

ные трансдуктанты сохраняли способность сквашивать молоко и остальные, характерные для бактерий *Str.cremoris*, 24 признака.

Табл.2. Трансдукционный перенос признака тетрациклин-резистентности в системе бактерий *Str.cremoris* 24

Длительность адсорбции, мин	0	10	20	30	40
Концентрация трансдуктантов, кл/мл	190	190	300	240	220
Эффективность трансдукции	$6,3 \cdot 10^{-7}$	$6,3 \cdot 10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$8,0 \cdot 10^{-7}$	$7,3 \cdot 10^{-7}$

Таким образом, создана система, позволяющая с достаточной эффективностью переносить хромосомальные гены между клетками молочнокислых стрептококков с помощью вирулентных фагов, выделенных в Беларуси.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белясова Н.А., Домашова Т.В., Гриц Н.В. Создание системы генетического обмена для молочнокислых стрептококков. Труды БГТУ. Вып.3. Химия и химическая технология. - 1996. -С.27-30.
2. Основы бактериофагии / Под редакцией Габриловича И.М. - Изд-во Вышэйш. школа, 1973.
3. Гриц Н.В., Белясова Н.А., Богданова Л.Л. Создание системы изогенных партнерских штаммов молочнокислых стрептококков для конъюгационного обмена // Труды БелНИКТИММП, 1997 (в печати).

УДК 579.861:576.8

Н.А.Белясова, доцент;
Т.В.Чаевская, аспирант;
Н.В.Гриц, доцент

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ПРОТОПЛАСТОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ

Protoplasts were isolated from 3 strains of starter cultures of the genera *Streptococcus*. The conditions of preincubation, action of lysozyme, 2-mercaptoethanol, the type of caused and regeneration medium, the type and concentration of stabilizer were optimized.

Из четырех известных способов обмена генетической информацией у бактерий слияние протопластов имеет самостоятельное значение, по-

сколькo позволяет объединять не только геномы, но и цитоплазмы клеток, принадлежащих не только к одному, но и к разным видам, родам и семействам микроорганизмов.

В процессе слияния могут участвовать сразу несколько клеток, и формирующееся рекомбинантное потомство часто наследует признаки более чем двух родительских клеток. Эта особенность может оказаться весьма полезной при конструировании штаммов молочнокислых стрептококков, использующихся в качестве полифункциональных заквасок. В данном случае появляется возможность ограничить количество видов микроорганизмов в закваске с сохранением свойств и лучших качеств продукта, что, в свою очередь, должно упростить процедуры производства заквасок, производства кисломолочных продуктов, а следовательно, и стоимость соответствующих технологий.

Как следует из анализа литературных данных, процесс получения протопластов может осуществляться с участием различных литических агентов, из которых наиболее доступен и лучше других исследован лизоцим [1]. Этот фермент разрушает β (1,4) - гликозидные связи в молекуле муреина и, тем самым, способствует лизису клеточной стенки. Однако условия обработки клеток лизоцимом сильно различаются в зависимости от их видовой (или даже штаммовой) принадлежности, и поэтому в каждом конкретном случае их следует подбирать экспериментально [2].

Целью настоящего исследования являлась оптимизация условий получения протопластов заквасочных штаммов молочнокислых стрептококков трех видов с использованием лизоцима и отработка параметров их эффективной регенерации в исходные клеточные формы.

Наибольшее влияние на процесс образования протопластов молочнокислых стрептококков оказывают следующие факторы: фаза роста обрабатываемой лизоцимом культуры, концентрация лизоцима, длительность обработки, температура литической смеси, состав буферной смеси, в которой производится обработка, тип и концентрация осмотического стабилизатора, тип агента, разрыхляющего клеточную стенку, его концентрация и длительность предобработки клеток, присутствие в литической смеси этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и его концентрация, состав среды, в которой выращивается культура клеток.

Из перечисленных условий оптимизации подвергались лишь те, по которым в литературных источниках существуют серьезные разночтения. Так, большинство авторов обнаруживало наибольшую эффективность получения протопластов из клеток культуры, находящейся в поздней логарифмической фазе роста [3]. К тому же наилучшие результаты получались при инкубировании клеток в стационарных условиях в синтетической среде (SDL), содержащей 0,2% d,l-треонина [4]. Таким образом, в данном ис-

следовании эти условия взяты за основу и оставалось определить лишь длительность инкубирования клеток, которая обеспечивает достижение поздней логарифмической стадии роста. Эти результаты получены в экспериментах по изучению динамики роста культур и составляют 4,5 часа для бактерий *Str.lactis* 57-3, *Str.diacetilactis* 64-7 и 4 часа для клеток *Str.cremoris*.

Следующая серия экспериментов была посвящена подбору состава лизирующей смеси. Исследовали 5 буферных смесей с различными осмотическими стабилизаторами - варианты, описанные в литературе и обеспечивающие наибольший выход протопластов. Результаты для бактерий *Str.lactis* 57-3, представленные в табл. 1, позволяют сделать выбор в пользу среды ММ9 с 0,6 М сахарозы в качестве осмотического стабилизатора. В этих экспериментах использовали лизоцим в концентрации 1000 мкг/мл и длительность обработки 20 минут.

