

УДК579.234:871.1.

Фуртат І. М., Михальський Л. О., Ногіна Т. М., Дем'яненко Ф. П.

СПЕКТРИ ПОВЕРХНЕВИХ БІЛКІВ *Corynebacterium glutamicum* НА РІЗНИХ ФАЗАХ РОЗВИТКУ КУЛЬТУРИ

Досліджено спектр поверхневих білків клітинної стінки штамів Corynebacterium glutamicum 22Л, E531 і ВНИИгенетика-90 на різних фазах розвитку культури. Показано, що в процесі росту C. glutamicum відбуваються певні зміни в складі поверхневих білків. Охарактеризовано білки, що виявляються тільки в окремих штамів або у певній фазі розвитку культур. Описано спектр білків, які містяться у всіх досліджених зразках незалежно від штаму та віку культури. Препарати всіх досліджених культур характеризуються наявністю найбільш інтенсивно виражених білків з M_m 85,0; 62,0; 39,0; 16,0 і 13,5 кДа, які можна розглядати як загальні переважаючі білки вказаних штамів. Препарати 24 год культур, які найбільш повно відображають індивідуальність білкових спектрів досліджених штамів, рекомендовано використовувати для порівняльних досліджень складу поверхневих білків різних видів коринебактерій.

Відомо, що склад поверхневих біополімерів клітинної стінки бактерій може залежати від умов культивування та стадії розвитку культури. Зміни в експресії поверхневих білків на різних

Фуртат І. М., Михальський Л. О., Ногіна Т. М., Дем'яненко Ф. П., 2002

фазах розвитку та міжштамові відмінності в їх спектрах описані, зокрема, у представників родів *Corynebacterium*, *Frankia* та *Staphylococcus* [1-3]. Одними із найрозповсюдженіших серед поверхневих протеїнів бактеріальних клітин є білки, які формують поверхневі S-шари. У більшості бактерій синтез та/або транслокація окремих субодиниць S-шарів звичайно припиняється з того моменту, коли поверхня клітин повністю вкривається білком. Вивільнення вказаних білків у культуральне середовище властиве лише небагатьом мікроорганізмам [4]. У окремих представників виду *C. glutamicum* поверхневі білки S-шарів, які звичайно асоційовані з клітинною стінкою, у значній кількості виявляли також і у культуральній рідині. Саме тому, на думку багатьох дослідників, *C. glutamicum* - ідеальна експериментальна модель для вивчення динаміки синтезу та секреції поверхневих білків, оскільки у цих бактерій відбувається їх безперервний синтез в клітинах і вивільнення у навколишнє середовище [1]. Метою даної роботи було порівняльне дослідження складу поверхневих білків промислових штамів *Corynebacterium glutamicum* на різних фазах розвитку культури.

Об'єктами досліджень були продуценти лізину *Corynebacterium glutamicum* 22Л, Е531 і *ВНИИгенетика-90*. Поверхневі білки клітинної стінки (КС) одержували з інтактних клітин 3, 12, 24, 48 та 72 год культур, які представляли всі фази розвитку *C. glutamicum* [5]. Екстракцію поверхневих біополімерів, електрофорез зразків у системі ПААГ-ДСН та аналіз електрофореграм проводили так само, як описано раніше [6]. Порівняльний аналіз електрофореграм штамів 22Л, Е531 та *ВНИИгенетика-90* проводили за найбільш інтенсивно вираженими (мажорними) білками, які реєстрували у гелях, зафарбованих кумасі блакитним R-250 («Serva», Німеччина). Загальний склад препаратів, наявність міnorних компонентів та природу біополімерів додатково вивчали, застосовуючи нейтральне фарбування нітратом срібла («Sigma», США) [7]. Для визначення молекулярних мас (M_m) використовували комерційний набір маркерних білків LMW («Pharmacia», Швеція): фосфорилазу В (97,4 кДа), альбумін (66,2 кДа), овальбумін (45,0 кДа), карбонатангідразу (31,0 кДа), інгібітор трипсину (21,5 кДа), лізоцим (14,4 кДа). -

За даними літератури, у різних штамів *C. glutamicum* (*C. melassecola* ATCC 17 965; *Brevibacterium lactofermentum* 15, 377 і ATCC 21 086; *B. flavum* 14067) на сьогодні описано два мажорні білки КС з M_m 67,0 кДа (PS1) і 63,0 кДа

