

Л. И. Воробьева

ПРОПИОНОВО-
КИСЛЫЕ
БАКТЕРИИ



Издательство
Московского университета

Л. И. Воробьева

ПРОПИОНОВО-
КИСЛЫЕ
БАКТЕРИИ

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
1995

Рецензенты:

профессор *И. Л. Работнова*,
профессор *Н. С. Егоров*

*Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета
Московского университета*

Воробьева Л. И. Пропионовокислые бактерии. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 288 с.

ISBN 5-211-02303-2

В монографии обобщены результаты многолетних исследований автора, а также данные литературы об уникальной форме жизни пропионовокислых бактерий. Автор рассказывает о сложности научных поисков, оригинальных подходах в изучении пропионовокислых бактерий, о большом вкладе в эту область микробиологии отечественных исследователей, открывших удивительные факты, имеющие общебиологическое значение. Представлены данные об ультраструктурной организации пропионовокислых бактерий, их биохимии, физиологии, экологии, новые данные о генетике этих бактерий, имеющие важное значение для понимания эволюции мира живых существ.

Для микробиологов, биохимиков, биотехнологов.

В $\frac{1905000000-037}{077(02)-95}$ Без объявл.

ISBN 5-211-02303-2

© Воробьева Л. И., 1995 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	8
Введение	11
Глава 1. ЧТО ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ	15
1.1. Общая характеристика рода <i>Propionibacterium</i>	15
1.2. Классические пропионовокислые бактерии	20
1.3. Кожные пропионовокислые бактерии	42
1.4. <i>Propionibacterium innosium</i> sp. nov.	50
1.5. <i>Propionibacterium propionicum</i> (<i>Arachnia propionica</i>)	50
1.6. Филогенетическое положение рода <i>Propionibacterium</i>	53
Глава 2. ЧТО ИЗВЕСТНО О ГЕНЕТИКЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИИ	54
2.1. Плазмиды	54
2.2. Естественный мутагенез	56
2.3. Индуцированный мутагенез	60
2.4. Антимутагенез	75
Глава 3. ПОЛУЧЕНИЕ ЭНЕРГИИ	91
3.1. Брожение	91
3.1.1. Биохимия брожения	91
3.1.2. Ферменты	96
3.1.3. Выход энергии	101
3.1.4. Сбраживаемые субстраты и соотношение продуктов брожения	105
3.2. Дыхание	109
3.2.1. Окислительная активность	110
3.2.2. Действие ингибиторов	114
3.2.3. Цепь переноса электронов	117
3.2.4. Окислительное фосфорилирование	121
3.2.5. Антиокислительная защита	124
3.2.6. Эффект Пастера. Переключение с анаэробного на аэробный путь получения энергии	127
Глава 4. КАК БАКТЕРИИ СИНТЕЗИРУЮТ КЛЕТОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ	130
4.1. Питание	130
4.1.1. Источники азота	130
4.1.2. Витамины	133

4.1.3. Ассимиляция серы (особенности)	135
4.1.4. Источники углерода и энергии	138
4.2. Количественные показатели роста	147
4.3. Условия роста	151
4.4. Анаболические процессы	153
4.4.1. Аминокислоты	154
4.4.2. Липиды	155
4.4.3. Полифосфаты	156
4.4.4. Антивирусные агенты и бактериоцины	160
4.4.5. Тетрапиррольные соединения	160
Глава 5. МЕТАБОЛИЗМ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ НА- СТРОЕН НА ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ВИТАМИНА В₁₂	185
5.1. В ₁₂ -зависимые реакции	185
5.1.1. В ₁₂ -зависимые реакции у пропионовокислых бактерий	188
5.2. Катаболизм и витамин В ₁₂	189
5.3. Анаболизм и витамин В ₁₂	193
5.3.1. Условия роста В ₁₂ -дефицитных бактерий	193
5.3.2. Синтез белка	195
5.3.3. Синтез ДНК	196
5.3.4. Метилирование ДНК	199
5.3.5. Отступление в сторону экологии	201
Глава 6. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ	206
6.1. Физиологические особенности иммобилизованных клеток; обра- зование жирных кислот	207
6.2. Выделение нуклеотидов и их производных	214
6.3. Синтез аспарагиновой и яблочной кислот	215
6.4. Синтез порфобилиногена (ПБГ)	217
6.5. Синтез витамина В ₁₂	218
Глава 7. ПРИМЕНЕНИЕ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ И МЕДИЦИНЕ 219	
7.1. Сыроделие	220
7.2. Витамин В ₁₂	225
7.2.1. Получение	225
7.2.2. Применение	227
7.3. Порфирины	231
7.4. Препараты для животноводства	231
7.5. Получение пропионовой кислоты	235
7.6. Пищевая промышленность	240
7.6.1. Хлебопечение	240
7.6.2. Кисломолочные напитки	240
7.6.3. Обессахаривание белка куриных яиц	241
7.7. Супероксиддисмутаза (СОД)	242
7.8. Применение <i>Corynebacterium parvum</i> (<i>P. acnes</i>) и анаэробных кориннебактерий в экспериментальной и клинической онкологии 244	
Заключение	250
Литература	257

CONTENTS

Preface	8
Introduction	11
Chapter 1. WHAT ARE THE PROPIONIC ACID BACTERIA	15
1.1. General characteristics of genus <i>Propionibacterium</i>	15
1.2. Classical propionic acid bacteria	20
1.3. Cutaneous propionic acid bacteria	42
1.4. <i>Propionibacterium propionicum</i> (<i>Arachnia Propionica</i>)	50
1.5. Phylogenetic position of genus <i>Propionibacterium</i>	53
Chapter 2. WHAT IS KNOWN ABOUT GENETICS OF PROPIONIC ACID BACTERIA	54
2.1. Plasmids	54
2.2. Natural mutagenesis	56
2.3. Induced mutagenesis	60
2.4. Antimutagenesis	75
Chapter 3. ENERGY GENERATION	91
3.1. Fermentation	91
3.1.1. Biochemistry of fermentation	91
3.1.2. Enzymes	96
3.1.3. Energy output	101
3.1.4. Fermented substrates and relation between the products of fermentation	105
3.2. Respiration	109
3.2.1. Oxidative activity	110
3.2.2. Effect of inhibitors	114
3.2.3. Electron transport chain	117
3.2.4. Oxidative phosphorylation	121
3.2.5. Antioxidative defence	124
3.2.6. Pasteur effect. Shift from anaerobic to aerobic way of energy generation	127
Chapter 4. HOW DO BACTERIA SYNTHESIZE CELL MATERIALS AND PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS	130
4.1. Nutrition	130
4.1.1. Sources of nitrogen. Nitrogen fixation	130
4.1.2. Vitamins	133

4.1.3. Sulfur assimilation (Peculiarities)	135
4.1.4. Sources of carbon and energy	138
4.2. Quantitative characterizatin of growth	147
4.3. Growth conditions	151
4.4. Anabolic processes	153
4.4.1. Aminoacids	154
4.4.2. Lipids	155
4.4.3. Polyphosphates	156
4.4.4. Antiviral agents and bacteriocins	160
4.4.5. Tetrapyrrools	160
Chapter 5. METABOLISM OF PROPIONIC ACID BACTERIA IS TUNED TO A HIGH LEVEL OF VITAMIN B₁₂	185
5.1. B ₁₂ -dependent reactions	185
5.1.1. B ₁₂ -dependent reactions in propionic acid bacteria	188
5.2. Catabolic metabolism and vitamin B ₁₂	189
5.3. Anabolic metabolism and vitamin B ₁₂	193
5.3.1. Growth conditions of B ₁₂ -deficient bacteria	193
5.3.2. Synthesis of protein	195
5.3.3. Synthesis of DNA	196
5.3.4. Methylation of DNA	199
5.3.5. Digression to ecology	201
Chapter 6. IMMOBILIZED CELLS	206
6.1. Physiology of immobilized cells, production of fatty acids	207
6.2. Excretion of nucleotides and their derivatives	214
6.3. Aspartic and malic acid production	215
6.4. Formation of porphobilinogen	217
6.5. Formation of vitamin B ₁₂	218
Chapter 7. APPLICATION IN NATIONAL ECONOMY AND MEDICINE	219
7.1. Cheese-making	220
7.2. Vitamin B ₁₂ production	225
7.2.1. Production	225
7.2.2. Application	227
7.3. Porphyrines	231
7.4. Preparations for husbandry	231
7.5. Production of propionic acid	235
7.6. Food industry	240
7.6.1. Baking	240
7.6.2. Lactic acid drinks	240
7.6.3. Desugeration of egg-white	241
7.7. Superoxide dismutase	242
7.8. Application of <i>Corynebacterium parvum</i> (<i>P. acnes</i>) and other anaerobic corynebacteria in experimental and clinical oncology	244
Conclusion	250
References	257

L. I. VOROBJEVA

PROPIONIC ACID BACTERIA

Monograph contains materials of many years investigations carried out at the Department of Microbiology of Moscow State University and in other world laboratories and relates about the unic form of life represented by propionic acid bacteria.

Different aspects of life: ecology, genetics, peculiarities of biochemistry and physiology, metabolic activities of free and immobilized cells, biosynthesis and functions of vitamin B₁₂ including new functions in anabolic reactions discovered by the author, antimutagenicity, nitrogen fixation and other important and new facts are presented in monograph.

In special chapters practical use of propionic acid bacteria in cheesemaking, vitamin B₁₂ — production, ensilage, veterinary, medicine is shown and a reader is convinced that propionibacteria really relate to the most useful ones.

The book is illustrated by many photographs made by the author in electron microscope, drawings and diagrams.

Monograph is addressed to microbiologists, biochemists, physicians teachers, post-graduating students and workers of manufactures based on the vital functions of propionic acid bacteria.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Между выходом в свет нашей первой монографии «Пропионовокислые бактерии и образование витамина В₁₂» в 1976 г. и настоящей книгой прошло более 18 лет. В последние годы автор занималась разработкой ряда теоретических и прикладных проблем, включая вопросы микробного синтеза витамина В₁₂, биотина, деградации и трансформации токсических ксенобиотиков, биокоррозии и защиты различных материалов¹. Эти исследования проводились не с пропионовыми бактериями, но приверженность к последним сохранялась в нашей лаборатории с начала их исследования в 1954 г.

В 1954 г. академик В. Н. Шапошников в качестве объекта исследования предложил нам пропионовокислые бактерии, не ограничив будущую работу формулировкой узкой темы диссертации. Открывалось широкое поле деятельности. В то время мало кто занимался этой группой бактерий и существовало относительно небольшое число публикаций, главным образом зарубежных ученых. О многих из них мы расскажем в этой книге, потому что это были основополагающие работы, а об одной из них хочу сказать уже сейчас; это монография известного американского ученого ван Нила «*The Propionic acid bacteria*» («Пропионовокислые бактерии», его кандидатская диссертация), вышедшая в 1928 г. Монография ван Нила стала для нас отправным пунктом длинного пути изучения пропионовокислых бактерий, итоги которого мы теперь подводим. Этот путь вместе с нами прошли многие аспиранты и студенты старших курсов, сменяя друг друга. Хотя науку относят к области творческой деятельности, этот вид творчества имеет серьезные ограничения в виде фактов, получаемых в экспериментах. Это строгие ограничители. Порой они опрокидывают красивые гипотезы, обрывают полет фантазии и снова прочно приковывают нас к химическому столу лаборатории. И лишь ненадолго оторвавшись от него, решили мы, прислушавшись к совету знакомого и умного журналиста Леонида Жуховицкого, «остановиться, оглянуться» и написать эту книгу, постоянно ощущая поднятый над своей головой «дамоклов меч»: «Быстро пишет тот, кто не боится писать плохо» (Вл. Набоков). Тем не менее торопит время, а приобретенный за долгие годы опыт надо успеть передать другим.

¹ Результаты исследований включены в книги автора «Микробиологический синтез витаминов», 1982; «Техническая микробиология», 1987; «Промышленная микробиология», 1989 и др.

Настоящая книга не есть переиздание первой со сходным названием. За последние 17—18 лет обнаружено много новых и существенных научных фактов, для изложения которых и потребовалось подготовить новую книгу. При этом мы помнили мудрые слова поэта:

Мы все тусклей гораздо жили
Или не жили бы давно,
Когда б на миг предположили,
Что все уже совершено,
Что за далекими горами
Не блещет новая гора,
Что завтра повторим мы с вами

Лишь то, что сказано вчера.
И может, в недрах сердца где-то
Я песню лучшую свою
Ношу, и, хоть она не спета,
Я все-таки ее спою.

Расул Гамзатов

Некоторые из обнаруженных фактов представляют общебиологический интерес. Поэтому хочется думать, что наша монография будет полезна не только для тех, кто непосредственно работает с пропионовыми бактериями, но и для более широкого круга специалистов-биологов.

Пропионовокислые бактерии служат хорошими продуцентами витамина В₁₂. Значительная часть наших исследований была связана с изучением пути биосинтеза и функций корриноидов в метаболизме продуцентов; открыты новые функции корриноидов, и результаты этих исследований получили отражение в настоящей монографии. Лучшие твердые сыры обязаны своими высокими качествами участию в процессе их созревания пропионовокислых бактерий. Опыт отечественных сыроделов говорит о том, что если пропионовые бактерии не размножаются в сырном тесте (а бактерии довольно требовательны к условиям роста), то сыр хорошим не получается. Но оказывается, в Италии существует явление «цветения» сыров, вызываемое чрезмерным ростом пропионовых бактерий, — проблема, над которой работают ученые университета в Милане. Требуется управляемое культивирование, которое зависит от глубины понимания физиологии микроорганизмов.

Пропионовокислые бактерии обладают уникальными биохимическими свойствами. Например, оказалось, что анаэробные представители семейства образуют значительные количества супероксиддисмутазы и каталазы, ферментов, характерных для аэробного метаболизма. Или другое интересное наблюдение: метаболизм диких природных форм настроен на высокий уровень витамина В₁₂.

В последние годы широко изучают генетические свойства пропионовокислых бактерий. Нами впервые показан антимуtagenез этих бактерий.

Эти и другие обнаруженные факты позволили рекомендовать новые способы и области практического применения пропионовокислых бактерий.

Выражаю благодарность всем, кто принимал участие в проведении экспериментальных исследований, результаты которых поло-

жены в основу настоящей книги. Все написанные нами книги готовились к печати в издательстве Московского университета. Считаю своим приятным долгом выразить глубокую признательность Н. М. Глазковой и Н. М. Горелик за постоянное участие в наших совместных трудах. Искренняя благодарность И. И. Щехуре за помощь при подготовке настоящей монографии к печати.

ВВЕДЕНИЕ

В изучении пропионовокислых бактерий условно различимы три главных этапа. Первый этап — разработка способов выделения и само выделение, главным образом из твердых сыров, большого числа разных штаммов, описание фенотипических свойств штаммов, классификация и исследование физиологии бактерий. Этот период начался с открытия пропионовокислых бактерий Фройденрайхом и Орла-Енсенем (Freudenreich, Orla-Jensen, 1906, Orla-Jensen, 1909). Сыры, молоко и молочные продукты стали основными источниками выделения пропионовых бактерий. Из эментальского сыра Фройденрайх и Орла-Енсен выделили чистые культуры бактерий, которые составили три морфологические группы: *Bacterium acidi propionici a*, *B. acidi propionici b* и *Bacillus acidi propionici*. В 1908 г. Тони и Алеман (Thöni, Alleman) в красных и коричневых точках сыров нашли пигментообразующие бактерии. Тролли—Петерсон (Peterson, 1903), пользуясь методом Бури, выделила ряд штаммов, большая часть которых была идентична с культурами Фройденрайха и Орла-Енсена, а одна отличалась значительным слизеобразованием и была отнесена к четвертой группе — *Bacterium acidi propionici c*. Первым исследователем микрофлоры русских сыров был А. Ф. Войткевич. Он описал изолированные пропионовокислые бактерии, которые по своим свойствам напоминали *B. acidi propionici a*.

В Америке Шерман (Sherman, 1921), пытаясь выяснить причину плохого вкуса американских сыров, обратил внимание на то, что сыры готовили из пастеризованного молока, где отсутствовала необходимая микрофлора. Шерман выделил ряд культур пропионовых бактерий, в том числе новую — *B. acidi propionici d*, отличающуюся от известных высокой продукцией кислот при развитии в молоке и на среде с глицерином. К этому периоду относится публикация замечательного труда ван Нилья (Van Niel, 1928), в котором он дает исчерпывающую характеристику пропионовокислых бактерий, включая их морфологию, физиологию, биохимию брожения и пути использования этих бактерий на практике.

Ван Ниль изолировал 30 штаммов пропионовокислых бактерий. В результате собственных исследований, а также на основании литературных данных он установил восемь видов и одну разновидность пропионовокислых бактерий, что положило начало их систематике.

1. *B. acidi propionici a* — *Propionibacterium freudenreichii*.
2. *B. acidi propionici b* — *P. jensenii*.
3. *B. acidi propionici d* — *P. shermanii*.
4. *Bac. acidi propionici* — *P. pentosaceum*.
5. *B. acidi propionici var. rubrum* — *P. rubrum*.
6. *B. acidi propionici var. fuscum* — *P. thoenii*.
7. *P. technicum*.
8. *B. acidi propionici c* — *P. petersonii*.
- 8a. *P. jensenii var. raffinosaceum*.

Ван Ниль поместил пропионовокислые бактерии в новый род *Prepionibacterium*, как было предложено ранее Орла-Енсенем. Большой вклад в изучение пропионовокислых бактерий внесен американскими исследователями Веркманом и Кендалом (Werkman, Kendall, 1931). Они установили новый вид, подняв разновидность *P. jensenii var. raffinosaceum* до уровня вида *P. raffinosaceum*.

В 1934 г. Хитчнер (Hitchner, 1934) выделил еще два вида пропионовокислых бактерий: *P. zae* и *P. arabinosum*. Новые штаммы пропионовых бактерий выделил и описал Сакагучи (Sakaguchi et al., 1941); Яношек в Германии (Janoschek, 1944) выделил из сыров 194 штамма, в том числе много пигментированных. Примечательно, что после этого периода (после 40-х годов) практически не было открыто новых видов пропионовых бактерий, за исключением кокковых форм, выделенных и описанных нами (Алексеева и др., 1973, 1983) как новый вид.

Пополнение рода произведено за счет перемещения видов из других родов.

Так, на основании ряда существенных хемотаксономических и генетических признаков анаэробные коринебактерии из рода *Corynebacterium* перенесены (Cummins, Johnson, 1986) в род *Propionibacterium*. В роде *Propionibacterium* они составили четыре новых вида.

Эти бактерии обладают уникальными иммуностимулирующими свойствами и имеют большие перспективы применения в медицине. Их называют кожные бактерии, так как они в значительных количествах населяют поверхность человеческой кожи, а также являются обычным компонентом микрофлоры желудка жвачных. Об их антивирусных, бактерицидных и противоопухолевых свойствах хорошо осведомлены врачи и медицинские микробиологи. В 1975 г. в Париже состоялся семинар «*Corynebacterium parvum*: application in experimental and clinical oncology». Есть даже международный клуб «*Corynebacterium parvum*». Установлено (Halpern et al., 1966; Wilkinson, 1975), что анаэробные коринебактерии, защищая животных от опухолей и инфекций, действуют как иммунологические адъюванты. Эти свойства анаэробных коринебактерий связывают с их способностью стимулировать функции клеток мононуклеарной фагоцитной системы.

Микробиологи немедицинского профиля, за исключением таких известных специалистов в области изучения анаэробных бактерий, как Прево и его группа в Париже, как правило, редко сталкиваются с анаэробными коринебактериями. В книге анаэробным коринебактериям уделено особое внимание.

Другой новый вид, недавно включенный в род «*Propionibacterium-Arachnia propionica*», который теперь называют (Charfreitag et al., 1988) *Propionibacterium propionicum*, также описан в настоящей книге.

Создание и изучение коллекции пропионовокислых бактерий происходило параллельно с исследованием биохимии этой группы и прежде всего биохимии брожения.

Пропионовокислое брожение открыл Фитц (Fitz, 1878), который и дал уравнение анаэробного превращения лактата в пропионат, ацетат, CO_2 и H_2O . Позднее это брожение изучали Вуд, Веркман и их сотрудники. Вуду принадлежит открытие гетеротрофной фиксации CO_2 именно на пропионовокислых бактериях.

Усилиями Вуда, Веркмана (Wood, Werkman, 1934, 1936 а, б) и их школы, Баркера, Липмана (Barker, Lipman, 1944), Дельвиха (Delwiche, 1948) в США расшифрован химизм пропионовокислого брожения. На втором этапе интенсивных исследований биохимии пропионовокислых бактерий другим ярким событием стали открытия в области аэробного метаболизма. Хотя еще ван Ниль (Van Niel, 1928) впервые, а затем Ше и Фромажо (Chaix, Fromageot, 1942), Ше и Андеман (Chaix, Andemand, 1940) указывали на окислительную способность пропионовых бактерий, аэробный метаболизм долгое время оставался в стороне. Этому способствовало общепринятое причисление пропионовых бактерий к анаэробам. И наше сообщение в 1954 г. о том, что эти бактерии можно культивировать в аэробных условиях, было встречено советскими микробиологами с удивлением. Однако вслед за этим были проведены исследования аэробного метаболизма как в нашей лаборатории, так и за рубежом. Большой вклад в этой области сделан школой Стаутамера в Нидерландах; американские исследователи (Delwiche, Carson, 1956) обнаружили у бактерий ферменты цикла Кребса. В результате изучения аэробного метаболизма у пропионовых бактерий установлена функционирующая цепь переноса электронов (ЦПЭ), кислородное, фумаратное, нитратное дыхание, система антиокислительной защиты. Эти исследования продемонстрировали удивительную лабильность метаболизма пропионовых бактерий, которые, как оказалось, экипированы как для анаэробной, так и для аэробной жизни. Но вместе с этими фактами возник вопрос: почему пропионовые бактерии имеют явную тенденцию к анаэробнобиозу? Правда, это тот вопрос, о котором персидская мудрость говорит так: «Ответ, равно как и вопрос, на почве знания возрос». Возник вопрос, наверное будет и ответ.

Третий этап в изучении пропионовых бактерий тесно связан с открытием витамина В₁₂ в образовании которого некоторые штаммы пропионовых бактерий оказались рекордсменами в природе.

Этот этап характеризуется изучением условий и пути биосинтеза корриноидов, их функций в метаболизме продуцентов и созданием промышленного производства витамина В₁₂ на основе жизнедеятельности пропионовых бактерий.

