

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.222.6

Витамин K₂ является медиатором транспорта электронов от НАДН-дегидрогеназы 2 к хинолоксидазе *bd*-типа у *Lacticaseibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529**Т.Ю. Динариева^{1,*,§}, А.И. Климко^{1,§}, Т.А. Чердынцева¹,
А.Л. Брюханов¹, А.И. Нетрусов^{1,2}**¹Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, Россия, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Факультет биологии и биотехнологии, Высшая школа экономики, 101000, Россия, г. Москва, ул. Мясницкая, д. 20

*e-mail: dinarieva@mail.ru

§ равноценный вклад

Lacticaseibacillus rhamnosus КМ МГУ 529 выращивали в периодической культуре при интенсивной аэрации в присутствии 38 мкМ гемина и 18 мкМ витамина K₂ как источника менахинона для активации дыхательного метаболизма. Контролем служила аэробная культура, выращенная без добавления гемина и менахинона. Внесение в ростовую среду гемина или менахинона по отдельности не оказывало существенного влияния на рост культуры. В дыхательных условиях (гемин + K₂) выход биомассы суточной культуры составлял 2,86 ± 0,05 г сухих клеток/л, а молярный экономический коэффициент Y_{P/S} после 18 ч культивирования – 25,6 ± 1,5 г сухих клеток/моль использованной глюкозы. Оба значения превышали аналогичные показатели для аэробных условий на 27%. Спектральный анализ выявил присутствие цитохромов *b*- и *d*-типа в мембранах *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Активность электрон-транспортной цепи бактерии исследовали полярографическим методом. Препараты мембран из клеток, выращенных аэробно на среде с геминном, активно потребляли кислород в присутствии 1 мМ НАДН. Внесение 0,2 мМ менахинона в реакционную смесь сопровождалось увеличением скорости окисления мембранами НАДН в 4,6 раза. С помощью MALDI-TOF MS/MS идентифицированы ферменты, предположительно участвующие в окислении мембранами НАДН: пиридиннуклеотид-дисульфид-оксидоредуктаза (Noh-2), НАДН-дегидрогеназа 2 (Ndh-2) и субъединица I убинолоксидазы *bd* (CydA). Таким образом, при окислении НАДН 80% транспорта электронов от НАДН к кислороду шло через Ndh-2, менахинон, хинолоксидазу *bd*-типа и только 20% – через Noh-2. В работе приведены экспериментальные свидетельства в пользу функционирования электрон-транспортной цепи у *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 при аэробном культивировании в присутствии гемина и менахинона. Впервые измерены скорости окисления НАДН препаратами мембран молочнокислой бактерии. При этом впервые продемонстрировано *in vitro* свойство экзогенного менахинона переносить электроны от Ndh-2 к хинолоксидазе *bd*-типа у молочнокислой бактерии.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, дыхание, электрон-транспортная цепь, НАДН-дегидрогеназа 2, хинолоксидаза *bd*, Noh-2

Молочнокислые бактерии (МКБ) широко используют в качестве стартовых и пробиотических культур при производстве ферментированных продуктов. Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении с пищей в достаточных количествах приносят пользу здоровью организма хозяина [1]. Среди лактобацилл, отнесенных к пробиотикам, широко изучается *Lacticaseibacillus rhamnosus*, ранее известная как *Lactobacillus rhamnosus*. В настоящее время из всех известных штаммов *L. rhamnosus* только штамм GG наиболее изучен и официально признан безо-

пасным [2]. Поиск новых безопасных штаммов МКБ с выраженными пробиотическими свойствами и высокой устойчивостью к условиям технологических процессов является весьма актуальным.

