

УДК 577.151.52.547.442

Л.Н. КОТОВА, В.М. СЕРЕБРЕННИКОВ, А.В. ГЛАЗУНОВ*

ФГУП “Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов” (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: glasunov@genetika.ru

Роль гетерогенности популяции и фактора pH в природном явлении сверхсинтеза α -ацетолактата у продуцента диацетила *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* B2103/74

Исследовали влияние факторов гетерогенности популяции и pH среды на обнаруженный нами эффект сверхсинтеза α -ацетолактата (АЛ) в культуре *L. lactis* bv. *diacetylactis* B2103/74. Природа ферментной системы, ответственной за этот эффект, способной существенно блокировать лактатдегидрогеназу (ЛДГ), перехватывая у нее до 80% NADH, и обозначенная нами как гемин-независимая электронпереносящая система (ГЕМНЭПС) неизвестна. Показано, что проявление эффекта маскировалось гетерогенностью культуры, причем особенно сильно в области околонейтральных значений pH 6,1 — 6,5. Установлено присутствие в популяции по меньшей мере трех типов диссоциантов, различавшихся по уровню активности ГЕМНЭПС и соответственно синтеза АЛ: активный диссоциант (накопление АЛ до 30 мМ), утративший ГЕМНЭПС неактивный диссоциант (АЛ не более 3 мМ) и диссоциант с промежуточной активностью (АЛ 15—17 мМ). Показано, что первостепенное значение в складывающейся общей картине метаболизма пирувата при разных pH и, в конечном итоге, в явлении сверхсинтеза имела активность ГЕМНЭПС при том или ином значении pH. Так, при pH 7,0 в силу низкой активности ГЕМНЭПС эффект сверхсинтеза не наблюдался и метаболизм пирувата протекал по гомомолочному типу. Однако в области pH 5,3—6,5 активность ГЕМНЭПС была настолько высокой, что это позволило ей взять на себя функцию главного регулятора окислительно-восстановительного баланса NAD⁺/NADH и отвести ЛДГ минорную роль. Продуктивность ЛДГ- и ацетолактатсинтазного путей зависела от активности ГЕМНЭПС при том или ином pH, а продуктивность пируватдегидрогеназного пути — непосредственно от внешнего pH. Последняя была относительно высока в околонейтральной области (pH 6,0—6,5) и заметно снижена в нейтральной (pH 7,0) и в слабокислой (pH \leq 6,0) зоне.

Ключевые слова: ацетонин, α -ацетолактат, диацетил, диссоцианты, молочнокислые бактерии.

Молочнокислые бактерии (МКБ) *Lactococcus lactis*, принадлежащие к биоварианту *diacetylactis*, относятся к достаточно редкой и ценной в практическом отношении группе микроорганиз-

мов из-за способности к образованию диацетила (Дц), имеющего первостепенное значение в формировании аромата молочных продуктов. α -Ацетолактат является у МКБ прямым предшественни-

Котова Любовь Николаевна, Серебрянников Владимир Михайлович, Глазунов Александр Викторович.

Список сокращений: АД — активный диссоциант; АК — аминокислоты; АЛ — α -ацетолактат; АЛДК — α -ацетолактатдекарбоксилаза; АЛС — α -ацетолактатсинтаза; ати — избыточные атмосферы; Ац — ацетонин; ГЕМНЭПС — гемин-независимая электронпереносящая система; ГМС — глубина метаболического сдвига; Дц — диацетил; ДЭ — дрожжевой экстракт; КЖ — культуральная жидкость; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; МКБ — молочнокислые бактерии; НД — неактивный диссоциант; НОК — NADH-оксидаза; ОП — оптическая плотность; ПАД — диссоциант с промежуточной активностью; ПДГ — пируватдегидрогеназа; СГ — степень гомомолочности.

* Автор для переписки.

ком ароматобразующих соединений — Дц и ацетона (Ац). Попадая из клетки в среду, АЛ спонтанно и быстро декарбоксилируется с образованием Ац и Дц, соотношение которых зависит от окислительно-восстановительного потенциала и кислотности среды [1]. Предшественником АЛ является пируват, из двух молекул которого он образуется при участии АЛС; далее под действием АЛДК он превращается в Ац и в форме этого соединения выводится в среду (рис.1). Это наиболее распространенный среди ароматобразующих лактококков ацетоиновый тип обмена без сопутствующего образования Дц. Для формирования Дц необходимо, чтобы АЛ попал в окружающую среду, а этому препятствует АЛДК. Тем не менее, в природе встречается более редкий тип лактококка, обозначаемый как биовариант *diacetylactis*, который, хотя и обладает активной АЛДК, но, в отличие от ацетоиновых культур, способен к небольшой утечке АЛ из клетки в среду. Поэтому наряду с Ац в таких культурах образуется и небольшое количество Дц. Полная реализация Дц-образующей способности возможна у лактококков в отсутствие АЛДК.

Культура с такой замечательной особенностью, обнаружена нами в коллекции ВКПМ и охарактеризована как природный мутант, лишенный активности АЛДК, т.е. как штамм-продуцент АЛ [2]. Поскольку потенциал данной культуры в отношении синтеза АЛ оставался неизвестным, были проведены всесторонние исследования по влиянию разных факторов на пути превращения пирувата в конечные продукты, одним из которых является АЛ [3, 4]. Обнаружено, что эта культура помимо отсутствия АЛДК обладает еще одной уникальной особенностью — способностью к сверхсинтезу АЛ. В литературе нет сведений о природном эффекте сверхсинтеза АЛ в культурах МКБ.

