

УДК 579.6:577.21:637.05

# Комплексная характеристика пяти штаммов *Lactococcus*: от фенотипических свойств к геномным особенностям

И. Д. Антипенко<sup>1\*</sup>, Н. П. Сорокина<sup>2</sup>, И. В. Кучеренко<sup>2</sup>, Е. В. Кураева<sup>2</sup>, Е. С. Масежная<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 16.07.2025

Принята к печати 21.08.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27747

**РЕФЕРАТ** Эффективность ферментации молочных продуктов зависит от характеристик молочнокислых бактерий, прежде всего от их метаболической активности и устойчивости к бактериофагам, поэтому важно понимать связь между генетическими и фенотипическими особенностями штаммов, используемых в промышленности. Нами проведен комплексный анализ пяти широко применяемых в России штаммов *Lactococcus* с использованием полногеномного секвенирования и оценки фенотипических свойств. Несмотря на генетическое сходство четырех штаммов *L. lactis*, выявлены значительные различия в их метаболической активности. Сравнение структуры ранее опубликованных геномов 337 штаммов *L. lactis* и 147 штаммов *L. cremoris* выявило отсутствие гена *lacZ* у *L. cremoris*, что указывает на видоспецифичные особенности метаболизма лактозы. Важно отметить, что у трех из пяти исследованных штаммов было выявлено наличие профагов, что коррелировало с пониженной кислотообразующей активностью. Штаммы *L. lactis* FNCPS 51n и 73n были устойчивыми ко всем 50 протестированным бактериофагам, что может быть связано с наличием системы abortивной инфекции AbiB. Полученные данные подчеркивают значимость интеграции геномного и фенотипического анализа при отборе эффективных и устойчивых стартовых культур *Lactococcus* для молочной промышленности.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** *Lactococcus*, ферментация, профилирование генома, профаги, стартовые культуры, бактериофаги.

## ВВЕДЕНИЕ

Представители рода *Lactococcus*, способные эффективно метаболизировать лактозу в молочную кислоту, входят в число ключевых микроорганизмов, используемых в производстве ферментированных молочных продуктов [1].

В молочной промышленности наибольшее распространение получили *L. lactis* и относительно недавно выделенный в самостоятельный вид *L. cremoris* [2]. Эти виды различаются наличием генов, связанных с метаболизмом углеводов и аминокислот [3], а также механизмами ответа на стресс [4].

Промышленно значимые различия выявлены и на внутривидовом уровне. Так, в пределах

подвида *L. lactis* subsp. *lactis* выделяют биовар *diacetylactis*, обладающий способностью метаболизировать цитрат с образованием диацетила — соединения, придающего продукту характерный маслянисто-сливочный аромат [5], который является важным компонентом аромата сыров типа Камембер, Эмменталь и Чеддер [6]. Комбинации штаммов для ферментации подбирают с учетом типа продукта: для кисломолочных изделий чаще используют *diacetylactis* и *L. cremoris*, тогда как *L. lactis* subsp. *lactis* применяется в сыроделии [7]. При этом показано, что скорость ферментации при использовании лактококковых заквасок в большей степени зависит от индивидуальных ха-

рактических штамма, нежели от его видовой принадлежности [8].

Разнообразие технологически значимых признаков у *Lactococcus* формировалось в результате эволюционных процессов и горизонтального переноса генов, включая плазмиды, несущие гены, связанные с метаболизмом сахаров, синтезом ароматических соединений и устойчивостью к бактериофагам [9]. В разных странах и регионах используют как коммерческие, так и местные штаммы молочнокислых бактерий (МКБ), отобранные либо на основе длительной традиции применения, либо благодаря уникальным технологическим свойствам [10].

В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ пяти штаммов *Lactococcus*, широко применяемых в России в производстве ферментированных молочных продуктов. Охарактеризованы метаболические и генетические особенности этих штаммов, включая устойчивость к бактериофагам, а также выявлены признаки, определяющие их технологическую ценность.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Штаммы и условия культивирования

В работе использовали пять штаммов: *L. cremoris* FNCPS 23 (GCA\_044990555.1), *L. lactis* FNCPS 51\_n, 43\_n, 81\_n и 73\_n (GCA\_044990575.1, GCA\_044990535.1, GCA\_044990605.1, GCA\_044990625.1), из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института маслоделия и сыроделия (ВНИИМС, филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН). Штаммы 81\_n и 43\_n были выделены из автохтонной сметаны, остальные — из молока. Все штаммы были получены из продуктов на территории Ярославской области, Россия, за исключением штамма *L. cremoris* FNCPS 23, выделенного из образца, поступившего из Литвы.

### Фенотипическая характеристика

Динамику роста определяли с помощью спектрофотометрии, применяя фотоэлектрический фотометр КФК-3-ЗОМЗ (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия). Штаммы культивировали в стерильном 10% восстановленном обезжиренном молоке при 30°C с добавлением 1% инокулята 16-часовой культуры. Оптическую плотность (OD) измеряли на длине волны 560 нм с интервалом 60 мин в течение 10 ч.

Для определения предельной титруемой кислотности в стерильное 10% восстановленное обезжиренное молоко добавляли 0.1% 16-часовой культуры лактококков и инкубировали при  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение

7 сут. Кислотность определяли титрованием раствором NaOH с использованием прибора Titrette, 50 мл (Brand, Германия), согласно ранее описанному методу [11] и выражали в градусах Тернера (°T).

Величину pH измеряли в стерильном 10% восстановленном обезжиренном молоке до ферментации (контрольное значение pH 6.53), а также во время ферментации в контрольных точках с использованием цифрового pH-метра STARTER 2100 (Ohaus, Швейцария).

Коагуляционную активность оценивали по способности штамма образовывать сгусток в 10% восстановленном обезжиренном молоке с 0.015% лакмуса. Для этого в стерильное лакмусовое молоко вносили инокулят каждого штамма в трех повторах. Образование сгустка и изменение окраски лакмуса (восстановление) оценивали ежечасно при инкубации при температуре 30 и 40°C [12].

Образование ацетона и диацетила определяли с использованием теста Фогеса–Проскауэра: 48-часовую культуру смешивали с 30% KOH, интенсивность окрашивания оценивали по 5-балльной шкале.

