Meaden S, Mestre MR, et al. PADLOC: a web server for the identification of antiviral defence systems in microbial genomes. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(W1):W541-W550. doi: 10.1093/nar/gkac400
- Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, et al. CRISPR-CasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W246-W251. doi:10.1093/nar/gky425
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357-359.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinfor-*

- matics.* 2016;32(6):929-931. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681
21. Lee I, Ouk Kim Y, Park SC, Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66(2):1100-1103. doi: 10.1099/ijsem.0.000760
22. Atasever M, Mazlum H. Biochemical Processes During Cheese Ripening. *Veterinary Sciences and Practices.* 2024;19(3):174-182.
23. Shu L, Wang Q, Jiang W, et al. The roles of diol dehydratase from pdu operon on glycerol catabolism in *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol.* 2022;157:110021.
24. de Freitas R, Madec MN, Chuat V, et al. New insights about phenotypic heterogeneity within *Propionibacterium freudenreichii* argue against its division into subspecies. *Dairy Sci Technol.* 2015;95(4):465-477. doi: 10.1007/s13594-015-0229-2
25. Lledó B, Martínez-Espinosa RM, Marhuenda-Egea FC, Bonete MJ. Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 2004;1674(1):50-59.
26. Maske BL, de Melo Pereira GV, da Silva Vale A, Souza DSM, Lindner JDD, Soccol CR. Viruses in fermented foods: Are they good or bad? Two sides of the same coin. *Food Microbiol.* 2021;98:103794.
27. Payne LJ, Hughes TCD, Fineran PC, Jackson SA. New antiviral defences are genetically embedded within prokaryotic immune systems. *bioRxiv.* Published online 2024:2021-2024.
28. Gao L, Altae-Tran H, Böhning F, et al. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science (1979).* 2020;369(6507):1077-1084.
29. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(2):67-83.
30. Aburjaile FF, Rohmer M, Parrinello H, et al. Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* to long-term survival under gradual nutritional shortage. *BMC Genomics.* 2016;17(1):1007. doi: 10.1186/s12864-016-3367-x
31. Kosmider A, Drozdzynska A, Blaszka K, Leja K, Czacyk K. Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* using crude glycerol and whey lactose industrial wastes. *Pol J Environ Stud.* 2010;19(6):1249-1253.
32. de Assis DA, Machado C, Matte C, Ayub MAZ. High cell density culture of dairy *propionibacterium* sp. and *acidipropionibacterium* sp.: A review for food industry applications. *Food Bioproc Tech.* 2022;15(4):734-749.
33. Dank A, Abee T, Smid EJ. Expanded metabolic diversity of *Propionibacterium freudenreichii* potentiates novel applications in food biotechnology. *Curr Opin Food Sci.* 2023;52:101048.
34. Dalmasso M, Nicolas P, Falentin H, et al. Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int J Food Microbiol.* 2011;145(1):113-120.
35. Georjon H, Bernheim A. The highly diverse antiphage defence systems of bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(10):686-700.
36. Deptula P, Laine PK, Roberts RJ, et al. De novo assembly of genomes from long sequence reads reveals uncharted territories of *Propionibacterium freudenreichii*. *BMC Genomics.* 2017;18(1):790.
37. Fatkulin AA, Chuksina TA, Sorokina NP, et al. Comparative Analysis of Spacer Targets in CRISPR-Cas Systems of Starter Cultures. *Acta Naturae.* 2024;16(4):81-85.
38. Bücher C, Burtscher J, Domig KJ. Propionic acid bacteria in the food industry: An update on essential traits and detection methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2021;20(5):4299-4323.