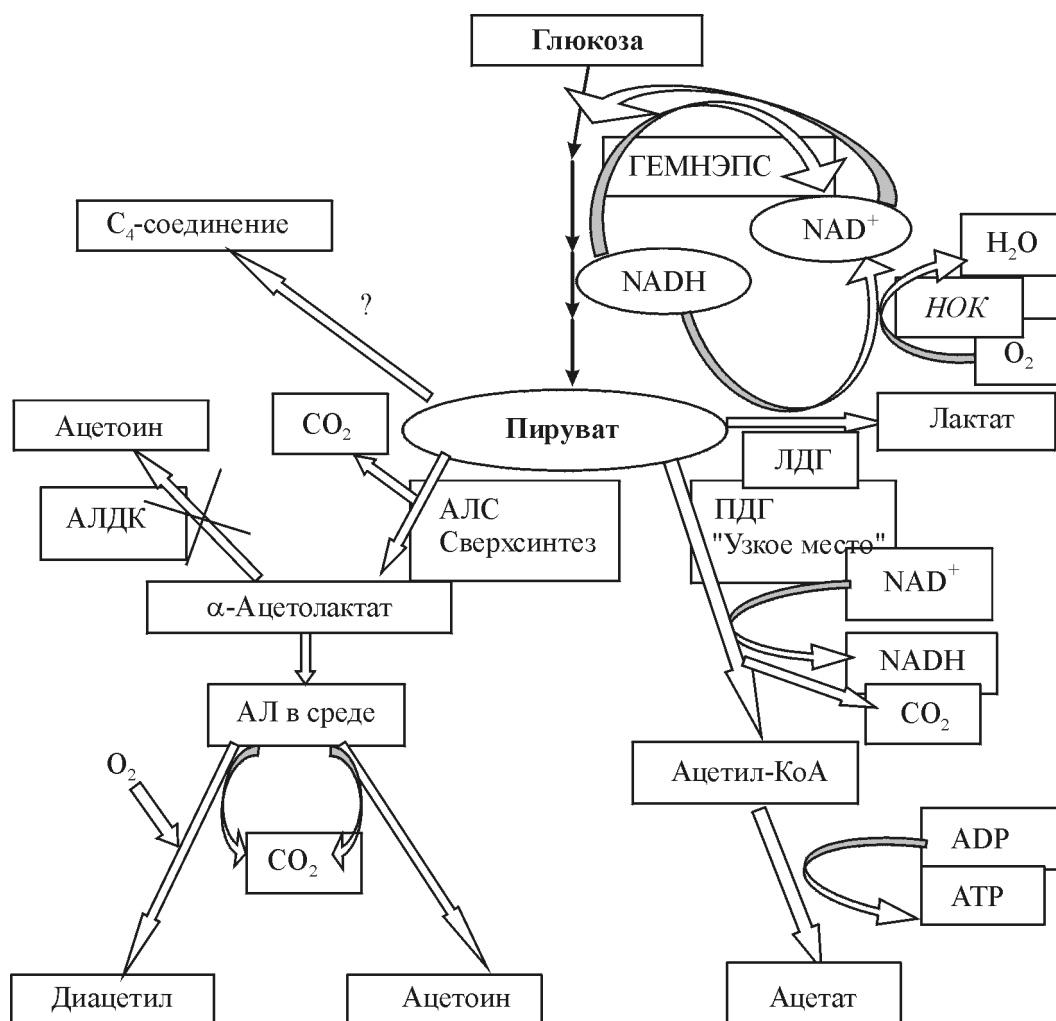


Рис. 1. Пути метаболизма пирувата и сверхсинтез АЛ в условиях интенсивной аэрации в культуре *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* B2103/74. Перечеркнут путь превращения АЛ в Ац, который неактивен у исследуемого микроорганизма

У лактококков пируват — конечный продукт энергетического метаболизма. Основной путь дальнейшего превращения — образование лактата, составляющего не менее 80% от суммы конечных продуктов обмена пирувата. У МКБ реакция восстановления пирувата при участии ЛДГ выполняет важнейшую физиологическую функцию — регенерацию NAD^+ , принимая на себя поток электронов в форме NADH , высвобождающихся в ходе катаболизма сахаров.

Хорошо известно, что у МКБ поступление O_2 в среду вызывает сдвиг метаболизма пирувата, в сторону минорных АЛС и ПДГ-путей (осуществляемых с помощью АЛС, ПДГ). Сдвиг вызывается оттоком NADH от ЛДГ в индуцируемую O_2 оксидазную реакцию, физиологическое назначение которой — защита клетки от окислительного стресса [5, 6]. NADH -оксидаза (НОК) нейтрализует O_2 , восстанавливая его до H_2O (НОК1) или до H_2O_2 (НОК2). Поток пирувата через ЛДГ-реакцию сокращается, а по минорным путям — нарастает. Таким образом, в условиях аэрации инициируется дополнительный к ЛДГ-реакции оксидатный путь регенерации NAD^+ . Глубина метаболического сдвига (ГМС) будет, очевидно, зависеть от активности НОК.

В культуре 2103/74 НОК является конститутивным ферментом, активность которого в отсутствие O_2 очень низка; она возрастает в 10—20 раз при поступлении O_2 в среду [4]. При мягкой/умеренной аэрации ($K_L a \leq 25 \text{ ч}^{-1}$) единственным фактором, ограничивающим ЛДГ по NADH , была НОК, которая, как и у других исследованных лактококков биоварианта *diacetylactis*, обуславливала невысокую ГМС [4]. Концентрация АЛ (косвенный показатель ГМС) не превышала 5—6 мМ. Однако в режиме активной аэрации ($K_L a = 60 \text{ ч}^{-1}$) в отличие от других проверенных биовариантов *diacetylactis*, ГМС в культуре 2103/74 многократно возрастала и синтез АЛ наблюдали на уровне 25—28 мМ. Это явление, ранее неизвестное, мы обозначили как эффект сверхсинтеза АЛ [4]. Ему сопутствовала очень низкая степень гомомолочности, т.е. сверхсинтез был связан с гораздо более сильным ограничением продуктивности ЛДГ-пути, чем это можно было ожидать от НОК. Поток высвободившегося пирувата перетекал исключительно в сторону реакции, катализируемой АЛС. Нижняя граница сверхсинтеза соответствовала 15 мМ, а верхняя — 30 мМ. Значительное переключение части потока NADH (до 70—90% пула) от ЛДГ-реакции на альтернативный путь окисления было связано не с НОК (активность которой

была слишком низка для этого), а с оксидазой неизвестной природы, обозначенной нами как гемин-независимая электрон-перехватывающая система (ГЕМНЭПС) [4]. В составе этой оксидазы нет цитохрома, поскольку источник гема, гемин, в среде отсутствовал. Возможно, эта система представляет собой фрагмент простейшей электротранспортной цепи, встроенной в мембрану [7].

Сильное снижение СГ и сопутствующий этому сверхсинтез АЛ можно объяснить только резким ограничением скорости реакции ЛДГ (физиологически основной путь регенерации NAD^+ в МКБ) из-за оттока значительной части NADH в сторону второго независимого пути регенерации NAD^+ — через ГЕМНЭПС. Степень сдвига потока NADH в направлении второго пути, а значит и величина сверхсинтеза будут, очевидно, зависеть от активности ГЕМНЭПС.

Наши исследования заключались в том, чтобы установить влияние на сверхсинтез внешних условий, в первую очередь, внешнего pH. Можно было полагать, что первостепенное значение в явлении сверхсинтеза при том или ином значении pH должна иметь активность ГЕМНЭПС при этих pH.

Но как оценить активность этой оксидазы? Поскольку в результате вызванного ее действием сокращения продуктивности ЛДГ-пути высвободившийся пируват конвертировался главным образом в АЛ, мы приняли количество образующегося АЛ за косвенный интегральный показатель активности этой ферментной системы. Образование АЛ на уровне сверхсинтеза (15—30 мМ) считали проявлением высокой активности ГЕМНЭПС; ниже 15 мМ — низкой активности, а на уровне 3 мМ (продуктивность утратившего ГЕМНЭПС диссоцианта [4]) — отсутствия активности.