Результаты этих исследований убедили нас в том, что анаэробный метаболизм пропионовых бактерий настроен на высокий уровень корриноидов в клетках.

Любое биологическое явление, как писал генетик Ф. Добржанский, можно считать осмысленным только в свете эволюционных представлений. Экспериментальные сведения, накопленные за 100 лет изучения этих бактерий, позволяют видеть в них важный объект для понимания эволюции микроорганизмов.

Некоторые «тайны природы» удалось приоткрыть с помощью пропионовокислых бактерий, и мы расскажем в книге, что и как удалось узнать об этой интересной форме жизни.

В последние десятилетия пропионовые бактерии стали интересовать специалистов в области геномной инженерии. В них обнаружены и охарактеризованы плазмиды, некоторые гены трансформированы.

Разработка генетики пропионовокислых бактерий может стать важным и новым этапом в изучении этой полезной группы микроорганизмов.

**ЧТО ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ
ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ****1. 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОДА
PROPIONIBACTERIUM**

Пропионовокислые бактерии объединены в род *Propionibacterium* (Orla-Jensen, 1909), который входит в состав семейства Propionibacteriaceae (Delwiche, 1957). Другой род этого семейства — *Eubacterium*.

В целом пропионовые бактерии характеризуют как грамположительные, каталазоположительные, неспорообразующие, неподвижные, факультативно анаэробные или аэротолерантные палочковидные бактерии.

Бактерии содержат менахиноны, главным образом типа МХ-9 (Н₄) (Fernandez, Collins, 1987), С₁₅ — насыщенную жирную кислоту мембранных липидов) и образуют пропионовую кислоту при брожении, откуда и получили свое название. Содержание ГЦ в ДНК 53—67%. После исследований Дугласа и Гантера (Douglas, Gunter, 1946) в род *Propionibacterium* стали включать виды анаэробных коринебактерий. Они перенесены в род *Propionibacterium* из рода *Corynebacterium* в связи с тем, что это: 1) анаэробы (большая часть коринебактерий — аэробы), 2) образуют пропионовую кислоту, как главный продукт метаболизма, 3) в пептидогликане клеточных стенок содержат в основном L-диаминопимелиновую кислоту (L-ДАП) как диаминокислоту; родственные им формы, например аэробные кожные коринебактерии, содержат мезо-изомер ДАП, а сходная морфологическая группа актиномицетов вообще не содержит ДАП. Далее: 4) изо- и антеизо-С₁₅ насыщенные кислоты — главные жирные кислоты клеточных липидов; 5) в отличие от аэробных коринебактерий они не содержат миколовых кислот и арабиногалактана. Отличаются от пропионовокислых бактерий тем, что обладают высокой протеолитической активностью, оптимум температуры 37° (оптимум температуры для пропионовокислых бактерий 30°). Помещение анаэробных коринебактерий в род *Propionibacterium* не поддерживает Прево (Prevot, 1976). Он считает, что группу «аспес» в силу ее патогенности и ретикулостимулирующих свойств следует поместить в подрод *Coryneforms* сем. *Corynebacteriaceae*. Обосновывая свою точку зрения, Прево суммирует различия между аэробными, анаэробными коринебактериями и пропионовыми бактериями, представленными в табл. 1.

Однако указанные выше доводы признаны весьма существенными и в 8-м издании определителя Берги (1986) анаэробные коринебактерии рассматриваются в составе рода.

Характерные отличия представителей коринебактерий, коринеформ и *Propionibacterium* (Prevot, 1976)

Тип дыхания	Коринебактерии	Анаэробные коринеформы	<i>Propionibacterium</i>
	аэробный или факультативный	строгие анаэробы	микроаэрофилы или факультативные
Клеточная стенка	Арабиноза, галактоза, манноза, мезо-ДАП, аланин, глутаминовая кислота	галактоза, глюкоза, глицин, L-ДАП	галактоза, глюкоза, манноза, рамноза, инозит, аланин, глутаминовая кислота, глицин, LL-ДАП
ДНК (Г+Ц, %)	51,9	58—64	65—68
Токсин	есть	нет	нет
Ретикулостимулин	нет	есть	нет
Кобаламин и корриноиды	нет	нет	есть
Колонии	бесцветные	розовые	серые, кремовые, желтые, коричневые, красные
Патогенность для:			
человека	+	+	нет
животных	+	+	нет
растений	+	нет	нет
Биохимические особенности:			
индол	+	±	—
желатина	+	±	—
Тип брожения	уксуснокислое или уксусно-маслянокислое	преимущественно ацетопропионовое	пропионово-уксусное

Поскольку главное место обитания анаэробных коринебактерий — это поверхность кожи людей, их стали называть кожными (cutaneous) пропионовокислыми, а бактерии, выделенные из сыра и молока, — молочными, или классическими пропионовокислыми бактериями.

На основании работ ван Ниля и других исследователей в 7-м издании определителя Берги (Bergey, 1957) описывается 11 видов (классических) пропионовокислых бактерий. После установления высокой степени гомологии ДНК штаммов (Johnson, Cummins, 1972) число видов сокращено до 4 (табл. 2).

Таблица 2

Виды рода *Propionibacterium*

Название видов и групп, принятых к 1988 г.	Первоначальное название видов
Классические	
<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. freudenreichii</i> , <i>P. shermanii</i>
<i>P. thoenii</i>	<i>P. thoenii</i> , <i>P. rubrum</i>
<i>P. jensenii</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. zeae</i> , <i>P. technicum</i> , <i>P. raffinosaceum</i> , <i>P. petersonii</i>
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. arabinosum</i> , <i>P. pentosaceum</i>
<i>P. coccoides*</i>	
Кожные	
<i>P. acnes</i>	<i>Corynebacterium acnes</i>
<i>P. avidum</i>	<i>C. avidum</i>
<i>P. granulosum</i>	<i>C. granulosum</i>
<i>P. propionicum</i>	<i>Arachnia propionica</i>
<i>P. limphophilum</i>	<i>C. limphophilum</i>

* Предложен в 1983 г. (Воробьева и др., 1983), но официального статуса вида еще не получил.

Кожные пропионовые бактерии иногда называют анаэробными коринеформами или анаэробными дифтероидами. Вначале описывали (Prevot, Fredette, 1966) 12 видов анаэробных коринеформ, однако позднее (Johnson, Cummins, 1972), после обследования 80 штаммов в отношении состава клеточных стенок и ДНК-ДНК-гомологии, было образовано 3 группы, которым можно было придать статус видов: *P. acnes*, *P. granulosum* и *P. avidum*.

Кожные пропионовые бактерии живут не только на поверхности нормальной кожи людей. Их выделяют также из угрей, реже из содержимого желудка, ран, крови, гнойных и мягких тканевых абсцессов. Таким образом, классические и кожные пропионовые бактерии различаются прежде всего по характерным местам их обитания в природе. Другие различия этих двух групп представлены в табл. 3 и 4. Классические пропионовые бактерии, в отличие от кожных, не образуют индола и не способны к гидролизу желатин.

Дифференциация видов рода *Propionibacterium* (Cummins, Johnson, 1986)

Организм	Кислота из		Гидролиз эскулина	Образование индола	Восстановление NO ₂	Гидролиз желатины	ДАП-изомер клеточной стенки	Гемолиз	ДНК, Г+Ц, мол. %
	сахара	мальтозы							
<i>P. acnes</i>	+	+	+	+	+	++	L, иногда мезо	+	59±1,49
<i>P. avidum</i>	+	+	+	+	-	+	L, иногда мезо	+	62±0,49
<i>P. granulorum</i>	+	+	+	+	-	+	L	+	62±1,00
<i>P. freudenreichii</i>	+	+	+	+	d	+	L	+	65±0,97
<i>P. jensenii</i>	+	+	+	+	-	+	L	+	67±1,07
<i>P. thoenii</i>	+	+	+	+	-	+	L	+	66±0,50
<i>P. acidil-propionict</i>	+	+	+	+	+	+	L	+	67±0,84
<i>P. limphophilum</i>	+	+	+	+	d	+	нет ДАП, клеточная стенка содержит лизин	+	53±0,71

Примечание. d — реакция положительная у 11—89% штаммов.

В 1988 г. на основании, главным образом, результатов сравнительного анализа длинных фрагментов 16S рРНК в род *Propionibacterium* под названием *P. propionicum* включена *Arachnia propinica* (Charfreitag et al., 1988), ранее включенная в род *Actinomyces*. *A. propionicum* образует нитчатые ветвистые клетки в отличие от палочковидных клеток других пропионовых бактерий, поэтому включение ее в род *Propionibacterium* делает этот род гетерогенным в морфологическом отношении.

Воробьева и др. (1983 г.) предложили в род *Propionibacterium* включить пропионовокислые кокки, имеющие с палочковидными бактериями много общих свойств и высокую степень гомологии ДНК. Кокки выделяют из молока и сыров на ранних стадиях их созревания. В отличие от типичных пропионовых бактерий кокки растут на поверхности плотных сред в виде оранжевых колоний и обладают широкими ферментативными способностями. Новый вид предложено назвать *P. coccoides*.

Важным свойством рода является образование пропионовой кислоты в результате пропионовокислого брожения, зависящего от кофермента

Дополнительные признаки для дифференциации видов рода *Propionibacterium* (Bergey, 1986)

Признак \ Вид	<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. lensetti</i>	<i>P. thoenii</i>	<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. avidum</i>	<i>P. granulorum</i>	<i>P. lymphophilum</i>
Желатин	—	—	—	—	+	+	d—	d+
Молоко (сгусток)	d+	d—	d—	d—	d+	+	+	+
Digestion	—	d—	—	—	d+	+	—	—
Образование индола	—	—	—	—	d+	—	—	—
Восстановление NO ₃	—	—	—	+	d+	—	—	d—
Каталаза	—	d+	+	d+	d—	—	+	+
Газ	—,1	—,1	—,1	1,2	—,2	—,1	—,1	—,1
Ацетон	—	—	—	d+	—	—	—	—
Рост в 20% -ной желчи	2,1	d+	—,1	4	2,1	d+	—,1	—,1

Примечание. «+» — реакция положительная у 90—100% испытанных штаммов «—» — реакция отрицательная у 90—100% штаммов; d— — реакция положительная у 10—40% штаммов; d+ — реакция положительная у 40—90% штаммов. Числа относятся к образованию (газ) или к уровню роста (желчь) в пределах баллов от 1 до 4.

V₁₂. Если не учитывать последнее обстоятельство, то к пропионовым бактериям могут быть ошибочно отнесены некоторые штаммы клостридий, не все из которых образуют споры. При этом, например *Clostridium botulinum*, *Cl. propionicum* и др., образуют пропионовую кислоту, но пропионовые бактерии имеют ДНК ГЦ-типа (65—67 мол % ГЦ у классических и 53—62 мол % ГЦ у кожных), а у клостридий ДНК — АТ-типа (25—30 мол % ГЦ).

Вместе с тем некоторые аэробные коринебактерии образуют пропионовую кислоту, имеют высокое содержание ГЦ (53—68 мол %), но отличаются от пропионовых бактерий в отношении состава липидов и клеточных стенок: они не содержат в большом количестве C₁₅ разветвленные жирные кислоты в мембранных липидах, а в клеточных стенках содержится арабиногалактан и миколовые кислоты, которых нет у пропионовых бактерий.

Из активного ила аэротенка, сбрасывающего сточные воды, выделена пропионовая бактерия (Samain et al., 1982) с пропионат-ацетатным типом брожения. Авторы так и называют ее «новая пропионовая бактерия». Это облигатно анаэробная аспорогенная грамотрицательная палочка. Бактерии способны сбрасывать этанол и пропанол. Истинные пропионовые бактерии грамположительны и указанные спирты не сбрасывают.

Известны и другие организмы, образующие пропионовую кислоту: *Selenomonas ruminantium*, *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Propionispira arboris*, большую часть которых не относят к близким родственникам пропионовокислых бактерий.

1.2. КЛАССИЧЕСКИЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

Главное место обитания — твердые сычужные сыры и более 60% штаммов, выделенных в Финляндии из «Эмментальского» сыра, относится к *P. freudenreichii* и *P. shermanii* (Mergilaeinen, Antila, 1976). Имеются сообщения о выделении *P. petersonii* (van Niel, 1957) и *P. pentosaceum* (Prevot, Fredette, 1966) из почвы, *P. zeae* — из силоса (van Niel, 1957); пропионовые бактерии выделяли также из бродящих оливок (Cancho et al., 1970, 1980; Plastourgos, Voughn, 1957).

Это азотолерантные или микроаэрофильные бактерии, хотя есть штаммы, предпочитающие аэробные условия. Палочковидные клетки бактерий склонны к плеоморфизму. Рудиментарное ветвление наблюдается в аэробных условиях или в анаэробных при низких значениях рН. Колонии обычно влажные, округлые или в виде гречичного зерна (рис. 1), блестящие, маслянистые, хотя недавно нами (Vogobjeva et al., 1990) описаны штаммы, образующие кожистые колонии, которые с трудом снимаются с поверхности агара. При росте в жидкой среде такие штаммы образуют тяжелый тянувшийся осадок.

Цвет колоний у пропионовых бактерий кремовый, желтый, оранжевый, красный, коричневый. Они отличаются под микроскопом от других бактерий по своеобразному «полисадному» расположению клеток, иногда образующих короткие изогнутые цепочки и «иерс-



Рис. 1. Общий вид расположения клеток *P. shermanii* (×12000)

глифы (см. рис. 1) вследствие деления с защелкиванием. В сканирующем микроскопе видно, что клетки бактерий неровные, с округлыми концами, в отдельных случаях покрыты слизью и образуют слизистые тяжи.

Ряд штаммов *P. thoenii* и *P. jensenii* капсулированы и представители ряда видов образуют экстрацеллюлярную слизь. Капсульный материал представлен полисахаридами и у *P. zeae* содержит в большом количестве маннозу (Skogen, 1970; Skogen et al., 1974). Было показано (Skogen, 1970; Skogen et al., 1974), что капсульный материал у *P. zeae* содержит в большом количестве манозу и меньше галактозы и глюкозы. Слизистые капсулы могут защищать клетки от внедрения бактериофага или других вредных воздействий.

Не исключают (Hettinga, Reinbold, 1972) иммунологических свойств слизистых капсул. Длина клеток у представителей видов варьирует от 0,5 до 1,5 мкм. Клетки *P. freudenreichii* имеют вид кокков (рис. 3), у *P. rubrum* (рис. 4), *P. pentosaceum* (рис. 2) — короткие палочки, а у *P. petersonii* — длинные палочки 8—10 мкм, что в 4—5 раз превосходит размеры клетки других видов (рис. 5). Толщина клеток 0,5—1,0 мкм. Клетки имеют тенденцию к рудиментарному ветвлению (рис. 6, 7), образуя местами небольшие утолщения, отростки и вздутия. Этот вид отличается от других необычайным плеоморфизмом. Неправильной формы клетки с ложным ветвлением и беспорядочными перегородками сохраняются на всех стадиях роста культуры, в отличие от коринебактерий, у которых палочковидная стадия сменяется образованием кокковых форм (Stevenson, 1968). *P. petersonii* образуют ярко-оранжевые сухие колонии в аэробных условиях и светло-желтые — в анаэробных.

Характерно сильное разрастание внешнего (муреинового) слоя, а также поперечных стенок. Внутренние перегородки могут быть толще, чем наружная клеточная стенка. Такие перегородки делят клетку на много частей. Разрастания, связанные со сверхсинтезом муреина, описаны для коринебактерий (Freer et al., 1969; Barksdale, 1970). Вероятно, эти разрастания являются причиной образования клеточных агломератов, оседающих на дно культиватора, а также причиной появления причудливых форм *P. petersonii*, создающих впечатление того, что клетка находится в клетке (рис. 8) или что клетка почкуется.



Рис. 2. Клетки *P. pentosaceum* (X21100)



Рис. 3. Клетки *P. freudenreichii* ($\times 60000$)

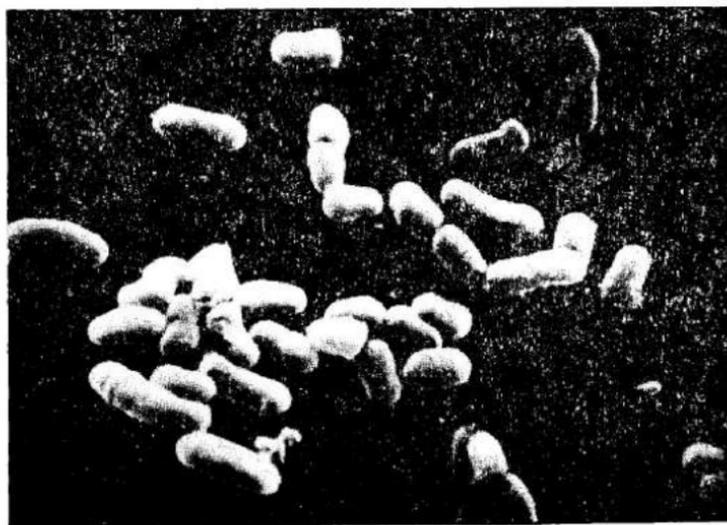


Рис. 4. Клетки *P. rubrum* ($\times 24000$)

Анатомия клеток представляет типичную картину для грамположительных бактерий (рис. 9, 10). Толщина клеточной стенки несколько менялась с возрастом культуры, находясь в пределах 20,0—30,0 нм. При окрашивании солями свинца можно различить два слоя клеточной стенки. Клеточное деление начинается с центростремительного образования поперечной перегородки: новые перегородки возникают раньше, чем завершается полное деление клеток.

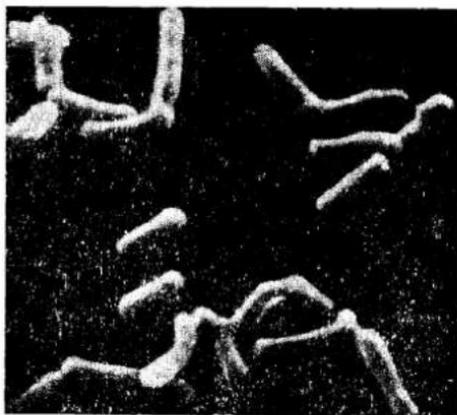


Рис. 5. Клетки *P. petersonii* ($\times 12000$)

Цитоплазма (рис. 9, 10) представляет собой район средней электронной плотности, в котором различимы рибосомы (иногда полисомы) и еще менее плотная нуклеарная область. Нуклеарная область представлена фибриллами. На препаратах, приготовленных методом отрицательного контрастирования, обнаруживали большое число мембранных телец (рис. 10, 11). При этом у одного вида находили все три типа мезосом, известных для грамположительных бактерий (Salton, 1956, 1967): трубчатый, везикулярный и ламеллярный.

Другим обычным включением в цитоплазме пропионовых бактерий являются гранулы, сильно поглощающие осмий и обладающие высокой электронной плотностью. Гранулы окрашиваются метиленовым синим и в световом микроскопе выглядят как пурпурно-красные, сохраняя ту же локализацию, которая обнаруживается и в электронном микроскопе. Увеличение количества гранул в клетках соответствовало увеличению содержания кислотонерастворимых полифосфатов.

Таким образом, можно полагать, что эти образования пропионовых бактерий являются метакрохроматиновыми гранулами и состоят, по крайней мере отчасти, из полифосфатов. Подобные гранулы описаны у микобактерий (Drews, 1960), коринебактерий (Freer, et al., 1969; Barksdale, 1970) и других микроорганизмов.

В клетках пропионовых бактерий гранулы обычно занимают полярное положение. При малом содержании полифосфатов в клетке под электронным микроскопом можно увидеть тонкозернистую структуру гранулы. В молодых клетках пропионовых бактерий гранул меньше и они небольшие. При старении культуры размер гранул, а иногда и их число, заметно увеличивается.

