

Фуртат І. М.

ОТРИМАННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТІВ ПОВЕРХНЕВИХ БІОПОЛІМЕРІВ КЛІТИННОЇ СТІНКИ НЕПАТОГЕННИХ КОРИНЕБАКТЕРІЙ

У роботі отримано та охарактеризовано препарати поверхневих біополімерів клітинної стінки непатогенних коринебактерій. Показано, що застосування методу екстрагування із цілих клітин 1 % розчином додецилсульфату натрію є ефективним для отримання препаратів поверхневих біополімерів клітинної стінки представників роду *Corynebacterium*. Встановлено, що внаслідок екстрагування поверхневих біополімерів клітини коринебактерій не зазнають лізису та зберігають життєздатність, здатність позитивно зафарбовуватися за Грамом і містять основний структурний компонент КС – комплекс пептидоглікан-арабіногалактан-міколові кислоти. З'ясовано також, що в препаратах поверхневих біополімерів клітинної стінки переважали кислі амінокислоти, а також у меншій кількості містились нейтральні та основні амінокислоти. Сірковмісні амінокислоти (цистеїн і метіонін) наявні у SDS-екстрактах у слідовій кількості, що притаманно переважній більшості поверхневих білків бактерій. Досліджено електрофоретичні спектри поверхневих біополімерів клітинної стінки, на підставі чого препарати 24-годинних культур, які найповніше відображають індивідуальність спектрів досліджених штамів, рекомендовано використовувати для порівняльних досліджень складу поверхневих біополімерів КС різних видів актинобактерій.

Ключові слова: непатогенні коринебактерії, *Corynebacterium glutamicum*, клітинна стінка, препарати поверхневих біополімерів КС, амінокислотний склад, поверхневі білки, електрофоретичні спектри поверхневих біополімерів КС.

Вступ

Відомо, що хімічний склад окремих компонентів клітинної стінки (КС) прокариот є однією із діагностично значимих хемотаксономічних ознак, що використовуються для класифікації та систематики бактерій. Так, на підставі експериментальних даних щодо структури і функцій окремих компонентів КС актинобактерій було створено модель організації клітинної стінки представників цього класу. Відповідно до цієї моделі актинобактеріям притаманна складна багатопшарова структура клітинної стінки та своєрідний хімічний склад, за якими вони значно відрізняються від інших грампозитивних бактерій. Зокрема, основним компонентом КС роду *Corynebacterium* та інших близькоспоріднених їм представників класу *Actinobacteria* є комплекс, утворений із ковалентно зв'язаних між собою пептидоглікану, арабіногалактану та міколових кислот [1–4]. Унікальною особливістю КС цієї групи прокариотів є формування зовнішньої атипової двопшарової мембраноподібної структури, що складається із міколових кислот і гліколіпідів [5; 6]. Цей ліпідний бішар пронизують пориноподібні білки, що формують канали [7; 8]. Окрім того, білки можуть бути локалізовані у

шарі КС, що примикає до ліпідного бішару, а також у S-шарах (Surface layers), розташованих на зовнішній поверхні бактеріальних клітин. Останні можуть бути сформовані з однотипних білків чи глікопротеїдів [3; 9–13]. Серед представників роду *Corynebacterium* поверхневі білки КС активно вивчаються як у патогенних коринебактерій (наприклад, *C. diphtheriae*), так і непатогенних видів – продуцентів амінокислот виду *C. glutamicum*. Зокрема, у згаданих бактерій описано порини [7; 8], адгезини білкової природи [14–16], білок PS1, що виявляє міколотрансферазну активність [3; 17], та білок PS2, що формує S-шар [11–13].

Переважаюча більшість методів, що традиційно застосовувалися для виділення й очищення поверхневих білків КС, у тому числі й S-шарів, бактерій передбачала механічне руйнування клітин із подальшим очищенням препаратів клітинної стінки ферментами чи екстрагуванням детергентами. Нині для отримання препаратів поверхневих біополімерів клітинної стінки запропоновано методичні підходи селективного екстрагування із цілих клітин поверхневих білків КС бактерій, зокрема S-шарів, за допомогою різноманітних детергентів [11–13, 18–20]. Позаяк останні виявляють здатність дезінтегрувати

мембрани, а також вилучати з клітинної стінки й утримувати у розчинному стані протеїни, не порушуючи їхньої структури. Як детергент за такого підходу поряд із іншими часто використовується додецилсульфат натрію (SDS). Цей детергент, взаємодіючи переважно з гідрофобними ділянками білкових молекул, екстрагує з інтактних клітин бактерій поверхневі білки та глікопротеїди, асоційовані нековалентними зв'язками з іншими структурними компонентами КС [11–13; 19]. Крім того, біополімери білкової природи, локалізовані на поверхні клітин грампозитивних бактерій, як правило, характеризуються ізоелектричними точками в кислій зоні рН, що, у свою чергу, полегшує їхнє вивільнення буфером із рН у цьому діапазоні [21–24].

Отже, застосування методу екстрагування з цілих клітин є зручнішим, швидшим, а також менш трудомістким, оскільки виключає багатадійні процедури механічної руйнації бактеріальних клітин та додаткового очищення препаратів. Разом із тим зазначений спосіб отримання поверхневих біополімерів потребує індивідуального підбору оптимальних умов екстрагування для певного виду бактерій. Наприклад, для виділення поверхневих білків КС представників виду *C. diphtheriae* автори випробовували детергент NP-40, дезоксихолат Na або веронал-метаноловий буфер [25; 26]. Причому за умов застосування 0,5 % розчину дезоксихолату Na чи веронал-метанолового буферу з клітин *C. diphtheriae* екстрагувалося близько 5–6 % речовини від сухої ваги бактеріальних клітин, тоді як за обробітку розчином SDS тієї ж концентрації – 10 % [25]. Поверхневі білки *Peptostreptococcus anaerobicus* ефективно виділялися розчинами, що містили 1 % SDS або 6 М сечовини, тоді як при застосуванні 0,1 % SDS чи 0,1–2,1 % дезоксихолату Na їх практично не одержували [21]. Дослідження складу екстрактів КС *Actinomyces polychroma*, отриманих після обробітку клітин різноманітними детергентами, які руйнують нековалентні зв'язки, засвідчило, що найповніше виділення біополімерів білкової природи відбувалося за обробітку 1 % SDS або гуанідиндигідрохлориду [27]. Слід підкреслити, що ефективність застосування SDS із метою отримання препаратів поверхневих біополімерів КС також було підтверджено й для інших грампозитивних бактерій [28; 29].

З огляду на вищевикладене метою роботи було отримання препаратів поверхневих біополімерів КС непатогенних коринебактерій шляхом екстрагування з інтактних клітин додецилсульфатом натрію та їхня характеристика.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були штами непатогенних коринебактерій – представники виду *Corynebacterium glutamicum* УКМ Ас-673, УКМ Ас-674 і УКМ Ас-675, що підтримуються в Українській колекції мікроорганізмів (УКМ) Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Культури вирощували в рідкому живильному середовищі – м'ясопептонному бульйоні (МПБ, Himedia, Індія), що містило 1 % глюкози і 0,5 % дріжджового екстракту (Difco, США), за температури 28 °С та постійного перемішування ($n = 240$ об/хв).