(PS2), крім того, в екстрактах КС було ідентифіковано ще три білки з M_m 65,0; 68,0 та 72,0 кДа [8, 9]. Застосування в наших дослідженнях гелю з більш високою розподільною здатністю (14 %, а не 7-10 %) дозволило виявити в препаратах значно більшу кількість мажорних і міnorних компонентів (табл. 1). Препарати досліджених культур *C. glutamicum* 22Л, Е531 і *ВНИИгенетика-90* незалежно від стадії розвитку характеризувались наявністю 5 найбільш інтенсивно виражених білків з M_m 85,0; 62,0; 39,0; 16,0 і 13,5 кДа, які можна розглядати як загальні мажорні білки вказаних штамів. Кожний із зазначених білків характеризувався певними кількісними змінами в препаратах культур різного віку (табл. 1). Зокрема, білок 85,0 кДа був максимально представлений у 3, 12, 24 і 48 год культур *ВНИИгенетика-90*; у 3, 24 і 72 год культур 22Л та у 12 і 24 год культур Е531. У слідovій кількості цей білок реєстрували в зразках 3, 48 та 72 год культур Е531 та 12 і 72 год культурах 22Л та *ВНИИгенетика-90*. Білок з M_m 62,0 кДа на електрофореграмах звичайно реєстрували у вигляді смуги, ширина та інтенсивність забарвлення якої залежали від штаму та фази розвитку культури (рис. 1, 2). Відомо, що вказані показники можуть опосередковано свідчити про кількість у зразках індивідуальних біополімерів [1, 10]. У зв'язку з цим можна стверджувати, що найбільша кількість білка 62,0 кДа незалежно від віку культури містилась у препаратах штаму 22Л (рис. 1, А). У штаму *ВНИИгенетика-90* було зафіксовано чітку залежність секреції вказаного білка від віку культури (рис. 2). Враховуючи стандартну похибку методу, ми вважаємо, що білок 62,0 кДа відповідає описаному у літературі білку PS2 з M_m 63,0 кДа, який формує поверхневий S-шар *C. glutamicum* [1, 8, 9]. Щодо інших загальних мажорних білків (39,0; 16,0 та 13,5 кДа), то нами встановлено, що їх кількість у зразках поступово зменшувалась зі старінням культури і у фазі відмирання (72 год). На електрофореграмах ці білки реєстрували у незначній (шт. Е531) або слідovій (шт. 22Л і *ВНИИгенетика-90*) кількостях.

Електрофоретичний аналіз препаратів, одержаних із клітин різного віку штаму 22Л, показав, що у зразках переважали загальні для всіх штамів мажорні білки, водночас окремим фазам розвитку вказаного штаму були притаманні деякі відмінності. Наприклад, препарат лаг-фази характеризувався найбільшою кількістю міnorних компонентів та наявністю фазоспецифічного мажорного білка з M_m 43,0 кДа. Білки з M_m 67,0-66,0 кДа і 40,0 кДа були специфічними для

Таблиця 1. Спектр поверхневих білків КС досліджених штамів на різних фазах розвитку

Молекулярні маси білків (кДа)	Штами коринібактерій та вік культури (год)														
	22Л					E531					ВНИИгенетика-90				
	3	12	24	48	72	3	12	24	48	72	3	12	24	48	72
165,0							+		+						
155,0							+		+						
150,0							+		+						
130,0							+	+							
125,0						+	+	+	++						
115,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
112,0						+	+	+	+		+	+	+		
110,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
107,0							+	+	+						
104,0							+		+						
102,0							+								
100,0							+	+	+	+					
97,0							+		+					+	
94,0							+	+	+			+		+	
92,0									+					+	
90,0						+	+	+	+			+	+	+	
88,0												+	+	+	
85,0	+++	+	+++	+	+++	+	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+
82,0					+		+	+	+					+	
74,0	++	+	+	+	+		++	++	++		+	+	+	+	+
72,0	++	+	+	+		+	++	+	++	+			+	+	
70,0	++	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	++	+	+	
67,0–66,0	++	+++	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
65,0													+	+	
64,0	++					+	+	+			+	+	+	+	+
63,0								+					+	+	+
62,0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
58,0						+	+	++	++	+	++	+++	+++	+++	+
55,0		+	++	++	++		++	+	++	+		+	+	+	+++
54,0		++	++	++	++	+	+++	++	++	+		+	++	+	+
52,0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	+	++	+++
50,0	+++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+	++	++	+	++	++
49,0											+	+	+	+	++
48,0	+++	+	++	++	+	++	+++	+	+	+	++	+	+	++	++
44,0	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+++	+++
43,0	+++	+	+	+	+	+	+	+	++		+	++			
40,0	+	+++	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+
39,0	++	+	++	++	+	++	++	+++	++	++	+++	+	+++	+	+

