

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена возможность прямой биотрансформации целлюлозы мицелиальными грибами в белок. Оптимальная продолжительность ферментации составляет 96-120 часов. В процессе биоконверсии субстрат обогащается белком на 12-15%. Содержание лигнина снижается на 60-70%. Полученный субстрат по своему составу соответствует растительно-углеводно-белковому корму.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Болтовский В.С., Цедрик Т.П. Повышение эффективности использования отходов деревообработки при биоконверсии// Деревообрабатывающая промышленность, 1996 (в печати).
2. Оболенская А.В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. -М.: Лесная промышленность, 1991.
3. Лабанок А.Г., Бабицкая В.Г. Микробный синтез на основе целлюлозы. - Минск. Наука и техника, 1988.
4. ГОСТ 20083-74 Дрожжи кормовые. Технические условия. Госстандарт, 1985.

УДК 557.21.044.14

Н.А.Белясова, доцент;  
Т.В. Домашова, студ.;  
Н.В. Гриц, доцент

#### СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ДЛЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ

The conjugational system of genetic transfer for bacteria of genus *Streptococcus* has been created.

Молочнокислые стрептококки являются основными организмами заквасок для производства всех молочнокислых продуктов. Их главное свойство - способность сбраживать лактозу молока в молочную кислоту и, как следствие этого, обеспечивать кислотную денатурацию белка казеина. При этом они выделяют ряд метаболитов, которые и придают продукту своеобразные вкус, запах, консистенцию, цвет и др. [1]. Таким образом, как качество, так и органолептические показатели молочнокислых продуктов определяются составом заквасок.

Обычно в состав заквасок входит несколько штаммов (или чистых культур) молочнокислых стрептококков. Каждый штамм должен обладать определенным набором качеств, удовлетворяющих производству молочнокислых продуктов: высокой скоростью роста, устойчивостью к неблагоприятным факторам, конкурентоспособностью по отношению к посто-



ронней микрофлоре, высокой ферментативной активностью и т.п. [2]. Это налагает ограничения на число используемых в промышленности штаммов и ставит перед исследователями задачи их совершенствования. Кроме того, такие микробные ассоциации, включающие большое число видов, нестабильны и ими трудно пользоваться. Следовательно, актуальна задача комбинирования свойств разных молочнокислых стрептококков в одной или небольшом количестве клеток. Это возможно осуществить с помощью системы генетического обмена.

Генетика молочнокислых стрептококков начала развиваться в 80-ых годах нашего столетия и по сравнению с генетикой других хозяйственно важных бактерий находится в состоянии зарождения. Тем не менее известно, что молочнокислые стрептококки обладают рядом уникальных особенностей: очень большое число детерминантов, определяющих хозяйственно важные признаки, располагаются у них на плаزمидях - небольших кольцевых молекулах ДНК, способных к автономной репликации и часто к переносу из клетки в клетку [3,4].

Такая особенность исследуемых бактерий послужила основанием для попытки разработать конъюгационную систему генетического обмена между изогенными штаммами молочнокислых стрептококков. Работа включала 3 этапа:

- создание системы маркированных реципиентных штаммов, которые должны обладать двумя неперенными свойствами: способностью воспринимать генетический материал и содержать признаки (маркеры), по которым можно вести отбор (селекцию) гибридных клеток (вариантов);
- подбор донорских штаммов, способных осуществлять конъюгационный перенос генетического материала в соответствующие реципиентные клетки;
- отработка условий конъюгации с целью получения наибольшей эффективности генетического транспорта.

Для осуществления первого этапа работы были отработаны условия мутагенеза с использованием нитрозогуанидина (НГ) и ультрафиолетового излучения (УФ), а также условия элиминации плазмид акридиновым оранжевым (АО) и акрифлавином (АФ). На рис. 1 и 2 представлены кривые выживаемости клеток в зависимости от дозы мутагенного фактора, которые позволяют определить длительность УФ- и НГ-обработки бактерий в определенных условиях, обеспечивающую наиболее эффективный мутагенез. Для УФ-мутагенеза - это 100 секунд (расстояние до источника облучения 40 см). Выживаемость бактерий лактококков составляет около 1%, и наблюдается наибольшая частота появления мутантных клеток (около  $10^{-5}$ ). Для НГ-мутагенеза оптимальными оказались следующие ус-



ловия: цитратный буфер (рН 5,8) в качестве среды, где велась обработка; концентрация НГ 100 мкг/мл; температура обработки 34°С; длительность воздействия мутагена 30 мин. При этом выживаемость бактерий снизилась до 40%, а эффективность мутагенеза приблизилась к величине  $10^{-4}$ .

С помощью элиминации удалось обеспечить получение вариантов стрептококков, не способных сбраживать лактозу, которые, предположительно, должны были утратить самую крупную (~ 80 МДа) плазмиду, содержащую Lac-оперон. Отбор таких клонов вели на специально модифицированной дифференциально-диагностической среде ЕМВ после обработки клеток АО либо АФ.