Поскольку полифосфатные гранулы появляются в основном в старых культурах пропионовых бактерий, они могут быть рассмотрены как хранители пирофосфата до использования его во время реактивации клеток. Пропионовые бактерии содержат активные

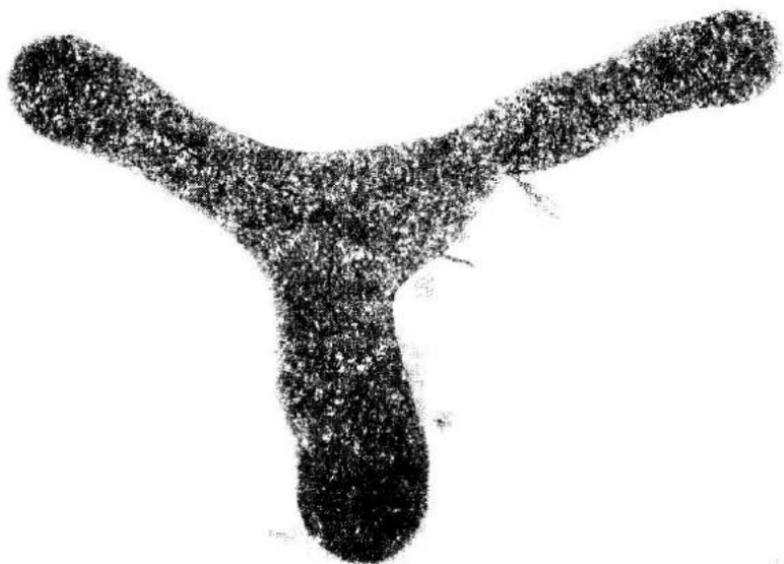


Рис. 6. Клетки *P. petersonii*; А — негативный контраст ($\times 30000$)

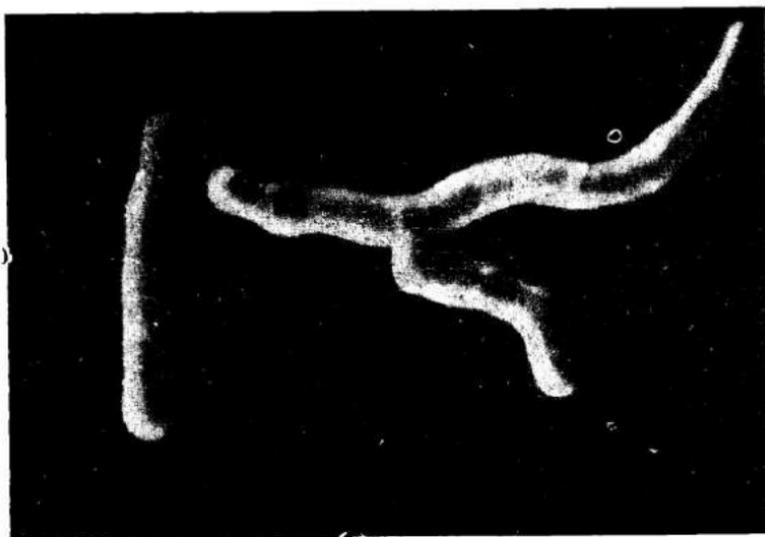


Рис. 7. Клетки *P. petersonii* в сканирующем электронном микроскопе ($\times 24000$)



Рис. 8. Тонкий срез с клеток *P. petersonii*. Видно сильное разрастание муренового слоя ($\times 60000$)

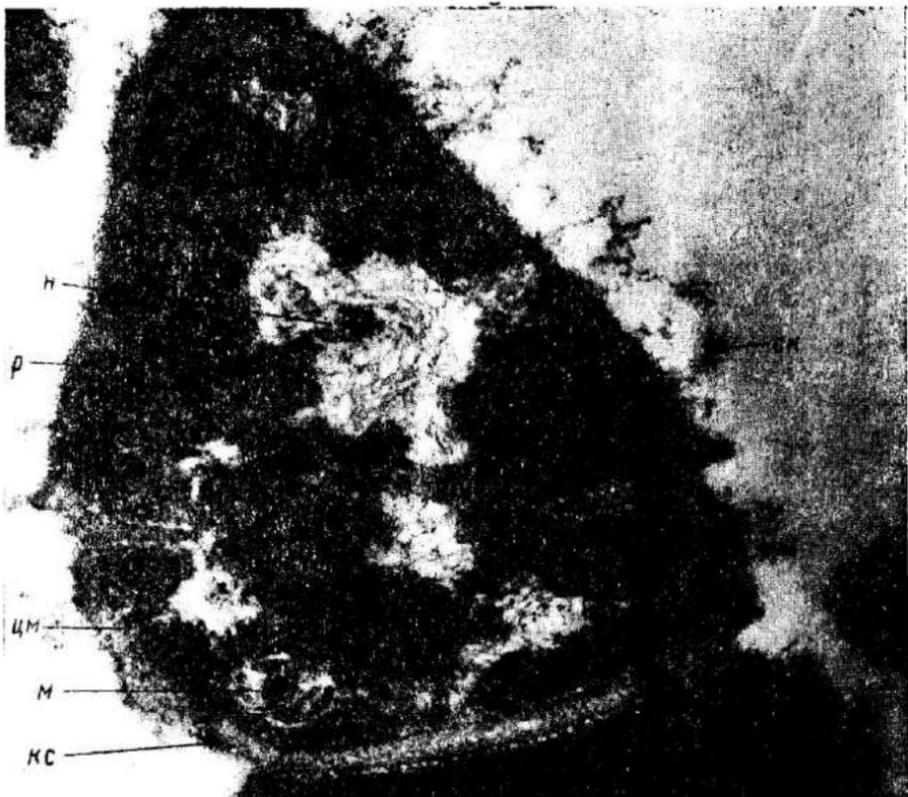


Рис. 9. Срез клетки *P. shermanii*; кс — клеточная стенка, м — мезосомы, н — нуклеоид, р — рибосомы, цм — цитоплазматическая мембрана, ск — слизистая капсула ($\times 228500$)

ферменты обмена полифосфатов (Кулаев и др., 1973), которые, по-видимому, играют важную роль в метаболизме.

Все изученные штаммы нуждаются в пантотеновой кислоте и биотине (Delwiche, 1949), некоторые из них требуют тиамин. Рост всех пропионовокислых бактерий стимулируется твином 80 (Johnson, Cummins, 1972).

Основными продуктами брожения глюкозы является пропионовая и уксусная кислоты и углекислота. Скерман (Skerman, 1967) в качестве таксономического признака вводит также способность использовать лактат. Все виды рода сбраживают пируват, диоксиацетон и глицерин с образованием тех же конечных продуктов, что и при брожении глюкозы.

Все пропионовые бактерии каталазоположительны (*P. arabinosum* имеет очень слабую каталазную активность).

Как правило, виды рода *Propionibacterium* образуют заметные количества витамина В₁₂. Перлман (Perlman et al., 1962) предла-

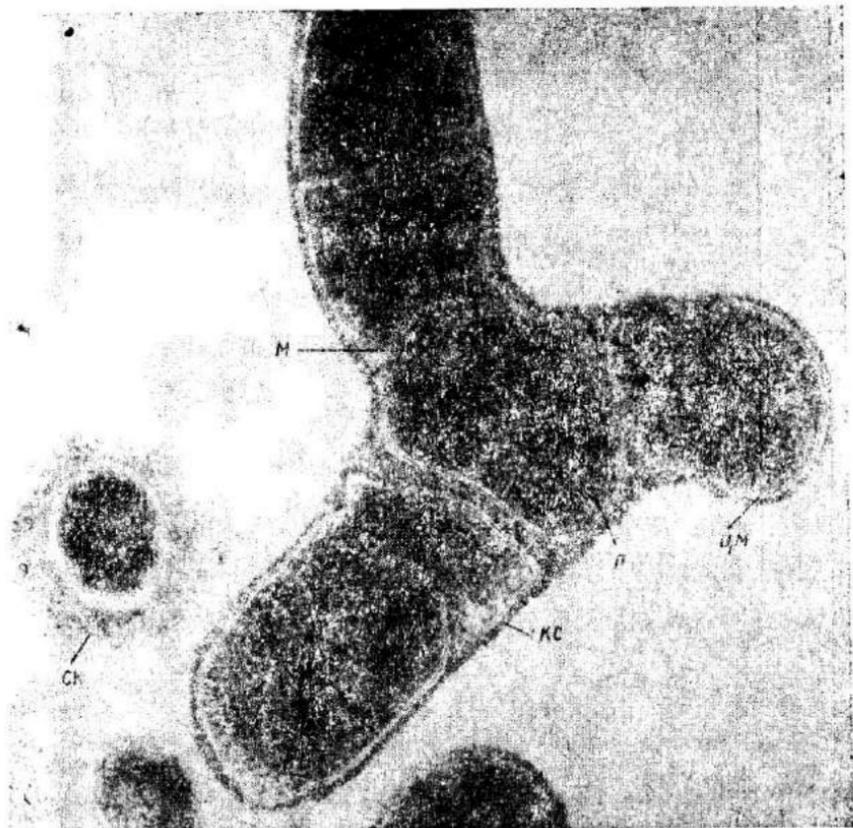


Рис. 10. Срез клетки *P. petersonii*. Обозначения те же. ($\times 80000$)



Рис. 11. Мембранные образования при негативном контрастировании



Рис. 12. Колонии *P. shermanii* со следами лизиса под действием фага. Натуральная величина

неудачи выделения фагов связаны с вмешательством слизистых слоев клеток. Однако (Борисова и др., 1973) иногда наблюдали частично лизированные колонии *P. shermanii*, характер лизиса которых (рис. 12) был похож на фаговый. При просматривании препаратов в электронном микроскопе обнаруживали полуразрушенные клетки с адсорбированными на них чехлами фагов (рис. 13).

Для обнаружения фага (Борисова и др., 1973) на твердую кукурузно-глюкозную среду рассеивали культуры пропионовокислых бактерий, после чего в центр чашки наносили лизат культуральной жидкости *P. shermanii*, предварительно отфильтрованный на фильтре Зейтца. Чашки Петри инкубировали при температуре 28—30° в анаэросторах с остаточным давлением воздуха 10—20 мм рт. ст. в течение восьми дней. Фаголизат получали по методу, описанному Клаусом и Хейсом (1970), с учетом анаэробности инди-

гал дифференцировать *Propionibacterium* в связи с природой коэнзимной формы витамина В₁₂.

Мы считаем, что ценным систематическим признаком рода является установление реакции изомеризации сукцинил-КоА ↔ метилмалонит-КоА, которую называют ключевой реакцией пропионовокислого брожения.

Бактериофаги. В отечественной и зарубежной литературе отсутствуют данные о наличии бактериофага у пропионовокислых бактерий; полагают (Hettinga, Reinbold, 1972), что

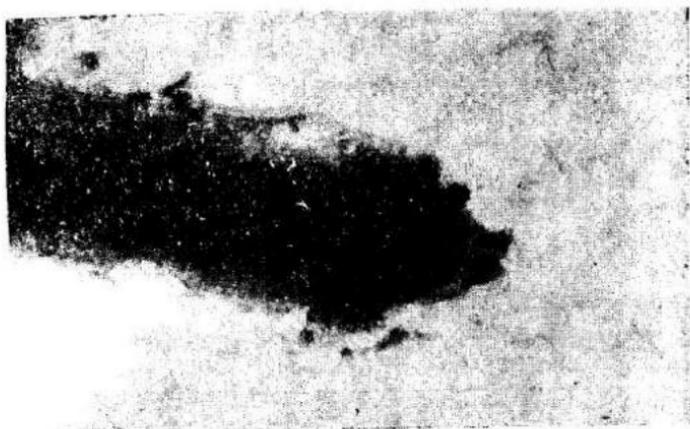


Рис. 13. Адсорбция фага на клеточной стенке *P. shermanii* (×80000)



Рис. 14. Фаг *P. shermanii* (А) ($\times 700000$); Б — негативные колонии фагов *P. shermanii* (Воробьева, 1976). Натуральная величина

каторной культуры. Наличие фага на газонах обнаруживали по негативным колониям. Концентрирование фага проводили методом дифференциального центрифугирования.

Лизат освобождали от нелизированных клеток центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 мин. Затем супернатант центрифугировали при 18000 об/мин в течение 40 мин для удаления клеточных остатков. Супернатант, содержащий фаговые частицы, центрифугировали в течение одного часа при 40000 об/мин. Фаговые частицы, содержащиеся в осадке, контрастировали 2%-ным раствором ФВК и просматривали препараты в электронном микроскопе с увеличением в 100 000 раз. Были обнаружены однородные по форме и размерам частицы фага. Фаговая частица состоит из головки и отростка (рис. 14, А). Головка имеет форму многогранника. Диаметр головки фага 500А, длина отростка — 1700А и диаметр отростка — 100А.

Негативные колонии имеют круглую форму, диаметр колоний 1,5 или 3,0 мм. Это указывает на возможное наличие нескольких видов фага у пропионовокислых бактерий (рис. 14, Б). На седьмые сутки на стерильных зонах выросли мелкие колонии фагоустойчивой культуры *P. shermanii*. В жидких средах при внесении фага вторичный рост наблюдается через двое-трое суток. В жидкой среде был получен фаг с титром 10^9 . При изучении влияния фага на культуры разного возраста установлено, что фаг поражает преимущественно клетки культур в начале экспоненциальной фазы роста.

Фаг размножается в широком диапазоне рН от 2,7—10,5; оптимум рН 6,5—7,2. В аэрируемых условиях действие фага выражено слабее или полностью отсутствует, что может быть вызвано легкой инактивацией его при встряхивании в результате отделения головок от длинных прикрепленных к ним хвостов. Фаг полностью инактивируется при прогревании при 100° в течение 3 мин. Инактивация фага достигается через несколько минут при воздействии гипохлорида и 4%-ного раствора формалина. Пергидроль в концентрации 1,5% инактивирует фаг за 24 ч, а в концентрации 3% — за 1 ч; 2%-ный раствор формалина инактивирует фаг за 1 ч, а 90%-ный этиловый спирт — в течение 3 ч (Борисова и др., 1973).

Фаг поражает только различные штаммы *P. shermanii*. Клетки *P. shermanii*, устойчивые к фагу, укорачиваются и имеют более овальную форму, чем клетки исходного штамма.

Состав клеточных стенок. Обнаружено (Schleifer, Kandler, 1972) два различных типа пептидогликана. Клетки *P. shermanii* и *P. freudenreichii* содержат непосредственно поперечно связанный пептидогликановый тип с *m*-ДАП в положении 3. Во всех других изученных видах — *L*, *L*-ДАП — глициновый тип, т. е. глицин осуществляет поперечную связь между тетрапептидами через аминогруппу *L*, *L*-ДАП и С-концевым аланином соседнего тетрапептида (Schleifer et al., 1968).

В состав сахаров клеточных стенок *P. shermanii* и *P. freudenreichii* входят галактоза, манноза и рамноза (последняя не обнаружена в клеточных стенках других видов), глюкоза отсутствует (Johnson, Cummins, 1972) (табл. 5).

Таблица 5

ДНК-ДНК гомология и компоненты клеточных стенок у видов
Propionibacterium (Johnson, Cummins, 1972)

Организмы	Г + Ц (мол. %)	Процент гомологии по отношению к ДНК из:				Компоненты клеточных стенок	
		<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. thoenii</i>	<i>P. jensenii</i>	<i>P. acidipropionici</i>	сахара	изомер ДАП
<i>P. freudenreichii</i>	65—66	90	20	26	25	галактоза, манноза, рамноза глюкоза	мезо-ДАП
<i>P. thoenii</i>	66—67	12	96	53	30		
<i>P. jensenii</i>	66—67	17	51	88	30	галактоза	L-ДАП
<i>P. acidipropionici</i>	66—67	8	35	38	37	манноза	

В состав полисахаридов клеточной стенки всех пропионовых бактерий, кроме *P. freudenreichii*, входит 2, 3-диаминогексуриновая кислота (Cummins, White, 1983, Cummins, 1985).

Двум типам муреинов в роде *Propionibacterium* соответствуют два морфологических типа клеток. Известно, что два мезо-ДАП-содержащих вида — *P. shermanii* и *P. freudenreichii* — более или менее кокковидны, другие виды образуют коринеформные палочки. Таким образом, для систематики важен не плеоморфизм, но скорее его молекулярная основа — состав и строение клеточных стенок бактерий.

Как известно, тейхоевые кислоты (и капсулы), входящие в состав клеточной стенки, определяют серологические свойства грамположительных бактерий. Иммунологические свойства пропионовокислых бактерий изучали Веркман и Браун (Werkman, Brawn, 1933).

Установив серологическую близость между видами, Мур и Като (Moore, Cato, 1963) на основании иммунологических исследований показали, что *S. acnes* близка к видам *P. arabinosum*, *P. jensenii*, *P. pentosaceum*, *P. rubrum*, *P. thoenii*, *P. zeae*, но не *P. shermanii* и *P. freudenreichii*. Последние обнаруживали слабые перекрестные

реакции и с другими видами пропионовых бактерий, что связывают с особым составом сахаров клеточных стенок *P. shermanii* и *P. freudenreichii* (Johnson, Cummins, 1972) (табл. 6). Хотя известно, что антигены могут быть распределены у организмов из различных семейств или даже царств, серологические тесты, подтвержденные другими характеристиками, могут иметь определенное таксономическое значение. Серологические данные показывают, что *P. shermanii* и *P. freudenreichii* — очень близкие виды, составляют изолированную группу в роде *Propionibacterium*. Поэтому выбор *P. freudenreichii* (van Niel, 1928) в качестве типового вида рода не совсем удачен. На самом деле этот вид атипичен, ибо: 1) содержит мезо-ДАП вместо L-изомера у других штаммов; 2) в клеточной стенке содержится рамноза, которой нет у других; 3) довольно далеко отстоит от других штаммов в отношении гомологии ДНК-ДНК (Johnson, Cummins, 1972); 4) содержит антеизо-С₁₆-кислоту, а у других видов i-С₁₆-кислота в липидах мембран.

Жирные кислоты, фосфо- и гликолипиды. При обследовании 40 штаммов, представляющих 7 видов *Propionibacterium*, было показано (Kaneda, 1967), что основным типом жирной кислоты, экстрагируемой из целых клеток, является С₁₅-насыщенная кислота с разветвленной цепочкой. Причем у видов *P. shermanii* и *P. freidenreichii* С₁₅-кислота присутствует в форме антеизо-С₁₅-изомера (12-метилтетрадекановая), у второй группы (*P. arabinosum*, *P. jensenii*, *P. pentosaceum*, *P. thoenii* и *P. zae*) обнаруживают в основном изо-С₁₅-кислоту (13-метилтетрадекановую). У других бактериальных видов С₁₅-кислоты присутствуют в «следо-

Таблица 6

Серологические свойства видов пропионовокислых бактерий и коринебактерий (Moore, Cato, 1963)

Антиген	Антисыворотка								
	<i>acnes</i> 118	<i>arabinosum</i>	<i>freudenreichii</i>	<i>jensenii</i>	<i>pentosaceum</i>	<i>rubrum</i>	<i>shermanii</i>	<i>thoenii</i>	<i>zae</i>
<i>Corynebacterium acnes</i> 118	320	160	0	10	80	40	0	80	160
<i>Corynebacterium acnes</i> 6921	320	80	0	20	320	80	0	80	40
<i>Propionibacterium arabinosum</i>	0	640	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. freudenreichii</i>	0	0	80	0	0	0	10	0	0
<i>P. jensenii</i>	40	80	10	2,560	40	10	10	80	10
<i>P. pentosaceum</i>	0	20	0	0	160	0	0	0	80
<i>P. rubrum</i>	0	0	0	0	0	80	0	0	0
<i>P. shermanii</i>	0	0	320	0	0	0	40	0	0
<i>P. thoenii</i>	40	40	0	20	10	80	0	80	160
<i>P. zae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	160

вых» количествах, так что наличие ее в больших количествах (больше в 2—3 раза, чем любой другой жирной кислоты) у пропионовых бактерий может служить диагностическим признаком. Однако этот признак нужно принимать с осторожностью, поскольку количество свободных жирных кислот у бактерий зависит от состава среды, возраста культуры и уровня витамина В₁₂. Добавление к среде изолейцина увеличивает синтез антеизо-С₁₅-кислот пропионовыми бактериями. В присутствии L-лейцина больше образуется изо-С₁₅-кислот за счет снижения синтеза антеизо-С₁₅-кислот (Moss et al., 1969).

В клетках молодых активных культур обычно больше мононенасыщенных кислот с прямой цепочкой (С₁₆:1, С₁₈:1). Содержание мононенасыщенных кислот выше, чем кислот с разветвленной цепочкой у культур, дефицитных по витамину В₁₂. С бесклеточным экстрактом *C. simplex* было показано, что дефицит витамина В₁₂ приводит к падению активности трансметиلاзной системы и снижению скорости трансформации мононенасыщенных кислот в СН₃-разветвленные жирные кислоты (Fujii, Fukui, 1969).

Таксономическим признаком рода служит также состав клеточных фосфолипидов. Обычно в мембранах бактериальных клеток находят один главный фосфолипид, составляющий 50% и более от всех других фосфолипидов мембран (Salton, 1967). От характера связи специфических белков с фосфолипидами в значительной степени зависит биохимическая активность клетки. Поэтому химическую природу мембран рассматривают как важный таксономический признак рода.

Для рода *Propionibacterium* основной фосфолипид представлен мономанозидом глицерилфосфорилмиоинозита (Shaw, Dinglinger, 1969). У родственной группы *Mycobacterium* диманнофосфоинозиты являются основными фосфолипидами. Шо и Динглингер (Shaw, Dinglinger, 1969) изучали химический состав гликолипидов пяти штаммов пропионовокислых бактерий. Грамположительные бактерии порядка *Eubacteriales* содержат гликолипиды дигликозильного диглицеридного типа, структура которых имеет таксономическое значение. Оказалось, что гликолипиды пропионовых бактерий имеют другой тип и не содержат глицерина.

Главный гликолипид пропионовых бактерий представлен 1-О-пентадеканоил-2-О (6-О-гептадеканоил-*L-D*-маннопиранозил) миоинозитом и включает жирные кислоты (пентадеканоидную, гептадеканоидную), маннозу и инозит в молярных отношениях 2:1:1.

Гликолипиды находятся в клеточных мембранах и составляют 40% от общего количества липидов у *P. shermanii*; у *P. freudenreichii* и *P. arabinosum* их содержится меньше. Гликолипиды пропионовых бактерий представляют собой первый случай нефосфорилированного инозитсодержащего липида и имеют сходство с «cord» фактором микобактерий (Lederer, 1967). Все изученные виды пропионовых бактерий содержат однотипный главный гликолипид, что является важным таксономическим признаком рода. Предполагают, что из-за содержания гидрофильных остатков гликолипиды мо-

гут принимать участие в образовании пор в мембранах, через которые проходят некоторые ионы и молекулы (Shaw, Baddiley, 1968).

Отличительным признаком пропионовых бактерий, сближающим их с микобактериями, считают присутствие в клетках большого количества трегалозы (Stjernholm, 1958; Winder et al., 1967).

Чувствительность к антимикробным агентам. Все штаммы проявляют высокую устойчивость к сульфамидам; к полусинтетическим пенициллинам, как оксациллину, более устойчивы, чем к пенициллину (Reddy et al., 1973). Некоторые штаммы растут в присутствии сульфадиазина (1000 мкг/мл). Низин оказывает сильное ингибиторное действие (Galesloot, 1957; Winkler, Fröhlich, 1957).

К лизоциму чувствительна только *P. freudenreichii*. Другие штаммы относительно чувствительны к некоторым муралитическим ферментам: муранолизину и ахромопептидазе.

Потребность в витаминах. Все штаммы нуждаются в биотине и пантотеновой кислоте (Delwiche, 1949). Тиамин и никотинамид усиливают рост. Некоторые штаммы требуют ПАБ. Твин-80 стимулирует рост всех штаммов (Fergusson, Cummins, 1978; Holland et al., 1979).

Характеристика видов. Дифференциация на виды представлена в табл. 7.

Предложена (Beer, 1987) идентификация и дифференциация пропионовокислых бактерий с помощью электрофореза их белков. Каждый штамм характеризовался специфическим спектром белков, который сравнивали со спектром «стандартных штаммов». Этот метод более быстрый и точный, чем классический микробиологический анализ пропионовых бактерий, хотя дифференциацию между штаммами *P. freudenreichii* subsp. *freidenreichii* и *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* этим методом провести не удалось.