Динаміку росту досліджених штамів вивчали за умов періодичного культивування в рідкому живильному середовищі за вищеписаних умов упродовж трьох діб. Рідке живильне середовище інокулювали стандартизованими суспензіями клітин добових культур бактерій (5 % від загального об'єму середовища) та синхронізували шляхом охолодження упродовж 30 хв за температури +4 °С. Про накопичення біомаси бактеріальних клітин судили за зміною оптичної густини культуральної рідини, яку реєстрували за допомогою фотоелектрокалориметра КФК-2МП за довжини хвилі 590 нм. Зразки культуральної рідини упродовж лаг-фази відбирали через кожні 30 хв, а починаючи зі стадії логарифмічного росту – через кожні 2 години.

Поверхневі біополімери КС одержували шляхом екстрагування з інтактних клітин коринебактерій, що перебували на різних фазах росту періодичної культури, а саме на 3, 12, 24, 48 та 72 години культивування. Позаяк обрані нами для дослідження часові проміжки репрезентували різні фази розвитку культури [30]. Клітини бактерій осаджували з культуральної рідини шляхом центрифугування за 8 тис. об/хв протягом 20 хв і тричі відмивали стерильним фізіологічним розчином NaCl у тому ж режимі. Відмиті клітини ресуспендували у 0,15 М розчині NaCl, рН 4,5, що містив 1 % SDS (Serva, Німеччина). Екстрагування поверхневих біополімерів КС здійснювали за постійного перемішування упродовж 2 год за кімнатної температури. Після центрифугування (8 тис. об/хв, 20 хв) одержаного гомогенату отримували два типи препаратів, а саме: препарати поверхневих біополімерів КС (ПБК) коринебактерій, що містилися у надосадовій рідині, та препарати клітин після екстрагування з них поверхневих біополімерів, які в подальшій роботі відповідно позначали як SDS-екстракти ПБК та SDS-клітини.

Для контролю життєздатності SDS-клітини висівали на щільне живильне середовище

м'ясопептонний агар (МПА, Difco, США) та фарбували за Грамом. Цілісність клітин контролювали із застосуванням світлової та електронної мікроскопії. Для останньої препарати інтактних та SDS-клітин виготовляли методом, описаним у працях [31; 32], та аналізували за робочого збільшення 20 000 із застосуванням мікроскопа JEM-1200 EX (JEOL, Японія). Найвність діагностичних амінокислот, що входять до складу пептидоглікану КС коринебактерій, мікролових кислот та моносахаридний склад гідролізатів SDS-клітин визначали із застосуванням загальноприйнятих методів [33].

Вміст білків у SDS-екстрактах визначали методом Лоурі, а вуглеводвмісних сполук антроновим методом [34]. Амінокислотний склад препаратів ПБКК вивчали із застосуванням автоматичного аналізатора Т-339 (Mikrotechn, Чехія) на сульфополістиролових іонообмінних смолах «Ostion LYANB» у Li-цитратному буферному розчині та одноколонковому режимі. Зразки препаратів ПБКК об'ємом, еквівалентним 2 мг сухого білка, гідролізували у скляних ампулах за температури 106 ± 1 °C і розчиняли у 0,3 н Li-цитратному буфері рН $2,2 \pm 0,02$. Амінокислоти (АМК) визначали за допомогою нінгідринового реактиву на проточному фотометрі з довжиною хвилі 560 нм. Кількісну оцінку хроматограм здійснювали щодо стандартної суміші амінокислот (Bio-Rad, США). Електрофорез SDS-екстрактів ПБКК проводили у системі ПААГ-SDS за Laemmli [35] із застосуванням 14 % гелів, як описано в роботі [36]. Для візуалізації електрофореграм застосовували фарбування гелів кумасі блакитним R-250 (Serva, Німеччина) та AgNO_3 (Sigma, США) [37]. Для визначення молекулярних мас (ММ) використовували комерційний набір маркерних білків LMW (Bio-Rad, США): фосфорилаза В (97,4 кДа), альбумін (66,2 кДа), овальбумін (45,0 кДа), карбонатангідратаза (31,0 кДа), інгібітор трипсину (21,5 кДа), лізоцим (14,4 кДа). Розрахунок ММ білків після сканування гелів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми TotalLab v1.10. Для проведення порівняльного аналізу білкового складу препаратів використовували значення молекулярних мас, розрахованих із трьох-п'яти гелів. Перед проведенням аналізу дані стандартизували і нормалізували: ММ поліпептидів зводили, виходячи зі стандартної похибки, яку вираховували для кожного гелю за шириною смуг.

Результати та обговорення

Відомо, що до складу КС коринебактерій входять різноманітні структурні компоненти: білки,

полісахариди, ліпіди та комплекси білково-полісахаридної природи. У дослідженнях, присвячених вивченню складу та властивостей цих біополімерів, автори, як правило, застосовували різноманітні методичні підходи їх одержання з бактеріальних клітин. Однак, зважаючи на низку переваг, найуживанішим серед них вважається екстрагування розчинами детергентів, оскільки вони володіють здатністю дисоціювати ліпід-білкові комплекси; дезінтегрувати мембрани й утримувати білки у солюбілізованому стані, не порушуючи їхньої структури та антигенних властивостей; розщеплювати гідрофобні зв'язки між окремими компонентами КС та викликати детоксикацію деяких бактеріальних ендотоксинів. Обраний нами методичний підхід отримання поверхневих біополімерів КС із застосуванням 1 % розчину SDS був обумовлений його успішним використанням для багатьох груп мікроорганізмів [19; 21; 27; 28], ефективністю та простотою одержання за його допомогою з інтактних клітин різних структурних компонентів КС бактерій, насамперед білкової природи чи глікопротеїдів.

Після екстрагування поверхневих біополімерів клітинної стінки із застосуванням детергенту насамперед аналізували препарати SDS-клітин. У результаті порівняння інтактних клітин досліджених штамів *C. glutamicum* та клітин після екстрагування було з'ясовано, що клітини коринебактерій до і після обробітку детергентом не відрізнялися між собою за розмірами та морфологією. Відповідно до даних світлової та електронної мікроскопії препаратів SDS-клітин було показано, що застосоване нами екстрагування поверхневих біополімерів КС із інтактних клітин коринебактерій 1 % розчином SDS не призводило до лізису клітин коринебактерій (рис. 1).

Окрім того, було встановлено, що SDS-клітини досліджених штамів коринебактерій зберігали здатність позитивно зафарбовуватися за Грамом, рости на щільному живильному середовищі МПА, не втрачаючи культуральних характеристик, притаманних виду *C. glutamicum*, а також залишалися життєздатними впродовж тривалого часу під час зберігання за температури +4 °C.