### Анализ литических профилей бактериофагов

Литический спектр бактериофагов определяли методом культивирования на двухслойном агаре в чашках Петри [13]. Чувствительность к бактериофагам оценивали по наличию или отсутствию зоны просветления в месте нанесения фага.

### Секвенирование генома

ДНК для секвенирования генома выделяли с использованием набора ExtractDNA Blood and Cells («Евроген», Россия) согласно инструкциям производителя. Библиотеки ДНК подготавливали с помощью набора MGIEasy Fast FS DNA Library Prep Set V2.0 (Cat. No. 940-001196-00, MGI) 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, США). Длину фрагментов библиотек ДНК оценивали с помощью капиллярного гель-электрофореза QIAxcel Advanced с использованием набора QX DNA Fast Analysis Kit (Cat. No. 929008, Qiagen). Секвенирование проводили с использованием проточной ячейки FCS на платформе MGI DNBSEQ-G50 (BGI, Китай) в режиме PE150.

Сборку бактериальных геномов выполняли с использованием SPAdes [14] в режиме isolate. Для повышения качества итоговой сборки сырые прочтения выравнивали на контиги при помощи Bowtie2 [15], после чего файлы выравнивания были отсо-

Таблица 1. Общие характеристики геномов исследованных штаммов *Lactococcus*

Параметр характеристики	<i>L. lactis</i> FNCPS 73n	<i>L. lactis</i> FNCPS 51n	<i>L. lactis</i> FNCPS 43n	<i>L. lactis</i> FNCPS 81n	<i>L. cremoris</i> FNCPS 23
Размер генома, п.н.	3110896	2258993	3084214	2963565	2528857
GC-состав, %	34.91	35.52	34.97	35.35	35.78
тРНК	75	44	57	60	53
рРНК	8	5	7	8	5
Гипотетические белки	965	720	907	1,121	765
Белки с установленной функцией	3349	2575	3292	3649	2224
CRISPR-локус	-	1	1	-	9
Белок Cas	-	-	-	-	-
Профаги	-	+	+	-	+
Плазмиды	repUS33	repUS4, rep32	repUS33, repUS4	repUS33	repUS33

Таблица 2. Фенотипические характеристики исследуемых штаммов

Штамм	Коагуляционная активность				Предельная кислотность, °Т	Образование диацетила, баллы
	при 30°С, ч		при 40°С, ч			
	Восстановление лакмуса	Свертывание	Восстановление лакмуса	Свертывание		
<i>L. lactis</i> 73n	8	8	8	8	98	-
<i>L. lactis</i> 81n	6	9	6	11	96	-
<i>L. lactis</i> 51n	10	16	9	11	98	4/5
<i>L. lactis</i> 43n	12 неполное	12	13	13	90	5/5
<i>L. cremoris</i> 23	13	14	-	-	88	-

ртированы и проиндексированы с использованием инструментов SAMtools [16] и переданы в Pilon [17] для исправления неточностей сборки. Качество сборки оценивали с помощью QUAST [18], полноту собранных геномов оценивали с использованием BUSCO [19].

### Анализ геномов

Аннотацию геномов и функциональный анализ проводили с использованием конвейера аннотации прокариотических геномов NCBI [20], BlastKOALA [21] и платформы BV-BRC [22]. Анализ наличия генов метаболизма в геномах штаммов рода *Lactococcus* осуществляли с помощью платформы BV-BRC на основе высококачественных, общедоступных полных сборок геномов: *L. lactis* ( $n = 337$ ) и *L. cremoris* ( $n = 147$ ). Профаги в бактериальных геномах выявляли с использованием инструмента PHASTEST с настройками глубокого поиска [23]. Системы защиты бактерий выявляли с помощью веб-инструмента DefenseFinder (v2.0.0, база моделей v2.0.2) [24]. Результаты, основанные на HMMER, фильтровали по критериям:  $i\text{-value} \leq 1e-5$ , покрытие профиля

последовательности  $\geq 70\%$ , покрытие целевой последовательности  $\geq 70\%$ .

Дополнительно спейсеры и компоненты системы CRISPR-Cas выявляли с использованием CRISPRCasFinder [25]. Плазмиды идентифицировали с использованием PlasmidFinder v2.0.1 (база данных: 2020-07-13) с порогами  $\geq 95\%$  идентичности и  $\geq 60\%$  покрытия [26].

### Филогенетический анализ

Филогенетическую идентификацию и определение близкородственных штаммов проводили с помощью анализа корреляции тетрануклеотидов через веб-сервис JSpeciesWS [27]. Сравнение средней нуклеотидной идентичности (ANI) выполняли с использованием алгоритма OrthoANI [28].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Общая геномная характеристика

Характеристики геномных последовательностей пяти анализируемых штаммов приведены в табл. 1. Они оказались схожими с опубликованными характеристиками штаммов соответствующих видов МКБ.