По современным представлениям наиболее технологичными способами получения стартовых и пробиотических культур МКБ являются аэробное и дыхательное культивирование. В последнем случае МКБ выращивают в присутствии экзогенного гемина (лактококки) или гемина и менахинона (лактобациллы) [3–8]. Большинство МКБ относят к аэротолерантным анаэробам. У МКБ

отсутствуют гены полного пути биосинтеза гема, лишь представители некоторых родов, включая *Lactococcus*, могут синтезировать менахинон [3]. При дыхательном культивировании у некоторых МКБ может функционировать электрон-транспортная цепь (ЭТЦ), состоящая из НАДН-дегидрогеназы, менахинона и хинолоксидазы *bd* (*CydAB*). Аэробный и дыхательный метаболизм наиболее исследован у *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* и *Lacticaeibacillus casei* [3–8]. МКБ, выращенные в дыхательных условиях, имеют большие выходы биомассы, а также демонстрируют повышенную устойчивость к окислительным стрессам, замораживанию, лиофильной сушке и длительному хранению по сравнению с анаэробными и аэробными культурами. В этой связи дыхательное культивирование представляется перспективным подходом для получения, хранения и реализации замороженных или лиофилизированных заквасок и пробиотических культур МКБ.

Не оставляет сомнения тот факт, что дыхательный метаболизм МКБ требует всестороннего изучения. Тем не менее, в настоящее время выводы о функционировании ЭТЦ у МКБ базируются главным образом на геномном анализе и увеличении выхода биомассы при дыхательном культивировании. Объектом настоящего исследования являлась гомоферментативная МКБ *Lacticaeibacillus rhamnosus* КМ МГУ 529, обладающая пробиотическими свойствами [9]. В работе измерены скорости окисления НАДН препаратами мембран, выделенными из клеток МКБ. Впервые показано *in vitro*, что менахинон является медиатором транспорта электронов от НАДН-дегидрогеназы к хинолоксидазе в ЭТЦ МКБ.

Материалы и методы

Материалы. В работе использовали: питательную среду MRS, KCN (Merck, Германия); гемин и фенилметансульфонилфторид (Fluka, Швейцария); витамин K_2 , дитиотреитол, дурухинон, НАДН, бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США).

Объект и условия культивирования. *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, выделенную на кафедре микробиологии МГУ из образца фекалий четырехмесячного младенца, выращивали на среде MRS (pH 6,5) в колбах объемом 250 мл с 15 мл среды в темноте при 220 об./мин и 37°C. Стерильные растворы гемина (2,5 мг/мл 50 мМ NaOH) и витамина K_2 (1 мг/мл этанола) добавляли в стерильную среду в конечной концентрации 38 мкМ и 18 мкМ соответственно. Оптическую плотность (ОП) культуры измеряли при 650 нм. Посевным материалом (10–15%) служила суточная культура, выращенная статично при 37°C в микроаэробных условиях в закрытых резиновыми пробками и алюминиевыми крышками флаконах объемом 12 мл с 10 мл среды.

Получение мембранных фракций. Культуру конца логарифмической фазы роста (1 л) осаждали центрифугированием (4000 g, 10 мин, 4°C), клетки трижды отмывали 50 мМ К-фосфатным буфером (pH 7,0). Впоследствии клетки осаждали и отмывали, используя тот же режим центрифугирования. Полученные осадки клеток суспендировали в буфере и разрушали в ледяной бане на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (У-РосПрибор, Россия) мощностью 150 Вт с частотой 22 кГц в течение 10 мин (20 × 30 с) в присутствии 1 мМ фенилметансульфонилфторида с последующим центрифугированием (20000 g, 40 мин, 4°C). Полученные экстракты клеток подвергали ультрацентрифугированию (150000 g, 3 ч, 4°C), после чего осадки мембран трижды отмывали буфером при тех же условиях, суспендировали в буфере и хранили при –20°C.

Полярографический анализ. Скорость поглощения кислорода измеряли с помощью кислородного электрода типа Кларка (Rank Brothers Ltd., Великобритания) в ячейке объемом 2 мл при 37°C. Отмытые от среды клетки или мембраны вносили в ячейку, содержащую 2 мл буфера. Реакцию начинали добавлением субстратов в конечных концентрациях: для мембран – 10 мМ дитиотреитол (ДТТ) + 0,75 мМ дурухинон, 1 мМ НАДН и 0,2 мМ витамин K_2 , а для клеток – 10 мМ глюкоза. В случае ингибиторного анализа препараты мембран инкубировали с KCN в течение 1 мин в полярографической ячейке, затем последовательно добавляли НАДН и витамин K_2 в конечных концентрациях 1,0 и 0,2 мМ соответственно. Скорости потребления O_2 рассчитывали, исходя из того, что в 1 мл буфера при 37°C растворено 210 нмоль O_2 .