Аналіз гідролізатів клітин коринебактерій (після екстрагування із них ПБКК) дозволив встановити, що SDS-клітини аналогічно до інтактних клітин містили діагностично значимі компоненти клітинної стінки коринебактерій, а саме пептидоглікану (мезо-діамінопімелінова кислота, глутамінова кислота і аланін у співвідношенні 1 : 1 : 2) та арабіногалактану (арабіноза й галактоза) [1–4; 38]. Найвність у гідролізатах SDS-клітин мезо-діамінопімелінової кислоти,

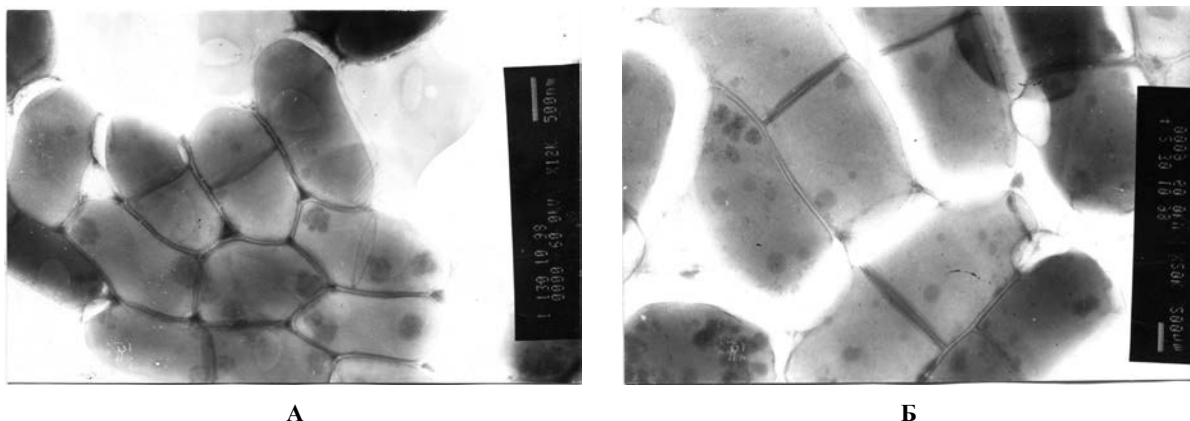


Рис. 1. Електронні мікрофотографії клітин штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-673: А – інтактні клітини; Б – клітини після екстрагування з них поверхневих біополімерів КС

яка є єдиною із відомих амінокислот, що зустрічається виключно у складі пептидоглікану КС бактерій [38], є беззаперечним доказом присутності цього компонента в досліджених препаратах клітин після екстрагування поверхневих біополімерів. Наявність у гідролізатах цих клітин таких діагностичних моносахаридів, як арабіноза та галактоза, які, у свою чергу, входять до складу основного полісахариду КС коринебактерій – арабіногалактану, свідчить на користь його присутності на поверхні SDS-клітин. У метанолізатах SDS-клітин також було виявлено коринеміколові кислоти, які, як зазначалося, складають основну частину ліпідів клітинних стінок коринебактерій [3; 5; 6]. Таким чином, враховуючи те, що SDS-клітини не лише зафарбовувалися за Грамом, залишалися життєздатними, а й містили характерні компоненти КС актинобактерій, ми дійшли висновку, що після екстрагування поверхневих біополімерів КС клітини коринебактерій зберегли основний структурний компонент їхньої клітинної стінки – комплекс пептидоглікан-арабіногалактан-міколові кислоти.

На наступному етапі роботи досліджували склад препаратів поверхневих біополімерів КС, отриманих із інтактних клітин коринебактерій шляхом екстрагування 1 % розчином SDS. Зважаючи на те, що кількість біополімерів клітинної стінки може залежати не лише від штаму та умов культивування, а й від фази розвитку бактерій [39–42], вміст поверхневих біополімерів КС визначали на різних стадіях росту досліджених штамів *C. glutamicum* (рис. 2) з метою визначення оптимального часу відбору клітин коринебактерій для отримання препаратів ПБКС. При вивченні складу препаратів поверхневих біополімерів клітинної стінки коринебактерій було показано, що вміст білків у препара-

тах ПБКС практично не відрізнявся у штамів *C. glutamicum* УКМ Ас-673 та УКМ Ас-674 й був дещо вищим у *C. glutamicum* УКМ Ас-675 (табл. 1). Незначні відмінності у SDS-екстрактах за цим показником спостерігали у культур на різних фазах росту. Так, найбільшу кількість біополімерів білкової природи було виявлено у препаратах ПБКС добових культур штамів УКМ Ас-673, УКМ Ас-674 та УКМ Ас-675, яка відповідно становила 5,5, 5,7 та 6,6 мг/г. Найнижчою вона, як правило, була в препаратах поверхневих біополімерів КС, отриманих із культур, що перебували у лаг-фазі та фазі відмирання культури, тобто на третю і 72-гу години культивування (рис. 2).

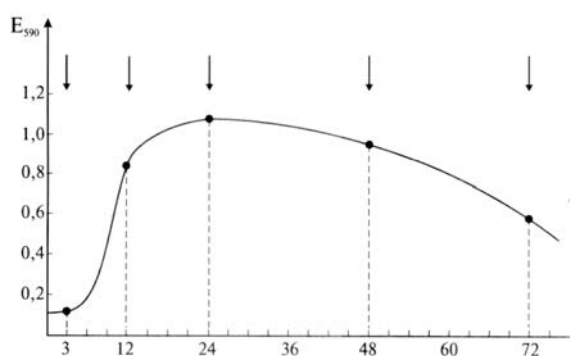


Рис. 2. Динаміка росту штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-673 за умов періодичного культивування. Стрілками позначено час відбору клітин для аналізу

Суттєвіші відмінності в препаратах поверхневих біополімерів КС спостерігали при визначенні компонентів вуглеводної природи. Насамперед їхній вміст у препаратах ПБКС, порівняно з біополімерами білкової природи, був вищим і більшою мірою залежав від фази росту культур. Так, аналогічно до білкових компонентів, кількість вуглеводних компонентів була найменшою у

SDS-екстрактах 3- та 72-годинних культур непатогенних коринебактерій. У логарифмічній фазі росту вміст біополімерів вуглеводної природи в препаратах ПБКС, порівняно із лаг-фазою, стрімко зростав, а саме: у 2,6 рази у штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-674 та 4,6 і 5,6 рази у штамів *C. glutamicum* УКМ Ас-675 і УКМ Ас-673 відповідно (табл. 1). Слід підкреслити, що для всіх

аспарагін, треонін, серин, гліцин і пролін у середньому припадало від 23 до 27 % загальної кількості АМК.

Аналіз амінокислотного складу SDS-екстрактів засвідчив, що в препаратах поверхневих біополімерів КС були наявні амінокислоти, які традиційно відносять до так званих пептидогліканових, а саме глутамін і аланін [38]. Зокре-

Таблиця 1. Вміст білкових та вуглеводних компонентів у препаратах поверхневих біополімерів КС досліджених штамів коринебактерій

Вид, штаб	Час відбору зразків культур за періодичного культивування	Вміст білкових компонентів (мг/г)	Вміст вуглеводних компонентів (мг/г)	Співвідношення білки/вуглеводи
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-673	3	5,0	2,7	1 : 0,5
	12	5,4	15,0	1 : 2,7
	24	5,5	13,6	1 : 2,5
	48	5,3	4,9	1 : 0,9
	72	5,1	3,4	1 : 0,7
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-674	3	5,4	6,3	1 : 1,2
	12	5,5	16,2	1 : 3,0
	24	5,7	15,1	1 : 2,6
	48	5,5	14,4	1 : 2,6
	72	4,8	0,8	1 : 0,2
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ас-675	3	5,8	3,1	1 : 0,5
	12	5,9	14,4	1 : 2,4
	24	6,6	13,4	1 : 2,0
	48	6,3	10,9	1 : 1,8
	72	5,4	9,6	1 : 1,7

трьох досліджених штамів коринебактерій було встановлено однакову тенденцію – максимальну кількість вуглеводних компонентів у препаратах поверхневих біополімерів КС виявляли у культур наприкінці логарифмічної фази росту, спостерігали їхнє поступове зменшення, після 24-ї години культивування, тоді як мінімальною вона була в препаратах ПБКС, отриманих із 3- та 72-годинних культур. Таким чином нами було встановлено, що препарати поверхневих біополімерів КС досліджених штамів коринебактерій містили біополімери як білкової, так і вуглеводної природи, співвідношення між якими залежало від штаму та години культивування.