Таблица 7

Дифференциация классических бактерий рода *Propionibacterium* (Cummins, Johnson, 1986)

Организм	Сбраживание сахарозы и мальтозы	Восстановление нитратов	β -гемолиз	Цвет пигмента	Изомер ДАП в клеточной стенке
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	—	d	—	кремовый	мезо
<i>P. jensenii</i>	+	—	—	кремовый	L
<i>P. thoenii</i>	+	—	+	красно-коричневый	L
<i>P. acidi-propionici</i>	+	+	—	кремовый до оранжевого	L

P. freudenreichii выделяют из «Швейцарского» и «Советского» сыров, сырого молока. В больших количествах образует пролин, с чем связывают аромат сыра. Клетки в виде коротких палочек, часто почти кокков. От других видов отличается более высокой термоустойчивостью. Главная жирная кислота — 12-метилтетрадеканонидная (~43%). Главный сахар в пептидогликане — галактоза, меньше маннозы и рамнозы, глюкозы нет вообще. Сбраживает ограниченное число углеводов: фруктозу, галактозу, глюкозу и маннозу; сахарозу и мальтозу не использует (см. табл. 6).

В пептидогликане мезо-ДАП вместо *L*-ДАП у других видов; содержание ГЦ: 64—67 мол. %. На основе способности сбраживать лактозу и восстанавливать нитраты различают три подвида:

	Восстановление NO ₃	Лактоза
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>freudenreichii</i>	+	—
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	+	+
<i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>globosum</i> Штаммы негемолитичны	—	—

P. jensenii. Вид включил в себя штаммы 5 первоначально принятых видов, поэтому имеются штаммовые различия в отношении морфологии и физиолого-биохимических свойств. Некоторые штаммы растут аэробно также хорошо, как анаэробно. Содержит *L*-ДАП и главный углевод пептидогликана — глюкозу. Главная жирная кислота липида — 13-метилдеканонидная (как и у других ниже описываемых видов). Содержание Г+Ц — 65—68 мол. %. Выделяют из молочных продуктов, силоса и иногда — из инфицированных поражений. Встречались гемолитичные штаммы.

Типовой штамм ATCC 4868.

P. thoenii. Образует обычно окрашенные в оранжевый и красно-коричневый цвет колонии. Вызывает гемолиз крови человека, коровы, овцы, кролика и свиньи. Содержит *L*-ДАП, в полисахариде клеточной стенки — глюкоза, галактоза и манноза. Содержание Г+Ц; 66—67 мол. %. Вид образован путем объединения *P. rubrum* и *P. thoenii* в связи с высокой гомологией их ДНК. Различают по характеру сбраживания углеводов: *P. rubrum* сбраживает раффинузу и маннит, но не сорбит, а *P. thoenii* сбраживает сорбит и не сбраживает раффинузу и маннит.

P. acidipropionici. Это тоже сборный вид, для которого, в отличие от других, характерна слабая или отрицательная каталазная реакция. Штаммы могут хорошо расти в аэробных условиях. Содержат *L*-ДАП. В пептидогликане: глюкоза, галактоза и/или манноза; Г+Ц: 66—68 мол. %.

Выделяют из молочных продуктов. Типовой штамм АТСС 25562.

Вид состоит из штаммов, первоначально относимых к *P. pentosaceum* и *P. arabinosum*; *P. arabinosum* не сбраживает ксилозу и рамнозу, а *P. pentosaceum* может их сбраживать, но этого различия недостаточно для видообразования. Штаммы имеют высокую степень ДНК-гомологии.

Пропионовокислые кокки. Мы считаем (Vorobjeva et al., 1990), что к молочным пропионовым бактериям должны быть отнесены и пропионовокислые кокки. Они выделяются из сыров на ранней стадии их созревания и имеют сходства с пропионовыми бактериями в отношении жирнокислотного состава: содержат C_{15} -насыщенную жирную кислоту в форме антеизо-изомера как основной тип жирной кислоты. Наибольшее сходство в жирнокислотном составе обнаружено с бактериями вида *P. jensenii*.

Сходство пропионовокислых кокков и бактерий отражено в строении генома, которое в наибольшей степени проявляется с бактериями вида *P. jensenii* — 49%. Содержание Г+Ц в ДНК — 63,4 мол. %, а у пропионовых бактерий — 65—67 мол. %.

Пропионовые кокки сбраживают лактаты с образованием в качестве конечных продуктов пропионовой, уксусной кислот и CO_2 .

Пропионовая кислота возникает из метил-малонил-КоА, образованного в реакции изомеризации, зависимой от кофермента B_{12} . Бактерии и кокки синтезируют кобаламины (Алексеева и др., 1973), каталазу, супероксиддисмутазу, а также пероксидазу (Краева и др., 1984).

Кокки сбраживают моно-, ди-, три- и полисахара: глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу, раффинозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, трегалозу, декстрины, крахмал, а также сорбит, маннит, салицин, глицерин. Ксилозу, рамнозу и дульцит не сбраживают.

Варианты имеются в отношении сбраживания арабинозы и целлобиозы.

Внутри каждого вида классических пропионовых бактерий уровень гомологии ДНК очень высокий — 87—96% (Cummins, Johnson, 1981) (табл. 8), а между видами колеблется от 8 до 53%. Пропионовые кокки по уровню гомологии ДНК нельзя отнести ни к одной из описанных групп, хотя наиболее близкими к ним оказались бактерии вида *P. jensenii*.

С этими бактериями кокки имеют и наибольшее фенотипическое сходство. В отличие от пропионовых бактерий кокки сохраняют шарообразную форму клеток на всех стадиях роста в аэробных и анаэробных условиях. Диаметр клеток от 0,6 до 1,2 мкм. Колонии от кремового до желтого цвета вырастают в аэробных и анаэробных условиях.

Рост кокков возможен при 8—10° и в присутствии 6,5% NaCl—условиях, не допускающих роста других представителей рода.

Уровень гомологии ДНК пропионовокислых кокков,
пропионовокислых бактерий и молочнокислых бактерий
(Воробьева и др., 1983).

Виды и штаммы культур	Гомология с реперами, %			
	штамм 15 (кокки)		штамм 1861 <i>P. jensenii</i> (<i>P. raffinosaceum</i>)	
	температура инкубации			
	70°	80°	70°	80°
Штамм 15 (кокки)	100±15	100±7	49±3	48±2
<i>P. jensenii</i> (<i>P. raffinosaceum</i>)	50±3	48±5	100±15	100±6
<i>P. thoenii</i>	4±1	2	2	1
<i>P. acidi-propionici</i> (<i>P. penosaceum</i>)	4±1	1	5±1	1
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	15±3	5±1	19±1	6±1
<i>L. leichmanii</i>	0	0	0	0
<i>S. lactis</i>	0	0	0	0
Связывание в гомологичной реакции, %	43	34	60	54

Деление клеток происходит в разных направлениях (рис. 15). Клетки имеют толстую клеточную стенку (200А), очень большую капсулу, полифосфатные гранулы, мезосомы (рис. 16). Ранее Frazier, Wing, 1932; Dörner, Thöni, 1939; Фостер и др., 1961) упоминали о пропионовокислых кокках в связи с их возможной ролью в процессах созревания твердых сыров.

На основании вышеизложенных критериев нами предложено включить пропионовокислые кокки в род *Propionibacterium*.

Однако внутри рода, как на основании морфологии, так и на основании строения генома, кокки должны быть выделены в отдельную группу, имеющую такой же таксономический статус, как и ранее описанные виды. Этот вид назвали *P. coccoides* (Воробьева и др., 1983).

Диагноз *Propionibacterium coccoides*. Клетки шарообразные, грамположительные, неподвижные, размеры 0,5—0,9 мкм в диаметре. Характерно неправильное, неравномерное, деление клеток (дробление). Колонии гладкие, выпуклые, блестящие, окрашены в кремовый или желтый цвет, вырастают на поверхности плотных сред в анаэробных и аэробных условиях.

В жидкой среде образуют равномерную муть без пленки с небольшим осадком. Факультативные анаэробы. Оптимальная температура для роста 17—22°, но хорошо растут при 8—10°, оптимальный pH 6,8—7,2. Галотолерантные организмы.

Сбраживают глюкозу, арабинозу, маннозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу, галактозу, трегалозу, декстрины, крахмал, а также сорбит, маннит, глицерин, лактат.

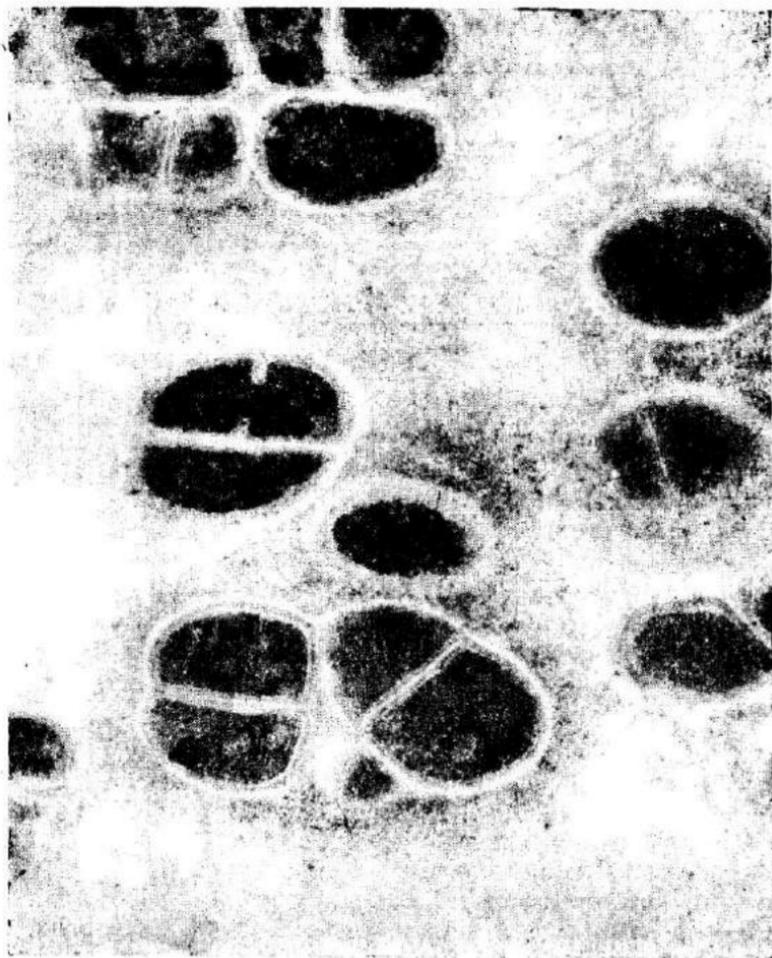


Рис. 15. Срез с делящихся клеток пропионовокислых кокков ($\times 16000$)

Ксилозу, рамнозу и дульцит не сбраживают. Целлобиозу плохо сбраживают или не сбраживают, индол, сероводород и аммиак не образуют, желатин не разжижают, нитраты не восстанавливают.

Катаболизм анаэробный. В качестве конечных продуктов брожения образуют пропионовую и уксусную кислоты (в отношении 2:1), углекислоту и в небольшом количестве формат.

Обладают каталазной, супероксиддисмутазной и пероксидазной активностями.

Молярный процент Г+Ц ДНК равен 63,4.

По строению генома (уровню гомологии ДНК) наиболее близки с пропионовокислыми бактериями вида *P. jensenii* van Niel, 1928, (*P. raffinosaceum*).

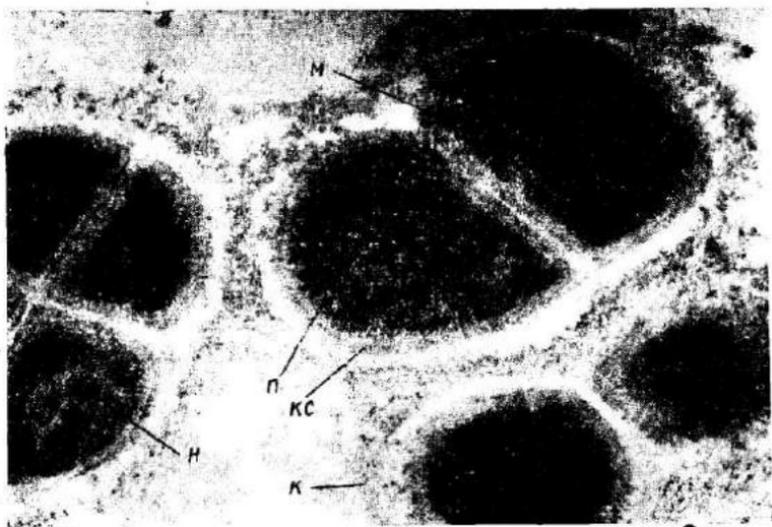


Рис. 16. Срез с клеток пропионовокислых кокков. кк — клеточная стенка, к — капсула, п — полифосфатные гранулы, м — мезосома, н — нуклеоид ($\times 100000$)

Основная длинноцепочечная жирная кислота представлена антеизо- C_{15} -изомером (12-метилтетрадекановой).

Типовой штамм пропионовокислых кокков выделен из сыра «Советский» (на ранней стадии созревания) из предгорной и степной части Алтайского края и сохраняется в чехословацкой коллекции чистых культур в Брно и на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ.

Выделение и хранение. При выделении пропионовых бактерий учитывают такие свойства, как способность использовать лактаты, хороший рост в анаэробных условиях при нейтральном значении рН. Анаэробные условия создают путем добавления к агаровой среде сульфита Na или цистеина, тиогликолята Na и наложения парафина на поверхность агара в чашках, культивирование бактерий в трубках Бури или в чашках Петри, помещенных в анаэростаты, заполненные на 10—20% CO_2 . Вместо чашек иногда используют полиэтиленовые мешочки с плохой газовой проницаемостью, выдерживающие автоклавирование (Hettinga et al., 1968). В них заливают среду с лактатом натрия и через 5—6 дней получают видимые колония («карманный» метод выделения). Лактаты, как правило, вводят во все среды при выделении пропионовых бактерий для создания элективности.

Другой несложный метод выделения состоит в использовании «candle oats» — овсяных свечей (Vedamuthu, Reinbold, 1967). Чашки Петри помещают в эксикатор, в котором создается атмосфера анаэробноза, водяных паров (для этого помещают влажные зерна овса) и углекислоты. Последнее достигается тем, что перед закрытием эксикатора зажигают свечу.

Купенов (1974) с целью получения колоний пропионовокислых бактерий в чашках Петри без создания анаэробных условий предлагает использовать среду Кребса, содержащую дрожжевой экстракт Дифко, лактат натрия «V. F.»-бульон, соли и 0,5—1% агара «Oxoid». Если pH среды находится в пределах 7,2—7,5, создаются условия, благоприятные для роста пропионовых бактерий по всей глубине твердой питательной среды и на ее поверхности. Старый, но приемлемый и простой метод для выделения пропионовых бактерий связан с использованием трубок Бурн. Расплавленная агаровая среда с бактериями заливается при этом в трубки, закрытые с одной стороны резиновой пробкой. Выросшие на 7—8-й день колонии извлекаются из агара, выдуваемого из трубки в стерильную чашку Петри.

При выделении пропионовокислых бактерий следует учитывать, что они, как показали наши исследования, не являются строгими анаэробными, а скорее микроаэрофилами. Даже наиболее «анаэробный» вид — *P. shermanii* — лучше растет в условиях слабого доступа воздуха, чем при полном отсутствии последнего и в атмосфере азота. Более того, среди пропионовых бактерий есть виды, которые предпочитают аэробные условия анаэробным, например *P. rubrum* (Bergey, 1957); видимо, поэтому этот вид, в отличие от других, плохо развивался при использовании метода «candle oats» (Vedamuthu, Reinbold, 1967). Штиккель (1967) также отмечала, что на чашках Петри, помещенных в обычные условия термостата и содержащих среду с 0,1%-ной аскорбиновой кислотой, колонии бактерий появляются раньше, чем на чашках в анаэроостате, содержащих среду без аскорбиновой кислоты.

Для выделения и поддержания пропионовых бактерий рекомендуют (Malik et al., 1968) среду следующего состава (%): триптиказа (BBL)—1, дрожжевой экстракт (Difco)—1, лактат Na—1, K_2HPO_4 —0,25, MnSO_4 —0,0005, агар (Difco)—1,5. Вода дистиллированная; конечный pH доводят до 7,0. Для создания оптимальных условий роста в среду вносят цистеин (0,05%) и твин 80 (0,05%), стимулирующие рост бактерий. Молочные пропионовые бактерии лучше растут при 30—32°, а кожные — при 36—37°. Максимальный рост обычно достигается через 48 ч. В указанной выше среде бактерии могут долго храниться при комнатной температуре или в холодильнике.

Итальянские исследователи (Galli et al., 1984) для выделения и подсчета пропионовых бактерий в молоке и твердых сырах предложили селективную среду следующего состава: бульон — 1 л, дрожжевой экстракт — 50 г, лактат-Na (70%) — 10 г, 2-фенилэтанол — 10 мл 1%-ного раствора, агар — 15 г, pH 7,0. 2-фенилэтанол добавляют перед непосредственным использованием, pH 7,0. Условия анаэробные. Авторы указывают, что в этой среде («Politi-Nettinga»), кроме пропионовых, могут расти главным образом бактерии рода *Lactobacillus* и в меньшей степени *Pediococcus* и *Streptococcus*. Колонии пропионовых бактерий отличимы от колоний молочнокислых, и эти различия представлены в табл. 9.

Признаки, позволяющие отличать колонии пропионовокислых бактерий от колоний *p. Lactobacillus* (Galli et al., 1984)

Свойства	Признаки	<i>Propionibacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
Физиологические	каталаза, пропионовая кислота из лактата время роста	+ + 5 дней	- - 2—3 дня
Культуральные	вид колоний: форма, цвет, край	выпуклые коричневые, желтые, оранжевые, блестящие, гладкие	плоские, белые или кремовые, матовые, бахромчатый
Морфология	соединение клеток	часто; часто в виде китайских иероглифов	часто в цепочках

Среда, поддерживающая хороший рост всех пропионовых бактерий (Simmins, Johnson, 1981), имеет следующий состав (%): триптиказа (BBL) — 1, дрожжевой экстракт (Дифко) — 0,5, глюкоза — 1, CaCl_2 — 0,002, MnSO_4 — 0,002, NaCl — 0,002, К-фосфатный буфер — 0,05 М, твин 80 Na-формальдегид сульфоксалат — 0,05, NaHCO_3 (добавляется как стерильный раствор вместе с инокулятом) — 0,1%, конечный pH — 7,0.

В наших исследованиях (Воробьева, 1976) хороший рост пропионовых бактерий достигался в кукурузно-глюкозной среде состава: кукурузный экстракт — 2%, глюкоза — 1%, K_2HPO_4 — 0,2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 10 мг/л, pH 7,0 (с помощью насыщенного раствора NaHCO_3).

Эта среда обеспечивает высокий уровень образования витамина B_{12} и накопления большой биомассы.

Синтетическая среда, использованная нами для физиологических исследований, имела следующий состав (%): лактат Na или глюкоза — 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,3, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,02, KH_2PO_4 — 0,1, NaCl — 0,002, MnSO_4 — 0,0005, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,001, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, пантотенат-Са — 1000 мкг/л, тиамин — 200 мкг/л, биотин — 1,0 мкг/л, pH 7,0, вода дистиллированная.

Для длительного хранения в среде не рекомендуют вносить глюкозу; ее следует заменить иным источником углерода.

Для хранения предложено (Holdeman et al., 1977) использовать мясную среду; среду разливают в пробирки и инокулируют под давлением N_2 с использованием техники Хангейта (Holdeman et al., 1977). Жизнеспособность сохраняется в течение многих месяцев при комнатной температуре. При низких температурах (в холодильнике) культура может погибнуть очень быстро.

Пропионовые бактерии можно хранить методом лиофилизации и периодических пересевов. По данным Аркадьевой с сотрудниками (1988), штаммы бактерий сохраняют высокую жизнеспособность при хранении в лиофилизированном состоянии от 15 до 24 лет и при периодических пересевах 1 раз в 5—6 мес в жидкой среде с лактатом Na. При сравнении условий хранения отмечаются штаммовые различия. *P. freudenreichii-30* образовывал при реактивации из лиофилизированного состояния больше кислот, чем при хранении методом пересевов, у *P. shermanii* наибольшее кислотообразование наблюдали (Аркадьева и др., 1988) при сбраживании лактата Na после хранения в гидролизованном молоке и на агаризованной среде с лактатом методом периодических пересевов.

На среде Difco «Brewer anaerobic agar 279» бактерии сохраняют жизнеспособность 4 мес (Niethamer, Hitzler, 1960). Для хранения жидких культур рекомендуется (Stolp, 1955) 1%-ный раствор Vitambact (Hameln), содержащий 1,0% глюкозы.

1.3. КОЖНЫЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

Анаэробные коринебактерии, называемые теперь кожные пропионовокислые, известны с 1897 г., когда ветеринарный врач Ру описал *Corynebacterium pyogenes*, вызывающую гнойные абсцессы у крупного рогатого скота, поэтому ее называли *C. pyogenes bovis*. В 1908 и в 1909 гг. Юнгано в Институте Пастера изучал микрофлору фекалий и описал три вида коринебактерий: *C. liquifaciens*, *C. diphtheroides* и *C. granulosum*. Первое указание на патогенность было сделано Массини в 1913 г., который выделил *C. anaerobium* из больных с заражением крови, гнойным аденитом и маститом. Это наиболее патогенная бактерия из анаэробных коринебактерий. *C. parvum* впервые описана в 1926 г. Майером; эта бактерия известна своей способностью вызывать стимуляцию ретикуло-эндоплазматической системы (РЭС). В 1938 г. Прево в Институте Пастера начал исследования ферментативных свойств этой группы бактерий, патогенности и стимуляции РЭС; последние два свойства связаны между собой (Prevot et al., 1949, Prevot, 1960). Изучая 600 штаммов анаэробных коринебактерий, Прево отмечал как самую удивительную особенность бактерий — их огромную вариабельность; так, бактерии можно первоначально выделить только в анаэробных условиях, причем колонии не обладают каталазной активностью и она появляется лишь при последующих пересевах, которые уже не требуют строгого анаэробноза. Другой пример их вариабельности проявляется в том, что почти все штаммы, даже выделенные в чистом виде из мест микробных заражений, теряют патогенность уже при первых пересевах. С этим связано отрицание патогенности анаэробных коринебактерий некоторыми исследователями, как отмечалось Прево (Prevot, 1975).

Места обитания. Бактерии трех видов — *P. acnes*, *P. granulosum* и *P. avidum* — встречаются на разных участках нормальной кожи людей и пропионовые кожные бактерии — это единствен-

ные анаэробные организмы кожной микрофлоры (McGinley et al., 1978); превалируют *P. acnes*, предпочитающие сальные влажные участки кожи: на коже лба может находиться 10^4 клеток/см², но число бактерий у разных людей варьирует от 10^2 до 10^6 клеток/см².

