

гантов автономно реплицирующейся плазмиды pSa, или плазмид меньшего размера - в случае утраты неселективных маркеров. Плазида pSa не влияла на частоту спонтанной элиминации генов деградации симазина.

Трансконъюганты, несущие pSa, были использованы в качестве доноров в скрещиваниях с рифампицину-чувствительными производными штамма B601, утаившими гены деградации симазина (B601Rif<sup>r</sup>Smz<sup>r</sup>). Перенос маркеров плазмиды pSa наблюдался с частотой около  $10^{-2}$  на клетку реципиента, а появление трансконъюгантов воспринявших pSa и утилизирующих симазин - с частотой порядка  $10^{-7}$  на клетку реципиента. Smz<sup>r</sup> трансконъюганты несли новую крупную плазмиду и сохраняли резидентные плазмиды реципиента. При росте на легкодоступных источниках азота эти трансконъюганты теряли способность утилизировать симазин с частотой около  $10^{-1}$  за пассаж при сохранении маркеров плазмиды pSa. Smz<sup>r</sup> производные теряли воспринятую при скрещивании крупную плазмиду, но имели новую плазмиду, соответствующую по молекулярной массе плазмиде pSa. Таким образом, гены деградации симазина могут быть мобилизованы с помощью плазмиды pSa за счет образования гибридных плазмид на основе ее репликаона.

#### ЛИТЕРАТУРА.

1. Мельников Н.Н., Белан С.Р. // *Агрехимия*. 1997, №2, с.66-67.
2. Cook A.M. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1987. V.46. P.93-116.
3. De Souza M.L., Seffernick J., Martinez B., Sadowsky M.J., Wackett L.P. // *J.Bacteriol.* 1998. V.180. P.1951-1954.
4. Бажанов Д.П., Новицкий В.Ф. // *Микробиология и биотехнология на рубеже XXI столетия*. Мат. межд. конф. Минск, 1-2 июня 2000 г. С. 21 - 23.
5. De Groot A., Heijnen I., de Cock H., Filloux A., Tommassen J. // *J.Bacteriol.* 1994. V.176. P.642-650.

УДК 579.8:576.8

### СОЗДАНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ЛАКТОКОККОВ МЕТОДОМ СЛИЯНИЯ ПРОТОПЛАСТОВ

Богданова Л.Л., Чаевская Т.В., Белясова Н.А., Дудко Н.В., Гриц Н.В., Сафроненко Л.В.

*Белорусский государственный технологический университет,  
Научно-производственное Республиканское унитарное предприятие "БЕЛНИКТИММП" (УП  
"БЕЛНИКТИММП"), г. Минск, Республика Беларусь*

Технологические процессы производства кисломолочных продуктов в Республике Беларусь, осуществляются с использованием многокомпонентных заквасок, что в определенной степени нивелирует явление фаголизиса. Накопленные материалы практических наблюдений свидетельствуют о все возрастающем значении бактериофагов как факторов, нарушающих технологический процесс производства ферментированных молочных продуктов, что приводит к ухудшению их качества [1,2].

Чтобы снизить риск развития фаговой инфекции, на предприятиях постоянно осуществляют ротацию штаммов, формирующих закваски. Поэтому в отделе микробиологии УП "БЕЛНИКТИММП" ведется непрерывный поиск и отбор устойчивых к бактериофагам молочнокислых бактерий из внешней среды.

В то же время существует возможность получения устойчивых к бактериофагам штаммов лактококков методом генетического обмена, в частности, слиянием протопластов [3], что послужило целью настоящего исследования.

Анализ индикаторных и коллекционных культур мезофильных лактококков отдела микробиологии УП "БЕЛНИКТИММП" показал, что из 73 штаммов с удовлетворительными производственными характеристиками 44 оказались чувствительными к широкому спектру коллекционных бактериофагов, то есть не могли быть использованы в составе заквасок. Среди этих бактерий отобраны штаммы, характеризующиеся чувствительностью либо устойчивостью к ряду антибиотиков: тетрациклину, пенициллину, рифампицину, стрептомицину.