Закінчення табл. 1

Молекулярні маси білків (кДа)	Штами коринебактерій та вік культури (год)														
	22Л					E531					ВІНИІгенетика-90				
	3	12	24	48	72	3	12	24	48	72	3	12	24	48	72
38,0											+++	+	+++	+	+
37,0	+	+	+	++	+	+	++	+	++	++	+	+++	+	++	+++
36,0		+	+	++	+	+	+	+	++			+++	+	+++	++
34,0	++	+	+	+++	+++			++			+	++	++	++	
33,0	++	+	+	+++	+++	+	++	++	++	+	++	+++	+++	++	+
31,5				++					++					+	
30,5		++	+++	++	++	+	+	+	+++	++					
30,0	++	+	+++	+							+	+++	+	++	+
29,0	+++	+	+	++		++	+++	+++	+++	++	+	+	+	++	++
28,0	++		++	++	+	+	+++	+++			+	+		+	
27,0	++	+	++	++		+	++	+	+++	+	+	+	+	+	+
26,5	+	+	++	+			+++	+	++				+	+	+
25,5	+++	+	+	++		+	++	+	++	+	+	+	+	+	++
24,5	+		+	++		+	++	+	++	+	+	+	+	+	++
23,5	+	+	+	++		+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
22,0	+++	+	++	+++		+++	+++		+++	+	+	++	+	++	
21,5		+	++	+		++	++	++	++	+		++	+	+	+
21,0	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+		+++	+	+++	+++
20,5	+++	+	++	+++	+	+++	+++	++	+	+	+	+	++	++	+
20,0	+++	+	+	+++		+++	+++	+	+++	+	+	+	+	+	+
19,5	++	+	+	++	+						+	+	++	++	+
19,0	++	+	+	++	+	++	++	+	++		+	+	+	+	+
18,5	++	+	+	++	+		+	+	+	+	+	++	+	++	+
17,5	++	+	+	+	+	+	++	+	++		+	+++	++	++	
17,0	++	+	+	+++	+			+	+	+	+	+	+	+	+
16,5	+	+	+	+	+	+	+++	+	+++			+	+	+	+++
16,0	+++	++	++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15,0	++	+	++	+++	++	+	+++	++	+	+	+	+	++	+	+++
14,4	+++	+	++	+	++	++	+	++	+		+	+	++	+	
14,5	+++	+	+	+++		+	+++	+	+++		+	+	+	+++	+
14,2	+++	+	++	+		++	+	++	+	+	+	+	++	+	
14,0	+	+	++	+++	+++	+	+++	+	+		+	++	++	+	+
13,8	++	+	+	+	+++	+	+++	++	+++		+	++	++	+	+
13,5	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Примітки: «+» – мінорні білки, «++» – білки із середнім ступенем вираження, «+++» – мажорні білки (фарбування гелів кумасі блакитним).