Спектральный анализ. Спектры поглощения препаратов мембран регистрировали на однолучевом спектрофотометре Specord 50 (Analytik Jena AG, Германия) при комнатной температуре и длине оптического пути 1 см. Образцы восстанавливали сухим дитионитом натрия или окисляли сухим персульфатом аммония.

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

Определение сухой биомассы и белка. Культуру (10–15 мл) осаждали центрифугированием и трижды отмывали осадки клеток деионизированной водой. Массу центрифужных пробирок, пустых и с биомассой, доводили до постоянного веса при 90°C.

Белок определяли по методу Брэдфорда [10], используя бычий сывороточный альбумин (фракция V) в качестве стандарта.

Масс-спектрометрический анализ. Культуру (15 мл) осаждали и трижды отмывали от среды деионизированной водой центрифугированием. Осадки клеток суспендировали в 1 мл ацетона (ос.ч., -20°C), трижды отмывали ацетоном и сушили на воздухе при комнатной температуре до полного испарения ацетона. Сухие клетки суспендировали в 130–200 мкл 2%-ного лаурилсульфата натрия и инкубировали 20 мин при 95°C с последующим центрифугированием (20000 g, 20 мин, 4°C). Подготовку проб полученных экстрактов клеток для нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии (нано-ВЭЖХ) проводили по методу, изложенному ранее [11]. Нано-ВЭЖХ и последующую времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS/MS) проводили, как указано ранее [12] с помощью масс-анализатора 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, США). Масс-спектры анализировали с помощью внутренних баз данных, используя пакеты программ Scaffold (Proteome Software, Inc., США) и Sequest [13]. Коды доступа AC (accession code) идентифицированных ферментов соответствуют базе данных белков UniProt (<https://www.uniprot.org>).

Статистический анализ. Статистический анализ данных проводили с помощью программы Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Данные представлены как «среднее \pm стандартное отклонение» по результатам из трех 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).

Результаты и обсуждение

Для активации дыхательного метаболизма *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 культивировали при интенсивной аэрации в присутствии гемина и витамина K_2 как источника менахинона (таблица). Контролем служила аэробная культура, выращенная без гемина и менахинона. Добавление в среду гемина или менахинона по отдельности не оказывало существенного влияния на ОП культуры по истечении 24 ч. Однако совместное их внесение в среду (дыхательные условия) приводило к увеличению ОП суточной культуры на 30% по сравнению с контролем (аэробные условия). В аэробных условиях выход биомассы составлял $2,26 \pm 0,01$ г сухих клеток/л, а в дыхательных – $2,86 \pm 0,05$ г сухих клеток/л ($p < 0,05$), или на 27% больше. В дыхательных условиях клетки полностью потребляли глюкозу по истечении 24 ч, тогда как в аэробных условиях остаточное содержание глюкозы в среде составляло $14,7 \pm 0,5$ ммоль/л, или около 10% от исходной концентрации. В этой связи значения

молярных экономических коэффициентов $Y_{P/S}$ определяли как количество сухой биомассы клеток, образованное на 1 моль использованной глюкозы после 18 ч культивирования. При этом в аэробных условиях оставалось около 25% от исходного содержания глюкозы в среде, а в дыхательных условиях – около 15%. Величины $Y_{P/S}$ составляли $20,1 \pm 1,0$ и $25,6 \pm 1,5$ г сухой биомассы/моль использованной глюкозы ($p < 0,05$) для клеток, выращенных в аэробных и дыхательных условиях соответственно. Таким образом, при культивировании *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в дыхательных условиях значение $Y_{P/S}$ превышало на 27% этот показатель для аэробных условий в отсутствие гемина и менахинона. Более эффективное использование глюкозы лактобациллой, выращенной в присутствии гемина и менахинона, очевидно, связано с получением клетками дополнительной энергии за счет окислительного фосфорилирования в ЭТЦ. Повышение выхода биомассы и урожая клеток в дыхательных условиях по сравнению с аэробными условиями наблюдали ранее в контролируемой периодической культуре *L. casei* N87 [5].

