

УДК 579.8:576.8

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

СЛИЯНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ ЛАКТОКОККОВ С ТЕРМОИНАКТИВАЦИЕЙ ПРОТОПЛАСТОВ ОДНОГО ИЗ РОДИТЕЛЬСКИХ ШТАММОВ

The method of protoplast fusion with thermal inactivation of one of parents strains is developed. The optimum conditions of process thermal inactivation are picked up.

Одним из наиболее перспективных направлений в селекции заквасочных штаммов для производства молочных продуктов являются генноинженерные работы [1-3]. Из четырех известных у бактерий способов обмена генетической информацией слияние протопластов имеет особое значение, т.к. позволяет объединять не только геномы, но и цитоплазмы клеток, принадлежащих не только к одному, но и к разным видам, родам и семействам микроорганизмов.

При слиянии протопластов объединяются полные геномы двух или даже большего количества клеток, в результате чего образующееся рекомбинантное потомство может наследовать признаки более чем двух родителей [4]. Данное явление может оказаться полезным при конструировании новых штаммов лактококков, используемых в качестве заквасок. При этом появляется возможность уменьшить количество штаммов и видов микроорганизмов в закваске и при этом сохранить качество конечного продукта.

Методика получения рекомбинантов с помощью метода слияния протопластов включает следующие основные этапы: установление не менее двух отличительных селективных признаков родительских штаммов по физиолого-биохимическим свойствам, получение протопластов, собственно слияние протопластов, регенерация клеточной стенки, отбор фузантов – продуктов слияния протопластов.

Ранее нами был проведен ряд экспериментов по оптимизации условий получения протопластов заквасочных штаммов лактококков, отработаны параметры их эффективного слияния и регенерации в исходные клеточные формы.

Зачастую при характеристике имеющихся штаммов лактококков, которые в большинстве случаев являются полиауксотрофными, выявленных различий их свойств оказывается недостаточно для осуществления селекции при генетическом обмене. В результате возникает необходимость получать дополнительные отличия у данных штаммов, используя методы индуцированного мутагенеза и элиминации плазмид. Этот процесс отнимает много времени, и, кроме того, в геномах обрабатываемых клеток могут возникать неконтролируемые мутации.

Целью настоящих исследований является разработка метода слияния протопластов лактококков с использованием процесса термоинактивации протопластов одного из родительских штаммов.

Для выполнения работы выбрано 2 штамма лактококков, отличающихся устойчивостью к одному и тому же антибиотику – рифампицину. Штамм, резистентный к рифампицину, был получен нами экспериментально. Клетки этого штамма должны были выступать в качестве донора генетического материала в процессе слияния протопластов.

Протопласты штамма *L.lactis* subsp.*lactis* var.*diacetylactis* 595/1-R, резистентного к рифампицину, планировалось подвергнуть термоинактивации и отбор фузантов вести только по одному селективному признаку – устойчивости к рифампицину.

Подготовительным этапом для этой работы служил подбор условий термоинактивации протопластов *L.lactis subsp.lactis var.diacetilactis* 595/1- R. При этом учитывалось, что температура выше 50°C может приводить к необратимой инактивации протопластов лактококков, в то время как ДНК при термообработке свыше 70°C может утратить свою нативность. Принимая во внимание эти условия, выбирали оптимальную температуру процесса термоинактивации в интервале температур от 50 до 65°C (рис. 1). Длительность термообработки при каждой температуре составляла 20 мин.

