

ПОЛУЧЕНИЕ МУКОИДНЫХ ШТАММОВ У *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* С ПОМОЩЬЮ *p*-ФТОРФЕНИЛАЛАНИНА

Ա.Ա. ԲԱՐՏԵԳՅԱՆ, Ո.Գ. ԳՐԻԳՐՅԱՆ, Ա.Վ. ՄԱՐՄԿՅԱՆ, Գ.Դ. ՕԳԱՆԵՍՅԱՆ

Институт микробиологии НАН Армении, 2201 Абовян, Армения

On solid media *Lactobacillus acidophilus* INMIA-9602 forms plane, crumby colonies. In presence of *p*-fluorophenylalanine (FPA; 1.5×10^{-4} M) the colonies become moderately mucoid. Approximately 15% clones keep their mucoidy through many generations. Fermented milk from mucoid mutants characterized by pleasant taste and stable, dense clot.

Молочнокислые бактерии - внеклеточные полисахариды - мукоидные мутанты - p-фторфенилаланин - Lactobacillus acidophilus

Внеклеточные полисахариды (ВПС), продуцируемые молочнокислыми бактериями (МКБ), предотвращают синерезис при ферментации молока, придают приятный вкус и улучшают текстуру молочных продуктов [4]. Бактериальные штаммы, обильно синтезирующие ВПС, на твердых средах образуют мукоидные (ослизненные) колонии. Синтез ВПС зависит как от генетических, так и от внешних факторов, таких как состав питательных сред, температура, влажность, рН, физиологическое состояние клеточной популяции и др. [2, 5]. Наибольший выход ВПС наблюдается при низких температурах, когда бактериальный рост сильно замедлен [6]. Способные включаться в структуру белков аналоги аминокислот, приводящие к их термолабильности, ранее были использованы для изучения контроля биосинтеза ВПС [7]. В присутствии субингибирующих доз таких аналогов, в частности *p*-фторфенилаланина (ФФА), клетки *Escherichia coli* на синтетической среде образовывали мукоидные колонии. Была показана способность ФФА не только стимулировать биосинтез ВПС, но и индуцировать образование стабильных мукоидных мутантов у *Streptococcus cremoris* [2].

Широко известный лечебно-профилактический кисломолочный продукт "Наринэ" обладает сильно тягучей консистенцией, однако культура *Lactobacillus acidophilus* ИНМИА-9602, служащая закваской для получения этого продукта, не образует слизистых колоний на твердых питательных средах, в том числе приготовленных на молочной основе.

Целью настоящей работы было изучение влияния ФФА на биосинтез ВПС и индукцию мукоидных мутантов у *L. acidophilus* ИНМИА-9602.

Материал и методика. Культуру *L. acidophilus* ИНМИА-9602 получили из РЦДМ, г. Аболян РА. Питательные среды, использованные в работе: LAPT [2], ESM (Enriched skimmed milk) [3] и MIA (Milk indicator agar) [1]. Среда LAPT и ESM при необходимости уплотняли 1,5%-ным агаром. Для индукции мукоидных колоний бульонную культуру высевали на чашки со средами, содержащими различные концентрации ФФА, и инкубировали при разных температурах.

Результаты и обсуждение. *L. acidophilus* ИНМИА-9602 на агаризованных средах образует плоские, рыхлые колонии. Для получения мукоидных мутантов, 12-часовую культуру *L. acidophilus* ИНМИА-9602 гитром $5-8 \times 10^7$ высевали на ФФА, содержащий среды LAPT, ESM и MIA, с таким расчетом, чтобы на чашках выросло не более 50-и колоний, и инкубировали при 28° и 37°. Так как перенос с высокой температуры на более низкую способствует повышению продукции ВПС [5], часть чашек после 5 ч выдерживания при 37° переносили на 28°. Ориентировочные дозы ФФА были взяты из литературы, их меняли с таким расчетом, чтобы они замедляли, а не подавляли рост клеток. Таковыми оказались концентрации $8,0 \times 10^{-5}$ М и $1,5 \times 10^{-4}$ М. Выросшие колонии были подразделены на немуконидные, плоско-рыхлые (ПР), слабомуконидные, гладковыпуклые (ГВ) и умеренно мукоидные (УМ) (табл.).