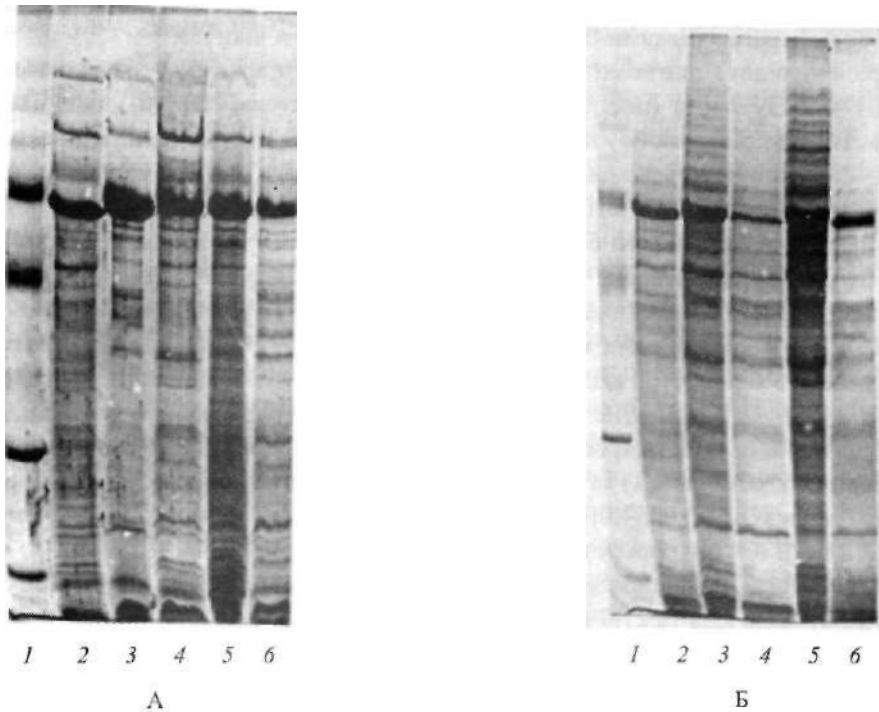


Рис. 1. Електрофореграми препаратів поверхневих білків клітинної стінки *C. glutamicum* 22Л (А) та Е531 (Б) на різних фазах розвитку культури: 1 - маркерні білки; 2 - препарат 3 год культури; 3 - препарат 12 год культури; 4 - препарат 24 год культури; 5 - препарат 48 год культури; 6- препарат 72 год культури. Фарбування кумасі блакитним

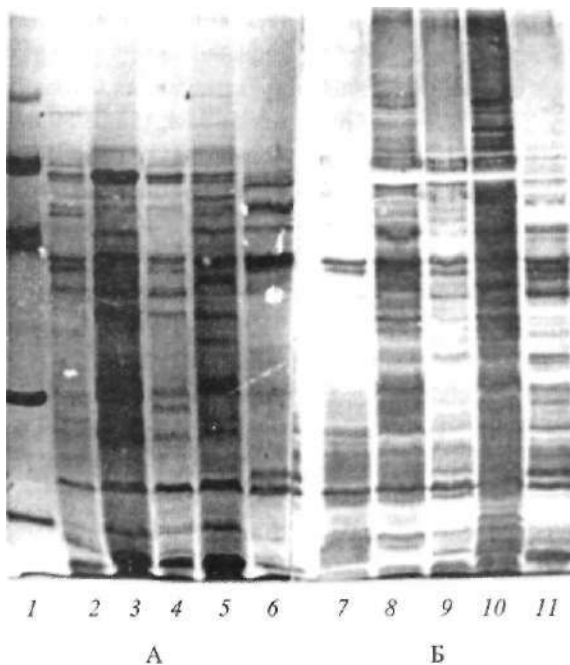


Рис. 2. Електрофореграми препаратів поверхневих білків клітинної стінки *C. glutamicum* ВНИИгенетика-90 на різних фазах розвитку культури: 1 - маркерні білки; 2, 7-препарат 3 год культури; 3, 8- препарат 12 год культури; 4, 9 - препарат 24 год культури; 5, 10 - препарат 48 год культури; 6, 11 - препарат 72 год культури. Фарбування кумасі блакитним (А), фарбування нітратом срібла (Б)

логарифмічної фази (табл. 1), які лише у 12 год культури були асоційовані з білками 62,0 кДа та 39,0 кДа, утворюючи відповідно комплекси з M_m 67,0-62,0 кДа і 40,0-39,0 кДа (рис. 1, А). Необхідно зауважити, що присутність у препаратах білка з M_m 67,0-66,0 узгоджується з даними літератури про наявність у клітинній стінці інших штамів *C. glutamicum* поверхневого білка PSI з аналогічною молекулярною масою [1, 8, 9]. У фазі сповільненого росту крім загальних білків (85,0; 62,0; 13,5 кДа) виявляли один спільний з логарифмічною фазою білок (30,5 кДа) та фазо-специфічні - з M_m 44,0 і 30,0 кДа. Для фази відмирання характерна наявність трьох із п'яти загальних мажорних білків (табл. 1) та спільних з іншими фазами білків з M_m 40,0; 34,0; 33,0; 30,5; 21,0; 14,0 і 13,5 кДа. В цій фазі росту практично зникали білки у зоні гелю, що відповідає молекулярним масам 30,0 - 22,0 кДа та 21,0 - 16,0 кДа, і виявлялись лише деякі із ідентифікованих у інших фазах білків (19,5; 18,5; 16,5; 16,0 і 15,0 кДа).