Гетерогенность популяции 2103/74 сильно осложнила проведение этих исследований [4, 8]. Этот фактор не только отразился на воспроизводимости общей картины потоков пирувата при разных pH, но также препятствовал верной оценке роли pH в проявлении эффекта сверхсинтеза. Чтобы оценить негативный вклад фактора гетерогенности в результаты исследований, в работе приведены данные, полученные с использованием как гетерогенной популяции 2103/74, так и гомогенных популяций: активного диссоцианта (АД-1, АЛ=30 мМ), неактивного диссоцианта (НД, АЛ=3 мМ) и диссоцианта с промежуточной активностью (ПАД-15; АЛ = 15—17 мМ).

Итак, целью настоящей работы было выяснение влияния внешнего pH на сверхсинтез АЛ.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Среды, штамм, диссоцианты и условия культивирования. Минеральной основой среды служил солевой раствор следующего состава, г/л: KN_2PO_4 — 2; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 (использовали 20%-ный раствор с плотностью 1,176 г/см³ (20°); 0,9 мл на 1 л среды); $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,05. Все соли были отечественного производства квалификации «ч.д.а.».

Основная среда ТДЭС-2 включала следующие компоненты, г/л: триптон (BD, США) или в отдельных экспериментах бактопептон (BD) — 15; ДЭ — 5; глюкозу отечественного производства квалификации «ч» — 10 и солевой раствор (см. предыдущий абзац). Солевой раствор вместе с глюкозой стерилизовали отдельно от пептона и ДЭ при 0,8 атм 30 мин. Среда ТС-2 имела тот же состав, что и основная, но не содержала ДЭ. Среда ТДЭС-15 (посевная) имела тот же состав, что и основная, за исключением измененных концентраций, г/л, глюкозы — 8 и KN_2PO_4 — 15, а также pH — 7,0. Среда ТС-20 была аналогична по составу ТС-2 за исключением того, что содержала KN_2PO_4 в концентрации 20 г/л и имела pH 7,0.

Объектом исследования служили гетерогенная популяция штамма *L. lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* В 2103/74 [3], активный диссоциант АД-1, диссоциант с промежуточной активностью ПАД-15 (полуактивный) и утративший способность к сверхсинтезу неактивный диссоциант (НД) 2103/74-Д с уровнем образования АЛ не выше 3 мМ [4]. Отбор высокоактивных по АЛ вариантов проводили путем рассева серийных 10-кратных разведений культуры штамма 2103/74 (выращенной на среде ТДЭС-15 в стационарных условиях) на плотную среду Кемплера [9]. Отдельные крупные колонии синего цвета (всего 30) переносили сначала в пробирки емкостью 50 мл с 20 мл ТДЭС-15. Выращивание проводили в течение ночи при 30° в стационарных условиях. После второго пассажа на той же среде активность синтеза АЛ проверяли путем культивирования в течение ночи на качалке при 220 об/мин в колбах на 250 мл с 50 мл среды ТС-20 при 30°. Практически все клоны полностью потребляли глюкозу и демонстрировали хороший рост (ОП = 4,8—6,2). Более половины клонов показали активность на уровне сверхсинтеза (содержание АЛ ≥ 15 мМ), из которых только два достигли предельно высоких значений — более 30 мМ (АД-1 и АД-14, соответственно 31 и 34 мМ). Для дальнейших исследований использовали активный диссоциант АД-1, поскольку АД-14 был неспособен к полному потреб-

лению глюкозы на среде ТС-2 при интенсивной аэрации. Диссоциант ПАД-15 показал на среде ТС-20 низкую активность (накопление АЛ 4 мМ), но хороший рост и исчерпывающее потребление глюкозы. Однако предварительные испытания варианта ПАД-15 показали, что при культивировании в ферментере на среде ТДЭС-2 при pH 6,0 его продуктивность по АЛ возрастала до 15 мМ, т.е. он был интересен как пример диссоцианта с промежуточной активностью (полуактивный диссоциант). Культуру 2103/74 и ее варианты АД-1, ПАД-15 и НД поддерживали на среде ТДЭС-15 и хранили при – 60°.

Эксперименты проводили в 2-литровом ферментере (Biostat B-DCU, Braun Biotech International, Германия) с объемом среды 1 л при 30°. Частота вращения мешалки и расход воздуха составляли 500 об/мин и 0,5 л/мин, соответственно. Постоянное значение pH поддерживали 3 М раствором КОН («Химмед», Россия). По сульфитному числу рассчитывали коэффициент объемного массопереноса O_2 ($K_L a$) для принятого расположения ярусов лопастей мешалки, который составил 120 ч⁻¹. Количество биомассы измеряли по величине светорассеивания при λ 540 нм (ФЭК КФК2, Россия). Инокулятом для ферментера служила 16-часовая культура, выращенная в статических условиях при 30° в 50 мл посевной среды.

Определение глюкозы и конечных продуктов метаболизма пирувата в КЖ. Глюкозу определяли на приборе BIOSENS line (EKF-diagnostics, Германия), АЛ и Ац — как изложено в [3]. Лактат анализировали согласно [4]; ацетат — [10], используя для этого ацетаткиназу (Sigma).

Степень гомомолочности (СГ) — долю углерода субстрата (глюкозы) в составе основного продукта, молочной кислоты — рассчитывали, как отношение содержания углерода лактата (мМ) и углерода глюкозы (мМ).

Все опыты повторяли не менее трех раз. Приведены графики типичных зависимостей, а также ошибки измерения среднего значения величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов с гетерогенной культурой штамма 2103/74 показали, что данные о распределении потоков пирувата по конечным продуктам и, в частности, уровень синтеза АЛ характеризовались плохой воспроизводимостью, что, как мы предположили, объяснялось гетерогенностью популяции. В табл. 1 представлена выборка данных из этих исследований. Для каждого значения pH приводятся два — минимальное и макси-

Минимальный и максимальный уровень синтеза АЛ и других конечных метаболитов на среде ТДЭС-2 в опытах с гетерогенной культурой штамма 2103/74

Номер варианта	рН	Концентрации метаболитов* в КЖ, мМ			С**, %
		АЛ	Лактат	Ацетат	
1	6,5	4,0	—	—	88,0
2		8,5	53,0	27,5	
3	6,1	9,5	44,5	33,0	88,0
4		16,5	36,0	27,0	87,0
5	5,4	5,5	82,5	12,5	96,0
6		25,0	28,5	23,5	93,0

* Ошибка среднего значения не превышает 10%.