При дослідженні амінокислотного складу препаратів поверхневих біополімерів КС непатогенних коринебактерій, що перебували на різних фазах росту культури, у всіх штамів *C. glutamicum* було ідентифіковано 18 амінокислот, хоча деякі з них (гістидин, тирозин, цистеїн і метіонін) були присутні у незначній кількості (табл. 2).

У препаратах ПБКС досліджених нами штамів коринебактерій переважали такі кислі амінокислоти: глутамін, аланін, аспарагін, треонін, серин, гліцин і пролін (рис. 3). У середньому на їхній вміст у SDS-екстрактах припадало: 74 % у штаму УКМ Ас-673 та 73 й 71 % у штамів УКМ Ас-674 і УКМ Ас-675 відповідно. Причому на

ма, у штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-673 їхній вміст на різних фазах росту коливався в межах 43,3–47,9 %; штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-674 – 34,6–47,6 % та штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-675 – 34,7–44,3 % загальної кількості виявлених у зразках амінокислот. Однак нами було з'ясовано, що співвідношення аланіну до глутаміну в досліджених препаратах ПБКС непатогенних коринебактерій відрізнялося від такого у пептидоглікані (1 : 2) й у середньому становило 1 : 3,9 у штаму УКМ Ас-673, 1 : 3,8 у штаму УКМ Ас-675 та 1 : 3,1 у штаму УКМ Ас-674. Отже, отримані дані свідчать, що кількість глутаміну у SDS-екстрактах перевищувала його вміст у препаратах пептидоглікану коринебактерій [1–4; 38]. Окрім того, у SDS-екстрактах було виявлено амінокислоти, які не входять до складу ПГ коринебактерій, зокрема аспарагін, лейцин, гліцин, валін і лізин (табл. 2). Кількість цих амінокислот становила від 50 до 57 % від загальної кількості АМК, причому вміст більшості з них практично не залежав від стадії розвитку культури.

Крім кислих амінокислот, препарати поверхневих біополімерів КС також містили нейтральні (валін, лейцин, ізолейцин, тирозин) та основні (лізин, гістидин, аргінін) АМК. Їх кількість у SDS-екстрактах становила 17–19 % та 8–10 % відповідно. Серед неполярних амінокислот

Таблиця 2. Амінокислотний склад препаратів поверхневих біополімерів клітинної стінки досліджених штабів непатогенних коринсбактерій

Вид, штаб	Час відбору зразків культури за періодичного культивування (год)	Кількість амінокислот, виявлених у препаратах поверхневих біополімерів (мол. %)																	
		Ala	Glu	Asp	Thr	Ser	Pro	hydroxy Pro	Gly	Lys	His	Arg	Val	Leu	Ile	Tyr	Phe	Met	Cys
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ac-673	3	6,71	38,75	10,50	3,96	3,06	2,25	2,78	5,49	3,88	0,68	2,51	4,67	6,69	4,07	0,49	2,59	0,07	0,84
	12	7,00	37,33	10,82	5,42	3,10	2,12	1,32	5,17	3,52	0,87	2,58	4,29	6,01	5,09	1,63	2,48	0,67	1,58
	24	8,95	37,24	9,19	4,54	2,63	2,20	7,92	4,80	3,61	0,88	2,13	3,48	4,89	3,28	1,03	1,88	0,02	1,33
	48	11,02	36,91	10,98	3,75	2,75	1,99	1,59	5,24	3,64	1,18	2,46	4,34	6,32	3,32	0,26	2,50	0,17	1,58
	72	12,51	33,48	10,62	3,79	2,52	2,22	3,04	4,77	4,09	0,94	2,59	3,98	6,35	3,54	1,45	2,47	0,02	1,62
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ac-674	3	6,05	35,90	11,86	4,07	3,10	3,90	5,92	3,63	2,92	1,17	2,88	5,36	6,40	3,22	0,43	2,35	0,24	0,62
	12	9,68	35,72	10,85	4,86	2,37	3,14	2,86	4,71	3,39	1,76	3,28	7,23	6,40	2,65	1,13	1,66	1,04	0,24
	24	11,17	35,92	11,10	4,06	2,72	2,65	4,51	4,27	4,73	1,50	2,80	3,43	4,57	2,63	0,51	3,49	0,09	0,06
	48	12,08	35,18	10,18	4,13	2,72	1,86	4,04	4,55	4,66	1,38	2,08	4,08	4,60	3,19	0,89	1,90	0,06	2,43
	72	12,81	21,78	8,45	3,54	2,41	1,55	3,76	4,32	3,35	0,53	0,90	4,69	5,81	4,26	0,77	2,96	0,04	1,68
<i>C. glutamicum</i> УКМ Ac-675	3	6,91	36,35	11,84	4,53	3,32	2,10	3,82	5,16	4,12	1,23	2,80	4,15	6,27	4,07	0,39	2,22	0,01	0,73
	12	8,21	36,49	11,77	4,65	3,76	2,25	1,75	5,07	4,13	1,95	5,88	4,45	5,97	7,15	1,67	2,30	0,65	1,67
	24	8,41	35,87	10,15	4,15	3,34	2,38	1,61	4,85	4,48	1,52	3,83	4,04	5,63	3,96	1,63	2,06	0,05	1,59
	48	9,88	34,20	10,54	4,59	3,44	2,18	2,33	4,96	4,27	1,05	3,21	4,28	6,73	3,59	1,40	2,31	0,13	0,91
	72	11,14	28,06	10,85	5,23	3,80	2,76	0,24	5,20	4,80	1,37	3,76	4,66	7,09	4,02	1,82	2,87	1,26	1,09

у препаратах ПБКС, окрім аланіну, виявляли досить високий вміст гліцину (4–5 %) і лейцину (6 %). Натомість кількість ароматичних АМК, зокрема фенілаланіну і тирозину, була незначною (рис. 3). Причому фенілаланін у досліджених нами препаратах ПБКС виявляли у кількостях, близьких за вмістом до білків, що формують S-шари бактерій. Сірковмісні амінокислоти

(цистеїн і метіонін) наявні у SDS-екстрактах у слідовій кількості (табл. 2), що притаманно переважній більшості поверхневих білків, зокрема S-шарів, як архе-, так і еубактерій, у яких також спостерігається незначна кількість чи практично повна відсутність АМК, які містять сірку [8–14; 16; 18; 21; 23]. Також у білків, що формують S-шари бактерій, дуже часто домінують дикар-

