

П. Н. Дімітрова

## ОТРИМАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ І ЇХ РЕГЕНЕРАЦІЯ ІЗ PROPIONIBACTERIUM SHERMANII — ПРОДУЦЕНТА ВІТАМІНУ В<sub>12</sub>

Розроблено оптимальні умови для максимального виходу протопластів із *Pr. shermanii*. Досліджено ефективність протопластування і розмір протопластів за різного часу і величини впливу лізоцима на *Pr. shermanii*. Показано дію різних концентрацій сахарози і желатину в регенераційному агарі. Відпрацьовано метод посіву протопластів і вивчено залежність їх регенерації від терміну обробки клітин лізоцимом.

**Вступ.** На сьогодні існує досить багато методів отримання і регенерації протопластів із різних видів мікроорганізмів [1, 3—6, 8—10, 12]. Було досліджено і опубліковано способи одержання сферопластів *Pr. shermanii* [11]. Так, уже отримують протопласти *Pr. freudenreichii sub. shermanii* МУ-512 — як моделі для вивчення поглинання нуклеотидної частини молекули вітаміну В<sub>12</sub> [3]. Авторами роботи [7] започатковано розробки генетичних обмінних систем по отриманню та регенерації протопластів *Propionibacterium*.

Метою цього повідомлення є підбір оптимальних умов утворення і регенерації протопластів пропіоновокислих бактерій *Pr. shermanii* — продуцентів вітаміну В<sub>12</sub>.

**Матеріали і методи.** Бактерійні штами, середовища. В експериментах використано мутантні штами *Pr. shermanii* П-8 і П-10, отримані шляхом поступового відбору музейної культури *Pr. shermanii* Д583 і її індукованого мутагенезу. Обидва штами характеризуються підвищеним синтезом вітаміну В<sub>12</sub>.

Всі використані харчові середовища стерилізували вологим паром під тиском при 121 °С протягом 15 хвилин. Бактерійні культури розвивалися в рідкому середовищі наступного складу (%): глюкоза — 1; гідролізат казеїну — 0,1; Vacto-Tripton — 0,15; дріжджовий екстракт — 0,5; біотин — 0,00003; пантотенат кальцію — 0,00004; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,16; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> — 0,16; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O — 0,04; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,001; CoCl<sub>2</sub> — 0,0012. Агаризоване рідке середовище готували з рідкого з домішкою 1 % агару, а густе харчове середовище — з домішкою 2 % агару. Склад регенераційного агару подібний до рідкого середовища, але з домішкою 0,5 М сахарози і 2,5 % желатину. Склад м'якого регенераційного агару відрізняється від вищесписаного лише за вмістом агару, який складає 0,5 %.

З метою підрахування початкового числа колоній, а також клітин, що вижили після лізоцимної обробки, готували середовище наступного складу: хотингеровий бульйон, 0,6 % екстракту кукурудзи, 2 % агару. При протопластуванні використовували буферне середовище, яке містило 0,5 М сахарозу, 100 мМ HCl і 10 мМ MgCl<sub>2</sub>. Лізоцим додавали до клітинної суспензії безпосередньо в концентрації 5, 10, 20, 30 мг/см<sup>3</sup>.

**Отримання протопластів та їх регенерація.** Клітинну культуру *Pr. shermanii* інкубували в рідкому середовищі при 30 °С до середини експоненційної фази росту. За цей період культуральне середовище досягало оптичної густини  $D=0,16-0,20$  ( $\lambda=570$  нм, товщина кювети 10 мм). Клітини відділяли центрифугуванням при

4000 об/хв протягом 5 хв, далі промивали два рази і повторну суспензію готували в протопластовому буфері. Для проби використовували частину клітинної суспензії і з неї готували десятикратні розбавлення. Посів у чашки Петрі здійснювали на густе харчове середовище, і після пророщення колоній їй підраховували. Потім, знаючи початкову кількість клітин в суспензії, додавали лізоцим у концентраціях 5, 10, 20 і 30 мг/см<sup>3</sup> і інкубували при 30 °С. Протягом 10, 15, 30 і 90 хв оброблені лізоцимом клітини відділяли центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 5 хв при кімнатній температурі. Супернатантну рідину обережно відділяли, клітини промивали двократно, і повторну суспензію готували

Таблиця 1

Утворення протопластів із *Pr. shermanii* П-8 під впливом лізоцима

Концентрація лізоцима, мг/см <sup>3</sup>	Утворення протопластів (%) за різних експозицій часу, хв		
	10	15	30
0	0	0	0
5	24,2	43,5	51,4
10	67,0	84,8	88,6
20	87,0	99,0	99,7
30	95,0	99,1	99,8

в протопластовому буфері. Для підрахунку клітин, які не утворювали протопластів, повторну суспензію десятикратно розбавляли і клітини розсівали в чашки Петрі на густе харчове середовище. Для регенерації протопластів мікроорганізми розсівали на регенераційному агарі і ще раз покривали м'яким регенераційним агаром.