** Показана доля углерода глюкозы, перешедшего из глюкозы через пируват в состав конечных метаболитов и CO₂.

мальное — значения продукции АЛ. При рН 6,5 эффект сверхсинтеза не наблюдали, и причина этого, как оказалось (см. ниже), была связана не с рН, а с гетерогенностью культуры. Особенно наглядно фактор гетерогенности проявился в одном из экспериментов при рН 5,4 (см. табл. 1, вариант 5 и 6). Опыт ставился параллельно в двух ферментерах (посевной материал готовился из одной замороженной партии), но продуктивность культуры оказалась совершенно разной. В околонейтральной среде (рН 6,0—6,2) сверхсинтез был редким событием и содержание АЛ не превышало 15—16 мМ; наоборот, в слабокислой зоне (5,25—5,6) наблюдалась относительно высокая воспроизводимость сверхсинтеза АЛ на уровне 18—21 мМ и в редких случаях — на уровне вариантов 5 и 6 (см. табл. 1).

При выращивании на среде ТС картина оказалась совершенно другой. Сверхсинтез не зависел от рН в проверенном диапазоне 5,3—6,6, хорошо воспроизводился в диапазоне концентраций 15—18 мМ и изредка выходил за верхнюю границу, достигая в максимуме 26 мМ.

Гомогенная популяция АД-1

Выделение и дальнейшая работа с АД-1 позволила снять проблему воспроизводимости и получить достоверные данные о роли рН в формировании общей картины метаболизма пирувата при интенсивной аэрации. Прежде всего, следует отметить очень низкую СГ (0,15—0,18) в широком диапазоне рН 5,3—6,5 (табл. 2, варианты 2—4), которая никогда не наблюдалась в гетерогенной куль-

туре 2103/74 даже при самом удачном соотношении активных и неактивных диссоциантов (см. табл. 1, вариант 6; СГ=0,26). Очень низкая СГ и сопутствующий высокий уровень сверхсинтеза АЛ (достигнута минимальная доступность NADH для ЛДГ-реакции) свидетельствуют о высокой активности ГЕМНЭПС при этих рН. По всей видимости, такая крайне низкая СГ является предельным ограничением лактатного пути, не нарушающим физиологическую норму культуры. В результате не менее 80% всего потока пирувата у варианта АД-1 направлялось на оставшиеся два пути (см. рис. 1), из которых ПДГ-путь является «узким местом» в системе метаболизма пирувата из-за характерной для МКБ низкой активности ПДГ-комплекса [4, 11, 12]. Всё вместе — мощная блокада ЛДГ и низкая пропускная способность ПДГ-пути — приводит к резкому подъему концентрации пирувата. Это является необходимым условием для достижения максимальной активности АЛС, или, другими словами, для сверхсинтеза АЛ в силу присущих данному ферменту кинетических особенностей: низкое сродство к пирувату и высокая положительная кооперативность [13]. Образно говоря, в случае, если метаболизм пирувата по всем другим путям существенно ограничен, АЛС играет роль аварийного клапана, сбрасывающего физиологически опасный для клетки накопившийся пируват.

В этих условиях верхняя планка сверхсинтеза определяется только пропускной способностью ПДГ-пути. Судя по содержанию ацетата (см. табл. 2, сравни варианты 2, 3 и 1, 4) наибольшая пропускная способность ПДГ-пути наблюда-

лась в околонеutralной области (pH 6,0—6,5), а наименьшая — при pH 5,3 и 7,0. Соответственно при pH 6,0—6,5 потоки пирувата распределялись между двумя путями в пропорции 1,5/1 (АЛС/ПДГ=АЛ/Ацетат=(25·2)/34), а при pH 5,3 — в пропорции 2,6/1 (АЛС/ПДГ=АЛ/Ацетат=(29·2)/22). Наиболее высокая концентрация АЛ в варианте 4 обусловлена, очевидно, более низкой активностью ПДГ-комплекса при pH 5,3 по сравнению с его активностью в околонеutralной области.

При pH 7,0 сверхсинтез АЛ не наблюдался. При этом, по-видимому, контроль ГЕМНЭПС над ЛДГ был в значительной степени утрачен, но полностью не исчез. Концентрация АЛ составила 8 мМ, тогда как в популяции, полностью утратившей этот путь окисления NADH (действует только НОК), соответствующая величина не поднималась выше 3 мМ (см. табл.2, варианты 1, 9 и 10).

Ранее было показано участие ДЭ при режиме умеренной аэрации в регуляции активности ПДГ- и пируватформиаглизного путей [3]. Исключе-

ние ДЭ из состава среды приводило к значительному снижению потока пирувата через эти пути. Высвободившийся пируват распределялся в пользу ЛДГ- и АЛС-путей, усиливая синтез АЛ приблизительно в два раза.

Такое же значительное снижение активности ПДГ-пути в ответ на исключение ДЭ наблюдалось и при интенсивной аэрации (см. табл.2, ацетат, варианты 5—8). Однако в этих условиях существенный вклад в общую картину распределения пула пирувата, по-видимому, вносила ГЕМНЭПС.

При pH 7,0 к высвободившемуся пирувату от ПДГ-пути (10 мМ, сравни ацетат в табл. 2, варианты 1 и 5) присоединился пируват (18 мМ) от резко сократившего свою продуктивность ЛДГ-пути (сравни лактат в табл. 2, варианты 1 и 5). Весь пируват распределился в пользу АЛС-реакции, подняв ее активность до уровня, обеспечивающего сверхсинтез АЛ. В результате при выращивании на среде ТС в отличие от ТДЭС диапазон сверхсинтеза расширился на всю область проверенных значений pH.

Таблица 2

Активность синтеза АЛ и других конечных метаболитов в зависимости от типа диссоциантов культуры 2103/74, состава и pH среды

№ варианта	Тип диссоцианта и среда культивирования	pH	Концентрация метаболитов* в КЖ, мМ				СГ	С***, %
			Лактат	Ацетат	АЛ	СО ₂ **		
1	АД-1 ТДЭС-2	7,0	65,0	20,0	8,0	28	0,59	93,0
2		6,5	16,0	35,0	25,2	60	0,15	92,0
3		6,0	17,0	34,0	25,0	59	0,16	92,0
4		5,3	20,0	22,0	29,0	61	0,18	94,0
5	АД-1 ТС-2	7,0	47,5	10,0	22,0	32	0,40	92,0
6		6,5	22,0	12,0	26,0	38	0,20	78,0
7		6,0	22,0	11,0	25,0	38	0,20	77,0
8		5,3	35,0	8,5	27,5	37	0,30	91,0
9	НД ТДЭС-2	6,5	84,5	12,5	3,1	16	0,77	94,0
10		5,4	88,0	8,0	2,9	11	0,80	93,0
11	ПАД-15 ТДЭС-2	6,0	55,0	20,0	16,2	36	0,50	97,0
12		6,0	60,5	4,0	7,2	11	0,55	72,0

* Ошибка среднего значения не превышает 10%.