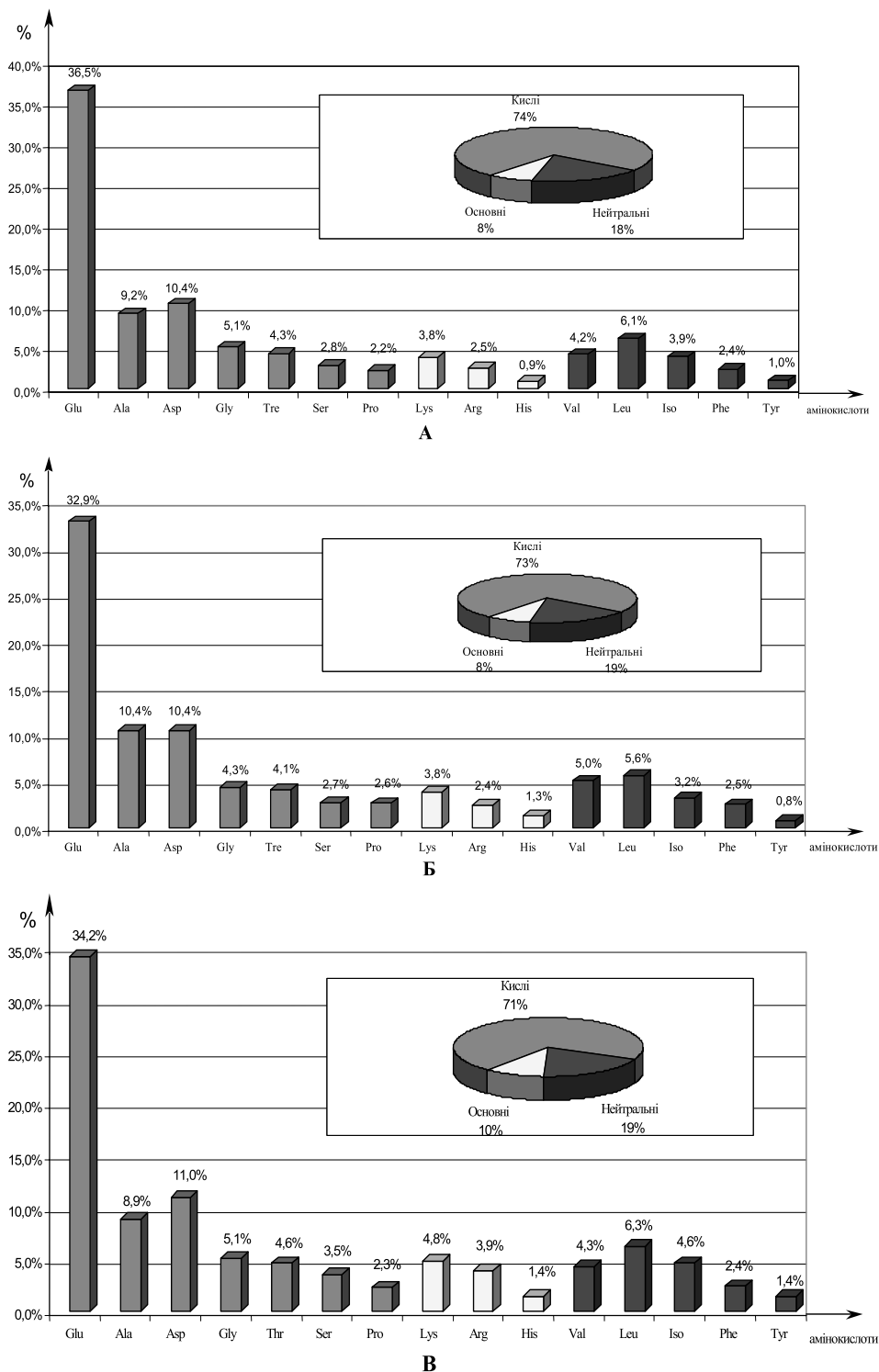


Рис. 3. Вміст амінокислот у препаратах поверхневих біополімерів клітинних стінок непатогенних коринебактерій: А – *C. glutamicum* УКМ Ас-673; Б – *C. glutamicum* УКМ Ас-674; В – *C. glutamicum* УКМ Ас-675

бонові амінокислоти, наприклад аспарагінова кислота [29]. Іншим поверхневим білкам клітинної стінки коринебактерій, зокрема *C. diphtheriae*, притаманний високий вміст таких амінокислот, як гліцин, серин, аланін та глутамінова кислота [7; 8; 15; 16; 25; 26].

Порівняльний аналіз амінокислотного складу препаратів поверхневих біополімерів КС клітин коринебактерій, які перебували на різних фазах розвитку, дозволив з'ясувати, що вміст переважної більшості амінокислот у SDS-екстрактах практично не змінювався під час росту культур. Кількість амінокислот у препаратах ПБКС була приблизно однаковою у всіх досліджених штамів і відповідала певній годині культивування (табл. 2). Наприклад, співвідношення лізину, гліцину, треоніну, валіну і лейцину у досліджених коринебактерій було практично однаковим, практично не залежало від години культивування й відповідно становило 1 : 1,4 : 1,1 : 1,1 : 1,6 у штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-673; 1 : 1,1 : 1,1 : 1,4 : 1,6 у штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-674 та 1 : 1,1 : 1,0 : 0,9 : 1,4 у штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-675. Виняток становив аланін, кількість якого значно зростала на пізніших фазах розвитку культур (табл. 2). Відповідно до цього співвідношення глутаміну і аспарагіну щодо аланіну поступово зменшувалось у всіх досліджених шта-

мів у середньому від 5,7 : 1,8 : 1 (третя година культивування) до 2,3 : 0,83 : 1 (72-га година культивування) (рис. 4).

Таким чином, результати наших досліджень щодо амінокислотного складу препаратів ПБКС непатогенних коринебактерій узгоджуються із результатами інших авторів [27], які показали, що SDS-екстракти КС *Actinomyces polychroma* містили 16 амінокислот. Близько 20 % із них становили кислі амінокислоти, серед яких переважали аспарагін, аланін, глутамінова кислота і гліцин. Окрім того, порівняльний аналіз даних, наведених у літературних джерелах і отриманих нами, дає підстави вважати, що за амінокислотним складом отримані препарати поверхневих біополімерів КС непатогенних коринебактерій близькі до амінокислотного складу білків поверхневих S-шарів клітинних стінок інших бактерій. Варто враховувати і той факт, що амінокислотний склад білків, що формують S-шари, практично не відрізняється в різних таксономічних групах бактерій, тоді як вуглеводна частина глікопротеїдів може бути надзвичайно різноманітною [5; 9–13; 19; 21; 29; 42].

Порівняльний аналіз електрофореграм поверхневих біополімерів КС білкової природи досліджених штамів здійснювали із застосуванням гелів, зафарбованих кумасі блакитним (рис. 5).