Всі посіви інкубували при 30 °С в анаеростаті. Видимі колонії на регенераційному агарі спостерігалися на 12—14-ту добу і їх кількісно враховували.

**Результати і обговорення.** Пропіоновокислі бактерії відрізнялися чутливістю до лізоцима і це визначило необхідність варіювання лізоцимного впливу. Ефективність протопластування клітин *Pr. shermanii* П-8 і розмір протопластів досліджували при експозиції з лізоцимом за різних умов. Різниця між колоніями на агаровому середовищі з відмінними культуральними ознаками, взятими до обробки лізоцимом і після неї, була віднесена за рахунок осмотично нестабільних клітин в популяції. Клітинні стінки штама *Pr. shermanii* П-8 лізували при внесенні його в гіпотонічний розчин. Результати досліджень представлено в табл. 1.

З цієї таблиці видно, що із збільшенням концентрації лізоцима ефективність перетворення оброблених клітин в протопласти збільшується. Самий високий процент протопластів отримували протягом перших 15 хв, після чого особливих кількісних змін не помічено. Термін дії лізоцима (30 хв) і використання його високих концентрацій (30 мг/см<sup>3</sup>) не показали відчутної різниці в отриманні протопластів.

Відомо, що ростова фаза клітин впливає на ефективність одержання протопластів. Для перевірки цього на різних етапах росту була проведена стандартна протопластоформуєча процедура. Так, процент перетворення клітин в протопласти був самим високим в середині логарифмічної фази росту у *Pr. shermanii* П-8 (99,0—99,3 %). На початку стаціонарної фази досягнуто протопластування 55,0—60,0 %. Ці результати збігаються з даними досліджень при отриманні протопластів у *Brevibacterium* [2, 5], *Pr. freudenreichii* [7], *Streptococcus* [8], *Clostridium* [8].

Досліджували також вплив температурних умов інкубації на утворення протопластів у *Pr. shermanii* П-8. Так, клітини експонували з лізоцимом у концентрації 20 мг/см<sup>3</sup> протягом 15 хв при 30, 34 і 37 °С, але при цьому не спостерігали різниці в утворенні протопластів.

Після стабілізації умов формування протопластів *Pr. shermanii* П-8 вивчали умови, за яких відбувається поновлення у них клітинних стінок. Було досліджено склад регенераційного середовища, метод розсіву протопластів для отримання регенерованих клітин і термін впливу на них лізоцима. Процес реверсії суттєво залежить від складу середовища. При регенерації протопластів бактеріальних клітин у таких родів, як *Streptomyces*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, про використання середовищ

для них повідомлялося іншими авторами [7], але ці середовища не були пристосовані до регенерації протопластів бактерій роду *Propionibacterium*. В наших експериментах використано агарове рідке середовище, багате на амінокислоти, вітаміни і мікроелементи. Результати досліджень представлено в табл. 2, звідки видно, що самий високий процент регенеруючої частоти було отримано на агаровому середовищі з додаванням 0,5 М сахарози і 2 %-го желатину. Концентрації осмотичних стабілізаторів, вищі за вказані, призводять до зниження частоти регенерації протопластів у *Pr. shermanii* П-8.

Таблиця 2

Вплив концентрацій сахарози і желатину на регенерацію протопластів *Pr. shermanii* П-8 при культивуванні на регенераційному агарі

Концентрація осмотичних стабілізаторів	Регенеруюча частота, %			Концентрація осмотичних стабілізаторів	Регенеруюча частота, %		
	Номер досліду				Номер досліду		
	1	2	3		1	2	3
Сахароза, моль				Желатин, %			
0	—	—	—	0	—	—	—
0,3	11,0	14,0	12,3	0,5	10,0	13,0	11,3
0,4	32,8	33,0	30,1	1,0	27,0	21,0	23,0
0,5	41,0	43,0	41,8	2,0	48,0	46,8	52,0
0,6	39,4	40,2	38,0	2,5	42,0	38,0	40,0
				3,0	28,0	21,0	24,7

Перевірено два методи посіву протопластів для регенерації. При однопластовому методі протопласти розсівали на поверхні регенераційного агару, при цьому частота регенерації складала лише 1—4 %. Колонії, які формувалися на поверхні регенераційного агару, були зовсім невеликими, і їх число не збільшувалося при подальшій інкубації (20—30 діб). Частота регенерації значно підвищувалася з використанням двопластового методу, заснованого на тому, що протопласти, котрі знаходилися на поверхні регенераційного агару, покривали м'яким регенераційним агаром. Колонії, які з'являлися, досягали нормальних розмірів на 12—14-ту добу, при пересіві їх на рідке середовище вони показувати нормальний ріст.