** Расчетная величина.

*** Показана доля углерода глюкозы, перешедшего из глюкозы через пируват в состав конечных метаболитов и СО₂.

В диапазоне рН 6,0—6,5 сложилась неожиданная ситуация. ПДГ-путь, снизивший продуктивность в три раза, высвободил значительное количество пирувата (около 22 мМ) (сравни ацетат, см. табл. 2, варианты 2, 3 и 6, 7). Однако ЛДГ- и АЛС-пути, в пользу которых, как ожидалось, этот пируват должен распределиться, оказались практически закрыты. ЛДГ-путь был почти закрыт из-за высокой, как и на среде ТДЭС, активности ГЕМНЭПС; СГ увеличилась незначительно — с 0,16 до 0,22. АЛС-путь, судя по полученным данным, достиг предельной пропускной способности 25—27 мМ по АЛ (или в пируватном эквиваленте 50—54 мМ) и был полностью закрыт для «лишнего» пирувата (18 мМ). Если бы это было не так, ожидаемая планка сверхсинтеза АЛ достигла бы уровня 33—34 мМ, чего на самом деле не наблюдали (см. табл. 2, сравни варианты 2, 3 и 6, 7).

Таким образом, в условиях интенсивной аэрации исключение ДЭ из среды привело к значительному сокращению продуктивности ПДГ-пути и появлению «лишнего» пирувата (18 мМ), для которого традиционные пути его утилизации при рН 6,0—6,5 были закрыты. На вопрос, куда могли исчезнуть 18 мМ пирувата, ответ дали аномально низкие, меньше 80%, данные по балансу углерода глюкозы в конечных продуктах, объяснить которые могло только наличие в КЖ неучтенного продукта (концентрация пирувата была не выше 1—2 мМ). Если предположить, что неидентифицированный продукт является С₄-соединением, образующимся в эквимолярном «лишнему» пирувату количестве (18 мМ), то баланс углерода глюкозы оказывается близким к 100%.

При рН 5,3 вопрос утилизации «лишнего» пирувата (около 14 мМ), появившегося при сокращении продуктивности ПДГ-пути, решил за счет частично открывшегося ЛДГ-пути (см. табл. 2, сравни варианты 4 и 8 по лактату и ацетату; СГ увеличилась с 0,18 до 0,3). АЛС-путь оставался на пределе сверхсинтеза и был закрыт для дополнительного пирувата.

Гомогенная популяция неактивного диссоцианта

В отличие от клоновой популяции АД-1 для НД (см. табл. 2, варианты 9 и 10) были характерны высокая СГ и потеря способности к сверхсинтезу АЛ (концентрация не выше 3 мМ). Это является следствием, как мы считаем, полной утраты активности ГЕМНЭПС. Между тем, многократное усиление синтеза АЛ от 0,2—0,5 мМ в режиме мягкой/умеренной аэрации (данные не приведены) до

3,0 мМ в режиме интенсивной аэрации (см. табл. 2, варианты 9 и 10) можно отнести на счет активности НОК, сохранившейся в НД [4]. На основании этого можно сделать вывод, что в популяции АД-1 традиционная для лактококков НОК-активность и ГЕМНЭПС являются независимо действующими системами. Первая из них — конститутивная оксидаза, функционирующая во всем диапазоне аэрации с активностью, зависящей от скорости поступления О₂ в среду, а вторая активируется и действует только в условиях интенсивной аэрации и может быть популяцией утрачена [4].

Полуактивный диссоциант ПАД-15

Предельный уровень сверхсинтеза АЛ при росте ПАД на ТДЭС был не выше 15—16 мМ (см. табл. 2, вариант 11). Это говорит о частичной утрате вариантом активности ГЕМНЭПС. Суммарная доля углерода глюкозы в конечных продуктах при росте на ТДЭС была близкой к 100 %, тогда как на ТС (см. табл. 2, вариант 12) она была аномально низкой, около 72 %. Этот факт является дополнительным подтверждением присутствия в КЖ неучтенного продукта неизвестной природы. Обращает на себя внимание очень сильное снижение продуктивности ПДГ-пути у ПАД-15, которое было вызвано исключением ДЭ из среды. Эта величина оказалась в три раза ниже, чем и без того невысокая продуктивность у АД-1 в аналогичных условиях (см. табл. 2, сравни варианты 7 и 12 по ацетату). Однако значительное количество пирувата, высвободившееся в связи с сокращением продуктивности ПДГ-пути, не усилило синтез АЛ (АЛС-путь сократил продуктивность и был закрыт для избыточного пирувата), а, вероятно, трансформировалось с образованием неидентифицированного соединения.

Различия между АД-1 и ПАД-15 наблюдались не только на уровне путей пируватного обмена, но и на физиологическом уровне, отчетливо проявляясь при исключении ДЭ из среды. На ТДЭС кривые роста и потребления глюкозы у диссоциантов были практически одинаковыми (рис. 2, А). Оба варианта характеризовались бурной динамикой конструктивных процессов. Значения удельной скорости роста μ были сходными для АД-1 и ПАД-15 и очень высокими, (соответственно $0,73 \pm 0,07$ и $0,83 \pm 0,07$ ч⁻¹). Короткая лаг-фаза сменялась лог-фазой, продолжавшейся до 5 ч, после чего обе популяции вступали в фазу активного линейного роста вплоть до полного исчерпания глюкозы и перехода в стационарную фазу. ДЭ выступил как селективный фактор, исключение которого из среды разделило диссоцианты по скорос-