При заболевании *acne vulgaris* (угри) число *P. acnes* на коже сильно увеличивается. Хотя вопрос о причастности этих бактерий к возникновению заболевания утвердительного ответа не имеет, известно, что для развития *acne vulgaris* требуется присутствие *P. acnes*, увеличение выделения жира и закупорка сальных желез (Helgert, Vincent, 1983). Полагают, что заболевание связано с нарушениями в работе эндокринных желез. Но если *P. acnes* и не являются первопричиной заболевания, они вносят вклад в ее течение путем выделения жирных кислот из триглицеридов под действием активных липаз. Продукты метаболизма этих бактерий могут вызывать раздражение кожи и воспалительные процессы.

Анаэробные коринебактерии (*C. liquefaciens*, *C. parvum*) выделены из костного мозга людей (Fujita, Saino, 1971; Saino et al., 1976).

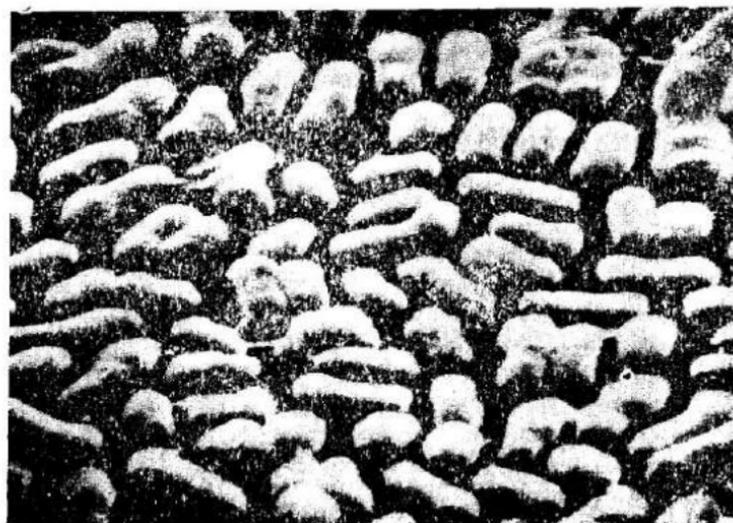
При обследовании 59 штаммов *C. parvum* (Cummins, Johnson, 1974) оказалось, что большинство из них (51) на самом деле представляют собой *P. acnes*. Поскольку *C. parvum* проявляют значительный стимулирующий эффект на иммунную систему и могут усиливать подавление опухолей у животных и человека (Halpern, 1975), полагают, что человеческие пропионовые бактерии могут играть иммуностимулирующую роль (см. ниже).

Предполагают также (Shuster, 1976), что *acne* может служить биологической защитой против развития рака. При закупорке сальных желез происходит колонизация их *C. acnes*, которые способствуют реализации некоторых общих иммунологических механизмов. У большинства клинически здоровых людей в сыворотке крови обнаруживают (Wolberg et al., 1977) антитела против *P. acnes* и в основном против *acne vulgaris*.

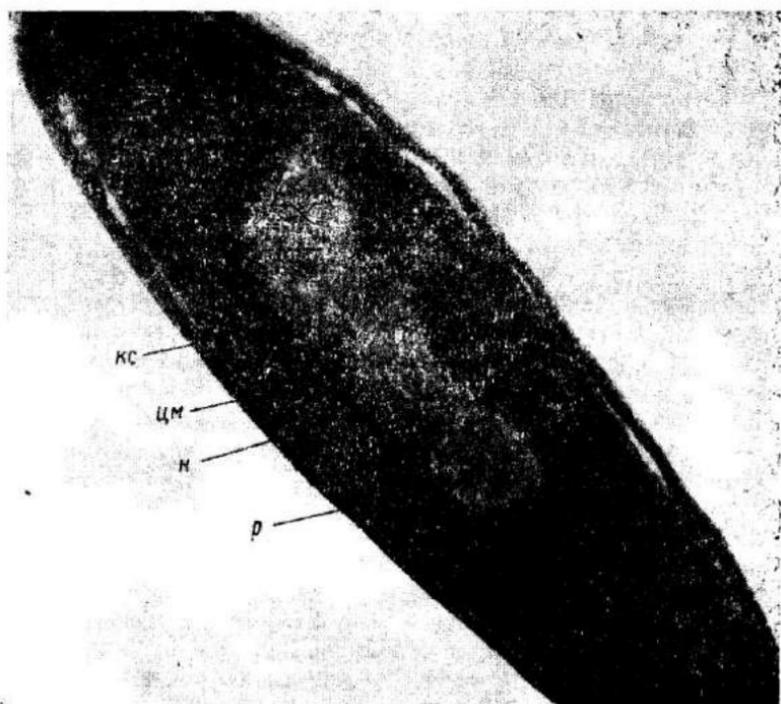
P. acnes обычно сопровождают бактерии *P. granulosum*, для которых хорошим субстратом служат выделения сальных желез. Но эти бактерии могут находиться и во влажных местах кожи, например, их обнаруживают под мышкой, в прямой кишке. Бактерии *P. avidum* встречаются только на тех местах кожи, где много влаги и главный источник из выделения — кишечный тракт.

Питательные потребности. *P. avidum* относительно нечувствительная к кислороду, а рост *P. acnes* и *P. granulosum* ингибируется кислородом. Штаммы двух последних видов имеют более сложные питательные потребности, чем *P. acnes*, что может быть следствием различных мест их обитания. *P. acnes* и *P. granulosum*, обитающие в местах с выделениями сальных желез, имеют многие метаболиты в готовом виде, например аминокислоты, жирные кислоты.

P. avidum после нескольких пересевов может расти в простой среде с глюкозой, минеральными солями и витаминами (Fergasson, Cummins, 1978). Все штаммы требуют пантотеновую кислоту,



А



Б

Рис. 17. Клетки *P. acnes* (А) ($\times 12660$); Б — срез с клетки *P. acnes*. кс — клеточная стенка, цм — цитоплазматическая мембрана, н — нуклеоид; р — рибосомы ($\times 100000$)

тнамин, биотин, никотинамид стимулирует рост. Для представителей двух других видов требуется присутствие в среде полного набора аминокислот. Их рост стимулируют три органические кислоты: лактат, пируват и α -кетоглутарат, а также твин 80 (Holland et al., 1979).

Морфология. Штаммы *P. acnes* образуют длинные неправильные палочки в молодых культурах, похожие на клетки *C. diphtheria*. Клетки вида *P. acnes* 0,5-1—1,5 мкм, слегка искривлены (рис. 17, А). В старых культурах все штаммы кокковидные. Колонии, типичные для пропионовокислых бактерий, вырастают только в анаэробных условиях. В анатомическом отношении *P. acnes* сходен с *P. shermanii* (рис. 17, Б).

Таблица 10

Ферменты, образуемые кожными пропионовокислыми бактериями (Holland et al., 1981)

Фермент	Виды <i>Propionibacterium</i>		
	<i>P. acnes</i>	<i>P. granulosum</i>	<i>P. avidum</i>
Гиалуронатлиаза	+	не опр.	не опр.
Липаза	+	»	»
Хондроитинсульфатаза	+	+	+
Нейраминидаза	+	мало	+
Фосфатаза	+	+	+
Протеаза	+	нет	+
Желатиназа	+	мало	+
Лецитиназа	—	+	+
Гемолизин	+	мало	+
ДНКаза	+	+	+
РНКаза	не определяли	не определяли	не определяли

Внеклеточные ферменты. Бактерии выделяют рибонуклеазу (Smith, 1969), нейраминидазу, гиалуронидазу (Ingham et al., 1979; Hoeflger, 1980), нейраминидазу (Von Nicolai et al., 1980), кислую фосфатазу (Ingham et al., 1980), лецитиназу (Werner, 1967), липазу (Smith, Wilett, 1968; Ingham et al., 1981) (табл. 10). Большое количество *P. acnes* в угрях связывают (Holland et al., 1981) с высокой способностью образовывать указанные выше ферменты *in vivo*, причем оптимум pH работы ферментов соответствует значениям pH на коже. Полагают (Puhvel, Reisner, 1972), что гиалуронатлиаза может расщеплять внутриклеточные вещества клеточной стенки сальных протоков и увеличивать проницаемость фолликул эпителия. Нейраминидаза может повреждать клеточные и тканевые мембраны, воздействуя на остатки сиаловых кислот на поверхности клеток. Под действием протеазы, обладающей у *P. acnes* также кератинолитической активностью, выделяются небольшие диффундирующие хемотактические пептиды, что может иметь значение в начале воспалительного процесса. Про-

тенная активность может иметь значение в активации комплимента. Препарат внеклеточной протеазы *P. acnes* P-37 содержит по крайней мере три вида протеиназ с различными молекулярными массами (Ingham et al., 1983). Образование протеиназы используется как критерий при классификации этих бактерий.

Патогенность. Анаэробные коринебактерии в экспериментах Прево (Prevot, 1955, 1958) на животных проявляли патогенность, в основе которой лежит вирулентное действие компонентов клеточной стенки (Prevot et al., 1968). Это вещество клеточной стенки было названо ретикулостимулином, поскольку оно вызывало стимуляцию РЭС, если использовать в малых терапевтических дозах. При больших дозах оно приводило к гисторетикулозу и летальному исходу. Как целая группа в природе, кожные бактерии могут быть лишь случайными патогенами. И хотя *P. avidum* встречается в инфекционных хронических свищах, почках, абсцессах, его обычно сопровождают другие организмы.

Ретикулостимулин (РС). Как было показано (Prevot, 1975), аэробные коринебактерии РС не образуют; РС синтезируют только анаэробные формы, если они не лизогенны. Стимуляция РЭС под действием РС происходит одновременно со стимуляцией синтеза ряда сывороточных белков, т. е. в основе природных защит системы (неспецифического иммунитета) лежат как клеточные, так и гуморальные механизмы.

Образование гистамина. *P. acnes* образует гистамин (Allaker et al., 1986), синтез которого происходит в процессе роста культуры и увеличивается с повышением скорости роста. Оптимальное значение рН для роста *P. acnes* — 6,0, а для образования гистамина — 4,5 и 7,5. Установлено, что гистамин образуется в результате декарбоксилирования гистидина.

Предполагают, что работают два фермента либо один фермент с двумя значениями оптимума рН для его синтеза и/или активности или стабильности (декарбоксилаза, как показано, нестабильна). Синтез гистамина может иметь значение для течения заболевания *acne vulgaris*. Если рН внутри фолликул достигает 4,5, то выход гистамина *in vivo* может увеличиваться, как метаболический ответ бактерий на окружающие условия, поскольку амины снижают кислотность среды, что создает более благоприятные условия для роста. В фолликулах сальных желез рН 5,0—6,2 (Holland et al., 1978); рН в фолликулах с *P. acnes* может быть около 7,5 (примерно такое же значение рН тканей (Greerman et al., 1981)). В таких условиях усиливается синтез гистамина, что обостряет воспалительный процесс.

Бактериофаги. Для *P. acnes* описан ряд фагов (Prevot, Thouvenot, 1964; Webster, Cummins, 1978), которые не лизируют клетки видов *P. avidum* и *P. granulosum*, что может иметь диагностическое значение. Бактериофаги у двух последних видов не изучались. У штаммов *P. acnes* наблюдали (Jond et al., 1975) спонтанную фагопродукцию, а также индуцированную ультрафиолетом и митомицином С. Авторы считают, что минимум 38% обследован-

ных ими штаммов *P. acnes* лизогенны: 28 выделенных фагов лизировали 46 штаммов бактерий, 7 штаммов были фагоустойчивы.

Чувствительность к антимикробным веществам. *P. acnes* чувствительна к пенициллину, эритромицину и новобиоцину и устойчива к стрептомицину и сульфамидам (Pochi, Strauss, 1961). Штаммы особенно устойчивы к сульфамидам и вырастают в присутствии более 500 мкг/мл этого агента. К лизоциму не чувствительны.

Состав клеточной стенки. У кожных бактерий обнаружено (Johnson, Cummins, 1972) два типа клеточных стенок в зависимости от присутствия трех сахаров: галактозы, глюкозы и маннозы. За небольшим исключением диаминокислота представлена L-ДАП (табл. 11). На основе строения полисахаридных антигенов и строения клеточной стенки различают два типа у *P. acnes*, два — у *P. avidum* и один — у *P. granulosum*. *P. acnes* типа II имеет сильные перекрестные реакции с *P. avidum* типа II. Полисахарид клеточной стенки *P. granulosum* содержит пируват (Cummins, Hall, 1985), которого нет у *P. acnes* и *P. avidum*.

Состав жирных кислот. По данным Мосса с сотрудниками (Moss et al., 1967), большинство штаммов содержит 31—40% C₁₅ жирных кислот с разветвленной цепью, а содержание жирных

Таблица 11

Состав клеточных стенок кожных пропионовых бактерий (Cummins, Johnson, 1986)

Вид	Аминокислоты в пептидогликане	Сахара в полисахариде *
<i>P. acnes</i>	Аланин, глутаминовая кислота*, глицин*, L-ДАП, (мезо-ДАП в некоторых штаммах)	1. Галактоза, глюкоза, манноза* 2. Глюкоза, манноза
<i>P. avidum</i>	Аланин, глутаминовая кислота, глицин*, ДАП (мезо-ДАП в некоторых штаммах)	1. Галактоза, глюкоза, манноза** 2. Глюкоза, манноза
<i>P. granulosum</i>	Аланин, глутаминовая кислота, глицин. L-ДАП	Галактоза, манноза
<i>P. lymphophilum</i>	Аланин, глутаминовая кислота, лизин	Галактоза, глюкоза, манноза

* Глицина нет у штаммов с мезо-ДАП.

** У *P. acnes* (I и II) и *P. avidum* (I и II) различные сахара в клеточной стенке.

кислот изо-типа варьирует от 40 до 50% от общего содержания жирных кислот; это отличало кожные бактерии от классических, у которых жирные кислоты изо-типа составляют главную фракцию жирных кислот. При использовании альтернативного способа экстракции и анализа было, однако, показано (Saino et al., 1976), что C_{15} и C_{17} жирные кислоты изо-типа содержатся у всех штаммов кожных бактерий и составляют 70—90% всех жирных кислот, так что присутствие жирных кислот изо-типа в клетках пропионовых бактерий рассматривается (Saino et al., 1976) как общая характеристика рода.

Характеристика видов. Особенности видов представлены в табл. 12.

Таблица 12

Главные особенности видов кожных пропионовых бактерий (Cummins, Johnson, 1986)

Особенности	<i>P. acnes</i> , типы		<i>P. avidum</i> , типы		<i>P. granulosum</i>
	I	II	I	II	
Сбраживание:					
Глюкоза	+	+	+	+	+
Сорбит	—	—	—	—	—
Сахароза	—	—	+	+	+
Мальтоза	—	—	+	+	+
Гидролиз эскулина	—	—	+	+	—
Биохимические тесты:					
Разжижение желатины	+	+	+	+	—
Образование индола	+	+	—	—	—
Восстановление нитратов	+	+	—	—	—
β -гемолиз кроличьей крови (68%, 5 дней, 37°)	+	—	+	+	—

Бактерии вида *P. acnes* каталазоположительны, разжижают желатину, образуют индол, восстанавливают нитраты; сбраживают глюкозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, фруктозу и маннозу; лактозу, крахмал, декстрины, дульцит, гликоген; ксилозу; рамнозу, салицин, сорбозу не используют.

Главная длинноцепочечная жирная кислота — метилтетрадеканойдная. Некоторые штаммы образуют бактериоциноподобные вещества, ингибирующие другие штаммы (Fujimura, Nakamura, 1978). В аэробных условиях, как и *P. granulosum*, не растет, хотя клетки нечувствительны к кислороду. На поверхности плотных сред растет медленно, колонии появляются на 4—5-й день. Многие штаммы гемолитичны для человеческой, кроличьей или лошадиной крови (Hoeffler, 1977).

Основными продуктами брожения *P. acnes* являются уксусная, пропионовая кислоты в отношении 1,5:1 (Сизова, Аркадьева, 1968), а также янтарная и следы молочной и муравьиной кислот (Moore, Cato, 1963).

По данным Сизовой и Аркадьевой (1968), бактерии, выделенные из рубца коров и идентифицированные как *P. acnes*, образуют 4—5 мг/л витамина В₁₂, т. е. количества, обычные для пропионовых бактерий. На основании сбраживания инозита, мальтозы, маннита и сорбита из 72 штаммов *P. acnes* создано 8 биотипов (Pulverer, et al., 1973). Эти 8 биотипов составили 11 серотипов, при этом биотипы и серотипы не совпадали. Для подразделения вида *P. acnes* предлагается комбинирование биотипов и серотипов. Немаловажное значение для целей дифференциации имеют также лизотипы, образованные на основании изучения литического действия фагов на 69 штаммов *P. acnes* (Pulverer et al., 1973). Содержание Г+Ц в ДНК — 59—60 мол. %.

P. granulorum в аэробных условиях не растет, обычно негемолитичен, содержит липазу, более активную чем у *P. acnes*. Выделяется из тех же мест кожи, что и *P. acnes*, но в меньших количествах. Индол не образует, желатину не разжижает, нитраты не восстанавливает, сбраживает сахарозу и мальтозу (табл. 11), чем отличается от штаммов *P. acnes*. Штаммы *P. granulorum* имеют низкую (~12—15%) ДНК гомологию со штаммами *P. acnes* и *P. avidum*. Такой же уровень гомологии у штаммов *P. acnes* и классических пропионовокислых бактерий. Содержание Г+Ц в ДНК — 61—63 мол. %.

P. avidum хорошо растет в аэробных условиях, гемолитичен, образует желатиназу и дезоксирибонуклеазу, но нет лецитиназы, гиалуронидазы и хондроитинсульфатазы (Hoeffler, 1977), в отличие от *P. acnes*; у *P. avidum* II и *P. acnes* II имеется сильная перекрестная серологическая реакция. Оба типа содержат мезо-ДАП вместо L-ДАП у других штаммов. У обоих типов в клеточной стенке содержится глюкоза и манноза, но нет галактозы. Содержание Г+Ц в ДНК — 62—63%.

P. lymphophilum. В род *Propionibacterium* включает также *P. lymphophilum*, анаэробные коринебактерии, образующие пропионовую и уксусную кислоты как главные продукты брожения, хотя механизм образования пропионовой кислоты неизвестен. *P. lymphophilum* отличается от других штаммов рода тем, что его клеточная стенка содержит лизин вместо ДАР, а в ДНК — низкое содержание ГЦ (53—54%). Изучено лишь несколько штаммов. Один из них выделен как инфекционный агент мочевых путей человека, другой — из брыжеечной железы обезьяны, ряд похожих штаммов выделено из лимфатических желез людей с заболеванием Hodgkins (Torgay, 1916).

Выделение. Кожные пропионовые бактерии обычно выделяют с кожи или с других эпителиальных поверхностей, используя специальные приемы (Kabongo et al., 1981). При соскабливании выделяют бактерии из сальных желез. При пользовании кисточкой, смоченной раствором детергента, выделяют бактерии с поверхности кожи. Для выделения используют среды, содержащие кровяной агар или пептоно-дрожжевой агар с глюкозой и твином 80. Чашки Петри инкубируют в анаэробных условиях в атмосфере Н₂+СО₂.

P. acnes можно выделять, используя среды, рекомендованные для классических пропионовых бактерий.

Для выращивания *P. acnes* предложена (Kabongo et al., 1982) простая среда, содержащая лецитин, ингибирующий рост *Staphylococcus aureus*, что указывает на некоторую селективность этой среды. Для *P. acnes*, образующей экзоферменты, гидролизующие фосфоглицериды, лецитин (фосфотидилхолин) служат единственным источником углерода, энергии и жирных кислот.

1.4. PROPIONIBACTERIUM inposuicum sp. nov.

На основе состава клеточной стенки, данных ДНК—ДНК гибридизации и секвенирования части 16S рибосомальной РНК предложен (Pitcher et al., 1991¹) новый вид коринеформных бактерий, обитающих на коже людей — *P. inposuicum*. Бактерии имеют фенотип классических пропионовых бактерий, но отличаются от них выраженным аэробным дыханием (способны также к брожению) и уникальным составом клеточных стенок, в которых LL-ДАП присутствует в сочетании с арабинозой и маннозой (галактоза отсутствует). Типовой штамм *P. inposuicum* NCTC 11082, молярный процент Г+Ц равен 62.0.

1.5. Propionibacterium propionicum (*Arachnia propionica*)

Род *Arachnia* был создан для объединения организмов, ранее называемых *Actinomyces propionicus* (Pine; Georg; 1969). В отношении патогенности и нитчатой морфологии *A. propionicus* имеет сходство с актиномицетами, особенно с *A. israelii* (Slack, Gerenser; 1975); но отличается от них тем, что образует пропионовую кислоту как один из основных продуктов метаболизма (Schaal, 1986); которая образуется по пути метилмалонил-КоА; как у других пропионовых бактерий (Allen, Linehan; 1977); содержит L-ДАП (Johnson, Cummins; 1972) подобно пропионовым бактериям (у актиномицетов диаминокислоты представлены лизином или орнитиним). Как и пропионовые бактерии, *Arachnia propionica* в качестве главных жирных кислот содержит изо- и антеизометилразветвленные жирные кислоты; 12- и 13-метилтетрадеканонидные кислоты (C₁₅) как главные жирнокислотные компоненты, небольшие количества C₁₆- и C_{18:1}-кислоты (Cummins, Moss, 1990). Три из четырех изученных штаммов содержали также необычную мононенасыщенную C₁₈-кислоту с прямой цепью в количестве от 2^x до 22^x%. В отличие от *P. propionicum* представители рода *Actinomyces* содержали главным образом C_{16:0}- и C_{18:1}-кислоты, а разветвленные C₁₅-кислоты не обнаруживались или присутствовали в следовых количествах, что поддерживало правильность отнесения *P. propionicum* к пропионовокислым бактериям.

¹ FEMS MICR. LETT. 1991. 84, 295—300.

У бактерий родов *Arachnia* и *Propionibacterium* есть сходство в составе менахинонов. Однако эти роды находились в совершенно различных семействах в соответствии с нумерической систематикой (Schofield, Schaal, 1981).