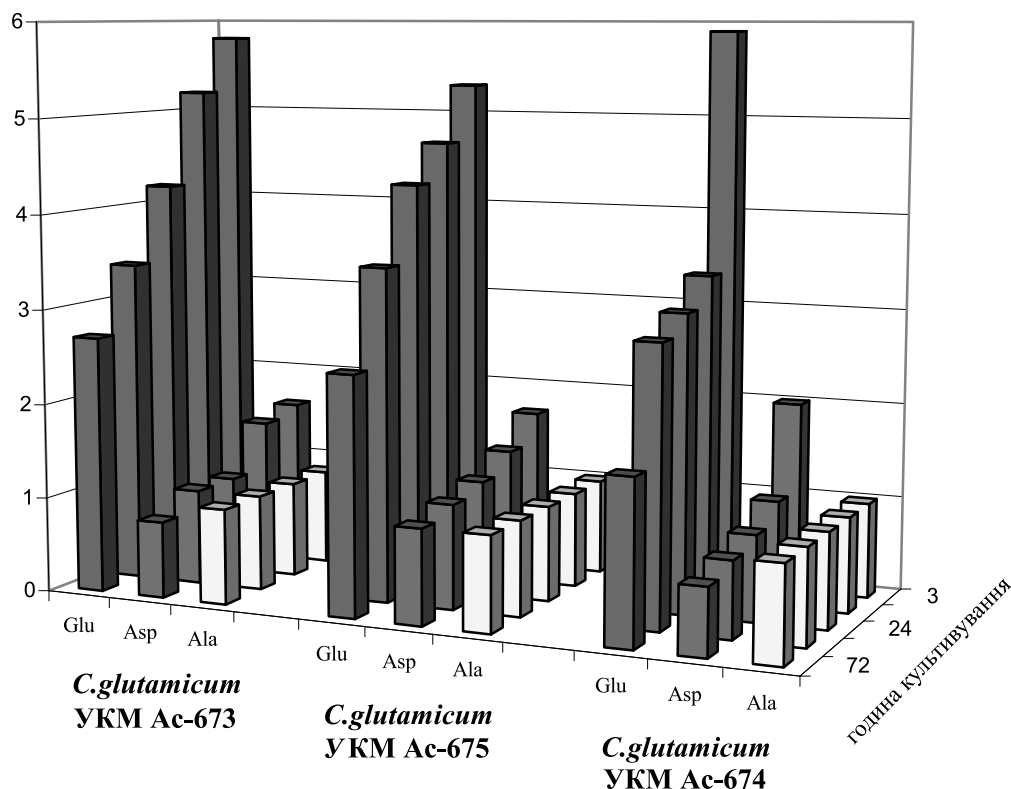


Рис. 4. Співвідношення глутаміну і аспарагіну до аланіну в препаратах поверхневих біополімерів клітинної стінки досліджених штамів непатогенних коринебактерій

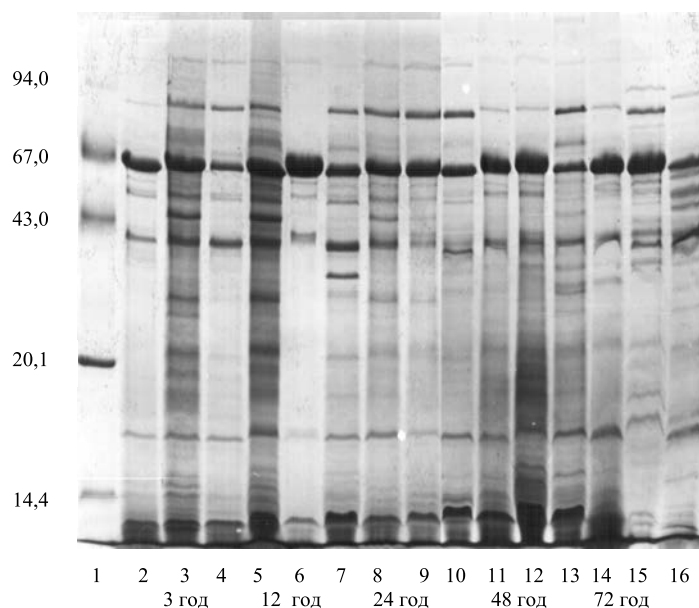


Рис. 5. Електрофореграма препаратів поверхневих біополімерів КС досліджених штамів коринебактерій, отриманих із клітин на різних годинах культивування: 1 – маркерні білки; 2, 5, 8, 11, 14 – препарати ПБКС штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-675; 3, 6, 9, 12, 15 – препарати ПБКС штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-673; 4, 7, 10, 13, 16 – препарати штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-674. 3, 12, 24, 48 та 72 години – час відбору зразків. Фарбування кумасі блакитним

Загальний склад препаратів, наявність мінорних компонентів та природу біополімерів КС уточнювали при фарбуванні гелів нітратом срібла (рис. 6), оскільки застосована модифікація фарбування дозволяє виявляти біополімери не лише білкової, а й змішаної природи, наприклад глікопротеїди. Як було показано нами в попередніх дослідженнях, такий комплексний підхід до фарбування гелів дозволяє [36]: аналізувати в препаратах мінорні компоненти, з'ясувати, що деякі смуги на електрофореграмах утворені не одним, а кількома біополімерами із близькими молекулярними масами, а також визначати природу біополімерів. Позаяк поверхневі біополімери клітинної стінки бактерій схильні до утворення комплексів, що, як правило, максимально проявляється в екстрактах КС, де білки зазвичай можуть бути агреговані з ліпідами, полісахаридами чи іншими структурними компонентами КС бактеріальної клітини. Причому в агрегованому стані може перебувати до 1 % усіх поверхневих білків КС бактерій [24].

Окрім того, під час електрофоретичного аналізу препаратів ПБКС непатогенних коринебактерій нами було застосовано гелі з роздільною здатністю більшою, порівняно з тими, які традиційно використовуються для електрофоретичного вивчення препаратів поверхневих біополімерів КС бактерій, а саме 14 % на відміну від 7–10 % [22; 23]. Це дало можливість виявляти в SDS-екстрактах досліджених штамів

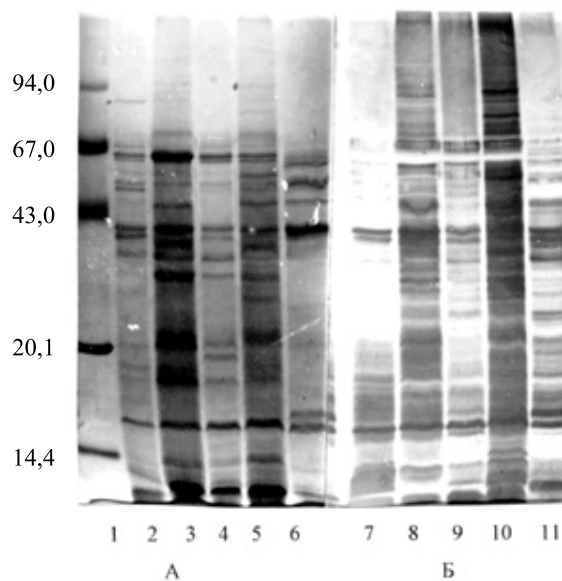


Рис. 6. Електрофореграма препаратів поверхневих біополімерів клітинної стінки штаму *C. glutamicum* УКМ Ас-674, отриманих з клітин на різних годинах культивування: 1 – маркерні білки; 2, 7 – препарат ПБКС 3-годинної культури; 3, 8 – препарат ПБКС 12-годинної культури; 4, 9 – препарат ПБКС 24-годинної культури; 5, 10 – препарат ПБКС 48-годинної культури; 6, 11 – препарат 72-годинної культури. А – фарбування кумасі блакитним, Б – фарбування нітратом срібла

максимально можливу кількість компонентів КС (від 30 до 74 індивідуальних біополімерів, молекулярні маси яких коливались у межах 165,0–10,0 кДа). Так, у препаратах ПБКС штаму УКМ Ас-673 залежно від години

культивування виявляли від 30 до 54 білків з молекулярними масами від 90,0 до 12,8 кДа. У SDS-екстрактах двох інших досліджених штамів було ідентифіковано дещо більшу кількість біополімерів з ММ від 165,0 до 10,0 кДа, зокрема від 43 до 64 у штаму УКМ Ас-674 та 37–74 у штаму УКМ Ас-675 (рис. 5 і 6). За електрофоретичного визначення складу препаратів ПБКС також встановлено, що наявність великої кількості біополімерів у досліджених зразках не була зумовлена лізисом клітин, оскільки їх ідентифікували виключно у SDS-екстрактах. Натомість у культуральній рідині після осадження клітин бактерій вони містились у незначній кількості і взагалі відсутні в рідкому живильному середовищі, які було використано у якості контролю. Наявність незначної кількості поверхневих біополімерів з ММ 66,0 і 62,0 кДа у культуральній рідині є характерною особливістю представників виду *C. glutamicum*, оскільки відповідно до даних, наведених у літературі, секреція поверхневих білків, зокрема S-шарів, у КР властива лише небагатьом бактеріям (зокрема виду *C. glutamicum*) і суттєво залежить від штаму [5; 9; 10; 19; 42].