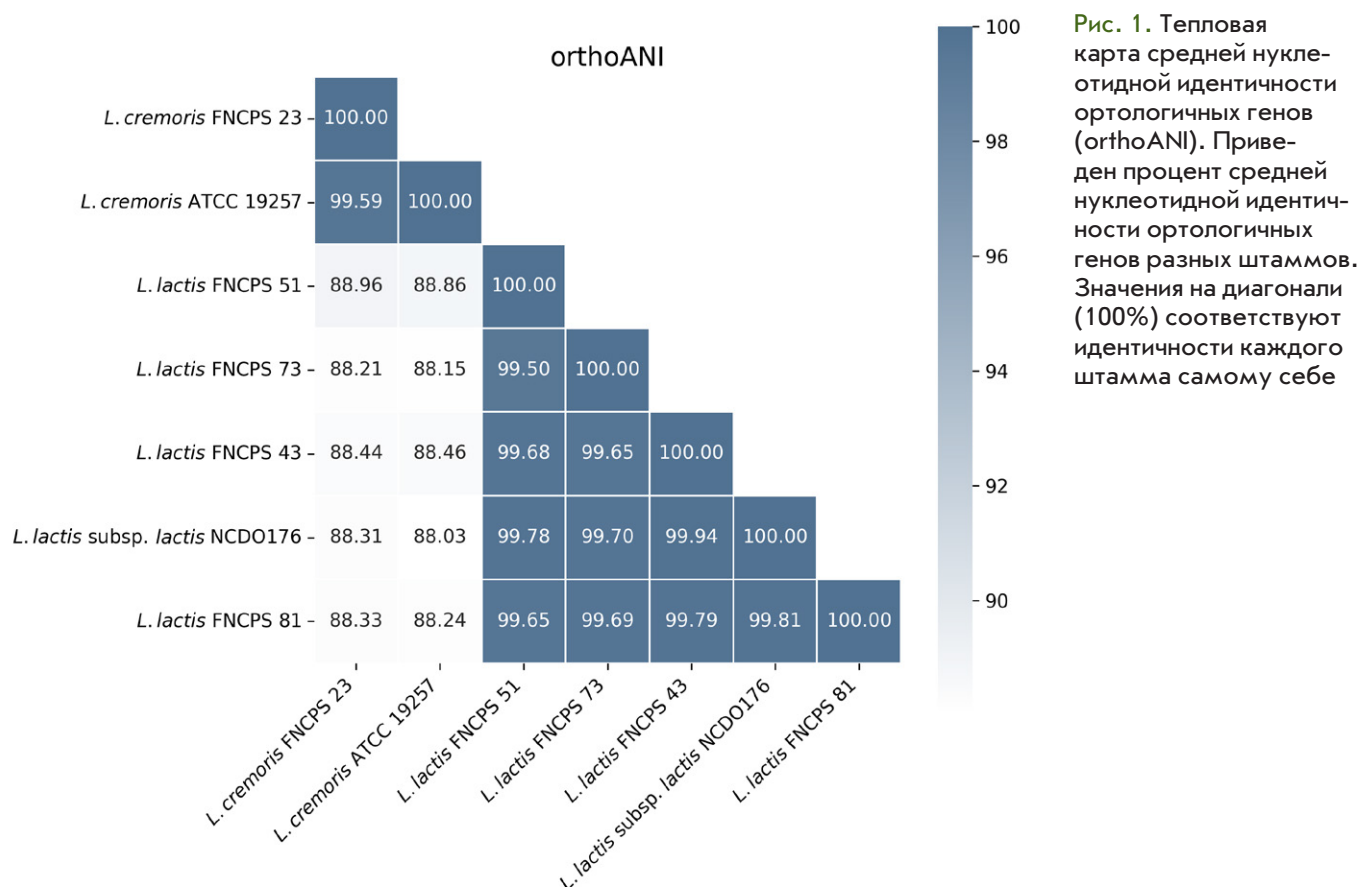


Рис. 1. Тепловая карта средней нуклеотидной идентичности ортологичных генов (orthoANI). Приведен процент средней нуклеотидной идентичности ортологичных генов разных штаммов. Значения на диагонали (100%) соответствуют идентичности каждого штамма самому себе

Четыре штамма были отнесены к *L. lactis*, один – к *L. cremoris*. Ближайшими типовыми геномами были *L. lactis* subsp. *lactis* NCD0176 (Z-score > 0.996) для *L. lactis* и *L. cremoris* ATCC 19257 (Z-score = 0.998) для *L. cremoris*. Анализ OrthoANI показал высокое сходство геномов штаммов *L. lactis* (>99.5%), что указывает на близкое родство (рис. 1). Штамм *L. cremoris* имел низкие значения ANI (88–89%) по сравнению с *L. lactis*, что подтверждает его отдельный видовой статус.

### Фенотипирование штаммов

Результаты фенотипических тестов исследуемых штаммов представлены в табл. 2.

Рост исследуемых штаммов оценивали по изменению оптической плотности (OD) в процессе культивирования. Штаммы *L. lactis* 73n, 81n и 51n демонстрировали сходные темпы роста, в то время как *L. lactis* 43n и *L. cremoris* 23 росли медленнее. Через 7 ч после начала эксперимента OD достигала плато, что может указывать на завершение активной фазы роста (рис. 2А).

Различия между штаммами также проявлялись в предельной кислотности: наименьшими значениями были у *L. lactis* 43n и *L. cremoris* 23 (табл. 2).

Аналогичная картина наблюдалась при измерении pH: наибольшим снижением pH среды культивирования было у штаммов *L. lactis* 73n и 81n, тогда как минимальное закисление среды к последнему этапу культивирования отмечено у *L. lactis* 43n (рис. 2Б).

Оценка коагуляционной активности при 30 и 40°C (табл. 2) подтвердила высокую метаболическую активность *L. lactis* 73n и 81n: восстановление лакмуса происходило за 6–8 ч, свертывание молока – за 8–11 ч при обеих температурах. *L. lactis* 51n демонстрировал температурную зависимость: при 40°C коагуляция наступала на 5 ч раньше, чем при 30°C. *L. lactis* 43n и *L. cremoris* 23 проявили наименьшую активность: свертывание происходило через 12–14 ч, при этом у 43n восстановление лакмуса было неполным. У штамма *L. cremoris* 23 при 40°C коагуляция и восстановление лакмуса не наблюдались.

### Анализ генов метаболизма

*Протеолитическая система и катаболизм аминокислот.* Эффективный рост МКБ в молоке требует расщепления белков, особенно казеина, составляю-

