



## НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ И ВНЕКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА ШТАММАМИ PSEUDOMONAS ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА МИНЕРАЛЬНЫХ СРЕДАХ С ЭТАНОЛОМ

Поиск новых источников белковых веществ, пригодных для пищевых, кормовых или технических целей — актуальный вопрос современности.

Наиболее перспективным источником белка являются микроорганизмы, которые способны значительную часть синтезированного белка выделять в культуральную жидкость. У многих микроорганизмов эта способность зависит от состава питательной среды и условий культивирования. Уже разработан процесс выращивания на углеводородах бактерий, которые выделяют из клетки около 80% белка [1.] Выделяемые белки сравнительно легко получать в чистом виде.

В данной работе исследована способность некоторых штаммов *Pseudomonas* накапливать биомассу и внеклеточный белок на различных минеральных средах с этанолом в качестве основного источника углерода.

### Материал и методика

В работе использованы штаммы *Pseudomonas* (из коллекции Проблемной лаборатории экспериментальной биологии БГУ имени В. И. Ленина), способные синтезировать внеклеточный белок.

Отбор продуцентов внеклеточного белка проводили по методу [2]. Исследуемые культуры (450 штаммов) выращивали на минеральных средах с этанолом, приготовленных по прописи [3] в виде изолированных колоний (по 12 на чашке Петри). Культуры, накапливающие внеклеточный белок на агаризованных средах, тестировали далее на способность выделять белок на жидких средах, состав которых указан в табл. 1.

В качестве органических добавок использовали пептон, молочную сыворотку, кукурузный и дрожжевой экстракты. Добавки стерилизовали отдельно кипячением и перед употреблением вносили в среды, приготовленные по прописи [3], в конечной концентрации 0,2%. Ингибитор синтеза клеточной стенки (пенициллин 10 ед/мл) добавляли спустя 15 ч после культивирования на средах 6 и 3, приготовленных по прописи [1] и [3] соответственно.

Культивирование псевдомонад проводили в колбах объемом 100 мл с 20 мл соответствующей питательной среды в течение 48 ч при 28°С на качалках (120 кач/мин). Инокуломом служила суточная культура, выращенная на той же среде на качалках.

Определение «истинного» внеклеточного белка проводили по методу, описанному в работе [2]. Количество белка, выделяемое псевдомо-

надами в культуральную жидкость, определяли методом Лоури [4], содержание внутриклеточного белка исследуемых культур — методом [5].

Таблица 1

Состав компонентов питательных сред, использованных для культивирования этанолсбраивающих штаммов псевдомонад

Компоненты, г/л	Среды					
	1	2	3	4	5	6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	—	—	—	—	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7	0,7	0,7	1,4	1,4	1,0
NaCl	0,5	—	0,5	—	—	—
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0	1,0	0,5	—	—	—
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,0	1,0	—	3,8	3,8	2,0
$\text{NaNO}_3$	—	4,8	—	—	—	—
KCl	—	0,4	—	—	—	—
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	—	—	4	—	—	—
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	—	—	—	3,5	3,5	—
Мочевина	—	—	—	3,4	3,4	—
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	—	—	—	—	—	5,0
Кукурузный экстракт	—	—	—	—	—	0,02
Дрожжевой экстракт	—	—	—	2,0	—	1,0
Этанол	2,5%	2,5%	2,5%	2,0%	2,0%	2,5%

Примечания. К основному фону среды 5 добавлены микроэлементы, мг/л:  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ —20,0;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —20,0;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ —0,5;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ —0,04;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —0,2;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,8;  $\text{CaCl}_2$ —50,0;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ —0,2; к основному фону среды 6, (в г/л):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,01;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —0,02;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,02. Среды 1—3 приготовлены по прописи [3]; 4,5—[6]; 6—[1].

В табл. 1—4 приведены средние значения из трех повторностей опыта.

### Результаты и их обсуждение

Исследована способность к выделению внеклеточного белка у 450 штаммов *Pseudomonas*. В результате отобрано 10 штаммов, дающих при обработке 5%-ной хлорной кислотой по методу [2] мутные зоны (осадок белка) под колониями ( $D=8-10$  мм). Автолиз колоний не наблюдался. Вероятно, обнаружение белка в среде является следствием выделения белка, синтезированного *de novo* исследуемыми культурами. Для дальнейших исследований отобраны штаммы 249, 278, 366, 22 к и 10 к. У этих культур изучена способность накапливать внеклеточный белок на различных минеральных средах с этанолом в качестве основного источника углерода.

Как видно из табл. 2, исследуемые штаммы псевдомонад накапливают биомассу и выделяют внеклеточный белок на всех пяти средах с этанолом. Наибольшее количество внеклеточного белка в бесклеточной культуральной жидкости обнаружено при выращивании культур на среде 3. Количественное содержание внеклеточного белка при культивировании на этой среде соответствовало 1,35—1,74 мг/мл, а максимальное накопление биомассы отмечено на среде 4 (5 г/л сухого веса).