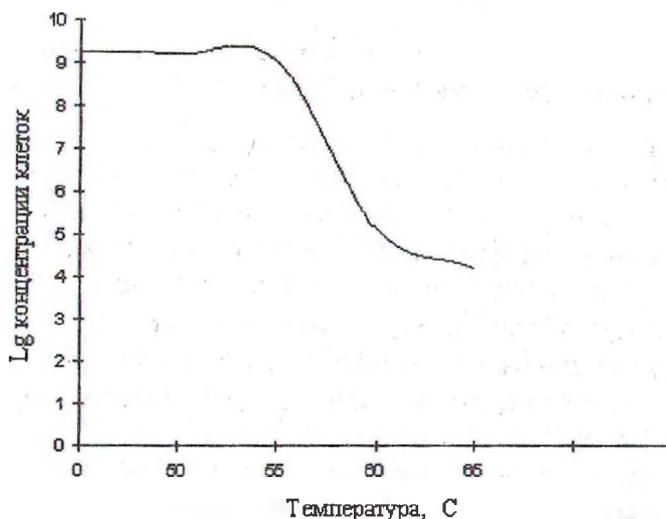


Рис. 1. Влияние температуры обработки на выживаемость протопластов

Из представленных результатов видно, что при увеличении температуры обработки от 55 до 65°C выживаемость протопластов снижается, однако не достигает нуля. Поэтому данные условия нельзя использовать для стадии термоинактивации протопластов одного из родительских штаммов при их слиянии. Следует отметить, что температура 65°C является критической (т.е. при ее повышении появляется риск нарушения свойств ДНК), поэтому для достижения эффекта полной инактивации протопластов в последующих экспериментах варьировали длительность термообработки при температуре 60°C, которая позволяет сохранить нативность ДНК. Зависимость выживаемости протопластов от длительности процедуры термоинактивации представлены в табл. 1 и на рис. 2.

Таблица 1

Выживаемость протопластов при термообработке с варьированием длительности обработки

Длительность, мин	Концентрация выживших клеток, кл./мл	Показатели процесса протопластирования
30	$5,6 \cdot 10^4$	$K_{исх} = 5,4 \cdot 10^9$
45	$4,1 \cdot 10^3$	$K_{осм} = 3,1 \cdot 10^7$
60	$5,5 \cdot 10^2$	
90	$7,0 \cdot 10^1$	$K_{рев} = 1,1 \cdot 10^9$



Рис. 2. Влияние длительности термообработки на выживаемость протопластов лактококков

Из представленных результатов видно, что при увеличении длительности термообработки количество жизнеспособных протопластов, способных ревертировать к клеточному состоянию, снижается и достигает наименьшего значения при длительности 90 мин. Этот режим (температура 60°C, длительность обработки 90 мин) выбран в качестве оптимального. Несмотря на то что при этих условиях сохраняется некоторое количество жизнеспособных протопластов ($7,0 \cdot 10^1$ кл./мл), данный режим можно использовать в методе слияния протопластов с термоинактивацией одного из родительских типов, поскольку число протопластов, участвующих в формировании фузантов, как минимум в 100 раз превосходит это количество.

В последующих экспериментах определялась возможность использования инактивированных термообработкой в подобранном режиме протопластов *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* 595\1-R (Rif^r) в качестве доноров генетического материала при слиянии с жизнеспособными протопластами *L. lactis* subsp. *lactis* l4 (Km^r).

Термообработку осуществляли после отмывки протопластов от лизоцима, а затем инактивированные протопласты объединяли с протопластами другого родительского штамма в присутствии ПЭГ. Высев смеси протопластов осуществляли в слой полужидкой гипертонической селективной среды, содержащей рифампицин в концентрации 50 мкг/мл (табл. 2)

Таблица 2

Параметры слияния протопластов бактерий

Бактерии	Концентрация клеток, кл./мл	ЭЦ, %	ЭРЦ, %	ЭСЦ, кл/кл
<i>L. lactis</i> L4 (Km ^r)	$K_{исх} = 6,7 \cdot 10^8$ $K_{осм} = 3,1 \cdot 10^6$ $K_{рев} = 1,2 \cdot 10^7$	99,53	1,33	-
<i>L. diacetylactis</i> 595/1-R (Rif)	$K_{исх} = 3,6 \cdot 10^9$ $K_{осм} = 1,8 \cdot 10^7$	99,49	-	-
Фузанты L4×595/1-R	$K_{эф} = 7,5 \cdot 10^3$	-	-	$0,7 \cdot 10^{-3}$