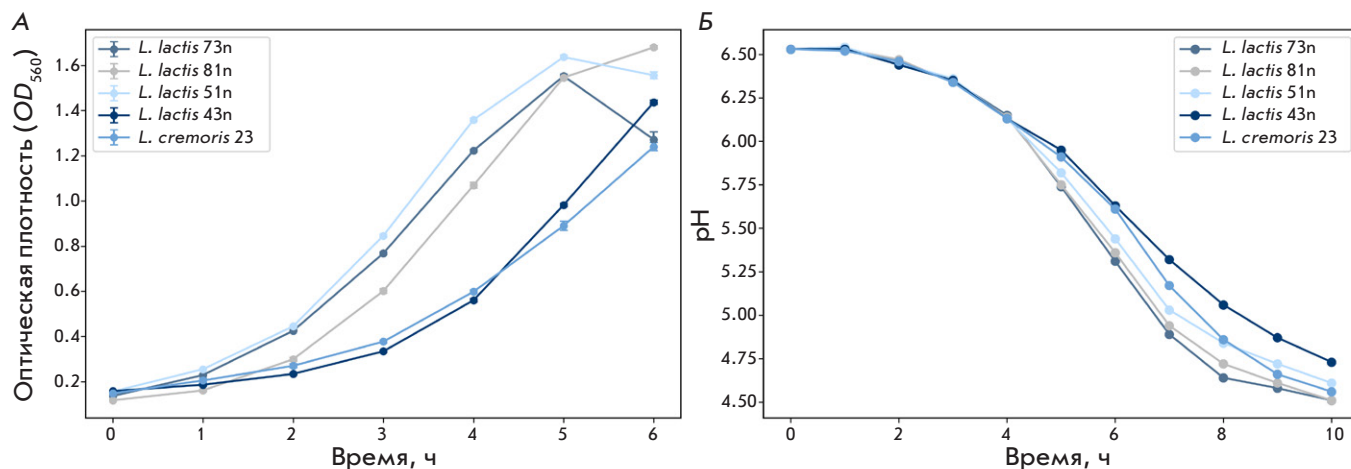


Рис. 2. А — динамика оптической плотности культуральной жидкости при инкубации исследуемых штаммов. Б — изменение рН культуральной жидкости в процессе культивирования тех же штаммов

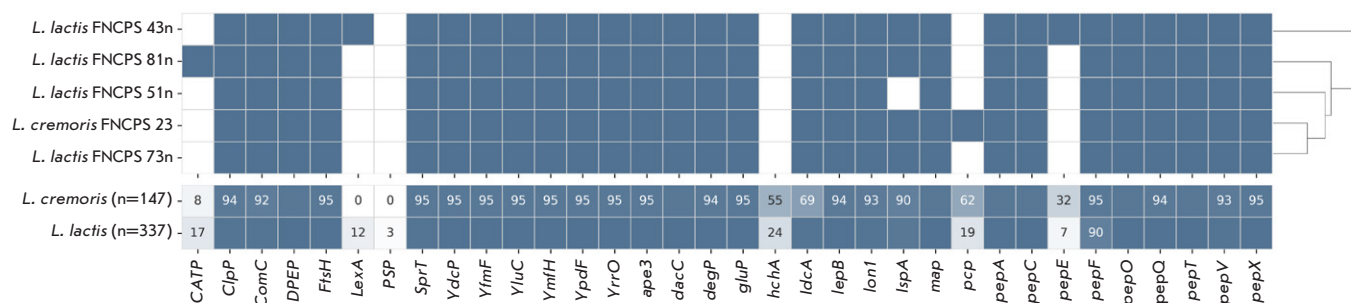


Рис. 3. Наличие генов протеолитических ферментов у представителей *L. lactis* ( $n = 337$ ) и *L. cremoris* ( $n = 147$ ), а также в пяти исследуемых штаммах. Верхняя панель представляет бинарную матрицу: синий цвет — наличие гена, белый — его отсутствие. Нижняя панель показывает процентное присутствие каждого гена в популяции; числовые значения указаны только для генов, встречаемость которых составляет менее 95% от общего числа штаммов. Штаммы сгруппированы по сходству их протеолитических геномных профилей; результаты кластеризации представлены в виде дендрограммы

щего около 80% всех белков молока [29]. Молекула казеина обогащена остатками пролина, что делает ее доступной для казеинолитических протеаз. У *Lactococcus* описаны два типа внеклеточных протеиназ — PI и PIII, различающихся специфичностью к фракциям казеина [29]. Лактоцепин I (PI) преимущественно гидролизует  $\beta$ -казеин, образуя более 100 олигопептидов длиной 4–30 аминокислотных остатков. PIII обладает более широкой специфичностью, он расщепляет  $\alpha$ s1-,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеин. При этом у половины промышленных штаммов *L. lactis* ген *prtP*, кодирующий эти ферменты, отсутствует [30].

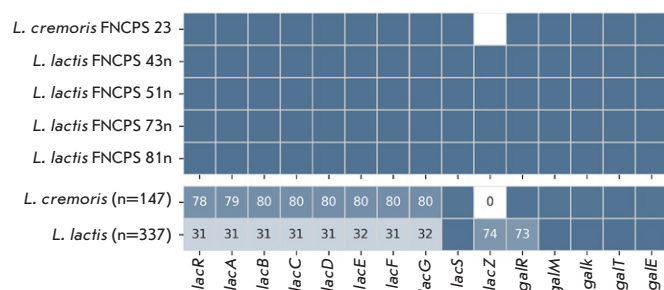
Ген *prtP* найден у трех из пяти исследованных штаммов: *L. cremoris* 23, *L. lactis* 51n и 81n. Белки *L. cremoris* 23 и *L. lactis* 51n показали высокую идентичность (97%), тогда как у *L. lactis* 81n обнаружена делеция из 427 аминокислот, что снизи-

ло идентичность до 76.6–77.2%. Все белки классифицированы как протеиназы типа PI. Сравнение с эталонной протеиназой типа PI (PrtP, P16271) показало 97.8% идентичности у *L. cremoris* 23, 95.9% — у *L. lactis* 51n и 74.9% — у *L. lactis* 81n.

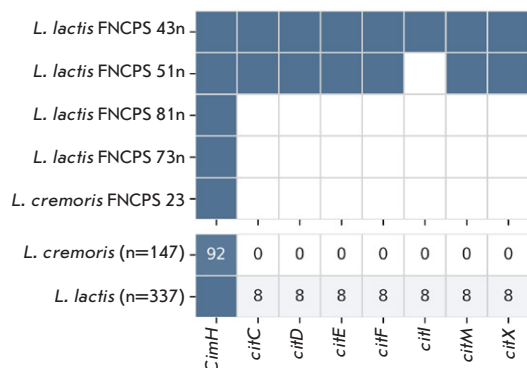
Пептиды, образующиеся при расщеплении казеина, транспортируются в клетку с участием систем Opp, DtpT и Dpp [31], гены которых представлены у всех пяти штаммов. В цитоплазме пептиды расщепляются экзо- и эндопротеазами [29]. Сравнительный анализ геномов показал сходный профиль наличия генов протеаз у всех пяти штаммов, соответствующий общему паттерну для рода *Lactococcus* (рис. 3).