Табл.1. Эффективность образования протопластов *Str. lactis* 57-3 при обработке клеток лизоцимом в разных буферных средах

Среда обработки	E ⁶⁷⁰ в среде ресуспендирования		% протопластов
	вода	стабилизирующий буфер	
Аммоний-цитратный буфер (pH 6,4)	0,160	0,172	6,9
Трис-НСl буфер с 0,9 М КCl (pH 8,0)	0,112	0,134	16,4
Трис-НСl буфер с 0,6 М сахарозы (pH 7,0)	0,174	0,211	17,5
Среда ММ9 с 0,6 М сахарозы (pH 7,0)	0,220	0,276	20,2
Среда ММ9 с 1,2 М глюкозы (pH 7,0)	0,174	0,174	0,0

Использование среды ММ9 с сахарозой в качестве среды обработки лизоцимом бактерий *Str.cremoris* 33 и *Str.diacetilactis* 64-7 позволило получить в аналогичных условиях 19,6% и 21,0% протопластов соответственно, что дает основание использовать эту среду для получения протопластов бактерий трех исследуемых видов.

Повысить частоту протопластирования клеток можно, оптимизировав дозу обработки их лизоцимом. В предварительных экспериментах ус-

тановлено, что концентрация лизоцима 500 мкг/мл является удовлетворительной и дальнейшее ее увеличение не способствует существенному повышению эффективности протопластирования клеток исследуемых бактерий.

Оптимизация длительности обработки клеток лизоцимом осуществлялась в среде ММ9 с 0,6 М сахарозы в качестве осмотического стабилизатора и лизоцимом в концентрации 500 мкг/мл при температуре 37°C (табл.2).

Табл.2. Влияние длительности обработки клеток лизоцимом на эффективность формирования протопластов

Штамм	Система разведения	E ⁶⁷⁰ при длительности обработки (мин)					
		20	30	40	50	60	70
Str.- Lactis57- 3	вода	0,120-	0,085-	0,100-	0,110-	0,085-	0,100-
	буфер	0,150-	0,110-	0,120-	0,120-	0,180-	0,210-
	% протопл.	20,0	22,7	16,7	28,3	52,8	52,3
Str.- Cremoris 33	вода	0,150-	0,090-	0,110-	0,100-	0,075-	0,080-
	буфер	0,170-	0,110-	0,140-	0,150-	0,190-	0,195-
	% протопл.	11,8	18,2	21,4	33,3	60,5	58,9
Str.dia-- cetilac-tis 64-7	вода	-	0,150-	0,160-	0,190-	0,120-	0,050-
	буфер	-	0,190-	0,250-	0,290-	0,360-	0,350-
	% протопл.	-	21,1	36,0	34,4	66,7	85,7

Как следует из результатов, представленных в табл.2, для бактерий *Str.lactis* 57-3 и для бактерий *Str.cremoris* 33 оптимальной длительностью обработки является 60 минут; для клеток *Str.diacetilactis* 64-7 - 70 минут обработки (эффективность протопластирования возрастает до 85,7%).

Известно, что стимулирующее воздействие на процесс образования протопластов оказывает предварительная обработка клеток агентами, разрушающими клеточную стенку, например дитиотреитолом либо меркаптоэтанолом в невысоких концентрациях.

Исследование воздействия этих агентов на процесс образования протопластов у бактерий *Str.lactis* 57-3 показал, что наибольший эффект оказывает меркаптоэтанол в концентрации 0,01% при длительности воздействия 30 минут при температуре 37°C (процедура предварительной обработки клеток). Подобранные условия позволяют получать протопласты

молочнокислых стрептококков исследуемых видов с эффективностью 90-99% (табл.3).

Табл.3. Эффективность образования и реверсии протопластов *Str. lactis* 57-3

Параметры	$K_{исх.}$	$K_{осм.}$	$K_{рев.}$
Концентрация клеток (кл/мл)	$1,46 \cdot 10^{10}$	$1,90 \cdot 10^8$	$5,52 \cdot 10^9$
Эффективность протопластирования (ЭП), %	$ЭП = 100 \cdot (K_{исх.} - K_{осм.}) / K_{исх.} = 98,7$		
Эффективность реверсии (ЭР), %	$ЭР = 100 \cdot (K_{рев.} - K_{осм.}) / (K_{исх.} - K_{осм.}) = 37,0$		

Обеспечить реверсию протопластов в исходные клеточные формы достаточно сложно, и данный процесс нуждается в оптимизации условий [2]. В числе первоочередных подобраны следующие: состав и концентрация агаризованной среды для реверсии (полусинтетическая среда SDL с 0,8% агар-агара); тип и концентрация осмотического стабилизатора (глюкоза 0,6М); температура инкубирования протопластов, подвергающихся реверсии (30°C).

В таких условиях эффективность реверсии протопластов достигала 30-40% (см. табл.3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Стоянова Л.Г., Егоров Н.С., Полин А.Н. Слияние протопластов молочнокислых стрептококков // Антибиотики и медицинская биотехнология. - 1987. - Т.32. - №2. - С.89-97.
2. Янковский Д.С. и соавт. Получение протопластов и регенерация клеток у некоторых заквасочных штаммов молочнокислых и уксуснокислых бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. - 1993. - Т.29. - Вып.3. - С.751-756.
3. Стоянова Л.Г. и соавт. Повышение чувствительности *Streptococcus lactis* к лизоциму в целях получения протопластов // Биотехнология. - 1987. - Т.4. - С.454-460.
4. Стоянова Л.Г., Егоров Н.С. Некоторые аспекты получения протопластов у *Streptococcus lactis* // Прикладная биохимия и микробиология. - 1990. - Т.26. - №4. - С.566-572.