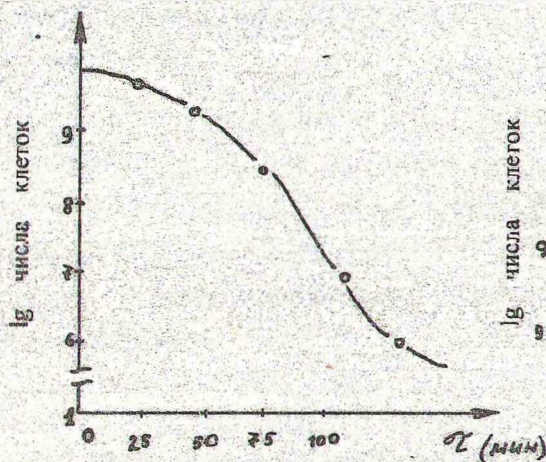


Рис. 1. УФ-мутагенез  
*Str. lactis* 57-3  
○ выживаемость клеток

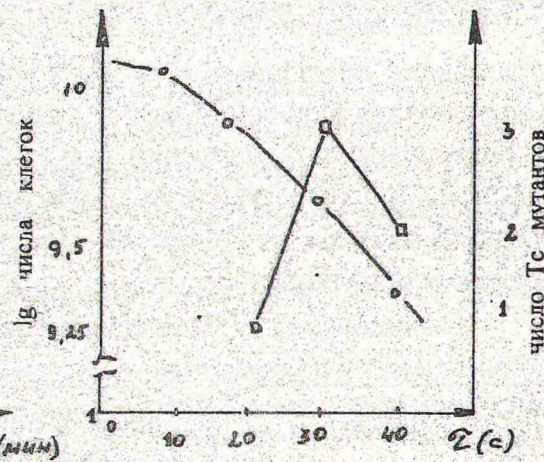


Рис. 2. НГ-мутагенез  
*Str. cremoris* 9-2  
□ число мутантов

В результате экспериментов по мутагенезу, элиминации плазмид, определения питательных потребностей создана коллекция культур для двух видов молочнокислых стрептококков: *Str. lactis* и *Str. cremoris*, содержащая порядка 50-ти маркированных штаммов. Полученные штаммы отличались зависимостью по нескольким факторам роста (аминокислоты и витамины), по способности утилизировать в качестве единственного источника углерода лактозу и по устойчивости к четырем антибиотикам: ампициллину (25 мкг/мл), канамицину (50 мкг/мл), тетрациклину (10 мкг/мл), стрептомицину (100 мкг/мл).

Второй этап исследования - подбор конъюгирующих пар - осуществляли с использованием оригинальной методики скрещивания в репликах, которая была специально адаптирована для данных бактерий. При этом скрещивающиеся партнеры образовывали на агаризованной селективной



среде визуально различимые "пятна", которые состояли из клеток трансконъюгантов. Таким способом удалось подобрать донорские бактерии, способные конъюгировать с полимаркированными реципиентными клетками, полученными на первом этапе исследования.

Последний этап работы заключался в оптимизации условий конъюгации подобранных донорских и реципиентных пар. Выяснилось, что конъюгационные скрещивания в жидкой среде неэффективны: в этих условиях не удалось получить трансконъюганты ни по одному из маркеров. Более результативным оказалось скрещивание на мембранных фильтрах, помещенных на поверхность агаризованной полноценной среды специально подобранного состава. Донорские и реципиентные клетки, взятые для конъюгации, находились в средней логарифмической фазе роста. Использовали гущенные суспензии клеток партнеров:  $10^8$  -  $10^9$  кл/мл. Скрещивание длилось 16 часов. Отбор трансконъюгантов вели по лактозе, а контрselection донорских бактерий осуществляли тетрациклином ( $10^4$  мкг/мл). При таких условиях эффективность переноса детерминанты утилизации лактозы из донорских в реципиентные клетки достигала  $10^{-6}$  на клетку донора (таблица).

Скрещивание: ♂ *Str. cremoris* 10-2 x ♀ *Str. cremoris* 9-2 Lac<sup>-</sup> Tc<sup>r</sup>

Среда	Смесь ♂ и ♀ до скрещивания (кл/мл)	Смыв с фильтра через 16 ч (кл/мл)
MM9 Lac (синтетическая лактозосолевая среда)	$1,1 \cdot 10^7$	
MM9 Lac Tc	0	$8,2 \cdot 10^1$

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. -М.: Наука, 1976.
2. Богданов В.М. Бактериальные закваски для производства молочных продуктов. -М.: Пищепромиздат, 1956.
3. McKay L.L., Baldwin K.A., Efstathion J.D.//Appl. Environ. Microbiol. -1976. -V.32. -N1. -P.45-52.
4. Anderson D.G., Togami H., Tayama K. et al.//Agric. Biol. Chem. -1989. -V.53. -N 9. -P.2435-2440.