Основные различия между видами *L. cremoris* и *L. lactis* заключались в частоте встречаемости генов пирролидонкарбоксилатпептидазы (*pcp*, [EC





**Рис. 4.** Гены метаболизма лактозы у представителей *L. lactis* ( $n = 337$ ) и *L. cremoris* ( $n = 147$ ), а также у пяти исследуемых штаммов. Верхняя панель представляет бинарную матрицу: синий цвет – наличие гена, белый – его отсутствие. Нижняя панель показывает процентное присутствие каждого гена в популяции; числовые значения указаны только для генов, встречаемость которых составляет менее 95% от общего числа штаммов



**Рис. 5.** Гены метаболизма цитрата у представителей *L. lactis* ( $n = 337$ ) и *L. cremoris* ( $n = 147$ ), а также у пяти исследуемых штаммов. Верхняя панель представляет бинарную матрицу: синий цвет – наличие гена, белый – его отсутствие. Нижняя панель показывает содержание (%) каждого гена в популяции; числовые значения указаны только для генов, встречаемость которых не превышает 95% от общего числа штаммов

3.4.19.3]) и пептидазы E (*perE*), которые, согласно базе UniProt, локализуются в плазмиде. Ген *pcr* найден у 62% штаммов *L. cremoris* и только у 19% *L. lactis*, тогда как *perE* – у 32% *L. cremoris* и 7% *L. lactis*. Напротив, гены CATP (белок семейства аминоконцевых протеаз СААХ) и *LexA* чаще встречались у *L. lactis* (17 и 12% соответственно), чем у *L. cremoris* (8 и 0% соответственно).

Анализируемые штаммы различались наличием пяти генов протеолитических ферментов. Так, у штамма *L. cremoris* 23 обнаружен ген *pcr*,

у штамма *L. lactis* 81n – CATP, у *L. lactis* 43n – *LexA* и *perE*, а у штамма 51n отсутствовал ген *lspA*, кодирующий сигнальную липопроteinпептидазу.

**Метаболизм лактозы.** Лактоза является основным источником углерода в молоке для МКБ. Метаболизм лактозы и галактозы происходит с использованием пути Лелуара и тагатозо-6-фосфатного пути [32]. Анализ штаммов *L. lactis* показал, что 31% (104 из 337) из них содержат все гены тагатозо-6-фосфатного пути, в отличие от 78% (115 из 147) штаммов *L. cremoris*. Все пять исследованных штаммов также содержали полный набор соответствующих генов (рис. 4).

Ключевым ферментом пути Лелуара является β-галактозидаза LacZ, катализирующая расщепление лактозы на глюкозу и галактозу. Ген *lacZ* не найден во всех геномах *L. cremoris*, включая штамм FNCPS 23, но идентифицирован в 74% штаммов *L. lactis*, включая все четыре исследованных штамма этого вида (рис. 4).

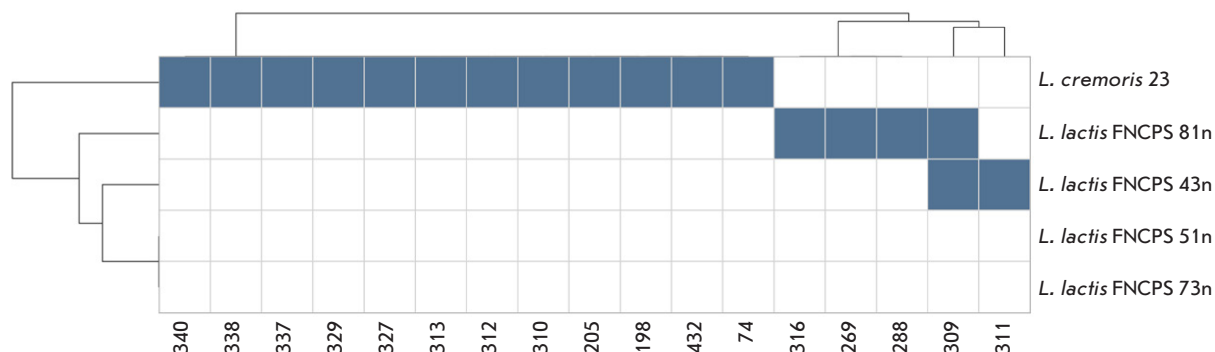
**Метаболизм цитрата.** Среди исследованных штаммов диацетил продуцировали только *L. lactis* 43n и 51n, причем 43n имел более высокую активность (табл. 2). Генетический анализ выявил гены, отвечающие за метаболизм цитрата, исключительно у этих двух штаммов (рис. 5). У всех представителей *L. cremoris* отсутствовали соответствующие гены. В целом, они были выявлены лишь в 8% (28 из 337) штаммов *L. lactis*, что указывает на ограниченное распространение биовара *diacetylactis*.

### Устойчивость к бактериофагам

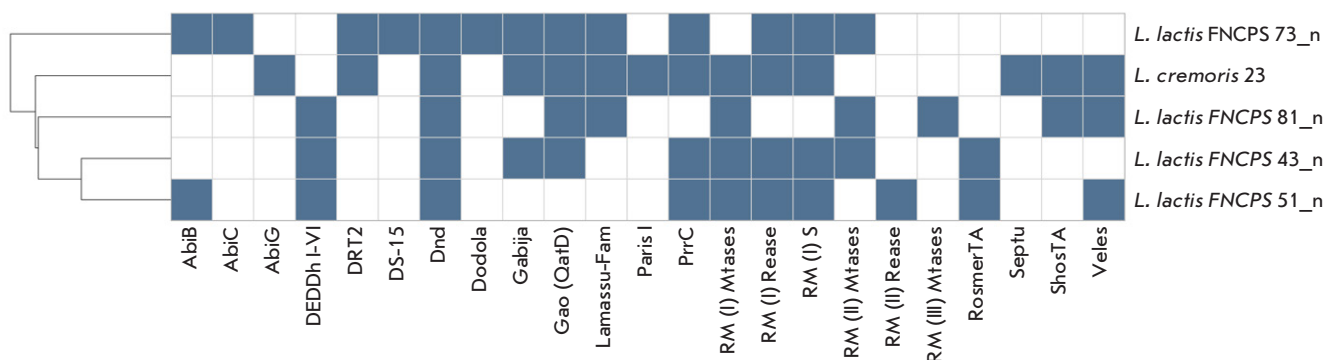
Бактериофаги – частая причина нарушений ферментации молочных продуктов, приводящая к экономическим потерям [33]. ДНК фагов, специфичных к *Lactococcus* и *Streptococcus*, обнаружена в 37% образцов молока, предназначенного для ферментации [34], что делает оценку фагоустойчивости важным этапом при подборе используемых штаммов.