Некоторыми исследователями [2, 6] показано, что добавка ростовых веществ к среде стимулирует рост и накопление белка микроорганизмами (*Pseudomonas*, *Bacillus*). В условиях нашего эксперимента при

Содержание биомассы и внеклеточного белка  
в культуральной жидкости при выращивании псевдомонад  
на минеральных питательных средах

Штаммы Pse- udomonas	Среды									
	1		2		3		4		5	
	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл								
249	0,320	0,860	0,220	0,130	1,41	1,98	0,290	1,00	0,090	0,150
278	0,590	0,80	0,860	0,340	1,35	0,680	0,430	2,50	0,260	0,290
366	0,540	0,630	0,630	0,280	1,38	0,60	0,430	3,61	0,200	0,280
22к	0,520	1,06	1,11	1,60	1,560	0,781	0,740	2,31	0,460	1,04
10к	1,23	1,40	0,980	0,971	1,742	0,942	1,350	4,52	0,080	0,181

Примечания. Минеральные питательные среды 1—3 приготовлены по прописи [3]; 4 и 5 — [6]. Этанол добавляли в среды непосредственно перед посевом культур. Состав сред приведен в табл. 1. «Белок, мг/мл» — здесь и в табл. 3, 4 означает не только вновь синтезированный клеткой белок, но и другие компоненты клетки, дающие положительную реакцию с реактивом Фолина.

выращивании на среде с органическими добавками, но без этанола, исследуемые культуры практически не накапливали биомассу (не более 0,15 мг/мл) (табл. 3). Небольшое количество белка, обнаруженного в бесклеточной культуральной жидкости, вероятно, является следствием автолиза клеток в отсутствии источника углерода (этанол). Установлено следующее: внесение органических добавок стимулировало накопление биомассы у большинства штаммов (366, 22 к и 10 к); на среде с кукурузным экстрактом количество биомассы было в 2,5—5 раз больше, чем без добавления последнего. При сравнительно хорошем росте культур содержание внеклеточного белка в бесклеточной культуральной жидкости было значительно ниже при выращивании культур на среде с добавками, чем на той же среде с этанолом, но без добавок. Сходные данные получены Udaка Shigezo [2], который показал, что добавление в среду дрожжевого и мясного экстракта стимулирует рост микроорганизмов, но не оказывает действия на выделение белка.

Нами установлено, что внеклеточный белок, накапливаемый псевдомонадами в культуральной жидкости составляет от 28,5 до 62% суммарного белка клетки. Из литературы [1] известно, что доля внеклеточного белка от суммарного белка клетки может составлять более 80%, например, при добавлении в среду (с углеводородами) поверхностно-активных веществ или антибиотиков, повышающих проницаемость клеточной стенки.

Мы изучили также влияние пенициллина на накопление биомассы и внеклеточного белка исследуемыми культурами (табл. 4). Количество внеклеточного белка после добавления пенициллина возрастает примерно в 1,5 раза и во столько же раз снижается содержание биомассы. Это, вероятно, происходит за счет нарушения синтеза клеточных стенок в присутствии пенициллина. В целом содержание внеклеточного белка в бесклеточной культуральной жидкости в два—три раза выше на минеральной среде 3, чем на среде 6. Количество биомассы на обеих средах одинаковое.

Таким образом, нами установлено, что способность накапливать биомассу и внеклеточный белок зависит от состава питательных сред, на которых культивируются псевдомонады.

Наиболее успешно выделение внеклеточного белка идет на минеральной среде 3 с этанолом, а накопление биомассы — на среде 4.

Таблица 3

Содержание биомассы и белка в бесклеточной культуральной жидкости при выращивании псевдомонад на минеральной среде 3 с органическими добавками в концентрации 0,2%

Штаммы Pseudomonas	Среда 3 с этанолом и добавками								Среда 3 с этанолом без добавки	Среда 3 без этанола с добавками								
	пептон		дрожжевой экстракт		молочная сыворотка		кукурузный экстракт			пептон		дрожжевой экстракт		молочная сыворотка		кукурузный экстракт		
	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл		белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	
249	0,680	0,95	0,120	1,34	1,45	сл	0,01	сл	1,10	1,45	0,25	сл	сл	сл	сл	сл	0,05	сл
278	0,75	0,40	0,430	0,63	0,570	0,19	0,06	1,60	1,30	1,630	0,31	сл	0,32	сл	0,10	сл	0,12	сл
366	1,00	1,38	0,520	1,89	0,31	0,64	0,15	1,76	1,35	0,60	0,32	сл	сл	сл	0,11	сл	0,08	сл
22к	1,20	1,56	1,14	1,68	1,23	1,05	0,14	2,97	1,48	0,683	0,39	сл	0,26	сл	0,120	0,9	сл	0,13
10к	1,22	1,07	1,32	0,77	1,29	1,06	0,06	3,96	1,59	0,790	0,36	сл	0,30	сл	0,14	0,1	сл	0,15