Таблица

Рост *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 в аэробных и дыхательных условиях культивирования

Условия культивирования	ОП, 0 ч	ОП, 24 ч	pH, 24 ч
А: Контроль	$0,26 \pm 0,08$	$4,49 \pm 0,22$	$4,02 \pm 0,16$
А: Гемин	$0,26 \pm 0,06$	$4,55 \pm 0,19$	$4,03 \pm 0,13$
А: Менахинон	$0,28 \pm 0,06$	$4,71 \pm 0,21$	$3,94 \pm 0,12$
Д: Гемин + Менахинон	$0,28 \pm 0,08$	$5,84 \pm 0,15^*$	$4,25 \pm 0,03^{**}$

Примечания: А – аэробные условия; Д – дыхательные условия; ОП – оптическая плотность; * – статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$; ** – статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$.

В дыхательных условиях значение pH культуральной жидкости по истечении 24 ч культивирования *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 было несколько выше по сравнению с аэробными условиями (таблица). Такой же эффект наблюдали в случае *Lactobacillus reuteri* FUA3168, *Lb. reuteri* DSM20016 и *Levilactobacillus spicheri* FUA3125 [14]. При этом в дыхательных условиях указанные культуры образовывали меньше лактата и ацетата, чем при росте в аэробных условиях на среде с менахиноном. Такое изменение pH, 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 пошел на образование лактата, вместе с НАДН, полученным в результате активности Pdh, может впоследствии окисляться в ЭТЦ. В пользу этой гипотезы свиде-

тельствует тот факт, что ингибирование Ldh оксидом натрия при росте *Lc. lactis* IL1403 в дыхательных условиях сопровождалось стимуляцией аэробного дыхания и повышением выхода биомассы [4]. Снижение активности Ldh и повышение выхода биомассы наблюдали также у *L. casei* N87 при переходе от аэробных к дыхательным условиям в контролируемой периодической культуре с 30%-ным насыщением кислородом [5]. Напротив, по данным протеомного анализа уровень компонента E3 Pdh у *L. casei* N87 был выше в дыхательных условиях по сравнению с аэробными [7]. Повышение уровня экспрессии генов *pdh* в дыхательных условиях по сравнению с аэробными показано у *L. rhamnosus* N132 [14].

Компоненты ЭТЦ *L. rhamnosus* КМ МГУ 529 исследовали с помощью спектрального анализа и масс-спектрометрии. На рис. 1 приведены разностные спектры поглощения препаратов мембран, выделенных из клеток конца логарифмической фазы роста, выращенных аэробно в присутствии гемина. Известно, что в этих условиях уровень экспрессии гена *cydA*, кодирующего субъединицу I хинолоксидазы *bd*, был максимальным у *Lv. spicheri* LP38, *L. rhamnosus* N132 и *L. casei* N87 [5, 14]. 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 к аналогичным значениям для очищенного цитохромного комплекса *bd* из *Bacillus stereothermophilus* [15], что свидетельствует в пользу присутствия хинолоксидазы *bd*-типа в мембранах *L. rhamnosus* КМ МГУ 529. Препараты мембран штамма КМ МГУ 529 окисляли донор электронов для хинолоксидазы (ДТТ/дурохинон) с высокой скоростью – $256,4 \pm 19,7$ нмоль O_2 /мин \times мг белка.

НАДН-оксидазную активность мембран изучали на препаратах из клеток, выращенных аэробно в присутствии гемина. Мембраны окисляли 1 мМ НАДН со скоростью $89,4 \pm 5,1$ нмоль O_2 /мин \times мг белка. Последующее внесение в реакционную смесь витамина K_2 в концентрации 0,2 мМ сопровождалось существенным увеличением скорости потребления кислорода мембранами, которая составляла $411,9 \pm 24,8$ нмоль O_2 /мин \times мг белка. НАДН-оксидазную активность мембран в присутствии витамина K_2 подавлял цианид ($K_i = 6,2 \pm 0,2$ мМ). По всей вероятности, экзогенный менахинон переносит электроны от НАДН-дегидрогеназы к хинолоксидазе *bd*, которая, в свою очередь, непосредственно восстанавливает кислород.