На рис. 6 представлены результаты тестирования 50 бактериофагов (отображены только те, которые вызывали лизис хотя бы одного из штаммов). Штаммы *L. lactis* 73n и 51n продемонстрировали устойчивость ко всем фагам. Штаммы 81n, 43n и *L. cremoris* 23 оказались чувствительными к отдельным бактериофагам, сохраняя при этом устойчивость к другим.

Поскольку различия в устойчивости к фагам могут быть связаны с вариабельностью фаг-специфичных защитных систем, кодируемых геномами бактерий, провели анализ с использованием DefenseFinder (рис. 7). Единственной системой, общей для всех штаммов, оказалась Dnd – механизм



**Рис. 6.** Литический спектр взаимодействия бактериофагов с исследуемыми штаммами. Указаны названия бактериофагов. Синий цвет ячейки – чувствительность штамма к соответствующему фагу; белый цвет – отсутствие литического эффекта. Штаммы и бактериофаги сгруппированы по сходству их литических профилей; результаты кластеризации представлены в виде дендрограммы



**Рис. 7.** Профиль систем бактериального иммунитета у исследованных штаммов. Приведены наименования систем устойчивости исследуемых штаммов. Синие ячейки указывают на наличие соответствующих генов, белые – на их отсутствие. Штаммы сгруппированы по сходству в представленности генов систем бактериальной защиты; результаты кластеризации представлены в виде дендрограммы

врожденного иммунитета, основанный на фосфоротиоатных модификациях ДНК [35].

Система AbiB выявлена только у устойчивых штаммов. У *L. lactis* 73n дополнительно обнаружены AbiC, DS-15 и Dodola. У *L. lactis* 51n выявлена уникальная система рестрикции-модификации (RM) II типа, отсутствующая у других штаммов. Штамм *L. lactis* 81n оказался наиболее чувствительным к фаговой инфекции (4/50 фагов вызывали лизис). У этого штамма отсутствовали гены рестриктазы и субъединицы S системы RM типа I, а также системы PrrC, что может объяснять его чувствительность к фагам. Наибольшую чувствительность показал *L. cremoris* 23, лизируемый 12 фагами, не активными в отношении других штаммов. При этом не выявлено ни одной защитной системы, представленной у всех *L. lactis*, но не найденной у *L. cremoris* 23, что может указывать на участие структуры клеточной стенки в восприимчивости к фаговой инфекции [36].

Гены Cas (I–IV типа) не обнаружены, однако CRISPR-спейсеры присутствовали во всех геномах, кроме *L. lactis* 81n и 73n.

### Детекция профагов

Анализ геномов выявил фаговые нуклеотидные последовательности, что указывает на присутствие профагов в большинстве исследованных штаммов. У штаммов *L. lactis* 73n и 81n вставки фаговых последовательностей не обнаружены, что свидетельствует об отсутствии интегрированных профагов.

В геноме *L. cremoris* 23 найдены два контига с фаговыми генами: один (33.5 т.п.н.) сходен с PHAGE\_Lactoc\_62503, другой (8.1 т.п.н.) – с PHAGE\_Lactoc\_bIL309. Эти контиги содержат 40 и 11 кодирующих последовательностей при GC-содержании 35.04–35.29%. Вероятно, первый фрагмент представляет собой функциональный профаг, тогда как второй – остаточную неактивную вставку.

Геном *L. lactis* 51n включает четыре контига с фаговыми последовательностями (2.8–7.3 т.п.н., суммарно около 22 т.п.н.), схожие с фагами bIL312, bIL309, D4410 и bIL286. Эти участки могут быть либо рудиментарными остатками, либо частями одного профага, разделенного при сборке генома.

В *L. lactis* 43n обнаружено шесть фагосодержащих контигов, крупнейшие из которых достигают 13.5 т.п.н. (общая длина около 44 т.п.н.). Найдены последовательности, сходные с фагами bIL312, bIL285, bIL309, а также 98201, bIL311 и BK5\_Т. Фаговые белки синтезируются с обеих цепей ДНК, что указывает на двухцепочечный характер фагового генома.

Поскольку ни один из фрагментов фаговой ДНК в штаммах *L. lactis* 43n и *L. lactis* 51n не был интегрирован в контиг, содержащий бактериальные гены, можно предположить, что обнаруженные последовательности представляют собой не интегрированные в геном профаги, а ДНК фагов, попавших в образец на этапе культивирования.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе охарактеризованы пять промышленных штаммов рода *Lactococcus*. Геномный анализ выявил высокое сходство между штаммами *L. lactis*, свидетельствующее об их клональном происхождении, в то время как *L. cremoris* 23 был таксономически обособлен. Несмотря на близкое родство, штаммы различались своей метаболической активностью: *L. lactis* 73n и 81n характеризовались высокой скоростью роста и продукцией кислот, тогда как *L. lactis* 43n и *L. cremoris* 23 отличались медленной скоростью роста и кислотообразованием. Штамм 51n, проявлявший умеренную активность, увеличивал скорость свертывания молока при 40°C – температуре, нетипичной для *Lactococcus* [37], что может иметь значение для производства сыров с высокотемпературным нагревом (Пармезан, Эмменталь и др.). Кроме того, штаммы *L. lactis* 43n и 51n относятся к биовару *diacetylactis*, что подтверждается наличием генов метаболизма цитрата и способностью продуцировать диацетил. При этом штамм 51n имел более низкий уровень продукции диацетила, чем 43n, что, вероятно, связано с отсутствием гена транскрипционного регулятора цитратлиазы (*citI*), участвующего в активации транскрипции соответствующего оперона в присутствии цитрата [38]. Корреляция между активностью продукции диацетила и наличием гена *citI* может представлять промышленный интерес, однако для подтверждения его роли необходимы эксперименты по геномному редактированию и оценке экспрессии мРНК соответствующих генов.