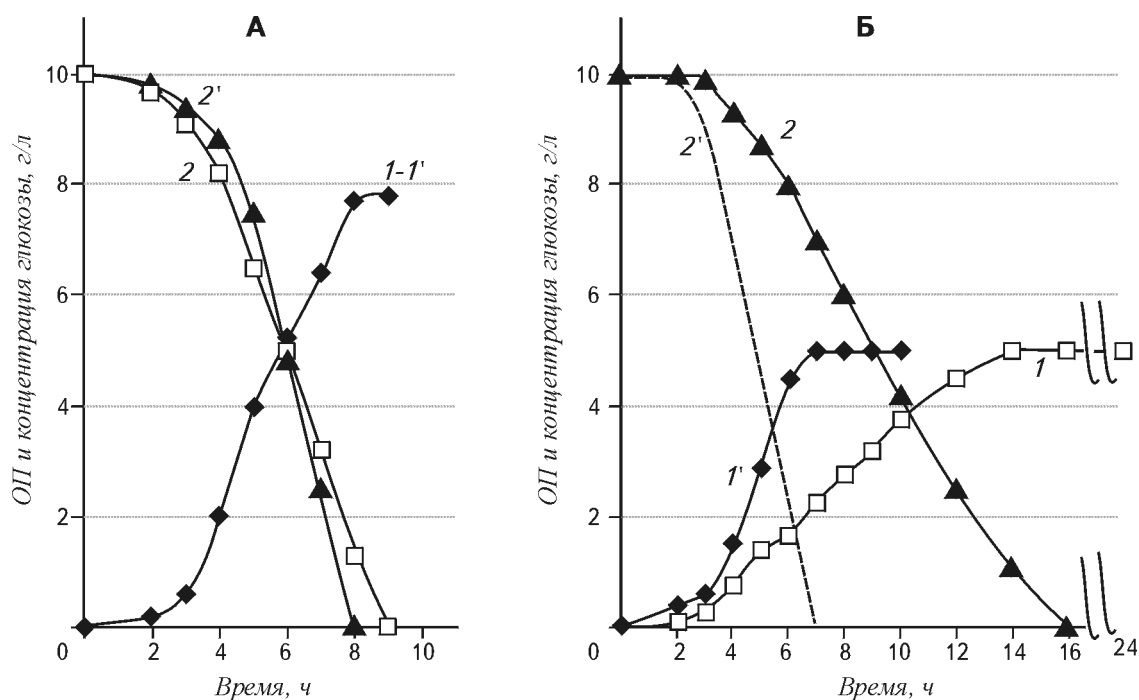


Рис. 2. Кривые роста и потребления глюкозы на среде с триптоном в присутствии (А) и в отсутствие (Б) дрожжевого экстракта (рН среды 5,4): 1 и 1' — ОП диссоциантов АД-1 и ПАД-15, соответственно; 2 и 2' — концентрация глюкозы в КЖ АД-1 и ПАД-15, соответственно

ти линейного роста. Очень короткая лог-фаза (μ у культур АД-1 и ПАД-15 были равны $0,58 \pm 0,05$ и $0,61 \pm 0,08 \text{ ч}^{-1}$, соответственно) сменялась линейным ростом с прежней, как и на ТДЭС, скоростью у ПАД и резко сниженной у АД (см. рис. 2, Б, кривые 1 и 1'). В результате общая продолжительность роста АД-1 растянулась до 14 ч, а полное исчерпание глюкозы было достигнуто в начале стационарной фазы, около 16 ч (см. рис. 2, Б, кривая 1). Эти данные позволили объяснить картину синтеза АЛ гетерогенной культурой 2103/74, наблюдавшуюся на среде ТС, когда уровень этого синтеза не выходил за пределы 16—18 мМ при всех проверенных значениях рН 5,3—6,5, доминированием в гетерогенной популяции вариантов типа ПАД-15 из-за их более высокой скорости роста.

Тот факт, что разница в ростовых характеристиках диссоциантов никак не отразилась на конечном урожае биомассы (см. рис. 2, Б), позволил предположить, что при диссоциативных переходах у АД-1 в отличие от ПАД-15 возникает лимитирующее рост «узкое место» в системе конструктивного метаболизма. Дело в том, что у МКБ сахара служат только источником энергии, скорость потребления которых зависит исключительно от интенсивности конструктивного обмена, построенного на использовании АК [14, 15]. Иначе говоря, конструктивный метаболизм в МКБ почти не включает в себя поток

углерода глюкозы и складывается из потока углерода АК. Поэтому резкое снижение потребления глюкозы АД-1 (см. рис. 2, Б, кривая 2) свидетельствует о появлении «узкого места» в системе конструктивного, а не энергетического метаболизма. Очевидно, это происходит при ассимиляции олигопептидов триптона на уровне транспорта и (или) гидролиза олигопептидов до АК специфическими пептидазами [16, 17], связанными с клеточной мембраной. В отличие от пептонов в составе ДЭ доля свободных АК очень высока (до 50%), а доля АК в связанном виде (олигопептиды) — низка. В пептонах все наоборот: АК содержатся главным образом в связанной форме, а содержание свободных АК крайне мало [18]. Исключение ДЭ из среды ставит культуру в сильную зависимость от природы пептона, т.е. от набора входящих в его состав олигопептидов и АК, а также от доли той или иной АК в связанной и в свободной формах. Диссоциативный переход, как можно предполагать, изменивший у АД-1 субстратную специфичность системы транспорта и/или гидролиза пептидов, может сделать какую-то часть олигопептидов труднодоступной как источник АК, тогда как легко ассимилируемые олигопептиды могут оказаться бедными по некоторым АК и тем самым ограничить скорость роста, а значит, и потребность в энергии и, следовательно, снизить скорость потребления глюкозы.

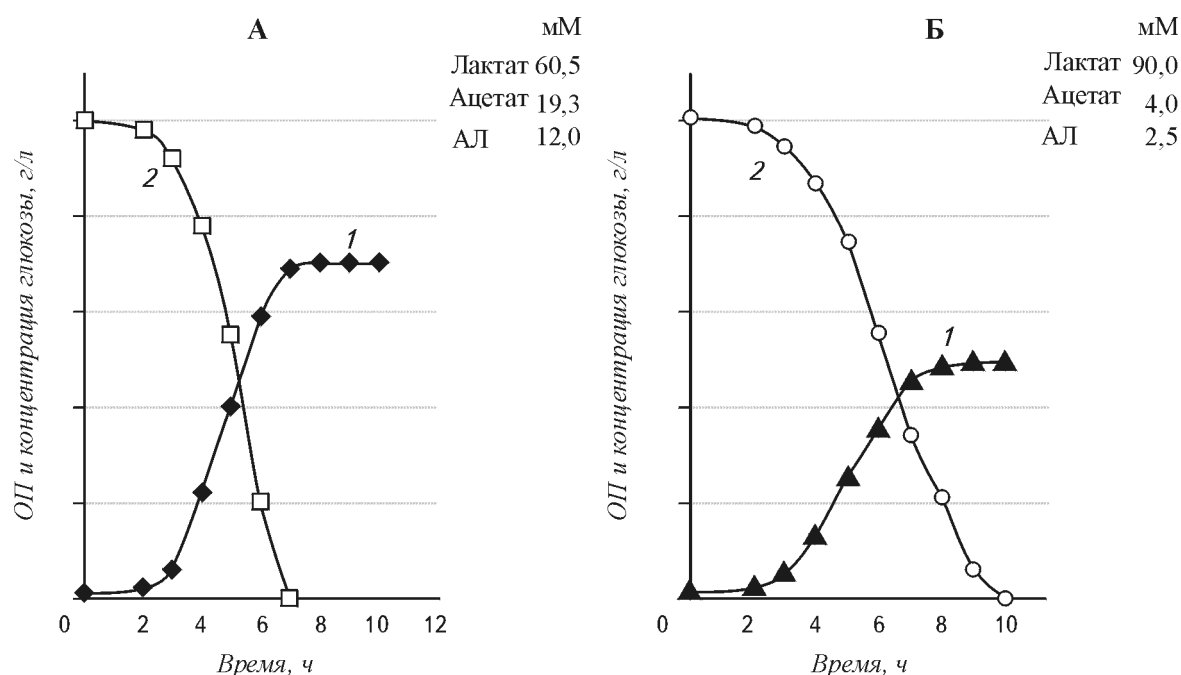


Рис. 3. Кривые роста и потребления глюкозы культурой АД-1 на среде с бактопептоном в присутствии (А) и в отсутствие (Б) дрожжевого экстракта (рН среды 5,4): 1 — ОП; 2 — глюкоза