За білковим профілем штам E531 подібний до штаму 22Л (рис. 1, Б). Найбільшу кількість мажорних білків у штаму E531 реєстрували в препараті логарифмічної фази. Крім загальних білків, у цьому препараті виявляли фазоспецифічні білки з M_m 27,0; 25,5 і 24,5 кДа. Препарати всіх фаз розвитку культури, за винятком логарифмічної, за білковими спектрами були практично ідентичними і поряд із спільними для всіх досліджених штамів мажорними білками містили білки, характерні для штаму E531 з M_m 54,0; 48,0; 44,0; 29,0; 28,0; 26,5; 22,0-20,5; 20,0-19,0; 18,5-17,5 кДа (табл. 1). Розрізнялись вказані зразки лише за кількістю спільних мажорних білків та їх вмістом в препаратах.

Штам *ВНИИгенетика-90* за складом мажорних білків практично не відрізнявся від штамів 22Л і E531 (рис. 2А). Препарат лаг-фази містив всі п'ять загальних мажорних білків, білок 30,0 кДа спільний зі штамом 22Л та один специфічний - 38,0 кДа. Ще чотири білка (58,0; 50,0; 48,0 та 14,4 кДа) були представлені менш інтенсивно (табл. 1). У препараті клітин логарифмічної фази (як і для штаму E531) відмічалась найбільша кількість мажорних білків: крім загальних для всіх штамів, у цій фазі додатково виявлено ще 9 білків (табл. 1). Препарати з клітин 24 і 48 год культур містили практично ті самі білки, що й препарати логарифмічної фази; у фазі сповільненого росту зафіксовано 12 мажорних білків, а у стаціонарній - 14. У фазі відмирання поряд із спільними з іншими фазами біл-

ками (табл. 1) виявляли також фазо- та штамоспецифічні білки 55,0 і 15,5 кДа. Деякі білки штаму *ВНИИгенетика-90*, визначені для культур певного віку як мажорні, на інших фазах розвитку були виражені менш інтенсивно. Зокрема, мажорний білок 33,0 кДа є спільним для логарифмічної та фази сповільненого росту, білки 44,0; 37,0 і 21,0 кДа - для логарифмічної, стаціонарної та фази відмирання, а білок 30,0 кДа - для всіх фаз за винятком фази відмирання. Крім мажорних білків, у досліджених зразках виявляли значну кількість мінорних компонентів, спектр більшості з яких змінювався залежно від віку та штаму бактерій. Деякі з них містились у препаратах постійно, незалежно від фази розвитку, тоді як інші були зареєстровані тільки у культур певного віку.

Слід підкреслити, що фазові відмінності у спектрах поверхневих білків досліджених штамів були зумовлені переважно зміною їх кількості у зразках (табл. 1). Встановлено, по-перше, що вміст білків поступово зменшувався зі старінням культури; по-друге, деякі мінорні білки були максимально представлені в одній із фаз розвитку. В препаратах усіх штамів також були виявлені білки, синтез яких у клітині починався з певної години росту і далі вони виявлялись протягом усього періоду росту. Деякі з них були притаманні тільки окремим фазам розвитку (табл. 1). Наприклад, білок 55,0 кДа виявляли переважно в препаратах, починаючи з 24 год культивування, білок 54 кДа - з 12 год, тоді як білки з M_m 52,0; 50,0 і 48,0 кДа реєстрували на всіх фазах розвитку. В препаратах штаму 22Л білки з M_m 25,5-23,0 кДа не змінювалися, у штаму E531 реєстрували збільшення молекулярної маси наприкінці логарифмічної фази - у зразках була зафіксована поява додаткової смуги з M_m 27,0-26,0 кДа; у штаму *ВНИИгенетика-90* подібне збільшення було зареєстроване лише у фазі відмирання. Крім того, у досліджених штамів були наявні білки, які реєстрували, як правило, у зразках 12, 24, 48 год культур. Зокрема, у штаму E531 - це білки з M_m 94,0; 74,0; 67,0; 28,5 кДа та білки 88,0 і 54,0 кДа у штаму *ВНИИгенетика-90*. В інших зразках деякі із вказаних білків визначали протягом усього циклу розвитку (наприклад, 67,0 кДа - у штамів 22Л і *ВНИИгенетика-90*), або тільки на певній фазі (зокрема, 94,0 кДа - у *ВНИИгенетика-90* та 74,0 кДа у 22Л і *ВНИИгенетика-90*). До фазоспецифічних біополімерів досліджених штамів належить білок 31,5 кДа, зареєстрований у фазі сповільненого росту та стаціонарній. У всіх досліджених штамів були

також виявлені штамоспецифічні білки, зокрема, у *ВНИИгенетика-90* - білок 49,0 кДа. У штамі E531 і *ВНИИгенетика-90*, на відміну від штаму 22Л, виявлено білок 58,0 кДа, який завжди асоційований з білком 62,0 кДа. Лише для штаму E531 характерна наявність значної кількості високомолекулярних мінорних білків (табл. 1).