Геномный анализ выявил гены систем транспорта пептидов Opp, DtpT и Dpp, а также характерный набор протеолитических ферментов МКБ [29]. Присутствие гена *prtP* внеклеточной протеазы I типа в штаммах *L. lactis* 51n и *L. cremoris* 23 не коррелировало с уровнем их метаболической активности. Недавно показали, что представленность генов отдельных пептидаз (*Pcp*, *PepE/G*, *PepI*, *PepR*, *PepL* и *PepQ*) в геномах молочнокислых бактерий может существенно варьировать, влияя на активность ферментации [39]. Изученные нами штаммы также различались составом генов, кодирующих отдельные внутриклеточные пептидазы, включая *pcp*, *ppeE*, *CATP*, *lspA* и *lexA*. Хотя выявленные вариации не объяснили фенотипические различия, они могут иметь функциональное значение. Для подтверждения их роли в формировании фенотипа необходимо функциональное тестирование соответствующих генов в комплексе с оценкой протеолитической активности. Кроме того, отсутствие очевидной корреляции может быть связано с различиями в копиях указанных генов и их возможной плазмидной локализацией, что не оценивали в рамках нашей работы, и является ее ограничением.

Мы подтвердили значительные различия в метаболизме лактозы между видами *L. lactis* и *L. cremoris*, что ранее отмечалось в литературе [1, 40]. Отсутствие *lacZ* у *L. cremoris* является характерной видовой особенностью, тогда как у большинства *L. lactis* этот ген присутствует. При этом у 80% *L. cremoris* и у трети *L. lactis* экспрессируются гены тагатозо-6-фосфатного пути. Все изученные штаммы *L. lactis* обладают генами обоих путей, что отражает их адаптацию к промышленным условиям.

Штаммы *L. lactis* 73n и 51n проявили устойчивость ко всем протестированным фагам. Для этих штаммов характерно наличие системы abortивной инфекции AbiB, однако полная устойчивость, вероятно, обусловлена комплексом факторов. Кроме того, как показано ранее, система AbiB эффективна преимущественно против фагов *Lactococcus* типа 936 [41], поэтому для подтверждения ее вклада в устойчивость указанных штаммов необходимо определить типы фагов, использованных в тестировании. Наши результаты согласуются с выводами длительного мониторинга фаговой динамики на сыродельных предприятиях, где устойчивость лактококков к бактериофагам также связывали с системами abortивной инфекции (Abi) [42]. Показано, что смена стартовых культур влияет на состав и численность фагов, а применение устойчивых штаммов может определять формирование фаговой экосистемы на производстве [42]. CRISPR-локусы выявлены у трех штаммов, при этом отсутствие белков Cas



согласуется с данными о неполных или деградированных CRISPR-системах у *Lactococcus* [43].

В геномах *L. lactis* 51n, 43n и *L. cremoris* 23 выявлены последовательности фаговой ДНК. У 51n и 43n они, вероятно, соответствуют внегеномным сателлитным фагам или вирусам, попавшим в образцы при культивировании. Профаг, обнаруженный у *L. cremoris* 23, вероятно, интегрирован, однако для подтверждения его способности к индукции следует провести эксперименты по активации.

Согласно ранее опубликованным данным, в целом более низкая скорость ферментации характерна для *L. cremoris* по сравнению с *L. lactis* [44], хотя отдельные штаммы *cremoris* могут проявлять более высокую активность, чем некоторые штаммы *lactis* [8]. Выявленное снижение ферментативной активности у штаммов *L. lactis* 51n, 43n и *L. cremoris* 23 по сравнению с *L. lactis* 73n и 81n, вероятно, также может быть обусловлено внутривидовыми различиями, причину которых еще предстоит выявить. Несмотря на отсутствие полного лизиса клеток, присутствие профагов в геноме, вероятно, создает дополнительную физиологическую нагрузку. Это может быть связано с активацией abortивных систем защиты (AbiC, AbiG и др.), которые, предотвращая распространение фага, одновременно нарушают нормальный клеточный метаболизм, что может снижать общую функциональную активность колонии бактерий за счет сопутствующего метаболического стресса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование показало, что метаболические особенности *Lactococcus*, осуществляющего молочнокислое брожение, в значительной степени определяются штаммоспецифическими характеристиками, а не филогенетической принадлежностью. Это подтверждается выраженной фенотипической вариабельностью близкородственных штаммов *L. lactis*. Возможная связь между присутствием профагов и сниженной метаболической активностью у штаммов *L. lactis* 51n, 43n и *L. cremoris* 23 подчеркивает важность анализа фагового профиля при подборе штаммов для промышленного применения. Кроме того, наличие системы AbiB у штаммов 51n и 73n, устойчивых к широкому спектру бактериофагов, делает эту систему перспективным маркером фагорезистентности. В совокупности полученные данные подчеркивают необходимость комплексного подхода, сочетающего геномные и фенотипические методы, для эффективного подбора штаммов, обладающих высокой продуктивностью и устойчивостью, для применения в молочной промышленности. ●