Эти бактерии формировали родительские пары для слияния протопластов: в каждую из 7 таких пар входили бактерии *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetilactis*, отличающиеся чувствительностью к большинству коллекционных фагов, и *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, устойчивые к исследуемым фагам. При этом родительские штаммы характеризовались перекрестной чувствительностью к антибиотикам, используемым для отбора фузантов

В результате экспериментов по слиянию протопластов родительских пар отобрано 122 клона молочнокислых бактерий, для которых определяли производственно-ценные свойства непосредственно после пересева с селективной среды в молоко, и сохранение этих свойств после трех перевивок в молоко. Порядка 80% полученных фузантов обладали необходимыми производственно-ценными свойствами, которые сохранялись практически без изменений в процессе восьми пассажей. Такие клоны были проверены на устойчивость к коллекционным бактериофагам, имеющимся в отделе микробиологии УП "БЕЛНИКТИММП". 57 % исследованных клонов оказались фагоустойчивыми.

Среди фагоустойчивых фузантов, сохраняющих характерные свойства при инкубировании в неселективных условиях, отобрали 36, обладающих признаками обоих родительских типов: способностью формировать плотный, однородный сгусток и устойчивостью к 42 коллекционным бактериофагам (свойства бактерий *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*), а также способностью образовывать ароматические вещества, унаследованную от бактерий *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetilactis*. Оценку органолептических свойств проводила группа экспертов, состоящая из 5 человек. Эксперты оценивали консистенцию, вкус и аромат молочных сгустков в баллах согласно принятым критериям. Все исследованные фузанты получили оценку 4,5 — 5 баллов (по пятибалльной системе).

Кроме того, все полученные рекомбинантные штаммы были исследованы на взаимный антагонизм друг к другу. Для выявления культур-антагонистов использовали метод перекрестных испытаний, учитывающий антагонистические взаимоотношения между планируемыми в состав бактериальных заквасок и бактериальных концентратов культурами. Антагонизм молочнокислых бактерий обусловлен действием молочной кислоты или же специфически связан с выработкой антибиотикоподобных веществ — низина (*L. lactis*), диплококцина (*Lactococcus cremoris*) и др.[4,5].

В результате было составлено 10 вариантов комбинаций бактериальных заквасок, включающих по два ароматобразующих рекомбинантных штамма. Комбинации отбирались по времени сквашивания и органолептическим показателям, особое внимание уделялось газо- и ароматообразованию. Отбраковывались те комбинации, для которых данные показатели ухудшались по сравнению с показателями штаммов, входящих в состав комбинации, взятых по отдельности. В результате проведенных исследований было отобрано 3 комбинации бактериальных заквасок для производства кисломолочных продуктов на основе сконструированных штаммов мезофильных лактококков.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Банникова Н.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф. / Микробиологические основы молочного производства //М: Агропромиздат. – 1987. –400 с.
2. Богданов А.М. Молочнокислая микрофлора молока и молочных продуктов различных климатических зон. // Труды ВНИМИ. – М. Пищепромиздат, вып.20. - С.25
3. Стоянова Л.Г., Егоров Н.С., Полин А.Н. Слияние протопластов молочнокислых стрептококков. //Антибиотики и медицинская биотехнология. Т.32, № 2, 1987.
4. Коваленко Н.К., Немировская Л.Н. Бактериоцины молочнокислых бактерий.// Микрорг. в сельск. хоз-ве. Тез. докл. 4 Всесоюз. научн. конф., Пушкино, 20-24 янв., 1992. – Пушкино, 1992. – С. 93.
5. Ратникова И.А., Гаврилова Н.Н., Колокова Н.Н. Идентификация антибиотических веществ молочнокислых бактерий //Биотехнология. 1995, № 5-6. – С. 19 - 20

УДК 577.122.5: 579.222.7

## СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА БЕЛКА ПОВЕРХНОСТНОГО СЛОЯ КЛЕТОК *BACILLUS SPHAERICUS* AP2

Бурдь В.Н., ван Пе К.-Х.<sup>1</sup>

Гродненский государственный университет имени Янки Купалы (кафедра биотехнологии), г.Гродно, Республика Беларусь. E-mail: burd@mail.grsu.grodno.by.