Сравнение последовательности 744 оснований 16S рРНК (Charfreitag et al., 1988) у *A. propionica*, *Act. bovis*, *Act. viscosus*, *P. freudenreichii* и *P. acnes* показало, что *A. propionica* стоит ближе к *Propionibacterium*, чем к другим изученным представителям. При этом *A. propionica* граничит с *Propionibacterium*, находясь внутри границ рода (рис. 18), и имеет почти одинаковое расстояние к *P. freudenreichii* и *P. acnes*. Значит, родство находится на уровне

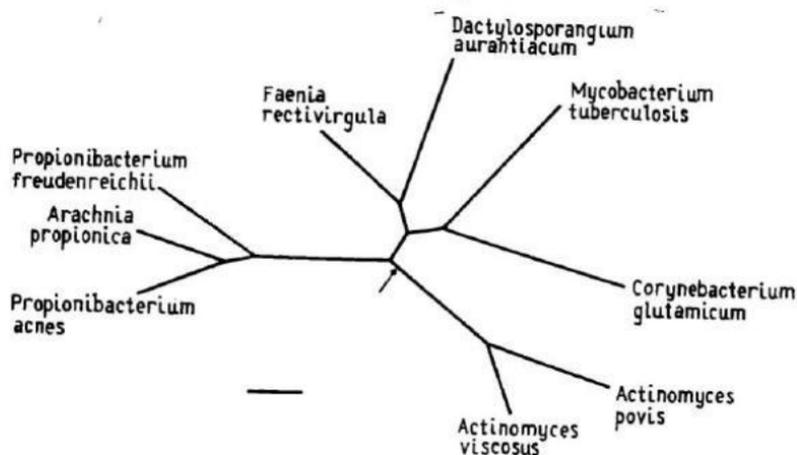


Рис. 18. Неукорененное дерево, отражающее филогенетические позиции штаммов (на основании последовательности оснований в 16s рРНК (Charfreitag et al., 1988)

рода, хотя различие с ДНК *P. freudenreichii* 1—5%. Но примерно такое же низкое сходство у *P. freudenreichii* и *P. acnes*. С двумя изученными представителями актиномицетов *A. propionica* имела отдаленное родство, хотя очень похожа на них в отношении мицелиальной морфологии. У *P. propionicum* обнаружены метилмалонил-КоА-транскарбоксилаза и 4 других фермента, участвующих в пропионовокислом брожении (Allen, Linehau, 1977), осуществляемом классическими пропионовокислыми бактериями. *A. propionica* теперь называют *P. propionicum*. Включение нитчатых штаммов в род *Propionibacterium* делает его сильно гетерогенным в отношении морфологии, но подобные примеры известны для таких актиномицетных видов, как *Actinomyces*, *Mycobacterium* и *Rhodococcus*. С учетом представленных дополнительных сведений предложен (Charfreitag, 1988) измененный диагноз рода.

Грамположительные, неподвижные, кислотонеустойчивые, короткие дифтероидные палочки 0,2—0,8 мкм в диаметре и 1—5 мкм длиной, которые могут не ветвиться, а могут ветвиться. Нитчатые

формы более типичны для молодых культур и для клинического материала.

Короткие дифтероидные палочки, 0,2—0,8 мкм в диаметре и 1—5 мкм длиной, которые могут ветвиться и не ветвиться. Ветвящиеся нити достигают 5—20 мкм длины. Некоторые штаммы образуют сферические клетки, напоминающие сферопласты, имеющие диаметр 5—20 мкм. Могут быть нитчатые микроколонии. В пептидогликане содержится ДАП или лизин как основная диаминокислота. Хорошо растет в стандартных сложных средах. В жидкой среде рост обычно флоккулярный или гранулярный; колонии на твердой среде могут варьировать от гладкой правильной формы, вязкой до шероховатой, похожие на колонии у *A. israelii*.

Главный дыхательный хинон представлен МХ-9 (Н₄). Жирные кислоты представлены прямыми насыщенными, изо- и антеизометилразветвленными типами; мононенасыщенные кислоты тоже, могут присутствовать в небольших количествах.

P. propionicum — обычные обитатели ротовой полости людей и выделяются из зубных бляшек, а также с поверхности шейки матки, влагалища и при типичных актиномикозах, поражающих разные органы (Brock et al., 1973). Растут аэробно и анаэробно, но лучший рост при меньшем инокуляте и с большим накоплением биомассы получают в анаэробных условиях. Не содержат каталазу, не образуют индол и не дают реакцию Фогес-Проскауэра. Восстанавливают нитраты и гидролизуют крахмал (Slack, Gerencser, 1975).

Бактерии чувствительны к β-лактамовым антибиотикам, тетрациклам, хлорамфениколам, макролидам, как эритромицин, и ряду других, как ванкомицин. Проявляют большую устойчивость к аминогликозидам, как гентамицину, нитроамидазольным соединениям, как метронидазол, и к пептидным антибиотикам, как колистину (Schaal, Pipe, 1980; Niederan et al., 1982).

Серотипы *P. propionicum*. С использованием техники флюоресцентных антител и тестов гель-диффузии описано 2 сероварианта (Slack, Gerencser, 1975; Gerencser, Slack, 1967; Holmberg; Forsum, 1973; Schaal, 1986). Два серовара представлены типовым штаммом *P. propionicum* ATCC 14157 (серовар 1) и ATCC 29326 (серовар 2; WVU 346, F. Lentze штамм «Fleischman»). Перекрестных реакций между этими штаммами в тесте агглютинации клеточных стенок не обнаружено (Johnson, Cummins, 1972), а серовар 2, штамм ATCC 29326 (VP 1 5067) имел очень низкую ДНК-гомологию (1%) с ATCC 14157. Два серовара давали отчетливые субкластеры в нумерическом фенетическом анализе (Schofield, Schaal, 1981). Не исключено, что два серовара следует различать на видовом уровне.

A. propionicum теперь называют *P. propionicum*, хотя есть мнение (Cummins, Johnson, 1992), что более подходящим названием для них служило бы *P. arachniiiforme*.

Результаты гибридизации ДНК·ДНК штаммов всех семи видов рода показали, что он не представляет собой гомогенную группу (Johnson, Cummins, 1972); одна группа включает кластер, состоящий из штаммов *P. acnes* и *P. avidum* и более далеко отстоящего *P. granulosum*, а вторая группа — *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici* и менее родственный им *P. freudenreichii*. Родство *Arachnia propionica* и пропионовокислых бактерий находится на том уровне, который разделяет эти две группы. И хотя род *Propionibacterium* гетерогенен, внутри актиномицетной ветви он образует отдельную сублинию (Stackenbrandt, Woese, 1981), причем главную линию предков в группе грамположительных бактерий с высоким содержанием Г+Ц, как было показано при изучении последовательности оснований в 16S рРНК.

Изучение длинных фрагментов 16S рРНК (Charfreitag, Stackenbrandt, 1989) у представителей шести видов позволило определить внутривидовые взаимоотношения, отображенные на рис. 18 в виде бескорневого дерева. Было подтверждено, что виды *P. jensenii* и *P. thoenii* имеют близкородственные отношения (уровень гомологии 98,3%). Вместе с *P. acidipropionici* они образуют кластер тех классических пропионовых бактерий, которые содержат мезо-ДАП и сбраживают сахарозу и мальтозу (Cummins, Johnson, 1986). Этот кластер далеко отстоит от четвертого вида *P. freudenreichii* и отличается от него в отношении вышеприведенных характеристик. Виды кожных бактерий *P. acnes* и *P. propionicum* имеют между собой такую же степень эволюционного родства, что и с классическими пропионовыми бактериями. Существенно, что данные, полученные двумя различными методами — определением последовательности оснований в 16S рРНК и гомологии ДНК·ДНК, — находятся между собой в полном соответствии.

Для определения межродовых взаимоотношений, которые не удалось оценить ранее применявшимися методами, использовали секвенирование фрагмента 16S рРНК, состоящего из 490 нуклеотидов у четырех штаммов пропионовых бактерий и 15 представителей рода актиномицетов.

Выяснили (Charfreitag et al., 1988), что род *Propionibacterium* имеет отдаленное родство с *Nocardioides* (рис. 18), а также с *Terabacter tumescens* (Collins et al., 1989). Вместе с тем пропионовые бактерии не имеют даже отдаленного родства с *p. Corynebacterium*, как предполагал ван Ниль, и потому образование подрода «*Coryneforms*» из анаэробных коринебактерий, как предлагал Превот (Prévot, 1976), вряд ли правомерно.

ЧТО ИЗВЕСТНО О ГЕНЕТИКЕ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Отсутствие токсичности, ценные биотехнологические свойства пропионовых бактерий обусловили их использование на производствах (в пищевой промышленности, производстве витамина В₁₂). С помощью генетических подходов возможно увеличение продуктивности штамма, изменение его питательных потребностей, придание штамму фагоустойчивости.

Существует, конечно, и теоретический интерес к генетике пропионовых бактерий, которая стала предметом исследования только в 1986 г.

В производстве применяют штаммы, измененные в результате мутаций, а также полученные методами генетической и клеточной инженерии. Мутагенез больше применяли в отношении пропионовокислых бактерий; клеточная и генетическая инженерия только еще разрабатывается, но определенные сведения, необходимые для генетических целенаправленных изменений штаммов, имеются.

2.1. ПЛАЗМИДЫ

Плазмидные ДНК выделены (Rehberger, Glatz, 1986) из 17 штаммов пропионовокислых бактерий, представляющих все виды, важные для пищевой промышленности. С помощью рестрикционного анализа идентифицировали (Rehberger, Glatz, 1990) семь отчетливых плазмид с размерами от 4,4 до более 200 мега Да (МДа) pRG01—pRG07:01—4,4,02—6,3,03—25,04—30,05—35,06—5,6 и 07—6,3 МДа. 17 штаммов содержали идентичные (pR01) плазмиды, 3 штамма — pRG02; плазмиды pRG04 и pRG06 также обнаружены более чем в одном штамме. Некоторые штаммы содержали две различные плазмиды. Так, в штамме *P. freudenreichii* обнаружены плазмиды pRG07 и 03 или только pRG01, у пяти штаммов *P. acidipropionici* — только pRG01, у трех штаммов *P. jensenii* — pRG02, у одного — pRG01 и 05 и еще у одного — pRG01.

Для четырех плазмид (pRG01—pRG04) созданы (Rehberger, Glatz, 1990) детализированные рестрикционные карты, которые показали, что наряду со структурной гетерогенностью существует и некоторая композиционная гомогенность. Как и хромосомная ДНК, ДНК плазмид характеризуется высоким содержанием ГЦ-пар. Плазмиды пропионовых бактерий лучше разрезаются рестриктазами, в сайтах которых находятся немодифицированные гуанин

и цитозин (Г и Ц), чем ферментами, сайты которых содержат мало ГЦ-пар. Сравнение карт рестрикции позволило идентифицировать законсервированные участки в плазмидах pRG01 и pRG02.

Методом гибридизации по Саузерну доказана гомология этих плазмид: зонд pRG02 гибридизируется с обоими Sall-фрагментами pRG01. Однако у pRG01 отсутствуют многие рестрикционные сайты, имеющиеся у pRG02. Обе плазмиды содержат один и тот же фрагмент размером 1800 п. н. Обе плазмиды (pRG01 и pRG02) гомологичны с pRG07 и со сходной последовательностью pRG05, что позволяет говорить об их общем предшественнике. Плазида pRG03 имеет частичную гомологию только с pRG07.

Излечивание от плазмид 01, 02 и 05 соответствующих штаммов не отразилось на их способности образовывать бактериоцин, сбраживать 21 углевод, а также на устойчивости к 21 антибиотику, включая ампициллин, бацитрацин, хлорамфеникол, цефалотин, клоксациллин, эритромицин, фузидовую кислоту, гентамицин, канамицин, линкомицин, метициллин, налидиксовую кислоту, неомицин, новобиоцин, триметоприм, ванкомицин, стрептомицин, тетрациклин, оксациллин, пенициллин и рифампин. Однако пока преждевременно делать окончательный вывод об отсутствии связи плазмид с указанными признаками, поскольку бесплазмидные производные не были проверены после введения в них соответствующих плазмид, которые при обработке акрифлавином могли интегрироваться с хромосомой.

Получены доказательства того, что плазида pRG05 у штамма *P. jensenii* кодирует образование клеточных агрегатов.

У *P. freudenreichii* subsp. *globosum* P93 обнаружили (Rehnberger, Glatz, 1987) 2 плазмиды pRG02 и pRG03 с молекулярной массой 6,3 и 22 МД соответственно. Этот *freudenreichii* отличался от близкородственного штамма *P. freudenreichii* subsp. способностью сбраживать лактозу (Bergey, 1974). После обработки клеток акрифлавином 15% всей популяции утратили эту способность, превратившись в Лас-штаммы, которые не содержали больше плазмиду pRG03. Клетки, не утратившие способности сбраживать лактозу после акрифлавиновой обработки, сохранили плазмиду pRG03. Изучены рестрикционные карты этих плазмид и установлено, что плазида pRG02 не гибридизуется с pRG03, а последняя не гибридизуется с плазмидой 4,7 МД, присутствовавшей у 11 штаммов и 2 плазмидами 6,3 МД, имеющимися у других 2 штаммов *Propionibacterium*. Таким образом, было установлено, что гены сбраживания лактозы у *P. globosum* находятся в плазмиде pRG03, которая неродственна другим собственным плазмидам пропионовых бактерий. Если у штамма отсутствуют плазмиды, как в случае *P. technicum* (Yongsmith, Cole, 1986), то передачу новых свойств можно осуществлять путем трансформации протопластов, способ получения которых для этих бактерий разработан (см. ниже). Возможен перенос хромосомных генов пропионовых бактерий в другие неродственные штаммы. В частности, фрагмент хромосомной ДНК *P. technicum* был присоединен *in vitro* к ДНК плазмиды pBR322

E. coli (Yongsmith, Cole, 1986) и рекомбинантной плазмидой трансформировали клетки кишечной палочки.

Новые трансформанты отличались по морфологии и физиологии от контрольных штаммов.

Получение и трансформация протопластов. Для получения протопластов с выходом 99,9—99,99% рекомендуют (Bachman, Glatz, 1976; Pai, Glatz, 1976) использовать клетки в середине лог-фазы, обработанные лизоцимом (20 мг/мл) в осмотически стабильных условиях. Превращение палочковидных клеток в протопласты (округлые формы) можно наблюдать в световом микроскопе. Регенерация протопластов происходит через 21 день и только в полужидком агаре. Суспензию протопластов распределяют по поверхности регенерационного агара и наслаивают полужидкий регенерационный агар, содержащий NLA (Na-лактатный агар), сахарозу, желатину и крахмал. Желатина и крахмал стимулируют регенерацию, $MgCl_2$ и $CaCl_2$ ингибируют регенерацию протопластов. Частоту регенерации определяют как число регенерантов на общее число исходных клеток. Частота регенерации достигает 30—40% (Pai, Glatz, 1987) и зависит от числа исходных клеток, концентрации лизоцима и соблюдения анаэробных условий инкубации. Произведена трансформация протопластов *P. technicus* плазмидами pT181, pC194, pE194, и pUB110 из *Staphylococcus aureus* и pAMB1 из *Streptococcus faecalis*.

Получены эритромицинустойчивые колонии бактерий, трансформированные плазмидой pE194, хотя интактные плазмиды не были обнаружены в предполагаемых реципиентах.

Эти сообщения показывают, что в клетках пропионовых бактерий могут «звучать» гены далеких в систематическом отношении бактерий.

2.2. ЕСТЕСТВЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

К сожалению, известная поговорка «новое — есть хорошо забытое старое» относится отчасти и к научным фактам. В 1988 г. французские авторы (Naud et al., 1988) сообщили о возникновении «природных» мутантов в популяции *P. freudenreichii*, помещенных в жесткие условия, недопускающие рост, или подвергнутых шоку под воздействием ультрафиолетовых лучей. Исходные палочковидные клетки и возникающие мутанты сферической формы различались по многим и разным признакам, о чем мы позже расскажем подробнее. Полученные авторами факты заставили нас вернуться к нашим почти забытым результатам конца 60-х годов (Воробьева, Баранова, 1969), касающихся также генетической природной изменчивости пропионовых бактерий. В те годы некоторые микробиологи в штыки встретили излагаемые ниже факты, поскольку они не укладывались в классические представления о пропионовокислых бактериях. Но теперь эти данные могут представить определенный научный и практический интерес.

Условия превращения исходной формы
Propionibacterium shermanii
в апигментную
(Воробьева, Баранова, 1969)

Состав среды	Количество колоний исходной формы, %
Мясопептонный агар (МПА) (подсушенные чашки Петри)	20
МПА	95
МПА + лактат (подсушенные чашки)	50
МПА + лактат	95
МПА + глюкоза + твин-80 (подсушенные чашки)	0
МПА + глюкоза + твин-80	80
МПА + глюкоза + цитрат	70
МПА + глюкоза + фосфат	100
МПА + глюкоза	50

Работая многие годы со штаммом *P. shermanii* ВКМ-103, мы наблюдали, что после ряда пассажей в жидкой среде эта «анаэробная» культура приобретает способность расти на поверхности плотной среды, образуя колонии с желтоватой окраской (колонии исходной культуры кремовые). Рост на поверхности плотной среды сохранялся и при длительном хранении бактерий в жидкой среде при 4°C. Штамм *P. shermanii*, образующий желтоватые колонии и именуемый нами «желтый», в аэробных условиях и в условиях, неблагоприятных для роста, например при сильном подсушивании плотной среды, высоком накоплении

продуктов метаболизма, превращался в новую апигментную форму, синтезирующую корриноиды в незначительных (менее 100 мкг/г биомассы) количествах. (Исходный штамм образует 800 мкг/г биомассы корриноидов.)

При обогащении среды фосфатами реверсии в апигментную форму не наблюдали (табл. 13). Фосфаты, как известно (Лабори, 1970), имеют регулирующее значение в переключении дыхания на брожение. Вместе с тем внесение в среду цитрата, ключевого метаболита ЦТК, увеличивало переход исходной формы в апигментную. Морфология клеток исходной, желтой и апигментной форм различалась незначительно; клетки имели вид коротких палочек (или микрококков) размером 0,5—0,6×0,4 мкм в первых двух случаях и 0,6—0,8×0,4 мкм у апигментной формы. Однако исходная и апигментная формы по-разному росли в жидкой среде: первая по всему столбику, а вторая в виде осадка на дне пробирок, и различались в отношении сбраживания некоторых источников углерода (табл. 13).

В отличие от исходной, апигментная форма хорошо росла за счет сорбита, маннита, глицерина, использовала глюконат кальция; не восстанавливала нитраты (табл. 14); она лучше утилизировала лактозу и раффинозу по сравнению с исходной формой, образуя больше биомассы и сильнее сдвигая рН, по-видимому, за счет того, что главные продукты ее метаболизма были представлены уксусной кислотой и CO₂ (пропионовая кислота присутствовала в небольших количествах). Исходная культура синтезировала пропионовую, ук-

Профили сбраживания углеводов штаммами
Propionibacterium shermanii
 (Воробьева, Баранова, 1969)

Углеводы	Штаммы	
	исходный	апигментный
D-глюкоза	+	+
Сахароза	—+	—
D-фруктоза	+	+
Галактоза	+	+
Лактоза	+	+
Мальтоза	+	+
Раффиноза	—	—+
Ксилоза	—	—+
Арабиноза	—	—
Сорбит	—	+
Маннит	—+	++
Глицерин	—	++
Глюконат Са	—	+
Крахмал	—	—
Восстановление NO ₃ ⁻	+	—

Примечание. «—» — роста нет, «+» — рост есть, «—+» плохой рост, «++» очень хороший рост.

сусную кислоты и CO₂ в соотношении 2:1:1. Таким образом, наблюдался сдвиг метаболизма апигментной формы в окислительную сторону. Такое же явление имело место и при искусственном ограничении синтеза корриноидов (за счет удаления из среды кобальта) у клеток *P. shermanii* (см. ниже). Иногда на колониях апигментной формы появлялись вторичные колонии розового цвета, имеющие все признаки исходной формы, т. е. происходила реверсия от апигментной формы к исходной. Не исключено, что описанные переходы связаны с включением или эксцизией плазмидной ДНК из хромосомы. Однако генетический анализ тогда не был проведен, а сделан 20 лет спустя французскими авторами (Naud et al., 1988) при изучении «природных» мутантов *P. freudenreichii* ATCC 13673 — штамма близко родственного с *P. shermanii*. Авторами было показано, что *P. freudenreichii* ATCC 13673 (исходный штамм) может находиться в двух стабильных формах: в виде коринеформных клеток (*P*) и больших кокков (~1 мкм) с толстой клеточной стенкой (штамм E₁). Превращение исходного штамма в сферический E₁ можно индуцировать путем помещения палочковидных клеток в среду, неблагоприятную для роста, либо подвергая клетки шоковому действию ультрафиолетовых лучей. Происходящие в этих условиях изменения проявляются на селективной среде, содержащей хлорамфеникол или эритромицин, поскольку на такой среде исходная форма не вырастает, а колонии, состоящие из кокков, растут.

Но если предобработанные вышеуказанным способом клетки высевались в среду без антибиотика, то вырастали колонии палочковидных клеток, которые могли ревертировать в «неиндуцированное» состояние. Следовательно, штамм *P. freudenreichii* E₁ вел себя как природный мутант. Для его возникновения не использовали мутагенез, а высокий выход сферических форм исключал полностью вмешательство мутационных механизмов. Экспериментальные данные показывают (Hall, 1989), что скорость спонтанных мутаций не является наследственным признаком организма, но служит объектом изменений под действием нормальных условий окружающей среды. Вероятность возникновения определенных мутаций может строго зависеть от ее селективных преимуществ.

Следует отметить, что наблюдалось и спонтанное возникновение Lac⁻ (лактозу несбраживающих) и хлорамфеникол (LM-C) устойчивых мутантов в популяции палочковидных клеток. Но даже после многих генераций без хлорамфеникола при отсутствии глюкозы индуцировалась реверсия сферических клеток в палочки. Объяснения этому явлению пока нет. Сферические формы превращались в палочковидные и в том случае, если глюкозу в среде заменяли на лактат натрия. Сферические формы утратили способность сбраживать некоторые полиспирты (эритрит, адонит, инозит) и приобрели способность активно сбраживать дисахариды, — мальтозу, сахарозу, трегалозу, — содержащие α-гликозидные связи, т. е. приобрели α-гликозидазную активность (табл. 15).