Изложенную точку зрения подтвердил подбор пептона, устранивший «узкое место». Таким субстратом оказался бактопептон (рис. 3). На полной среде (бактопептон + ДЭ) АД-1 показывал высокие ростовые характеристики (см. рис. 3, А). При исключении ДЭ они не изменились таким драматическим образом, как это случилось при переходе от ТДЭС к ТС (см. рис. 2). Наблюдалось (типичное для гетерогенной культуры 2103/74) некоторое понижение характеристик процесса: с ДЭ рост и потребление глюкозы завершались к 7-му часу при ОП биомассы 7,0 (см. рис. 3, А), а без ДЭ эти процессы оканчивались несколько позже, соответственно к 8-му и 9-му часу при ОП 5,0 (см. рис. 3, Б).

Природа пептонов и эффект сверхсинтеза

Эксперименты с бактопептоном показали, что природа ростового субстрата имела принципиальное значение для проявления эффекта сверхсинтеза АЛ. В отличие от ТДЭС/ТС на среде с бактопептоном этот эффект не наблюдался. На полной среде (бактопептон + ДЭ) синтез АЛ был хотя и высоким (10—12 мМ), но не достигал нижней границы сверхсинтеза (15 мМ). Без ДЭ, судя по СГ (очень высокая, около 0,9), активность ГЕМНЭПС не проявлялась и культура переходила в режим гомомолочного брожения с максимальной активностью ЛДГ-пути и минимальной минорных путей (содержание ацетата 4 мМ, АЛ — 2,5 мМ).

Таким образом, из полученных данных можно сделать следующие выводы. Культуру 2103/74 можно отнести к типу бактерий с заметным уровнем естественной изменчивости. В популяции присутствовали по меньшей мере три типа диссоциантов, различающихся по степени проявления активности ГЕМНЭПС: активный (АД-1), утративший ГЕМНЭПС неактивный (НД) и вариант с промежуточной активностью (ПАД-15). Это обстоятельство сильно осложнило проведение исследований, о чем свидетельствуют данные в табл. 1 и 2. Для гетерогенной популяции 2103/74 (см. табл. 1) общая картина метаболизма пирувата была, очевидно, результатом разного соотношения диссоциантов, складывающегося при том или ином значении рН. По уровню синтеза АЛ можно было судить о типе диссоцианта, доминировавшего в популяции: от активного АД (АЛ=25 мМ, см. табл. 1, вариант б) до утратившего ГЕМНЭПС НД (АЛ = 4—5 мМ, см. табл. 1, варианты 1 и 5). Тот факт, что при рН 6,5 сверхсинтез АЛ не наблюдался, говорит о зависимости соотношения диссоциантов от рН, возможно, вызванной различиями в скорости их роста при разных значениях данного показателя. Хорошо известно, что диссоцианты различаются по скорости роста, и связано это, по-видимому, с особенностями строения их клеточных оболочек [8]. Предполагают, что при диссоциативных переходах первичные фенотипические изменения происходят в синтезе клеточных оболочек, обуславливаю-

щих в том числе изменения в скорости поступления веществ в клетку, а значит и скорости роста. В нашем случае, как уже говорилось выше, это проявлялось в том, что вариант АД-1 в отличие от ПАД-15 скорее всего имел дефект в системе транспорта и/или гидролиза олигопептидов, немедленно проявляющийся в резком замедлении роста при переходе на обедненную по свободным АК (без ДЭ) среду. Различия в текучести мембран (разница диссоциантов по количеству липидов и насыщенности входящих в их состав жирных кислот) могут сильно изменить активность ряда связанных с ними ферментов [8]. В нашем случае это разная активность ГЕМНЭПС у АД, ПАД и отсутствие ее у НД.

Использование гомогенной популяции АД-1 позволило получить объективное представление о роли pH в явлении сверхсинтеза. Общую картину распределения метаболических потоков определяла активность ГЕМНЭПС при том или ином значении pH и зависящая от этого скорость ЛДГ-реакции. Тандем систем ГЕМНЭПС—ЛДГ, взаимодействующих между собой посредством NADH, — главное звено, управляющее перераспределением потоков между ЛДГ- и АЛС-путями. ПДГ-путь был автономным, никак не связанным с изменением потоков по ЛДГ- и АЛС-ветвям. Наиболее наглядно это видно из сравнения вариантов 1 и 4 по синтезу АЛ (см. табл. 2). При pH 5,3—6,5 (см. табл. 2, варианты 2—4) активность ГЕМНЭПС была, видимо, настолько высокой, что позволила ей взять на себя функцию главного регулятора окислительно-восстановительного баланса $NAD^+/NADH$ и отвести ЛДГ-пути минорную роль. В этой области pH поток, минуя ПДГ-, смещен к АЛС-пути. При pH 7,0 (см. табл. 2, вариант 1), наоборот, наблюдалась высокая СГ, связанная, очевидно, с низкой активностью ГЕМНЭПС. В результате поток сместился к ЛДГ-пути.

Активность АЛС в связке ЛДГ—АЛС управлялась, по всей видимости, только мощностью потока пирувата, т.е. чисто кинетическим фактором — концентрацией субстрата. Низкое сродство к субстрату (K_m 50—70 мМ) и сигмоидная форма зависимости скорости реакции от концентрации пирувата исключает конкуренцию за субстрат между АЛС и ферментами ЛДГ и ПДГ [12,13]. АЛС активно включается только на тех этапах метаболизма, когда необходимо удаление избыточных концентраций пирувата в клетке, в данном случае в условиях сверхсинтеза.

При переходе на среду ТС существенно важным оказалось сокращение продуктивности ПДГ-пути и расширение зоны действия ГЕМНЭПС на

всю область проверенных pH от 5,3 до 7,0. Такое сильное снижение активности ПДГ-пути при всех значениях pH, скорее всего, могло быть вызвано уменьшением доступного пула липоевой кислоты (кофактор ПДГ-комплекса), источником которого может выступать ДЭ [19].