<sup>1</sup>Институт биохимии Дрезденского технического университета, г.Дрезден, ФРГ.

Мономолекулярный кристаллический слой (S-слой), состоящий из белков, принадлежит к наиболее часто встречаемой поверхностной структуре многих представителей прокариот [1]. Во время роста и деления клетки ее поверхность покрывается замкнутой высокопористой решеткой. Морфологические, химические, генетические и морфогенетические исследования показали, что данная структура представляет собой простейшую биологическую мембрану, возникшую в ходе эволюции. Как правило, S-слой состоит из белковой молекулы одного типа, часто гликопротеина. Аналогичная надмолекулярная структура самопроизвольно возникает и *in vitro* при контакте раствора S-белка с любой иной гидрофобной поверхностью, например, кремневой пластинкой, липидной пленкой или липосомой. Эта уникальная способность белков S-слоя обуславливает широкий спектр их практического приложения в биотехнологии, молекулярной нанотехнологии, диагностике и т.п. [2].

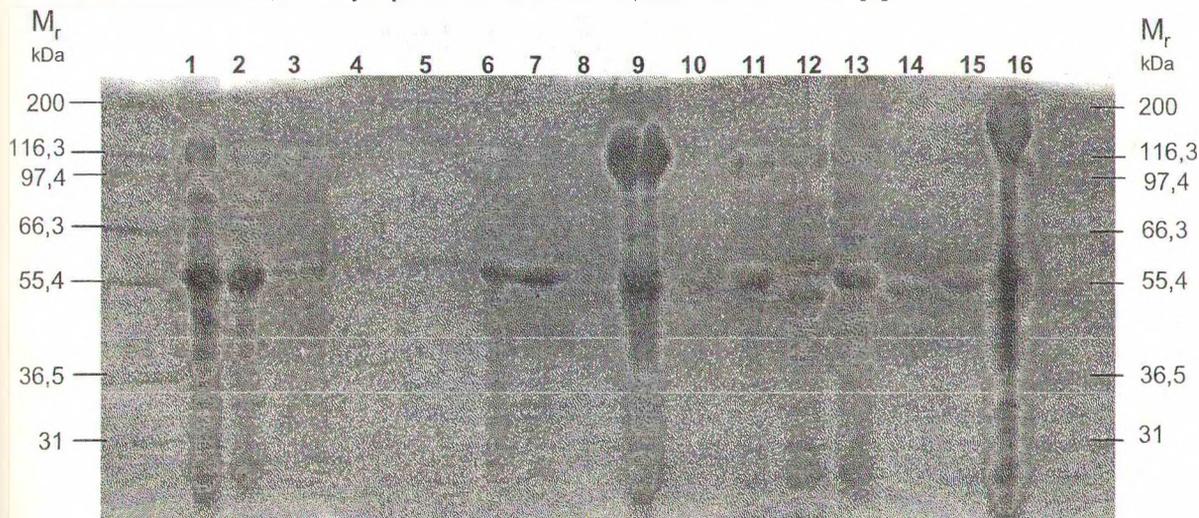


Рис.1. Электрофорез в SDS-ПААГ. 1 – 10 мМ EDTA pH 8.0; 2 – 10 мМ EGTA pH 8.0; 3 – 100мМ HEPES pH 2.0; 4 – 100мМ HEPES pH 3.0; 5 – 100 мМ HEPES pH 4.0; 6 – 200мМ глицин/HCl pH 2.0; 7 – 200 мМ глицин/HCl pH 4.0; 8 – 100 мМ трис/HCl pH 2.0; 9 – 1М мочевины; 10 – 4М LiCl; 11 – 1М гуанидин/HCl pH 7.0; 12 – 4М гуанидин/HCl pH 7.0; 13 – 10 мМ NaCl; 14 – 10 мМ CaCl<sub>2</sub>; 15 – 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 16 – 1% SDS.