*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

- Kondrotiene K, Zavistanaviciute P, Aksomaitiene J, Novoslovskij A, Malakauskas M. *Lactococcus lactis* in dairy fermentation—Health-promoting and probiotic properties. *Fermentation*. 2023;10(1):16.
- Li TT, Tian WL, Gu CT. Elevation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* to the species level as *Lactococcus cremoris* sp. nov. and transfer of *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* to *Lactococcus cremoris* as *Lactococcus cremoris* subsp. *tractae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2021;71(3):004727.
- Torres Manno M, Zuljan F, Alarcón S, et al. Genetic and phenotypic features defining industrial relevant *Lactococcus lactis*, *L. cremoris* and *L. lactis* biovar. *diacetylactis* strains. *J Biotechnol*. 2018;282:25–31. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.06.345>
- Kim WS, Ren J, Dunn NW. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiol Lett*. 1999;171(1):57–65.
- van Mastrigt O, Mager EE, Jamin C, Abee T, Smid EJ. Citrate, low pH and amino acid limitation induce citrate utilization in *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. *Microb Biotechnol*. 2018;11(2):369–380.
- Curioni PMG, Bosset JO. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int Dairy J*. 2002;12(12):959–984.
- Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B. Eating fermented: Health benefits of LAB-fermented foods. *Foods*. 2021;10(11):2639.
- Poudel R, Thunell RK, Oberg CJ, et al. Comparison of growth and survival of single strains of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus cremoris* during Cheddar cheese manufacture. *J Dairy Sci*. 2022;105(3):2069–2081. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20958>
- Kelleher P, Mahony J, Bottacini F, Lugli GA, Ventura M, van Sinderen D. The *Lactococcus lactis* Pan-Plasmidome. *Front Microbiol*. 2019;Volume 10–2019. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00707>
- Panebianco F, Giarratana F, Caridi A, Sidari R, De Bruno A, Giuffrida A. Lactic acid bacteria isolated from traditional Italian dairy products: Activity against *Listeria monocytogenes* and modelling of microbial competition in soft cheese. *Lwt*. 2021;137:110446.
- Tomovska J, Gjorgievski N, Makarijoski B. Examination of pH, titratable acidity and antioxidant activity in fermented Milk. *J Mater Sci Eng A*. 2016;6(11):326–333.
- Gutierrez-Mendez N, Rodriguez-Figueroa JC, Gonzalez-Cordova AF, Nevarez-Moorillon G V, Rivera-Chavira B, Vallejo-Cordoba B. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Can J Microbiol*. 2010;56(5):432–439.

13. Kutter E. Phage host range and efficiency of plating. *Bacteriophages: Methods and protocols, Volume 1: Isolation, characterization, and interactions*. Published online 2009;141-149.
14. Pribelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020;70(1):e102.
15. Langdon WB. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min*. 2015;8:1-7.
16. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079.
17. 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.
18. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075.
19. Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Gene prediction: methods and protocols*. Published online 2019:227-245.
20. 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
21. Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol*. 2016;428(4):726-731. doi: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006
22. 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
23. Wishart DS, Han S, Saha S, et al. PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Res*. 2023;51(W1):W443-W450. doi: 10.1093/nar/gkad382
24. Tesson F, Planel R, Egorov AA, et al. A Comprehensive Resource for Exploring Antiphage Defense: DefenseFinder Webservice, Wiki and Databases. *Peer Community Journal*. 2024;4:e91. doi: 10.24072/pcjournal.470
25. Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, et al. CRISPR-CasFinder, an update of CRISPRfinder, 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
26. Alessandra C, Ea Z, Aurora GF, et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3895-3903. doi: 10.1128/aac.02412-14
27. Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016;32(6):929-931. doi: 10.1093/bioinformatics/btv681
28. 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
29. Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*. 2021;26(7):1858.
30. Passerini D, Beltramo C, Coddeville M, et al. Genes but Not Genomes Reveal Bacterial Domestication of Lactococcus Lactis. *PLoS One*. 2010;5(12):e15306. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015306
31. Venegas-Ortega MG, Flores-Gallegos AC, Martínez-Hernández JL, Aguilar CN, Nevárez-Moorillón G V. Production of Bioactive Peptides from Lactic Acid Bacteria: A Sustainable Approach for Healthier Foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18(4):1039-1051. doi: https://doi.org/10.1111/1541-4337.12455
32. Iskandar CF, Cailliez-Grimal C, Borges F, Revol-Junelles AM. Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. *Trends Food Sci Technol*. 2019;88:121-132. doi: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.020
33. Garneau JE, Moineau S. Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb Cell Fact*. 2011;10(1):S20. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S20
34. del Rio B, Binetti AG, Martín MC, Fernández M, Magadán AH, Alvarez MA. Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol*. 2007;24(1):75-81. doi: https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.001
35. Gan R, Wu X, He W, et al. DNA phosphorothioate modifications influence the global transcriptional response and protect DNA from double-stranded breaks. *Sci Rep*. 2014;4(1):6642. doi: 10.1038/srep06642
36. Stuart A, Irina S, Evgenii V, et al. Differences in Lactococcal Cell Wall Polysaccharide Structure Are Major Determining Factors in Bacteriophage Sensitivity. *mBio*. 2014;5(3):10.1128/mbio.00880-14. doi: 10.1128/mbio.00880-14
37. Chen J, Shen J, Ingvar Hellgren L, Ruhdal Jensen P, Solem C. Adaptation of Lactococcus lactis to high growth temperature leads to a dramatic increase in acidification rate. *Sci Rep*. 2015;5(1):14199. doi: 10.1038/srep14199
38. G MM, Christian M, Diego de M, Paloma L. CitI, a Transcription Factor Involved in Regulation of Citrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *J Bacteriol*. 2005;187(15):5146-5155. doi: 10.1128/jb.187.15.5146-5155.2005
39. Shi Z, Fan X, Tu M, Wu Z, Pan D. Comparison of changes in fermented milk quality due to differences in the proteolytic system between Lactobacillus helveticus R0052 and Lactococcus lactis subsp. lactis JCM5805. *Food Biosci*. 2023;51:102271.
40. Rodríguez J, Vázquez L, Flórez AB, Mayo B. Phenotype testing, genome analysis, and metabolic interactions of three lactic acid bacteria strains existing as a consortium in a naturally fermented milk. *Front Microbiol*. 2022;Volume 13-2022. https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1000683
41. Chopin MC, Chopin A, Bidnenko E. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(4):473-479. doi: https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.006
42. P JA, Marie-Laurence L, Elyse B, et al. Longitudinal Study of Lactococcus Phages in a Canadian Cheese Factory. *Appl Environ Microbiol*. 2023;89(5):e00421-23. doi: 10.1128/aem.00421-23
43. Mileriene J, Aksomaitiene J, Kondrotiene K, et al. Whole-Genome Sequence of Lactococcus lactis Subsp. lactis LL16 Confirms Safety, Probiotic Potential, and Reveals Functional Traits. *Microorganisms*. 2023;11(4):1034. doi: 10.3390/microorganisms11041034
44. Garvie EI, Farrow JAE. NOTES: *Streptococcus lactis* subsp. cremoris (Orla-Jensen) comb. nov. and *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* (Matuszewski et al.) nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1982;32(4):453-455. doi: 10.1099/00207713-32-4-453