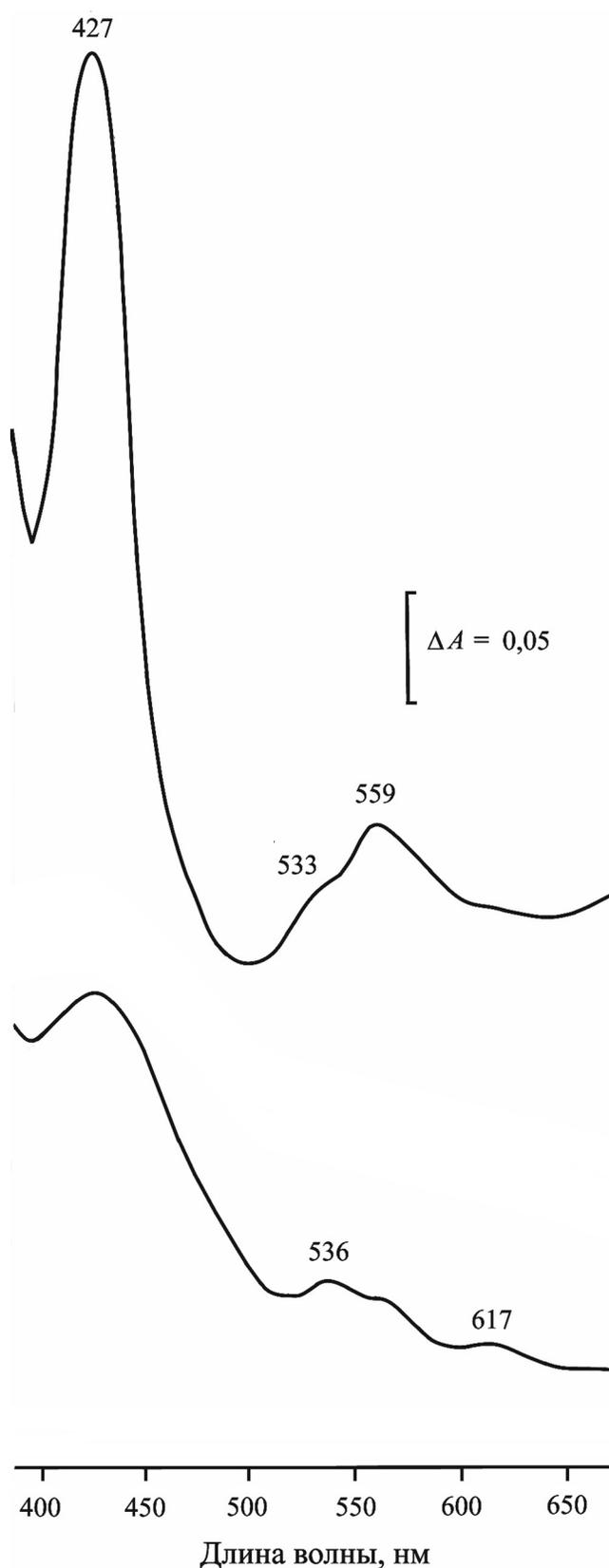


Рис. 1. Разностные спектры поглощения (восстановление дитионитом натрия минус окисление персульфатом аммония) мембранных фракций из *L. rhamnosus* КМ МГУ 529, выращенной в присутствии гемина. Нижний спектр – неполное восстановление цитохромов *b*-типа, верхний – полное восстановление. Мембраны суспендированы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