Порівняння спектрів поверхневих біополімерів КС досліджених штамів коринебактерій, що перебували на різних стадіях росту, дозволило насамперед виявити в отриманих SDS-екстрактах біополімери білкової і змішаної природи, наявність яких не залежала ні від штаму, ні від фази росту культури. У досліджених штамів *C. glutamicum* до спільних віднесені біополімери з молекулярними масами 110,0, 85,0, 67,0–66,0, 63,0–62,0, 52,0, 50,0, 48,0, 44,0, 40,0, 39,0, 37,0, 33,0, 20,5, 16,0, 15,0 та 13,5 кДа. Окрім вищезазначених, у препаратах ПБКС також описано штам- та фазоспецифічні біополімери з ММ 115,0, 112,0, 100,0, 90,0, 64,0, 49,0, 31,5, 30,5, 30,0 і 19,5 кДа, детальний аналіз яких наведено в роботі [36]. Причому найбільшу кількість біополімерів, що характеризували індивідуальність білкових профілів досліджених штамів коринебактерій, виявляли в препаратах ПБКС добових культур. У підсумку треба зазначити, що отримані нами дані щодо електрофоретичних спектрів препаратів поверхневих біополімерів КС непатогенних коринебактерій узгоджуються з описаними іншими дослідниками для поверхневих білків штаму *C. glutamicum* ATCC 1318, які було екстраговано з цілих клітин із застосуванням детергенту Triton X114 [20]. Автори дослідження довели, що електрофоретичні профілі цих білків не відрізнялися від отриманих традиційним методом.

Висновки

Таким чином, унаслідок проведених досліджень нами показано, що структурні біополімери КС непатогенних коринебактерій із високою ефективністю можна отримувати шляхом екстрагування з цілих клітин 1 % розчином додецилсульфату натрію (рН 4,5). За таких умов екстрагування не відбувається лізису клітин, що дає можливість одержувати препарати поверхневих біополімерів клітинних стінок коринебактерій, які містять значну кількість поверхневих білків та біополімерів змішаної природи. Препарати ПБКС гетерогенні за складом індивідуальних біополімерів і містять білкові та вуглеводні компоненти з молекулярними масами від 10,0 до 165,0 кДа. Найбільшу кількість біополімерів, що характеризують індивідуальність білкових профілів досліджених штамів, було зареєстровано у SDS-екстрактах, отриманих із культур на 24 годину культивування.

Аналіз складу SDS-екстрактів дає підстави стверджувати, що за низкою характеристик (зокрема, відсутність мезо-діамінопімельінової кислоти; переважання таких кислих амінокислот, як глутамін, аланін та аспарагін; незначний вміст сірковмісних амінокислот) досліджені препарати ПБКС значною мірою містять білки, локалізовані на поверхні бактеріальних клітин, у тому числі й ті, що формують S-шари коринебактерій. Відомо, що екстрагування поверхневих біополімерів КС бактерій, зокрема білків, різноманітними агентами, які руйнують той чи інший тип зв'язків, опосередковано дає змогу визначати характер їхнього зв'язку з іншими структурними компонентами клітинної стінки. З огляду на те, що принцип дії використаного нами детергенту (додецилсульфату Na) полягає у послабленні гідрофобних зв'язків і підвищенні розчинності білків, можна припустити, що поверхневі білки клітинної стінки досліджених штамів коринебактерій зв'язані з іншими структурними компонентами клітинної стінки шляхом гідрофобної взаємодії.

Під час аналізу клітин коринебактерій після вилучення з них розчинних у SDS поверхневих біополімерів КС було з'ясовано, що вони зберігали життєздатність, здатність зафарбовуватися за Грамом та основний структурний компонент їхньої клітинної стінки – комплекс пептидоглікан-арабіногалактан-міколові кислоти.

Отже, зважаючи на результати наших досліджень, для отримання шляхом екстрагування з цілих клітин препаратів поверхневих біополімерів КС представників роду *Corynebacterium* та інших актинобактерій найбільш інформативним є застосування добових культур бактерій.