Любопытно, что время генерации (g) сферической формы при росте в аэробных условиях составляло 2 ч, а исходной — 4,5 ч. В анаэробных условиях оба штамма росли с одинаковой скоростью

Таблица 15

Профили сбраживания углеводов штаммами
Propionibacterium freudenreichii (Naud et al., 1988)

Углеводы	Штаммы		
	ATCC 13673 (исходный), P	E ₁ (сферические клетки)	R ₁ (ревертант, E ₁ → P ₁)
Галактоза	+	+	+++
D-фруктоза	-	++++	-
D-манноза	++++	+	+++
Мальтоза	-	+++	-
Сахароза	-	++++	-
Трегалоза	-	++++	-
Глицерин	+	+	+
Эритрит	++	-	++
Адонит	+++	-	+++
Инозит	++++	-	++++
Глюконат кальция	++	-	+

Примечание. «-» — роста нет, «+» — указатель интенсивности роста.

($g=4,5$ ч), и это говорило о том, что сферическая форма лучше приспособлена к аэробному стилю жизни (аналогично атипичному штамму в наших исследованиях). В отличие от исходного штамма, обладающего $D(-)$ -лактатдегидрогеназной (ЛДГ) активностью (но не $L+$ ЛДГ), у штамма E_1 обнаружена только $L(+)$ ЛДГ-активность.

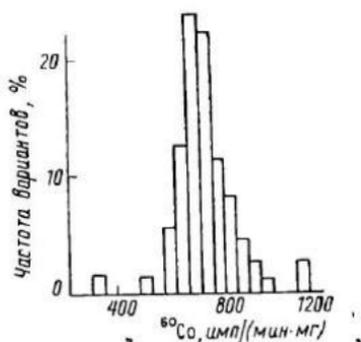
Появление устойчивости к хлорамфениколу у сферической формы сопровождалось утратой устойчивости к 15 из 26 испытанных лекарственных препаратов, которая имела у исходной формы и у ревертанта R_3 , полученного при реверсии E_1 в исходную форму. Сферические формы более чувствительны, чем палочковидные, к ряду аминокликозидов, что служило указанием на увеличенную проницаемость клеток к этим положительно заряженным молекулам. Изменение ферментационных свойств и устойчивости к антибиотикам у сферических клеток авторы (Naud et al., 1988) связывают со строением оболочки. Так, утрата способности к сбраживанию некоторых полиолов может быть вызвана инактивацией обычных мембраносвязанных транспортных механизмов, именно ФЕП-фосфотрансферазной системы (Dills et al., 1980). Появление новой ферментативной активности может быть связано с увеличением проницаемости к индуктору синтеза белка, а проявлению индукцибельности α -гликозидазы у исходной формы может мешать инсерция плазмиды или фага внутри ферментного локуса по гомологичным участкам ДНК. Значит, после удаления чужой ДНК индукцибельность фермента может проявиться и в связи с этим очень существенно обнаружение авторами двух плазмид и только у сферических клеток: У исходного штамма плазмиды не обнаружены. Более того, реверсия сферической формы в палочковидную сопровождалась исчезновением плазмидной ДНК, которая могла либо утрачиваться, либо интегрироваться с хромосомой. В результате трансформации палочковидных клеток фрагментом ДНК, экстрагированным из штамма $LM-C$ (устойчивого к хлорамфениколу), получили сферические клетки.

2.3. ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Исследования по мутагенезу пропионовокислых бактерий проводились главным образом с целью повышения продуктивности по витамину B_{12} (Воробьева и др., 1973, Грузина и др., 1973, 1974), поскольку производство этого витамина во многих странах основано на жизнедеятельности пропионовокислых бактерий.

Когда мы начинали эти исследования в 1970 г., то предшественников у нас не было и первое, на что мы обратили внимание, это большие природные различия штаммов в отношении продуктивности по витамину B_{12} . Разница в содержании витамина достигала 80% (рис. 19), а по данным Грузиной (1974), варьирует от 0 до 160%. Так что, осуществляя отбор активных форм, уже можно значительно повысить выход желаемого продукта, в данном случае витами-

Рис. 19. Спонтанная изменчивость *P. shermanii* в отношении корриноидообразования (Воробьева, 1972)



на. Однако этот способ ограничен генотипом бактерий, поэтому применяют индуцированный мутагенез.

В микробиологической практике широкое применение получили в качестве мутагенов N-нитрозозамещенные соединения. К ним относятся N-нитрозометилмочевина (НММ), N-нитрозоэтилмочевина (НЭМ), N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ). Эти соединения называют супермутагенами, так как они имеют большой мутагенный эффект при низкой летальности. Супермутагены индуцируют мутации, не встречающиеся в природе, вызывают повторяющиеся мутации и резко повышают их частоту. Особенно интересный спектр мутаций мы получили при использовании НГ.

Механизм действия НГ комбинированный. НГ специфически взаимодействует с ДНК. Тот факт, что повреждения, вызванные НГ, репарируются, так же как повреждения, вызванные УФ-лучами, позволяет отнести НГ к радиомиметическим агентам. Мутанты *Haemophilus influenzae*, имеющие дефект в репарационной системе и высокочувствительные к УФ-облучению, чувствительны и к НГ (Kimball et al., 1971). Мутанты *E. coli*, устойчивые к излучению, устойчивы и к действию НГ (Ferawaki, Greenberg, 1965).

Известно, что темновая репарация повреждений ДНК, вызванных УФ, ингибируется акрифлавином (АФ). АФ ингибировал репарацию летальных повреждений ДНК у *B. subtilis* 202, вызванных НГ (Yoshido, Yoki, 1968).

На специфическое влияние НГ на ДНК указывает тот факт, что трансформирующая активность ДНК, выделенной из клеток *B. subtilis* 202, обработанных НГ, ниже на 50% трансформирующей активности ДНК необработанных клеток. В ДНК, обработанной N-(C¹⁴)-метил-N'-нитро-N'-нитрозогуанидином, метка обнаруживается в 7-метилгуанине. Кроме того, НГ реагирует с органическими аминами с образованием продуктов, содержащих нитрозогуанидинную группу (McCalla, 1968). Показано (Cerdo-Olmedo, Napawalt, 1967), что НГ подавляет синтез функциональных белков, в частности, синтез галактозидазы у *E. coli* TAU bag или ее активность (если фермент присутствовал в клетках до обработки НГ). На основании экспериментальных данных предположили, что НГ влияет на синтез белка, вызывая ошибки трансляции, что может привести к нарушению синтеза ферментов, катализирующих репликацию ДНК. Не исключено, что НГ действует на ДНК-полимеразу, вследствие изменения которой происходят ошибки при репликации ДНК; это альтернативное объяснение (Yoshida, Yuki, 1968) основано на наблюдениях действия НГ на синтез белка.

Большую роль в индукции различных мутаций играет генотип организма. Тип ДНК (ГЦ или АТ), неравномерность распределения пар нуклеотидов определяют наличие «горячих» точек ДНК и определенный спектр мутаций. Высокой чувствительностью к рентгеновским лучам и алкилирующим соединениям обладают бактерии, ДНК которых относится к ГЦ-типу. К ГЦ-типу относятся ДНК и пропионовокислых бактерий (Воробьева и др., 1965; Лавлес, 1970). Кроме того, спектр мутаций зависит от физического состояния ДНК. Наиболее подвержены действию мутагенов денатурированные участки ДНК. Нарушение водородных связей возможно в результате изломов ДНК и в момент репликации. Ряд интересных мутаций, полученных под действием ДМС, ДЭС, ЭМС и нитрозогуанидина, описал Педживилк (Pedziwilk, 1971), в том числе непигментированные мутанты, почти не синтезирующие витамин В₁₂ и отличающиеся от исходного штамма *P. shermanii* по продуктам брожения: мутанты накапливали муравьиную, молочную, уксусную и пропионовую кислоты.

Несомненный интерес в изучении мутагенеза пропионовокислых бактерий представляют данные Зайлера (Seiler, 1973) о мутагеном действии бензимидазола и его производных, поскольку 5,6-диметилбензимидазол в качестве предшественника витамина В₁₂ вносят в среды для выращивания продуцентов последнего.

Считают (Seiler, 1973), что мутагенное действие бензимидазола связано с его включением в ДНК вместо обычных пуринов, что было установлено в результате идентификации продуктов гидролизованной ДНК. *E. coli*, выращенной в присутствии 2-¹⁴С-бензимидазола. Включаясь вместо пуриновых оснований, бензимидазол вызывает транзиции, хотя возможны и трансверсии, поскольку молекула последнего не содержит боковых групп, необходимых для «распознавания» основания.

Известно, что в работе по мутагенезу, пожалуй самым важным условием успеха является разработка чувствительного и быстрого метода селекции. Образование витамина В₁₂ пропионовокислыми бактериями коррелирует с кислотообразованием. Однако метод селекции, основанный на отборе колоний с максимальным диаметром зон растворения мела при выращивании на твердой среде в чашках Петри, не дал положительных результатов, так как размер колоний не одинаков, а накопление кислот зависит от количества биомассы.

Селекция по коррелятивному с витаминообразованием признаку — розовой окраске колоний — имеет большую ограниченность в связи с тем, что отбор вариантов пропионовых бактерий приходится проводить методом ступенчатого отбора малых мутаций, когда разница в окраске не может быть замечена глазом.

Был использован метод непосредственного определения витамина В₁₂ в каждой колонии после подращивания в пробирках с кукурузно-глюкозной средой в объеме 30 мл. Культуру микроорганизмов выращивали при 30° в течение 4 дней.

Ежедневно подтитровывали среды 4%-ным раствором NaOH до рН 6,8—7,0. На 3-й день вносили 12,5 мг/л 5,6-ДМБ. Витамин В₁₂ определяли микробиологическим методом с *E. coli*-113-3 и отбирали наиболее активные варианты. Каждый активный вариант снова рассеивали на твердую среду в чашки Петри и определяли витамин В₁₂ не менее чем в 100 колониях после подращивания в пробирках. Этот метод отбора трудоемок, что ограничивает проверку большого количества колоний на образование витамина В₁₂. Кроме того, микробиологический метод определения имеет ошибку около 30%, поэтому затрудняет отбор вариантов с активностью, превышающей контроль по образованию витамина В₁₂ на 10—20%. Необходимость регулирования рН в процессе выращивания культуры также вносит значительную ошибку в оценку продуктивности культур.

Нами (Воробьева и др., 1973) был разработан метод, основанный на использовании сред с радиоактивным кобальтом (⁶⁰Со), поскольку Со входит в состав молекулы витамина В₁₂. Суспензию клеток после обработки мутагеном и суспензию необработанных клеток взятую в качестве контроля, рассеивали на твердую среду с радиоактивным кобальтом. Бактерии выращивали в анаэробных условиях в чашках Петри в течение девяти дней при температуре 25°. Определяли вес колоний путем взвешивания их на стерильных подложках.

Радиоактивность колоний измеряли в сцинтилляционном счетчике γ-излучений.

Радиоактивность колоний рассчитывали на 1 мг сырой биомассы по формуле

$$x = \frac{\frac{2000}{t_1} - \frac{400}{t_2}}{m},$$

где x — активность ⁶⁰Со в имп/мин·мг; t_1 — время счета колоний (2000 имп); t_2 — время счета фона (400 имп); m — сырой вес колоний в мг.

Вес колоний в чашках Петри из необработанной суспензии клеток варьирует от 1,5 до 5 мг.

В среднем активность колоний, выросших из клеток, необработанных мутагеном, составляла 600—700 имп/мин·мг, σ не превышая 120 имп/мин·мг и CV—16%. Добавление стабильного кобальта к среде снижает включение метки до 200—300 имп/мин·мг. Ошибка при просчете колоний не превышала 3%.

Колонии с высокой активностью ⁶⁰Со отбирали и снова рассеивали на плотную среду с ⁶⁰Со. Для каждого варианта просчитывали не менее 100 колоний, из которых отбирали наиболее активные для дальнейшей проверки на образование витамина В₁₂. Активные варианты проверяли на образование витамина В₁₂ в производственной среде с ⁶⁰Со. Окончательную проверку активных вариантов проводили в производственной среде в объеме 9 л на опытной установке (ферментер объемом 250 л) и в цехе.

Предложенный нами способ отбора микроорганизмов, образующих кобальторганические соединения, позволяет с высокой точностью проверять не менее 400—500 колоний в день, что повышает эффективность отбора высокопродуктивных вариантов пропионовокислых бактерий. Селекция проводилась методом ступенчатого отбора малых мутаций.

Условия обработки пропионовокислых бактерий различными мутагенами. Работу по изучению индуцированной изменчивости витаминообразования проводили с производственным штаммом *P. shermanii* (Воробьева и др., 1973; Чан Тхи Тхань, 1973).

В качестве химических мутагенов использовали N-нитрозометилмочевину (НММ), N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) и диметилсульфат (ДМС).

Культуру *P. shermanii* выращивали в кукурузно-глюкозной среде 14—18 ч. Клетки отделяли от среды, промывали стерильным фосфатным буфером (рН 7,0) и обрабатывали различными дозами мутагенов.

N-нитрозометилмочевина. Клетки обрабатывали 0,1%- и 0,5%-ными растворами НММ в фосфато-цитратном буфере и течение 30 мин, 2, 3, 4, 5 ч.

Диметилсульфат. Использовали разведение 1:6000 (0,017%-ный раствор). Время обработки 12—16 ч. Обработка клеток парами мутагена может быть проведена по методу Купенова (1974). При этом мутаген, помещенный в маленькую чашечку, вводят в пробирку с тонким слоем клеток, полученного путем вакуум-испарения. Прекращение действия паров ДМС осуществляется путем извлечения чашечки из пробирки.

Выживаемость клеток, обработанных различными дозами мутагенов, относили к числу выживших клеток необработанной суспензии, принимаемому за 100.

Учитывали следующие морфологические и культуральные признаки:

- 1) размеры и пигментацию колоний;
- 2) характер роста в жидкой среде;
- 3) витаминообразование.

N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин. Нитрозогуанидин в растворе является нестойким веществом. При рН 7 НГ превращается в диазометан, а при рН 5 — в азотную кислоту. Диазометан и азотистая кислота — также мутагены, но вызывают больший летальный эффект, чем НГ, при меньшей частоте мутаций.

Наиболее стабилен НГ при рН 5,5—6,5. В связи с этим клетки обрабатывали 0,05%-ным раствором НГ в фосфатном буфере при рН 6,0. Время обработки 20, 40 и 60 мин.

Выживаемость и изменчивость пропионовых бактерий под действием химических мутагенов. Выживаемость клеток, обработанных химическими мутагенами, зависит не только от генотипа организма, условий обработки и концентрации мутагена, но также и от наличия восстановитель-

ного периода после обработки. Этот период необходим для восстановления летальных повреждений или возникновения нового метаболического пути.

Процесс восстановления протекает наиболее успешно в условиях замедленного роста, поэтому выдерживание обработанной суспензии в буферном растворе в течение некоторого времени увеличивает количество выживших клеток. Обработанную мутагеном суспензию клеток высевали через 2 ч после обработки. Определяли выживаемость бактерий, наличие морфологических мутантов и изменчивость по включению ^{60}Co . Составляли вариационные ряды, представленные в виде гистограмм, для каждого варианта определяли среднюю арифметическую (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (σ) и коэффициент изменчивости (cv) (Чан Тхи Тхань, 1973; Воробьева и др., 1973).

Нитрозометилмочевина. Положительные и отрицательные варианты по признаку витаминообразования, полученные под действием НММ, оказывались неустойчивыми и через несколько пассажей возвращались к исходному уровню. Морфологических мутантов под действием НММ получено не было. По действию НЭМ Рослякова (1974) имела положительные результаты. Так, добавление в среду НЭМ в концентрации 0,25% приводило через 24 ч к трехкратному увеличению количества биомассы и витамина B_{12} у опытных вариантов по сравнению с контрольными. Нитрозосоединения оказывают воздействие на клетки не только в растворе буфера, но и будучи внесены в малых концентрациях в питательную среду.

Диметилсульфат. Выживаемость клеток при обработке ДМС довольно высокая и снижается при увеличении концентрации мутагена и времени обработки суспензии (табл. 16).

ДМС не индуцировал морфологических мутантов, но увеличивал размах изменчивости по включению ^{60}Co и число малоактивных колоний (рис. 20). Положительные мутанты (с активностью $\bar{x} + 3\sigma$) составляли 1,2%. В результате последовательной (ступенчатой) обработки ДМС получены варианты 2^{5e} и $1^{5ж}$, превышающие исходный штамм по витаминообразованию на 30% (табл. 17).

Таблица 16

Влияние ДМС на выживаемость
Propionibacterium shermanii (Воробьева, 1976)

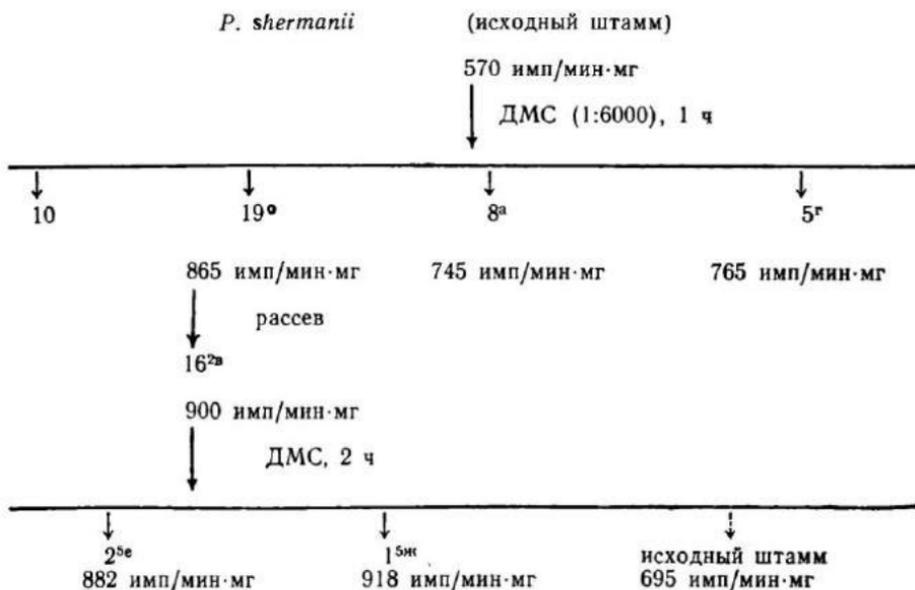
Концентрация ДМС, %	Время обработки, ч	Выживаемость, %
0,017	2	46,0
0,017	4	21,0
0,017	6	4,0
0,034	2	0,0
0,05	2	0,0
Газовая фаза	3	39,0

Включение ^{60}Co и образование витамина B_{12} активными штаммами, полученными при обработке ДМС*

Штамм <i>P. shermanii</i>	Активность ^{60}Co в имп/мин·мг		Витамин B_{12} , мкг/мл
	кукурузно-глюкоз- ная среда	кукурузно-лактат- ная среда	
19 ^{5a}	1960	630	—
25 ^{5a}	2480	—	7,5
14 ^{5b}	2250	600	—
29 ^{5b}	2520	—	8,0
11 ^{5d}	1570	645	—
2 ^{5e}	3000	730	10,1
1 ^{5к}	2150	720	9,1
21 ^{5в}	3500	640	—
24 ^{5з}	2080	—	—
30 ^{5з}	2550	580	9,4
4 ^{5л}	1750	620	—
Исходный штамм	2010	570	7,0

* Бактерии культивировали в глубинных условиях, знак минус означает, что определение не проводили.

Схема отбора активных вариантов *P. shermanii*, полученных под действием ДМС, представлена ниже.



Устойчивых отрицательных мутантов под действием ДМС не получали. Положительные мутанты сохраняли высокую активность по образованию витамина В₁₂ при культивировании в лабораторных производственных условиях.

Нитрозогуанидин (НГ). Как указывалось выше, нитрозогуанидин относится к сильным мутагенам, вызывающим широкий спектр мутаций у различных видов микроорганизмов.

Показано (Glatz, Anderson, 1988), что для получения ауксотрофных и холодоустойчивых мутантов разным штаммам требуются различные дозы НГ. Для некоторых штаммов выживаемость около 10% — условие, при котором возникновение ауксотрофных мутантов среди выживших клеток происходит с высокой частотой, — достигалась при экспозиции 1 мг/мл НГ, рН 9,0 в течение 90 мин. Для других штаммов достаточна была экспозиция 100 мкг/мл НГ, рН 6,0 в течение 30 мин. В большей части экспериментов содержание мутантов среди выживших клеток составляло только около 1%.

В результате обработки клеток 0,05%-ным раствором НГ уже в течение 20 мин резко снижается включение ⁶⁰Со в клетки (табл. 18), хотя выживаемость довольно высокая — 3,5%. После 60 мин обработки жизнеспособными остаются всего 0,2% клеток, тогда как существенных изменений в накоплении ⁶⁰Со не наблюдается (Воробьева и др., 1973) (табл. 18).

Таким образом, под действием НГ снижение выживаемости пропорционально времени обработки, а активность по ⁶⁰Со падает почти во всех просчитанных колониях, за

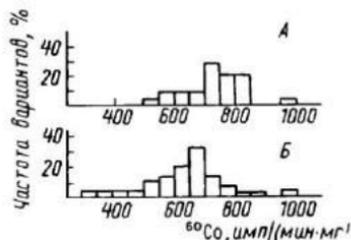


Рис. 20. Изменчивость *P. shermanii* по включению ⁶⁰Со, индуцированная диметилсульфатом (ДМС) (Воробьева и др., 1973):

А — спонтанная изменчивость, Б — изменчивость, индуцированная ДМС

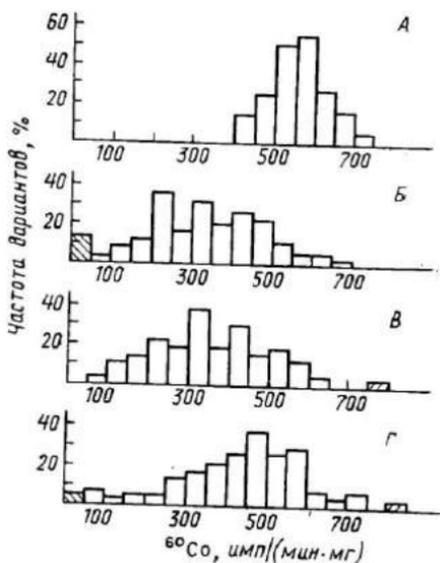


Рис. 21. Изменчивость *P. shermanii* (штамм 19^а) по включению ⁶⁰Со, индуцированная нитрозогуанидином (НГ) (Чан Тхи Тхань, 1973):

А — спонтанная изменчивость; Б — изменчивость под действием НГ; В — время обработки 20 мин; Г — время обработки 60 мин.