Как следует из представленных данных, использование в ходе слияния протопластов в качестве доноров генетической информации инактивированных тепловой обработкой протопластов лактококков позволяет получить достаточно высокий выход фузантов – $0,7 \cdot 10^{-3}$ клеток на клетку ревертантов реципиентного штамма, или 0,07%. Эта эффективность слияния протопластов сопоставима с лучшими результатами аналогичных экспериментов, описанными в литературе, – 0,1% [5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Gasson M.J., Anderson P.H. Transductional evidence for plasmid linkage of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2 // FEMS Microb. Letters. – 1985. – V. 30. – № 1. – P. 193-196.
2. Kondo J.K., McKey L.L. Plasmid distribution in lactis streptococci // Appl. Environ. Microbiol. – 1984. – № 2. – P. 252 - 259.
3. Vossen J.M.M., Kok J., Venema G. Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactis acid) streptococci // Appl. Environ. Microbiol. – 1985. – V. 50. – № 2. – P. 540-542.
4. Яковенко К.Н., Троицкий Н.А. Протопласты микроорганизмов. Мн.: Наука и техника, 1985. – С. 115-136.
5. Стенько А.С. Протопласты как модель генетических исследований у микроорганизмов // Молекул. биология. – 1982. – Вып. 32. – С. 7-16.

УДК 547.722'775'778.2

Н.М. Кузьменок, доцент; С.Г. Михаленок, ассистент;
М.А. Кушнер, ст. преподаватель; А.М. Звонок, профессор

1,3-ДИПОЛЯРНОЕ ЦИКЛОПРИСОЕДИНЕНИЕ ДИАЗОУКСУСНОГО ЭФИРА К НЕНАСЫЩЕННОМУ ЭПОКСИКЕТОНАМ

4-Aryl-5-carbethoxy-3-(2-methyl-2,3-epoxypropionyl)-2-pyrazolines as diastereomeric mixtures were obtained by cycloaddition diazoacetic ester to unsaturated epoxy ketones. For the first time the products of intermolecular rearrangement were isolated by column chromatography of reaction mixtures.

Кросс-сопряженные эпоксипиразолинилкетоны являются удобными синтонами для синтеза 4-оксозамещенных пирролидино[1,2-*b*]пиразолов, оксигенированных производных природных алкалоидов [1-3]. С целью расширения ассортимента исходных субстратов для получения карбэтоксизамещенных пирролидино[1,2-*b*]пиразолов было исследовано циклоприсоединение диазоуксусного эфира к ненасыщенным эпоксикетонам.

Установлено, что нагревание β -арилакрилоилоксиранов **1а-н** с диазоуксусным эфиром в диоксане в течение 7-12 ч приводит с выходом 25-72 % к смеси двух диастереомерных 4-арил-5-карбэтокси-3-[(2-*R*3)-(3-*R*1)-(3-*R*2)-2,3-эпоксиалканоил]-2-пиразолинов **2а,б-14а,б** (табл. 1). Хроматографическое разделение реакционных смесей соединений **1а-г** с диазоуксусным эфиром позволило выделить с выходом 25-28 %, кроме этилпиразолинкарбоксилатов **2а,б-5а,б**, соединения **15-18**, которым на основании спектральных данных приписана структура этил-4-арил-3(5)-(3-гидрокси-2-метилпропионил)пиразол-5(3)-карбоксилатов или региоизомерных этил-5(3)-арил-4-(3-гидрокси-2-метилпропионил)пиразол-3(5)-карбоксилатов. Образование соответствующих пиразолов было зарегистрировано с помощью тонкослойной хроматографии и в случае остальных эпоксиенонов, однако эти смеси не были подвергнуты хроматографическому разделению. Строение полученных соединений **2а,б-18** подтверждено данными элементного анализа и спектрально. Так, в ИК-спектрах соединений **2а,б-14а** присутствуют полосы валентных колебаний С=О и С=N связей в области 1660 и 1650 см⁻¹ [4], а поглощение валентных колебаний С=О связи сложноэфирной группы расположено в области 1740 см⁻¹. Полоса валентных колебаний NH группы пиразолинового цикла на-