Таким чином, у результаті порівняльного аналізу препаратів однієї фази розвитку досліджених штамів були встановлені певні відмінності у складі мажорних білків. Спільними мажорними білками 3 год культур всіх досліджених штамів були чотири з п'яти загальних білків, за винятком білка 85,0 кДа. До специфічних білків лаг-фази штаму 22Л належать білки з M_m 50,0; 43,0; 29,0; 25,5; 22,0-20,5; 19,5-19,0; 18,5-17,5; 14,5; 14,4 і 14,0 кДа. Препарати логарифмічної фази також характеризувались наявністю специфічних білків, зокрема, у штаму E531 було визначено 14 білків (54,0; 48,0; 44,0; 29,0; 28,0; 26,5; 22,0-20,5; 20,0-19,0; 18,5-17,5; 16,5; 15,0; 14,5; 14,4; 14,0 кДа), у штаму 22Л - 2 (67,0 і 40,0 кДа) та у штаму *ВНИИгенетика-90* - 1 (33,0 кДа). Препарати фази сповільненого росту досліджених штамів відрізнялись один від одного наявністю білків: 30,5 і 30 кДа - у штаму 22Л; 50,0 і 44,0 кДа у штаму E531 та 58,0 кДа - у штаму *ВНИИгенетика-90*. Серед мажорних білків, завдяки яким була встановлена різниця між препаратами стаціонарної фази, у штаму 22Л виявлено комплекси з M_m 22,0-16,0 і 15,0-13,0 кДа, у штаму E531 - білки 50,0; 44,0 і 29,0 кДа та у штаму *ВНИИгенетика-90-58,0*; 52,0; 44,0; 30,0; 22,0; 21,0 і 14,4 кДа. Препарати фази відмирання містили лише деякі загальні білки (табл. 1), а також специфічні для окремих штамів, а саме: у штаму 22Л - це білок 40,0 кДа та у штаму *ВНИИгенетика-90* - 55,0; 52,0; 50,0; 44,0; 37,0; 16,5 і 15,5 кДа.

Порівняльний аналіз гелів, зафарбованих кумасі та нітратом срібла, дозволив встановити таку закономірність: максимальна кількість індивідуальних біополімерів у штаму 22Л міститься в препаратах наприкінці лаг- та стаціонарної фаз, тоді як у штамів E531 і *ВНИИгенетика-90* - у зразках логарифмічної і стаціонарної фаз. Крім того, фарбування гелів нітратом срібла дозволило визначати в препаратах мінорні компоненти, зокрема високомолекулярні, які при візуалізації кумасі виявляли, як правило, у слідовій кількості (рис. 2 А, Б). Серед зазначених були ідентифіковані біополімери з M_m 112,0; 110,0; 107,0; 104,0; 97,0; 94,0; 92,0; 90,0; 88,0; 82,0; 80,0 кДа тощо. Встановлено також, що деякі смуги утворені не

одним, а кількома біополімерами з близькими молекулярними масами, наприклад, 45,0 і 44,0 кДа та 16,0 і 15,5 кДа. Такий характер розташування смуг на електрофореграмах, очевидно, можна пояснити схильністю поверхневих біополімерів до утворення комплексів із гомологічними і гетерологічними молекулами. Саме така агрегація, як відомо, максимально проявляється в екстрактах клітинних стінок бактерій, де білки зазвичай агреговані з ліпідами, полісахаридами та іншими компонентами КС, причому у зв'язаному стані може перебувати до 1 % всіх поверхневих білків [11]. Необхідно відмітити, що у наших дослідженнях характерною особливістю гелів, зафарбованих нітратом срібла, була максимальна кількість ідентифікованих біополімерів саме у тих зонах, де при візуалізації кумасі білки, як правило, реєстрували у слідовій кількості (рис. 2). Така висока насиченість треків при фарбуванні гелів $AgNO_3$ може свідчити про наявність у препаратах, поряд із білками, компонентів змішаної чи небілкової природи. Можливо, більша частина із визначених нами білків є глікопротеїнами, що подібні до описаних у представників деяких актинобактерій, зокрема *C. diphtheriae* (17,0; 15,0; 12,5 кДа) [12] та *Rhodococcus equi* (17,0-15,0 кДа) [13]. Отже, чисельність білкових компонентів в одержаних нами препаратах можна пояснити, по-перше, наявністю у складі КС досліджених штамів великої кількості індивідуальних, функціонально відмінних білкових молекул, які формують поверхню *C. glutamicum*. По-друге, не виключено, що гетерогенність поверхневих біополімерів КС пов'язана з наявністю у їх складі нековалентно- та ковалентнозв'язаних вуглеводних компонентів [14, 15].