Список літератури

1. Варбанец Л. Д. Структура и биологическая роль полисахаридов *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia* / Л. Д. Варбанец // *Микробиол. журнал.* – 1988. – Т. 50, № 5. – С. 98–107.
2. Daffe M. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. / M. Daffe, M. McNeil, P. J. Brennan // *Carbohydr. Res.* – 1993. – Vol. 249, No. 2. – P. 383–398.
3. 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 / V. Puech, M. Chami, A. Lemassu et al. // *Microbiology.* – 2001. – Vol. 147. – P. 1365–1382.
4. Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae* / L. G. Dover, A. M. Cerdeno-Tarraga, M. J. Pallen et al. // *FEMS Microbiology Reviews.* – 2004. – Vol. 28. – P. 225–250.
5. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications / N. Bayan, C. Houssin, M. Chami et al. // *J. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 104. – P. 55–67.
6. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state / B. Zuber, M. Chami, C. Houssin et al. // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190, No. 16. – P. 5672–5680.
7. PorA represents the major cell wall channel of the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* / N. Costa-Riu, A. Burkovski, R. Krämer et al. // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185, No. 16. – P. 4779–4786.
8. *Corynebacterium diphtheriae*: identification and characterization of a channel-forming protein in the cell wall / B. Schiffler, E. Barth, M. Daffé et al. // *J. Bacteriol.* – 2007. – Vol. 89, No. 21. – P. 7709–7719.
9. Crystalline surface layers on bacteria. In: *Crystallin Bacterial Cell Surface Layers* / [Sleytr U. B., Messner P.] ; ed. U. B. Sleytr et al. – Berlin : Springer-Verlag, 1988. – P. 160–186.
10. Beveridge T. J. Surface layers of bacteria / T. J. Beveridge, L. L. Graham // *Microbiol. Rev.* – 1991. – Vol. 55, No. 3. – P. 684–705.
11. The S-layer protein of *Corynebacterium glutamicum* is anchored to the cell wall by its C-terminal hydrophobic domain / M. Chami, N. Bayan, J. L. Peyret et al. // *Molecular Microbiology.* – 1997. – Vol. 23, No. 3. – P. 483–492.
12. Charting and unzipping the surface layer of *Corynebacterium glutamicum* with the atomic force microscope / S. Scheuring, H. Stahlberg, M. Chami et al. // *Molecular Microbiology.* – 2002. – Vol. 44, No. 3. – P. 675–684.
13. Classification of hyper-variable *Corynebacterium glutamicum* surface-layer proteins by sequence analyses and atomic force microscopy / N. Hansmeier, F. W. Bartels, R. Ros et al. // *J. Biotechnology.* – 2004. – Vol. 112, No. 1–2. – P. 177–193.
14. Mattos-Guaraldi A. L. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae* / A. L. Mattos-Guaraldi, L. C. Duarte Formiga, G. A. Pereira // *Microbes Infect.* – 2000. – Vol. 2, No. 12. – P. 1507–1512.
15. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes / A. C. Colombo, J. R. Hirata, C. M. Rocha de Souza et al. // *FEMS Microbiol. Letters.* – 2001. – Vol. 197. – P. 235–239.
16. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells / L. Ott, M. Höller, R. G. Gerlach et al. // *BMC Microbiol.* – 2010. – Vol. 10, No. 2. – P. 1–9.
17. Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes *cop1*, *cmt1*, and *cmt2* can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope / S. Brand, K. Niehaus, A. Puhler et al. // *Arch. Microbiol.* – 2003. – Vol. 180. – P. 33–46.
18. Characterization of detergent-soluble proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis* / C. E. Braithwaite, E. E. Smith, J. G. Songer et al. // *Vet. Microbiol.* – 1993. – Vol. 38, No. 1–2. – P. 59–70.
19. Biochemistry of S-layers / P. Messner, G. Allmaier, C. Schaffer et al. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1997. – Vol. 20, No. 1–2. – P. 25–46.
20. A rapid and simple method using the detergent Triton X114 for preparation of outer membrane proteins from bacteria containing mycolic acids / T. Aizava, N. Iwabuchi, A. Kikuchi et al. // *Actinomycetol.* – 2001. – Vol. 15, No. 1. – P. 6–10.
21. Crystalline surface protein of *Peptostreptococcus anaerobicus* / A. Kotiranta, M. Haapasalo, K. Lounatmaa et al. // *Microbiology.* – 1995. – Vol. 140. – P. 1065–1073.
22. Cloning and nucleotide sequence of the *cop1* gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of *Corynebacterium glutamicum*: the deduced N-terminal region of PS1 is similar to the *Mycobacterium* antigen 85 complex / G. Joliff, L. Mathieu, V. Hahn et al. // *Molecular Microbiol.* – 1992. – Vol. 16, No. 6. – P. 2349–2362.
23. Characterization of the *copB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum* / J. Peyret, N. Bayan, G. Joliff et al. // *Molecular Microbiol.* – 1993. – Vol. 9, No. 1. – P. 97–109.
24. Fifis T. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation / T. Fifis, J. S. Rothel, P. R. Wood // *Vet. Microbiology.* – 1994. – Vol. 40. – P. 65–91.
25. Физико-химическое изучение дезоксиолатных экстрактов коринебактерий дифтерии / Е. П. Гренкова, М. О. Биргер, Н. Г. Фиш и др. // *Эпидемиология, микробиология и профилактика капельных инфекций : сб. научн. тр. – М., 1983. – С. 56–61.*
26. Кондрашина Н. Н. Выделение и иммунохимическая характеристика растворимых мембранных белков клеточных стенок коринебактерий дифтерии / Н. Н. Кондрашина, Е. А. Шмелева, С. Ф. Берестень // *Биохимия.* – 1987. – Т. 52, № 6. – С. 978–983.
27. Особенности строения полимеров клеточной стенки *Actinomyces polychroma* ИНА 2755 / Г. М. Стрешинская, И. Б. Наумова, А. С. Шашков и др. // *Биохимия.* – 1991. – Т. 56, № 12. – С. 2270–2280.
28. Блишников Е. И. Биохимический и иммунохимический анализы белковых компонентов клеточной стенки стрептококков группы А, выделенных шадящим химическим методом / Е. И. Блишников, А. Р. Шихман // *Журн. микробиол.* – 1992. – № 11–12. – С. 2–5.
29. Северина Л. О. Структура и химический состав S-слоев представителей рода *Sulfobacillus* / Л. О. Северина, А. А. Сеньюшкин, Г. И. Каравайко // *Микробиология.* – 1995. – Т. 64, № 3. – С. 336–340.
30. Апсите А. Ф. Продукты L-лизина из рода *Brevibacterium* / А. Ф. Апсите, Г. Р. Межия, В. П. Осе. – Рига : Зинатне, 1978. – 170 с.
31. Гнутова Р. В. Серология и иммунохимия вирусов растений / Р. В. Гнутова. – М. : Наука, 1993. – 170 с.
32. Миронов А. А. Метод электронной микроскопии в биологии и медицине / А. А. Миронов, Я. Ю. Комисарчик, В. А. Миронов. – СПб. : Наука, 1994. – 399 с.
33. Методы почвенной микробиологии и биохимии ; под ред. Д. Г. Звягинцева. – М. : Изд-во МГУ, 1991. – 304 с.
34. Захарова И. Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И. Я. Захарова, Л. В. Косенко. – К. : Наукова думка, 1982. – С. 37.
35. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, No. 15. – P. 680–685.

36. Спектри поверхневих білків *Corynebacterium glutamicum* на різних фазах розвитку культури / І. М. Фуртат, Л. О. Михальський, Т. М. Ногіна та ін. // Наукові записки НаУКМА. – 2002. – Т. 20 : Біологія та екологія. – С. 8–17.
37. Harlow E. Antibodies: a laboratory manual / E. Harlow, D. Lane. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. – 726 p.
38. Schleifer K. H. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications / K. H. Schleifer, O. Kandler // Bacteriol. Reviews. – 1972. – Vol. 36, No. 4. – P. 407–477.
39. Изменение состава и структуры клеточных стенок *Streptococcus pyogenes* при периодическом культивировании / С. А. Битко, Л. О. Дынга, О. П. Дегтерева и др. // Журн. микробиол. – 1987. – № 8. – С. 3–7.
40. Изменчивость мембран *Staphylococcus aureus* в зависимости от фазы роста культуры / Л. М. Котелевец, Ю. С. Бабенко, В. А. Еремина и др. // Микробиол. журн. – 1987. – Т. 49, № 3. – С. 14–18.
41. Изучение строения поверхности клеток продуцента лизина методом микроэлектрофореза / Л. А. Скирда, И. П. Мужиковская, Л. Г. Чирко и др. // Регуляция микробного метаболизма: всесоюзная конф., 12–14 июня 1989 г. : тезисы докл. – Пушкино, 1989. – С. 32.
42. Organization of the outer layers of cell envelope of *Corynebacterium glutamicum*: A combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study / M. Chami, N. Bayan, J.-G. Dedier et al. // Biol. Cell. – 1995. – Vol. 83. – P. 219–229.

I. Furtat

OBTAINING AND CHARACTERISATION OF CELL WALL SURFACE BIOPOLYMERS PREPARATIONS OF NON-PATHOGENIC CORYNEBACTERIA

In this paper we obtain and characterize the cell wall surface biopolymers preparations of non-pathogenic corynebacteria. The method of extraction from whole cells with 1 % solution of sodium dodecyl sulfate was shown to be effective to obtain Corynebacterial cell wall surface biopolymers preparations. It has been established, that following the surface biopolymers extraction, Corynebacterial cells do not lyse, remain viable, do not change Gram staining, and contain the main structural component of the cell wall like complex of peptidoglycan-arabinogalactan-mycolic acids. It was also shown that acidic amino acids were dominant in the cell wall surface biopolymers preparations, neutral and basic amino acids were also present, but in smaller numbers. Trace amounts of sulfur-containing amino acids (cysteine and methionine) were present in SDS-extracts, which is typical for the vast majority of surface proteins of bacteria. Electrophoretic spectra of surface biopolymers were investigated, on the basis of which, preparations obtained from 24 hour cultures were recommended for comparative studies of surface biopolymers of different species of actinobacteria.

Keywords: non-pathogenic corynebacteria, *Corynebacterium glutamicum*, cell wall, preparations of surface biopolymers, amino acid compound, surface proteins, electrophoretic spectra of cell wall surface biopolymers.

Матеріал надійшов 12.07.2014