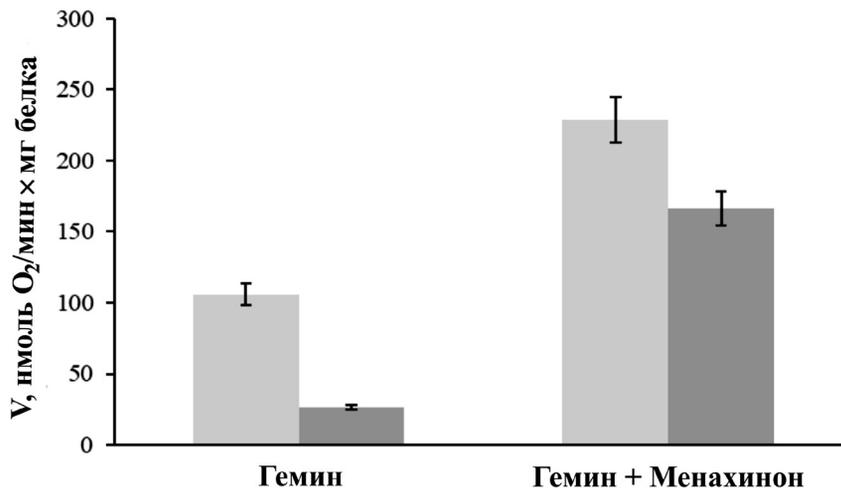


Рис. 2. Потребление кислорода целыми клетками *L. rhamnosus* KM МГУ 529 в присутствии глюкозы. Среда культивирования содержала гемин или гемин + менахинон; потребление кислорода отмытыми от среды клетками обозначено светлым цветом, а клетками после хранения при 0°C в течение суток — темным цветом. Реакционные смеси содержали 0,3–0,5 мг белка/мл.

Ферменты, участвующие в окислении мембранами НАДН, были идентифицированы с помощью MALDI-TOF тандемной масс-спектрометрии: пиридиннуклеотид-дисульфид-оксидоредуктаза (АС С2K0С6, ген *nox-2*, 40,6% сходства); НАДН-дегидрогеназа 2 (АС F3MUB2, ген *AAULR_18781* (*ndh-2*), 41,6% сходства) и субъединица I убинолоксидазы *bd* (АС A0A249N3D0, ген *N507_0943* (*cydA*), 18% сходства). *Nox-2* переносит электроны и протоны от НАДН непосредственно на кислород с образованием воды [16]. *Ndh-2* передает электроны и протоны от НАДН на хинон, который затем окисляется хинолоксидазой *bd*-типа с образованием протондвижущей силы [17]. Добавление менахинона в реакционную смесь сопровождалось увеличением скорости окисления мембранами НАДН в 4,6 раза. Из соотношения скоростей следует заключить, что при этом 80% транспорта электронов от НАДН к кислороду шло через *Ndh-2*, менахинон и хинолоксидазу и только 20% — через *Nox-2*.

Результаты изучения влияния дыхательного метаболизма на потребление *L. rhamnosus* KM МГУ 529 кислорода в присутствии глюкозы приведены на рис. 2. Целые клетки штамма KM МГУ 529, выращенные аэробно на среде с гемом, активно потребляли кислород в присутствии глюкозы. Внесение в ростовую среду менахинона сопровождалось двукратным увеличением скорости окисления клетками глюкозы, что, очевидно, является результатом встраивания менахинона в ЭТЦ и переноса им электронов от *Ndh-2* к хинолоксидазе *bd*-типа. После хранения клеточных суспензий при 0°C в течение 24 ч скорость окисления глюкозы снижалась на 75% у клеток из среды с гемом и лишь на 30% у клеток из среды с гемом и менахиноном. Таким образом, выращенные в дыхательных условиях клетки лактобациллы способны дольше сохранять метаболитическую

активность по отношению к глюкозе по сравнению с аэробными клетками, выращенными на среде с гемом. Интересно, что клетки *Lc. lactis* IL1403 с активированным дыхательным метаболизмом оставались жизнеспособными после хранения при 4°C в течение нескольких месяцев, тогда как клетки с бродительным метаболизмом — менее 20 сут [10].