Для встановлення ступеня подібності зразків поверхневих біополімерів та одержання статистично вірогідних результатів при їх порівнянні була використана спеціальна комп'ютерна програма підрахунку коефіцієнтів подібності (КП) препаратів [6]. Порівняльний аналіз проводили одночасно за двома параметрами - обчислювали КП препаратів за спектром сумарних (всі ідентифіковані в препаратах) та мажорних білків (відповідно табл. 2, 3). Одержані дані свідчать про існування певних закономірностей синтезу окремих поверхневих білків КС під час розвитку коринебактерій. Найвищі КП за спектром сумарних білків реєстрували у препаратів, одержаних на різних фазах розвитку культури одного штаму, тоді як між препаратами відповідного віку різних штамів цей показник був дещо нижчим

(табл. 2). Так, при аналізі електрофореграм штаму 22Л найбільшу кількість індивідуальних білків виявляли у препаратах культур наприкінці лаг-фази, фази сповільненого росту та стаціонарної. За спектром сумарних білків ці препарати були також максимально подібними. КП відповідно становив: 87,9 % - 3 і 24 год культур; 85,1 % - 24 і 48 год культур та 80,5 % - 3 і 48 год культур. Дещо меншу кількість білків реєстрували у фазі відмирання - КП між цим зразком і попередніми відповідно дорівнював: 71,6% (з 3 год); 79,6 % (з 24 год) та 83,3 % (з 48 год). Найвищими були КП препаратів, одержаних із клітин тих фаз, які безпосередньо змінюють одна одну, і, навпаки, найбільшу різницю виявляли між препаратами віддалених за часом фаз. Зокрема, було показано, що білкові профілі штаму 22Л лаг-фази та E531 логарифмічної фази практично збігалися - відповідно КП за спектром мажорних білків цих зразків становив 82,8 %. Препарат штаму *ВНИИгенетика-90* логарифмічної фази, хоча і містив значну кількість білків, за спектром мажорних білків дещо відрізнявся від вищезгаданих культур (із 22Л КП = 68,2 % та із E531 = 67,4 %). Максимальний рівень подібності реєстрували у препаратів добових культур: 84,8 % (22Л і E531), 81,6 % (22Л і *ВНИИгенетика-90*) та 78,9 % (E531 і *ВНИИгенетика-90*). Найсуттєвішими були відмінності у складі мажорних білків у препаратах культур фази відмирання та логарифмічній, тоді як у лаг-фазі вони були незначними (табл. 3). При порівнянні пре-

паратів за спектром сумарних білків не було зафіксовано таких значних відмінностей, як при їх аналізі за мажорними білками (табл. 2 і 3). Це є доказом того, що у процесі росту *C. glutamicum* змінюються не всі поверхневі біополімери, а лише окремі.

Отримані нами результати свідчать, що загальними мажорними білками лізинсинтезуючих штамів *C. glutamicum* є білки з M_m 85,0; 62,0; 39,0; 16,0 і 13,5 кДа. Для вказаних штамів характерна також наявність у препаратах білків з M_m від 58,0 до 48,0 кДа, які утворюють на електрофореграмах окрему зону. Слід підкреслити, що вказана зона сформована білками, що не належать до мажорних і зазнають певних змін у процесі росту бактерій, однак активно синтезуються культурами і зумовлюють своєрідність білкового профілю штамів *C. glutamicum*. У всіх досліджених зразках, незалежно від штаму та фази розвитку культури, присутні білки з M_m 110,0; 67,0-66,0; 52,0; 50,0; 48,0; 44,0; 40,0; 37,0; 33,0; 20,5 та 15,0 кДа. В препаратах виявлені також фазо- чи штамоспецифічні білки з M_m 115,0; 112,0; 100,0; 90,0; 64,0; 49,0; 31,5; 30,5; 30,0 і 19,5 кДа. Наявність міжфазових відмінностей у штамів характеризується значенням КП білкових спектрів > 60 %. Препарати фази сповільненого росту культур (24 год), які містять весь спектр мажорних білків і зумовлюють індивідуальність білкових профілів досліджених штамів, ми рекомендуємо використовувати для порівняльних досліджень різних видів коринібактерій.