Таблица 4

Содержание биомассы и белка в бесклеточной культуральной жидкости при выращивании псевдомонад на питательных средах с пенициллином

Штаммы Pseudomonas	Среда 6						Среда 3					
	без пенициллина			с пенициллином			без пенициллина			с пенициллином		
	«истинный белок», мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	«истинный белок», мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	«истинный белок», мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл	«истинный белок», мг/мл	белок, мг/мл	биомасса сухой вес, мг/мл
366	0,13	0,20	0,35	0,18	0,24	0,28	0,28	0,40	0,41	0,39	0,52	0,39
22к	0,15	0,31	0,93	0,23	0,74	0,60	0,49	1,14	1,21	0,66	1,62	0,77
10к	0,22	0,37	0,68	0,32	0,78	0,46	0,58	1,29	1,10	0,76	1,71	0,95

Примечание. «Истинный белок» без примесей компонентов, дающих положительную реакцию с реактивом Фолина.

Добавление в среду пептона, молочной сыворотки, кукурузного и дрожжевого экстрактов (в 0,2%-ной концентрации) не увеличивает выхода внеклеточного белка, но способствует большему накоплению биомассы псевдомонадами.

Некоторые штаммы (366, 22к, 278) выделяют в среду до 60% общего белка, синтезируемого клеткой. Содержание внеклеточного белка в бесклеточной культуральной жидкости может быть значительно повышено путем внесения в среду веществ (пенициллин), влияющих на проницаемость клеточной стенки бактерий.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тапак К. (Япония). Пат. 3709783 (США).
2. Uda K. Shigeso.— *Amino Acid and Nucl. Acid.*, 1976, № 33, p. 71.
3. Квасников Е. И., Исакова Д. М., Киприанова О. Н. и др.— *Микробиологический ж.*, 1974, т. 36, вып. 6, с. 683.
4. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Farr A. L., Randall R. I.— *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, p. 265.
5. Термхитарова Н. Г., Шульга А. В.— *Прикладная биохим. и микробиол.*, 1974, т. 10, с. 6, 928.
6. Идельчик М. С., Горнак Н. М.— В сб.: *Микроорганизмы в промышленности и сельском хозяйстве*. Минск, 1975, с. 42.

Поступила в редакцию  
20.02.79.

Кафедра микробиологии

УДК 577.472+578.08

Н. М. КРЮЧКОВА, В. Х. РЫБАК

### ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ РАЗВИТИЯ ДАФНИИ ПРИ РАЗНЫХ ПИЩЕВЫХ УСЛОВИЯХ

До настоящего времени вопрос о том, в какой мере темп развития планктонных животных зависит от трофических условий, окончательно не выяснен. Согласно одним данным [1], в условиях лабораторного выращивания ветвистоусых ракообразных концентрация пищи заметно влияет на продолжительность их развития, по другим [2] — при удовлетворении пищевых потребностей прослеживается лишь тенденция к сокращению продолжительности постэмбрионального развития планктонных раков ( $D_n$ ) с улучшением пищевых условий.

Задачей настоящего исследования было выяснить особенности роста *Daphnia magna* Straus, кормом для которой служила зеленая водоросль *Chlamydomonas eugametos* Моев. при разных концентрациях последней: 0,02; 0,17; 0,65; 1,16; 2,70; 6,11; 10,5 мг/л сухого веса (по 9 параллельных при каждой концентрации). Сухой вес клетки, определенный экспериментально, составлял  $261 \cdot 10^{-9}$  мг, калорийность — 4,5 кал/мг сухого веса.

Однодневных дафний по одному экземпляру помещали в склянки (объем 30 мл), укрепленные на вращающемся диске барабана (скорость вращения 16 об/ч) для предотвращения оседания водорослей на дно сосуда. Опыты проводили в темной комнате. Ежедневно корм меняли; животных измеряли, под микроскопом МБС-1; отмечали появление выводковой камеры и яиц; появившуюся молодь отсаживали. Средняя температура опыта 19,8°С (18—21°С), продолжительность 18—21 день.

При самых низких концентрациях водорослей (0,02 и 0,17 мг/л) уже на вторые-третьи сутки опыта дафнии начали отставать в росте. На протяжении всей экспозиции они были прозрачны, малоактивны, часто с темными включениями в области кишечника. В последние дни жизни (18—20-е сутки) рачки опускались на дно склянки. Лишь на 20-е сутки у дафний появлялись выводковые камеры (см. таблицу), и животные погибали, так и не дав яиц.