Таким образом, в работе приведены экспериментальные свидетельства в пользу функционирования ЭТЦ у гомоферментативной МКБ *L. rhamnosus* KM МГУ 529 при аэробном культивировании в присутствии гема и менахинона. Показано, что в мембранах из клеток, выращенных аэробно на среде с гемом, 80% транспорта электронов от НАДН к кислороду идет через ЭТЦ при наличии экзогенного менахинона. Клетки *L. rhamnosus* KM МГУ 529 с активированным дыхательным метаболизмом более эффективно использовали глюкозу и дольше сохраняли метаболитическую активность по сравнению с клетками, выращенными в аэробных условиях. Всестороннее изучение дыхательного метаболизма МКБ создает перспективы для повышения выхода биомассы пробиотических культур, отличающихся высокой устойчивостью к окислительным стрессам, замораживанию, лиофильной сушке и длительному хранению, не прибегая при этом к методам генетической инженерии.

Исследование выполнено в рамках госзадания по теме кафедры микробиологии МГУ «Физиология и биохимия фототрофных и хемотрофных микроорганизмов» (№ 121032300094-7). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B., Morelli L., Canani R.B., Flint H.J., Salminen S., Calder P.C., Sanders M.E. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014. Vol. 11. N 8. P. 506–514.
2. Moslem P., Hossein N., Mahdi R., Seyed N.H., Seyed A.S. *Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (GG): a top well-researched probiotic strain // J. Med. Microbiol. 2017. Vol. 5. N 5–6. P. 46–59.
3. Pedersen M.B., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M.A., Gruss A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2012. Vol. 3. P. 37–58.
4. Arioli S., Zambelli D., Guglielmetti S., De Noni I., Pedersen M.B., Pedersen P.D., Dal Bello F., Mora D. Increasing the heme-dependent respiratory efficiency of *Lactococcus lactis* by inhibition of lactate dehydrogenase // Appl. Environ. Microbiol. 2013. Vol. 79. N 1. P. 376–380.
5. Ianniello R.G., Zotta T., Matera A., Genovese F., Parente E., Ricciardi A. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87 // PLoS One. 2016. Vol. 11. N 11: e0164065.
6. Zotta T., Parente E., Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry // J. Appl. Microbiol. 2017. Vol. 122. N 4. P. 857–869.
7. Siciliano R.A. Pannella G., Lippolis R., Ricciardi A., Mazzeo M. F., Zotta T. Impact of aerobic and respirative life-style on *Lactobacillus casei* N87 proteome // Int. J. Food Microbiol. 2019. Vol. 298. P. 51–62.
8. Johanson A., Goel A., Olsson L., Franzén C.J. Respiratory physiology of *Lactococcus lactis* in chemostat cultures and its effect on cellular robustness in frozen and freeze-dried starter cultures // Appl. Environ. Microbiol. 2020. Vol. 86. N 6: e02785–19.
9. Klimko A.I., Cherdyntseva T.A., Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. *In vitro* evaluation of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2020. Vol. 12. N 3. P. 1139–1148.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
11. Teteneva N.A., Mart'yanov S.V., Esteban-López M., Kahnt J., Glatter T., Netrusov A.I., Plakunov V.K., Sourjik V. Multiple drug-induced stress responses inhibit formation of *Escherichia coli* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2020. Vol. 86. N 21: e01113–20.
12. Wagner T., Wegner C.E., Kahnt J., Ermler U., Shima S. Phylogenetic and structural comparisons of the three types of methyl coenzyme M reductase from *Methanococcales* and *Methanobacteriales* // J. Bacteriol. 2017. Vol. 199. N 16: e00197–17.
13. Eng J.K., McCormack A.L., Yates J.R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994. Vol. 5. N 11. P. 976–989.
14. Ianniello R.G., Zheng J., Zotta T., Ricciardi A., Gänzle M.G. Biochemical analysis of respiratory metabolism in the heterofermentative *Lactobacillus spicheri* and *Lactobacillus reuteri* // J. Appl. Microbiol. 2015. Vol. 119. N 3. P. 763–775.
15. Sakamoto J., Koga E., Mizuta T., Sato C., Noguchi S., Sone N. Gene structure and quinol oxidase activity of a cytochrome *bd*-type oxidase from *Bacillus stearothermophilus* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1411. N 1. P. 147–158.
16. Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N. Biomarkers and utility of the antioxidant potential of probiotic lactobacilli and bifidobacteria as representatives of the human gut microbiota // Biomedicines 2021, Vol. 9. N 10: e1340.
17. Marreiros B.C., Sena F.V., Sousa F.M., Batista A.P., Manuela M. Pereira M.M. Type II NADH: quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences // Environ. Microbiol. 2016. Vol. 18. N 12. P. 4697–4709.