1. Chami M., Bayan N., Dedieu J. C. et al. Organization of the outer layers of the cell envelope of *Corynebacterium glutamicum*: A combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study // *Biol. Cell.* - 1995. - V.83. - N2-3. - P. 219-229.
2. Tavares F., Sellstedt A., Parente A., Salema R. Protein excretion from Frankia strains HFPC13 and R43.: Abstr. 9th Congr. Fed. Eur. Soc. Plant Physiol. (Brno) // *Biol. Plant.* - 1994. - V. 36. - P. 340.
3. Котелевець Л. М., Бабенко Ю. С., Еремина В. А. и др. Изменчивость мембран *Staphylococcus aureus* в зависимости от фазы роста культуры // *Микробиол. журн.* - 1987. - Т. 49. - № 3. - С. 14-18.
4. Messner P., Sleytr U. B. Crystalline bacterial cell-surface layers // *Adv. Microbiol. Physiology.* - 1992. - V. 33. - P. 213-275.
5. Анциме А. Ф., Межуге Г. Р., Осе В. В. Продукенты L-лизина из рода *Brevibacterium*: Атлас морфологических изменений. - Рига: Зинатне, 1978. — 171 с.
6. Михальський Л. О., Фуртат І. М., Дем'яненко Ф. П., Костючик А. А. Електрофоретичні спектри білків клітинної стінки як критерій для ідентифікації та класифікації непатогенних коринібактерій // *Укр. біохім. журн.* - 2001. - Т. 73. - № 3. - С. 61-70.
7. Harlow E., Lane P. *Antibodies a laboratory manual* Cold. Spring Harbor Laboratory, 1988. - P. 653.
8. Joliff G., Mathieu L., Hahn V. et al. Cloning and nucleotide sequence of the *cspl* gene encoding PSI, one of the two major secreted proteins of *Corynebacterium glutamicum*: the deduced N-terminal region of PSI is similar to the *Mycobacterium* anti-gen 85 complex // *Molecular Microbiol.* - 1992. - V. 16. - N 6. - P. 2349-2362.
9. Peyret J., Bayan N., Joliff G. et al. Characterization of the *cspl* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum* // *Mol. Microbiol.* - 1993. - V.9. - N 1. - P. 97-109.
10. Dent V. E., Williams R. A. D. Chemotaxonomic identity of *Corynebacterium matruchotii* from animal and human dental plaques // *Curr. Microbiol.* - 1987. - V. 15. - N 5. - P. 273-276.
11. Fifis T., Rothel J. S., Wood P. R. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation // *Vet. Microbiology.* - 1994. - V. 40. - P 65-91.
12. Кондрашина Н. Н., Шмелева Е. А., Берестень С. Ф. Выделение и иммунохимическая характеристика растворимых мембранных белков клеточных стенок коринибактерий дифтерии // *Биохимия.* - 1987. - Т. 52. - № 6. - С. 978-983.
13. Takaj S., Koike K., Ohbushi S. et al. Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi* // *J. Clin. Microbiol.* - 1991. - V. 29. - N 3. - P. 439-443.
14. Савельев Е. П., Блишкова Е. И., Битко С. А. и др. Выделение и характеристика поверхностных белков стрептококка группы А // *Биохимия.* - 1987. - Т. 52. - N 2. - С. 1875-1880.
15. Puech V., Chami M., Lemassu A. et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane // *Microbiology.* - 2001. - V. 147. - P. 1365-1382.

I. M. Furtat, L. O. Mykhalsky, T. M. Nogina, F. P. Demyanenko

THE SPECTRUMS OF SURFACE PROTEINS *Corynebacterium glutamicum* ON DIFFERENT PHASES OF CULTURE DEVELOPMENT

*The surface proteins spectrum of the cell wall the strains of *Corynebacterium glutamicum* 22L, E531 i VNIIGenetica 90 on different phases of culture development were studied. It was shown that during growth *C. glutamicum* a certain changes on surface proteins composition occurred. The proteins that are detected only in some strains or on the certain phase of cultures development are characterized. The proteins spectrums presented in all investigated samples irrespective of strains and of culture age are revealed. The patterns of all studied cultures are characterised by presence of the most intensively expressed proteins with Mm 85,0; 62,0; 39,0; 16,0 i 13,5 kDa, that can be considered as general prevailing proteins these strains. The preparations of 24 hours of cultures, which most full reflect individuality of proteins profiles strains, can be recommended for comparative investigations of surface proteins composition of various corynebacteria species.*