Опыты на среде ТС показали, что в области значений pH 6,0—6,5 из-за ограниченной пропускной способности ЛДГ- и АЛС-путей возникает проблема с утилизацией «лишнего» пирувата, возникшего в связи с сильно сократившейся продуктивностью ПДГ-пути. Судя по полученным данным, чтобы снять внутриклеточное «напряжение» из-за накопления пирувата, активировался его метаболизм по дополнительному пути с образованием неидентифицированного соединения. Здесь уместно сослаться на опубликованные ранее данные [3, 4] и отметить, что баланс по углероду глюкозы часто составлял около 85%. Недостающие 15%, видимо, можно было бы отнести на счет образования этого неидентифицированного C_4 -соединения.

Получено 3.06.15

ЛИТЕРАТУРА

1. *Wainwright, T.D.* Diacetyl — A review. Part I — Analytical and biochemical considerations // *J. Inst. Brew.* — 1973. — V.79. — P. 451 — 470.
2. *Серебренников В.М.* Изучение синтеза α -ацетолактата, предшественника диацетила, периодической культурой *Lactococcus lactis* / В.М. Серебренников, Л.Н. Воронина, А.В. Глазунов // *Биотехнология.* — 2005. — № 3. — С. 13 — 21.
3. *Серебренников В.М.* Биосинтез α -ацетолактата у природного мутанта *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* B2103, лишённого α -ацетолактатдекарбоксилазы, в зависимости от состава среды / В.М. Серебренников, Л.Н. Котова, А.В. Глазунов // *Биотехнология.* — 2012. — № 3. — С. 20 — 31.
4. *Серебренников В.М.* Сверхсинтез α -ацетолактата из глюкозы у продуцента диацетила *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* B2103, природного мутанта, лишённого α -ацетолактатдекарбоксилазы / В.М. Серебренников, Л.Н. Котова, А.В. Глазунов // *Биотехнология.* — 2013. — № 4. — С.24 — 38.
5. *Condon, S.* Responses of lactic acid bacteria to oxygen // *FEMS Microbiol. Rev.* — 1987. — V.46. — P. 269 — 280.
6. *van Niel, E.W.J.* Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions / E.W.J. van Niel, K. Hofvendahl, B. Hahn-Hägerdal // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — V. 68. — P. 4350 — 4356.
7. *Акименко В.К.* Альтернативные оксидазы микроорганизмов. — М.: Наука, 1989. — 263 с.

8. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяций бактерий и процесс диссоциации. — М.: Изд-во МГУ, 1991. — 142 с.
9. Kempler, G.M. Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* / G.M. Kempler, L.L. McKay // Appl. Environ. Microbiol. — 1980. — V.39. — P.926 — 927.
10. Rose, I.A. Enzymatic phosphorylation of acetate / I.A. Rose, M. Grunberg-Manago, S.R. Korey, S. Ochoa // J. Biol. Chem. — 1954. — V. 211. — P. 737 — 755.
11. Broome, M.C. Pyruvate dehydrogenase activity in streptococci / M.C. Broome, M.P. Thomas, A. I. Hillier, G. R. Jago // Aust. J. Biol. Sci. — 1980. — V. 33. — P. 15 — 25.
12. Snoep, J.L. Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and α -acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* / J.L. Snoep, M. Joost Teixeira de Mattos, M. J.C. Starrenburg, J. Hugenholtz // J. Bacteriol. — 1992. — V. 174. — P. 4838 — 4841.
13. Кисриева Ю.С. Выделение и очистка ацетолактатсинтазы и ацетолактатдекарбосилазы из культуры *Lactococcus lactis*/ Ю.С. Кисриева, В.М. Серебренников, Н.А. Загустина, А.М. Безбородов// Прикл. Биохим. микробиол. — 2000. — Т.36. — № 2. — С.138—142.
14. Novak, L. The metabolic network of *Lactococcus lactis*: distribution of ^{14}C -labeled substrate between catabolic and anabolic pathways / L. Novak, P. Loubiere // J. Bacteriol. — 2000. — V. 182. — P. 1136 — 1143.
15. Cocaign-Bousquet, M. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis* / M. Cocaign-Bousquet, C. Garrigues, P. Loubiere, N.D. Lindley // Antonie van Leeuwenhoek. — 1996. — V. 70. — P. 253 — 267.
16. Flambard, B. The contribution of caseins to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depends on the type of cell envelope proteinase / B. Flambard, S. Helinck, J. Richard, V. Juillard // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — V. 64. — P. 1991 — 1996.
17. Juillard, V. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk / V. Juillard, D. le Bars, E.R.S. Kunji, W.N.Konings, J. Gripon, J. Richard // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — V. 61. — P. 3024 — 3030.
18. Benthin, S. Amino acid utilization by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD — during growth on yeast extract or casein peptone / S. Benthin, J. Villadsen // J. Appl. Bacteriol. — 1996. — V. 80. — P. 65 — 72.
19. Drinan, D.F. Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria / D. F. Drinan, S. Tobin, T.M. Cogan // Appl. Environ. Microbiol. — 1976. — V.31. — P. 481 — 486.

L.N. KOTOVA, V.M. SEREBRENNIKOV,
and A.V. GLAZUNOV*

The State Research Institute for Genetics and Selection of Microorganisms (GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia

e-mail: glazunov@genetika.ru

A Role of Population Heterogeneity and pH Factor in Natural α -Acetolactate Supersynthesis in a Diacetyl Producer, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis* B2103/74

The effect of the population heterogeneity and medium pH on the found out by us supersynthesis of α -acetolactate (AL) by the *L. lactis* bv. *diacetylactis* B2103/74 culture has been investigated. The nature of an enzyme system that is responsible for this effect due to lactate dehydrogenase essentially blocking by intercepting up to 80% NADH from it and was indicated as hemin-independent electron-transferring system (HIETS) is unknown. It was shown that the effect was disguised by the culture heterogeneity which was the most pronounced at neighboring to neutral pH values 6.1—6.5. It was established that at least three types of dissociants with different HIETS and, consequently, AL levels occurred in the population: active dissociant (AL accumulation up to 30 mM); inactive dissociant that lost HIETS activity (AL content of no more than 3 mM); and dissociant with moderate activity (AL content 15—17 mM). It was demonstrated that HIETS played a major part in the whole pyruvate metabolism at various pH and finally in the AL supersynthesis. For instance, at pH =7.0, the effect of supersynthesis failed to be observed due to the HIETS low activity, and the pyruvate metabolism proceeded by the homolactic pathway. However, at pH 5.3—6.5, the HIETS activity was so high that it permitted the system to take over a function of the major regulator of the redox NAD^+/NADH balance leaving the minor part to LDH. The productivities of LDH and acetolactate-synthase pathways depended on the HIETS activity at various pH values, whereas that of the pyruvatedehydrogenase pathway was a straight function of external pH. The latter was rather high in the close to neutral pH area (6.0—6.5) and was significantly lower in the neutral (pH=6.0—6.5) and light-acidic (pH \leq 6.0) zones.

Key words: acetoin, α -acetolactate, diacetyl, dissociants, lactic acid bacteria.

* Author for correspondence.