Таблица. Частота получения мукоидных мутантов *L. acidophilus* ИНМИА-9602 в зависимости от состава питательной среды, температуры и концентрации ФФА

Среды	Концентрация ФФА, М	Количество выросших колоний	Доля ПР, ГВ и УМ колоний, выросших на различных средах и разных температурах, %								
			37°			28°			37° → 28°		
			ПР	ГВ	УМ	ПР	СМ	УМ	ПР	СМ	УМ
LAPT	0	672	100	0	0	100	0	0	100	0	0
	$8,0 \times 10^{-5}$	586	100	0	0	100	0	0	98	2	0
	$1,5 \times 10^{-4}$	644	100	0	0	96	4	0	92	8	0
ESM	0	532	100	0	0	99	1	0	98	2	0
	$8,0 \times 10^{-5}$	618	99	1	0	97	3	0	63	35	0
	$1,5 \times 10^{-4}$	590	98	2	0	79	19	2	49	45	6
MIA	0	623	100	0	0	98	2	0	96	4	0
	$8,0 \times 10^{-5}$	584	97	3	0	95	5	0	40	58	2
	$1,5 \times 10^{-4}$	620	84	16	0	54	40	6	22	63	15

Как видно из табл., на всех средах среднее количество выросших колоний, независимо от температуры и концентрации ФФА, было примерно одинаково, тогда как соотношение ПР, ГВ и УМ колоний сильно варьировало в зависимости от состава питательной среды. Наибольший выход мукоидных мутантов был отмечен на среде MIA, тогда как на среде LAPT, вовсе отсутствовали мукоидные колонии.

Другим важным фактором, влияющим на выход слизистых колоний,

оказалась температура. Так, в отсутствие ФФА все выросшие при обеих температурах колонии в основном были ПР, но при температурном переносе с 37° на 28° на средах ESM и MIA 2-4% становились ГВ. При указанных температурах образования мукоидных колоний без ФФА не наблюдалось. Добавление ФФА приводило к образованию ГВ колоний на средах LAPT, и ESM, а на среде MIA - к образованию также около 2% УМ колоний. Наибольший выход УМ колоний был зафиксирован при концентрации ФФА 1.5×10^{-4} М на среде MIA, около 6% при 28° и более 15% при температурном переносе. Соответственно увеличивался также выход ГВ колоний, до 50%-60%.

Для проверки стабильности мукоидной морфологии колоний отобранные УМ клоны трижды пересевали на исходные среды без ФФА. В этих условиях среди отобранных штаммов более 60% сохраняли мукоидную морфологию. Закваски, приготовленные с использованием мукоидных культур, придавали приятный вкус и улучшали текстуру заквашенного молока. Большинство мутантов обладало более высокой молокоосвертывающей активностью по сравнению с исходной культурой.

Таким образом, было показано, что с помощью *p*-фторфенилаланина у штамма *L. acidophilus* ИНМИА-9602 можно получать стабильные мукоидные клоны, обладающие более высокими технологическими показателями, чем родительский штамм.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Vuyst L., Bart Degeest FEMS Microbiology Reviews, 23, 153-177, 1999.
2. Forsen R., Veli-Mies Häiiva FEMS Microbiology Letters, 70, 2., 409-413, 1981.
3. Gamar-Nourani L., Blondeau K., Simonet M. J. Appl. Microbiology, 85, 4, 664-671, 1998.
4. Grobhen G.J., Smith M.R., Sikkema J., de Bont J.A.M. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 279-285, 1996.
5. Kang S., Markovitz A. J. Bacteriol. 93, 2, 584-591, 1967.
6. Vaningelgem F., Medana Zamsir, Fernanda Mozzi, Tom Adriany, Marc Vancanneyt, Jean Swings, Luc De Vuyst Appl. Environ. Microbiol. 70, 2, 900-912, 2004.
7. Vedamuthu E.R., Neville, J.M. Appl. Environ. Microbiol. 51, 677-682, 1986.

Поступила 17.IV.2007