Вивчали і вплив терміну дії лізоцима на регенеруючу частоту клітин. Так, бактерії *Pr. shermanii* П-8 експонували з лізоцимом (20 мг/см<sup>3</sup>) протягом 15, 60 і 90 хв. Результати цих експериментів представлено в табл. 3.

Найкращу регенеруючу частоту протопластів отримано при обробці лізоцимом клітин *Pr. shermanii* П-8 протягом 15 хв. Збільшення часу обробки клітин лізоцимом призводить до зменшення регенеруючої частоти.

Результати експериментів дозволяють запропонувати метод отримання і регенерації протопластів *Pr. shermanii* — продуцентів вітаміну В<sub>12</sub>. Він придатний при трансформації протопластів пропіоновокислих бактерій. Цей метод також можна використовувати для введення молекул ДНК в клітини при генетичному дослідженні культури *Propionibacterium*, а також для удосконалення штамів цієї промислово важливої групи мікроорганізмів.

Таблиця 3

Вплив лізоцима на регенеруючу частоту протопластів *Pr. shermanii* П-8 залежно від часу обробки

Час обробки лізоцимом, хв	Регенеруюча частота протопластів, %		
	Номер досліду		
	1	2	3
15	53,0	63,0	58,0
60	32,8	33,0	31,0
90	24,0	30,0	26,0

ISOLATION OF PROTOPLASTS AND THEIR REGENERATION  
OF PRODUCER OF VITAMIN B<sub>12</sub>, PROPIONIBACTERIUM SHERMANII

Summary

The optimum conditions for maximum outlet of protoplast from *Propionibacterium shermanii* have been developed. Protoplast production and regeneration in *Propionibacteria* are being discusses in this article.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Абілев С. К. Генетика і генетична інженерія анаеробних бактерій // Генетика промислових мікроорганізмів і біотехнологія.— М.: Наука, 1990.— 275 с.
2. Лівшиць В. А., Штанніков А. В., Жданова Н. І. Отримання генетичних рекомбінантів у *Brevibacterium ammoniagenes* і у *Brevibacterium divaricatum* методом об'єднання протопластів // Генетика.— 1982.— 18, № 10.— С. 1728.
3. Подопрігора О. І., Дацюк Н. М., Виговська Т. В. та ін. Протопласти *Propionibacterium freudenreichii subspecies shermanii* МУ-512 як модель для вивчення поглинання попередників нуклеотидної частини молекули вітаміну В<sub>12</sub> // Мікробіол. журн.— 1990.— 52, № 4.— С. 23.
4. Суденко В. І., Каасніков Е. І. Отримання і регенерація протопластів дріжджів *Rhodospiridium diobovatum* і деяких мутантів // Там же.— 1988.— 50, № 1.— С. 49.
5. Штанніков А. В., Лівшиць В. А., Жданова Н. І. Об'єднання протопластів і генетична рекомбінація у *Corynebacterium glutamicum* і *Brevibacterium flavum* // Генетика.— 1981.— 17, № 8.— С. 1419.
6. Ayala F. J., Kiger J. A. Modern genetics.— New York: The Benjamin Cummings publ. Co., 1988.— 368 p.
7. Glatz B. A., Baehman L. R. Protoplast production and regeneration in *Propionibacteria* // J. Dairy Sci.— 1989.— 72.— P. 2877—2884.
8. Kondo I., McKay L. Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts // Appl. Environ. Microbiol.— 1984.— 48.— P. 1252.
9. Hames B. D., Higging S. J. Transcription and translation.— Oxford: IRL press, 1987.— 399 p.
10. Szent G. S., Cahndar R. Molecular genetics.— San Francisco: Univ. of California, 1981.— 88 p.
11. Sahlstrom S., Espinosa C., Langsrud T. Cell wall membrane and intracellular peptidase activities of *Pr. shermanii* // J. Dairy Sci.— 1989.— 72.— P. 342—350.
12. Industrial microbiology and advent of genetic engineering.— San Francisco: W. H. Frieman and Co., 1984.— 120 p.

Вищий ін-т харчової і смакової промисловості, Пловдив

Одержано 21.03.95