Поступила в редакцию 16.05.2022

После доработки 21.07.2022

Принята в печать 25.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Vitamin K₂ mediates electron transport from NADH dehydrogenase 2 to *bd*-type quinol oxidase in *Lacticaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529

T.Y. Dinarieva^{1,*,§} , A.I. Klimko^{1,§} , T.A. Cherdyntseva¹ ,
A.L. Bryukhanov¹ , A.I. Netrusov^{1,2} 

¹Department of Microbiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Faculty of Biology and Biotechnology, High School of Economics, Mjasnitskaja 20, Moscow, 101000, Russia

*e-mail: dinarieva@mail.ru

§contributed equally

To activate respiratory metabolism *Lacticaseibacillus rhamnosus* CM MSU 529 was grown in a batch culture under intensive aeration in the presence of 38 μM hemin and 18 μM vitamin K₂ as a source of menaquinone. Unsupplemented aerobic culture served as a control. Supplementation of the growth medium with hemin or menaquinone separately had no significant effect on culture growth. Biomass concentration of 2,86 ± 0,05 g dw cells/l and the

yield coefficient for biomass $Y_{P/S}$ of $25,6 \pm 1,5$ g dw cells/mol glucose consumed were determined after 24 h and 18 h of cultivation under respiratory conditions (hemin + K_2) respectively. Both values were 27% higher compared to those for aerobic conditions. Spectral analysis revealed the presence of cytochromes *b*- and *d*-type in membranes of *L. rhamnosus* CM MSU 529. The activity of bacterial electron transport chain was investigated by polarographic technique. Membrane preparations obtained from cells grown aerobically on hemin-containing medium intensively consumed oxygen in the presence of 1 mM NADH. Addition of 0.2 mM menaquinone to reaction mixture caused the increase of NADH oxidation rate by 4.6 fold. Enzymes presumably involved in NADH oxidation by membranes were identified using MALDI-TOF MS/MS: pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase (Nox-2), NADH dehydrogenase 2 (Ndh-2), and ubiquinol oxidase *bd* subunit I (CydA). Thus, during NADH oxidation 80% of electron transport from NADH to oxygen went via Ndh-2, menaquinone, *bd*-type quinol oxidase and only 20% – via Nox-2. The study presents experimental evidence for electron transport chain functioning in *L. rhamnosus* CM MSU 529 during aerobic cultivation with hemin and menaquinone. The NADH oxidation rates of membrane preparations of lactic acid bacteria were measured for the first time. The property of exogenous menaquinone to transfer electrons from Ndh-2 to *bd*-type quinol oxidase was demonstrated for the first time *in vitro* in lactic acid bacteria.

Keywords: *lactic acid bacteria, Lacticaseibacillus rhamnosus, respiration, electron-transport chain, NADH dehydrogenase 2, quinol oxidase bd, Nox-2*

Funding: The study was performed within the framework of the state task on the topic of the Department of Microbiology of MSU “Physiology and Biochemistry of Phototrophic and Chemotrophic Microorganisms” (project number 121032300094-7).

Сведения об авторах

Динариева Татьяна Юрьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: dinarieva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9081-0688>

Климко Алена Игоревна – аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: alenaklimko221@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6188-6525>

Чердынцева Татьяна Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-63; e-mail: taniacherd@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8764-0200>

Брюханов Андрей Леонидович – канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: brjuchanov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1807-297X>

Нетрусов Александр Иванович – докт. биол. наук, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-83; e-mail: anetrusov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2803-3037>