Результаты обработки штамма *P. shermanii*
19° нитрозогуанидином

Время обработки, мин	Выживаемость, % от выживаемости необработанных клеток	Число просчитанных колоний	Средняя активность ⁶⁰ Со в колониях, имп/мин·мг	Количество колоний с активностью выше $\bar{x} + 3\sigma$		
20	3,5	105	474	—	—	—
40	1,8	176	365	1	—	—
60	100	70	574	—	69±5	12,0±1,0

исключением немногих, относимых к положительным мутантам (рис. 21).

Положительные варианты получены при обработке суспензии штамма 19° 0,05% -ным раствором НГ в течение 40 и 60 мин.

Колонии, выросшие из суспензии, обработанной НГ, резко отличаются по внешнему виду от колоний исходного штамма. Колонии исходного штамма круглые, выпуклые, кремового цвета, блестящие, диаметр от 2 до 5 мм.

В результате обработки НГ возникают: 1) карликовые колонии, бесцветные, с очень низкой активностью по ⁶⁰Со, 2) плоские, бесцветные, желтые или кремовые колонии, 3) бугристые колонии, 4) ярко-желтые колонии, 5) колонии, типичные для пропанонокислых бактерий (Воробьева и др., 1973).

Карликовые белые колонии, в большом числе возникающие под действием НГ, через ряд пассажей восстанавливают нормальный синтез корриноидов. Можно выделить 5 групп мутантов, полученных под действием НГ.

I. Не отличающиеся по морфологическим, культуральным и физиологическим признакам от исходного штамма, но имеющие более высокую активность по витамину В₁₂.

II. Отрицательные по биосинтезу витамина В₁₂ мутанты, отличающиеся от исходного штамма более медленным ростом.

III. Ауксотрофные, отрицательные по биосинтезу витамина В₁₂ мутанты.

IV. Морфологические мутанты, являющиеся, как правило, отрицательными по биосинтезу витамина В₁₂.

V. Морфологические мутанты с высокой активностью по ⁶⁰Со.

Мутанты I группы являются активными продуцентами витамина В₁₂ и сохраняют это свойство в последующих генерациях.

Штамм 30^{3д} относится ко II группе мутантов. По морфологическим и культуральным признакам не отличается от исходного штамма. Хорошо растет в синтетической среде с тремя витаминами (биотин, тиамин, пантотеновая кислота), но образует десятые доли микрограмма корриноидов в миллилитре среды (табл. 19).

Образование корриноидов мутантами *P. shermanii*

Штаммы	Биомасса, г/л * (сухая)	Корриноиды, мкг/мл
9 ^{1д}	2,37	2,38
16 ^{3д}	1,08	0,24
«Черный»	2,66	0,14
«Бугристый»	2,27	0,17
30 ^{3д}	2,20	0,10
Исходный	3,48	4,84

* Рост в кукурузно-глюкозной среде с дрожжевым экстрактом

Синтез незначительных количеств корриноидов культурой 30^{3д} не влияет на сбраживание субстрата. Культура образует такое же количество пропионовой и уксусной кислот, как и исходный штамм.

К III группе мутантов относится штамм 16^{3д}. По морфологическим признакам этот штамм не отличается от исходного, но очень медленно растет даже в богатой кукурузно-глюкозной среде с дрожжевым экстрактом. В синтетической среде не растет. Потребности в факторах роста проверяли по схеме Холидея (Holliday, 1956) и установили, что *P. shermanii* 16^{3д} дефицитен по урацилу (табл. 20), образует 0,24 мкг/мл корриноидов, накапливает продукты обмена, типичные для пропионовокислого брожения (пропионовую и уксусную кислоты).

Среди морфологических мутантов пропионовокислых бактерий значительный интерес представляют «бугристый» и «черный» (IV группа). «Бугристый» мутант имеет размеры и форму клеток, типичную для вида *P. shermanii*, но образует колонии бугристой формы с углублением в центре (рис. 22). «Бугристый» мутант дефицитен по пуриновым основаниям: аденину и гуанину, образует 0,17 мкг/мл корриноидов в кукурузно-глюкозной среде с дрожжевым экстрактом и нормальное количество пропионовой и уксусной кислот.

Таблица 20

Влияние азотистых оснований на рост мутантов *P. shermanii*

К синтетической среде добавлено 0,06%	Вес сухой биомассы, г/л			
	16 ^{3д}	9 ^{1д}	«бугристый»	«черный»
Аденина	—	0,64	0,40	0,48
Гуанина	—	0,79	0,52	0,51
Аденина и гуанина	—	1,6	0,50	1,5
Урацила	0,44	—	—	—



Рис. 22. Клетки «бугристого» штамма, дефицитного по аденину и гуанину (Воробьева и др., 1973) ($\times 24000$)

«Черный» мутант не отличается от исходного штамма ни по морфологии клеток, ни по форме и размерам колоний, но образует темный «пигмент», так что колонии через несколько дней приобретают почти черную окраску. «Черный» мутант дефицитен по гуанину (табл. 20), хорошо растет в кукурузно-глюкозной среде с дрожжевым экстрактом, образует 0,14 мкг/мл корриноидов и сбраживает глюкозу с образованием пропионовой и уксусной кислот.

Биосинтез витамина B_{12} ауксотрофными мутантами восстанавливается при добавлении пуриновых оснований в среду, т. е. дефицит последних резко влияет на продуктивность клеток по витамину B_{12} .

Вместе с тем под действием НГ получен ауксотрофный по аденину и гуанину мутант 9^{1d} , не отличающийся по морфологическим и культуральным признакам от исходного штамма и образующий в богатой среде такое же количество витамина B_{12} , как исходный штамм. Таким образом, ауксотрофность по пуриновым основаниям не всегда коррелирует с нарушением синтеза корриноидов.

Исследованные мутанты образуют в основном истинную форму витамина B_{12} . Исключение составляет «черный» мутант, который образует незначительное количество витамина B_{12} и корриноид, имеющий максимум поглощения в области 300—304, 355, 430—455, 488, 520—530 нм (Чан Тхи Тхань, 1973).

«Бугристый» и «черный» мутанты при дефиците пуриновых оснований в среде образуют больше порфиринов, чем исходный штамм. Видимо, в условиях, блокирующих синтез корриноидов, 5-АЛК используется на синтез порфиринов. Образование другого тетрапиррольного соединения — каталазы — «бугристым» и

«черным» мутантом сильно подавлено, в отличие от прототрофного отрицательного мутанта 30^{3д}, имеющего такую же активность фермента, как исходный штамм.

При добавлении к культуре 30^{3д} бесклеточного экстракта исходного штамма *P. shermanii* удавалось восстановить (хотя и не полностью) синтез витамина В₁₂. Активность 5-АЛК синтетазы и 5-АЛК дегидратазы у штамма 30^{3д} не была подавлена, синтез ПБГ также происходил с обычной скоростью, следовательно, блок в образовании корриноидов имел место на пути, следующем после ПБГ, и расхождение путей синтеза порфиринов и корриноидов происходит после стадии образования ПБГ.

Следует отметить, что соотношение между пропионовой и уксусной кислотами у отрицательных мутантов сохраняется в пределах 2:1; муравьиная кислота обнаружена только у двух культур — 30^{3д} и «бугристой». Мутант 9^{1д} почти не накапливает уксусной кислоты и летучие кислоты представлены в основном пропионовой кислотой.

Таблица 21

Включение ⁶⁰Со ярко-желтыми мутантами пропионовокислых бактерий

Штамм	Активность ⁶⁰ Со, имп/мин·мг	Штамм	Активность ⁶⁰ Со, имп/мин·мг
29 ^а	969	27 ^а	2284
1 ^ч	1404	28 ^а	1269
15 ^ч	4485	30 ^а	3051
21 ^{3д}	1135	9 ^а	1999
Исходный	773	12 ^{аа}	5455
		исходный	574

Особую группу мутантов составляют ярко-желтые мутанты (У), полученные при обработке положительных вариантов и накапливающие в клетках большое количество кобальта по сравнению с исходным штаммом (табл. 21).

Мутант *P. shermanii* 21^{3д}, имеющий активность ⁶⁰Со 1135 имп/мин·мг, был рассеян на твердую среду с ⁶⁰Со и дана характеристика вариационного ряда: $n=118$, $\bar{x}=1237$ имп/мин·мг, $\sigma = \pm 336$ имп/мин·мг, $cv=27,1\%$. Высокий коэффициент изменчивости указывает на большую спонтанную изменчивость по включению ⁶⁰Со у данной культуры.

Наиболее активные колонии, полученные в результате рассева штамма 21^{3д}, были отобраны и исследованы на образование корриноидов (табл. 22). Ярко-желтые мутанты хуже растут в жидкой среде, чем исходный штамм. Биомасса таких мутантов быстро темнеет на воздухе. Обычно применяемый нами метод выделения корриноидов из клеток путем экстракции смесью спиртовой 0,01%-ный раствор KCN — вода (3:1) оказался в данном случае непригодным. Клетки после такой экстракции оста-

Образование корриноидов ярко-желтыми мутантами *P. shermanii*

Штаммы	Экстракция корриноидов					
	0,01% KCN в 30%-ном этаноле			0,01 М KCN при 70°		
	витамина В ₁₂			витамина В ₁₂		
	мкг/мл	мкг/г	при 367 нм ΔD	мкг/мл	мкг/г	при 367 нм ΔD
28 ⁴	6,3	220	0,535	14,6	570	0,710
	8,2	285	0,590	13,6	580	0,650
27 ⁴	7,6	226	0,690	13,6	692	0,770
	4,4	202	0,530	13,6	692	0,770
30 ⁴	8,2	264	0,600	15,8	728	0,600
	8,2	291	0,680	14,0	512	0,680
16 ^{4b}	16,4	585	0,840	18,4	736	0,940
	11,8	539	0,530	12,0	500	0,650
Исходный штамм	12,6	458	0,700			
	11,0	492	0,680			

вались темного цвета, т. е. экстракция проходила неполностью. Корриноиды в клетках находятся в свободном состоянии и могут быть связаны с белками. Для выделения связанных корриноидов требуются более жесткие условия, а именно экстракция 80%-ным этиловым спиртом с 0,1 М KCN при 70° в течение 30 мин. Этот метод выделения корриноидов был использован при определении их у ярко-желтых мутантов (брали водный, а не спиртовой раствор). Корриноиды определяли микробиологическим методом с *E. coli*-113-3 в качестве тест-организма. Исследованные мутанты оказались неравноценными в отношении биосинтеза (табл. 22).

Экстракт из биомассы штамма 21^{3d} имеет красновато-коричневый цвет. Его обрабатывали кислым этиловым спиртом для удаления белков и солей, осадок отделяли центрифугированием. Супернатанты имели красный цвет, осадок черный. Осадок отмывали несколько раз кислым спиртом для удаления следов корриноидов и растворяли в воде при щелочном pH; полученный раствор имел красновато-коричневый цвет и обладал биологической активностью по отношению к *E. coli*-113-3. Активность значительно уменьшалась после 10-минутного гидролиза в щелочных условиях.

Можно полагать, что ярко-желтый мутант 21^{3d} представляет собой тип мутантов, у которых образующиеся в большом избытке корриноиды связаны в прочный комплекс. Полученные мутанты имеют несомненный теоретический и практический интерес.

Н. В. Росляковой (1974) нитрозоэтилмочевина (НЭМ) и нитрозометилмочевина (НММ) вносились в концентрациях 0,05—0,012%, непосредственно в питательную среду, которая сразу

же инокулировалась пропионовокислыми бактериями. При этом наблюдали заметную стимуляцию роста бактерий и превышение синтеза витамина В₁₂ над контрольным уровнем в 3 раза. При непосредственной обработке клеток *P. shermanii* аналогичной дозой мутагена (НММ) выход витамина и биомассы не отличался от контрольного варианта.

Изменчивость *P. shermanii* М-82 изучали (Ганичева, Воробьева, 1991) под действием мутагенов, ранее не применявшихся в селекции этого штамма N-нитрозо-N-метилбурета (НМБ), комбинированного воздействия НМБ и ультрафиолетовых лучей и гидрохлорида-3-(3-хлорпропоксифенил)5,6-дигидроимидазо(2,1-b)тиазола (ГХТ). Клоны отбирали по морфологическому признаку — розовому цвету колоний; содержание витамина В₁₂ — физико-химическим методом.

В табл. 23 представлены данные о частоте возникновения вариантов с повышенной продуктивностью. Анализ полученных дан-

Таблица 23

Летальный и мутагенный эффект действия N-нитрозо-N-метилбурета, гидрохлорида-3 (3-хлор-пропоксифенил)5,6-дигидроимидазо (2,1-b) тиазола и комбинированного действия N-нитрозо-N-метилбурета и ультрафиолетовых лучей на культуру *Propionibacterium shermanii* (Ганичева, Воробьева, 1991)

Мутаген	Концентрация раствора, время обработки, рН	Выживаемость (%)	Количество проверенных вариантов	\bar{x}	σ	св	Число плюс-вариантов*
Контроль	—	100	39,3	94	9,5	10,1	24,4
НМБ	0,1:15 рН 9,0	0,04	99	99,2	10,5	10,6	45,5
НМБ	0,1:30 рН 6,0	89	107	97,8	11,3	11,6	42,1
ГХТ	0,1:30 рН 6,0	32	97	100	11	11	42,2
НМБ	0,3:15 рН 9,0	0,0007	97	72,2	24,2	33,6	4,2
НМБ	0,3:15 рН 6,0	4,1	97	89,6	13,4	15	17
НМБ+ УФ-лучи	0,1:30 рН 6,0 500 эрг/мм ²	0,05	119	87,5	14,4	16,5	25,3

* К плюс-вариантам относили клоны, продуктивность которых была выше 100% относительно контроля.

ных показывает почти одинаковую эффективность действия в отношении возникновения плюс-вариантов 0,1%-ной концентрации НМБ и ГХТ при рН 6,0. Индуцированная изменчивость приводит к увеличению в два раза числа плюс-вариантов по сравнению с контролем при одинаковой выживаемости. Варианты после обработки мутагенами распределяются в основном в двух классах — 81—100% и 101—120%, тогда как в контроле три класса — 61—80%, 81—100%, 101—120%. Размах изменчивости сдвигается в сторону высокоактивных вариантов, что подтверждается отсутствием вариантов в классе 61—80%. Несколько возросло среднее арифметическое значение: с 94 до 100%. При воздействии НМБ (0,3%) в условиях слабокислой (рН 6,0) и щелочной (рН 9,0) реакции среды получены результаты, показывающие незначительные различия мутагенного эффекта в отношении индукции плюс-вариантов.

Нитрозометилбиурет относится к группе нитрозоалкиламидов (НАА), которые очень нестабильны и разлагаются в зависимости от значения рН с образованием диазометана и азотистой кислоты. В нейтральной и слабокислой среде молекулы НАА стабильны. В кислой среде НАА подвержены гидролизу с образованием азотистой кислоты, которую многие исследователи считают ответственной за мутагенез для этих соединений. В щелочной среде происходит разложение НАА с образованием диазоалканов, период полураспада которых исчисляется минутами (Veleminskij et al., 1967). В нашем случае, когда мутагенное действие НМБ мало зависело от величины рН, можно предположить, что продукты распада НМБ оказывают действие на изменчивость бактерий. Летальный эффект при разных рН зависит от условий обработки. При значении рН 9,0 выживаемость на три порядка ниже, чем при рН 6,0.

При повышении концентрации мутагена увеличивается размах изменчивости, что особенно сильно проявляется при рН 9,0 (до 33,6%). Сдвиг изменчивости происходит в сторону минус-вариантов.

Комбинированное действие НМБ+УФ-лучи вызывает сильное летальное действие. Летальный эффект совместного действия НМБ и УФ-лучей на три порядка сильнее действия одного НМБ. Увеличивается также размах изменчивости, что связано с увеличением числа минус-вариантов. Количество плюс-вариантов в результате совместного действия двух мутагенов снижается по сравнению с действием одного НМБ.

Высокопродуктивные варианты, отобранные после действия НМБ и ГХТ, как правило, теряли в дальнейших опытах свою первоначальную продуктивность.

Эти события могут быть связаны с тем, что исходный штамм *P. shermanii* М-82 был ранее получен (Грузина, 1974) под действием НАА. Поскольку НМБ относится к этому же классу соединений, он не вызывает образования стабильных мутаций у штамма, геном которого уже насыщен точковыми мутациями под

действием НАА. Только один вариант, полученный под действием ГХТ, сохранил повышенную способность к синтезу кобаламинов, превышающую на 17% уровень контроля. Популяция пропионовых бактерий (как, впрочем, и многих других) весьма гетерогенна (по крайней мере, в отношении биосинтеза корриноидов). Для получения высокопродуктивных штаммов, помимо отбора важна стабилизация популяции с помощью антимутагенов (см. ниже). Исследование по индуцированному мутагенезу пропионовых бактерий показали, что наиболее эффективным мутагенным фактором является нитрозогуанидин. Он индуцирует большое число морфологических и биохимических мутантов, а также вызывает широкий размах изменчивости по образованию витамина В₁₂.

Среди большого числа мутагенов, а именно УФ-лучей, этиленмин+УФ-лучи, ДЭС, НММ, НЭМ и НГ, ННБ, ГХТ, испытанных на клетках, *P. shermanii* в дозах с различным летальным эффектом, наибольший мутагенный эффект признан за нитрозосоединениями.

2.4. АНТИМУТАГЕНЕЗ

Пропионовые бактерии, как и все живые существа и в первую очередь бактерии, постоянно и длительно подвергаются воздействию внешних и внутренних мутагенов. К обычным естественным внешним источникам мутагенов относятся радиация, газ радон, космические лучи, К⁴⁰ и другие радионуклиды (ядра нестабильных изотопов, симпроизвольно распадающихся) в земной коре. На сегодня изучено генетическое действие только одного процента имеющихся в биосфере химических соединений и среди них тысячи мутагенов. Внутренние источники мутагенов — это сами организмы, в процессе метаболизма которых образуются вещества с мутагенным (канцерогенным) действием. Например, при нормальном метаболизме многих бактерий образуются такие мутагенные вещества, как Н₂О₂, нитрозамин, Н₂S, формальдегид, некоторые антибиотики.

Наиболее часты точковые мутации, вызванные заменой пар оснований (транзиции и трансверсии), происходящие при репликации и репарации ДНК. Точковые мутации имеют тенденцию к обратному мутированию. В процессе генетической рекомбинации и репарации цепи ДНК возникают делеции и вставки оснований, в результате чего происходит сдвиг рамки считывания. Поскольку в естественных условиях микроорганизмы (а также растения и животные) постоянно подвергаются действию мутагенов, у них сформировался эндогенный и экзогенный защитные механизмы: У всех живых существ образуются молекулы, способные к осуществлению антимутагенеза. Под антимутагенезом понимают снижение частоты спонтанной и индуцированной мутации. Антимутагены регулируют скорость спонтанных мутаций, стабилизируют мутационный процесс, но полностью мутабельность не по-

давляют и не работают, если первоначальный уровень мутаций очень низкий (исключение составляет цистеин, полностью ингибирующий действие НГ), потому что в противном случае организмы не могли бы эволюционировать. Примечательно, что вымирающие виды обладают слабой антимуtagenной защитой (Носман, 1989). Антимуtagenез был открыт сравнительно недавно, в 1952 г., когда было показано (Novic, Scillard, 1952), что при добавлении к среде пуриновых нуклеозидов спонтанные мутации у *E. coli* снижались на 60—70%. Три классических типа репараций ДНК включают фотореактивацию, эксцизионную репарацию и пострепликативную рекомбинационную репарацию. При значительных нарушениях в ДНК, когда ее репликация невозможна, включается система *sos*-репарации. Это система срочной репарации, но она делает ошибки при репликации ДНК.

Действие антимутагенов может проявляться на любом уровне, начиная с детоксикации мутагена и кончая репарацией поврежденной ДНК. В соответствии с характером действия антимутагены подразделяют (Kada et al., 1986) на десмутагены и биоантимутагены. Десмутагенез: инактивация мутагенов и карциногенов различными методами. Биоантимутагенез: усиление немутагенной репарации ДНК, инактивирование мутагенной репарации, инактивирование *sos*-репарации (допускающей ошибки) или вмешательство в экспрессию мутаций.

Антимутагены повышают активность ферментных систем, участвующих в детоксификации поступающих в клетку веществ, влияют на окислительно-восстановительный потенциал организма. Многие мутагены генерируют свободные радикалы. Им противостоят антиокислительные ферменты, соединения Se и такие антиокислители, как токоферол, аскорбиновая кислота, филлохинон. Некоторые антимутагены (CoCl_2) обеспечивают точность протекания одного из типов репарации (Kuroda, Inoue, 1988) и активируют репарацию. Все эти процессы приводят к снижению мутаций.

Известно около 200 индивидуальных веществ с антимутагенными свойствами. Частоту мутаций могут снижать некоторые аминокислоты (аргинин, гистидин, метионин, цистеамини др.); витамины и провитамины (α -токоферол, аскорбиновая кислота, ретинол, β -каротин, филлохинон, фолиевая кислота), ферменты (пероксидаза; НАДФН-оксидаза, глутатион-пероксидаза, каталаза), комплексные соединения растительного и животного происхождения, вещества с антиокислительными свойствами (производные галловой кислоты, инол, оксипиридины, некоторые соли селена) и другие. Причем многие вещества проявляют физиологичность действия, т. е. в низких концентрациях это антимутагены, а в высоких — мутагены. Это типично для аргинина, глутаминовой кислоты, селенита Na, стрептомицина, производных галловой кислоты. Вместе с тем увеличение концентрации других антимутагенов (α -токоферола, β -каротина, филлохинона и др.) даже на несколько порядков не изменяет характер их действия. Чем ближе границы

концентраций вещества, определяющие смену эффекта, тем в меньшей степени физиологичен данный антимутоген.

Для оценки мутагенных и антимутогенных свойств химических веществ предложено около 100 различных тест-систем, хотя универсальной тест-системы, которая могла бы выявить все типы генетических повреждений и соответствующих репараций, нет. В лабораториях используют чаще всего тест Эймса *Salmonella*/микросомы для учета генных мутаций, а также *E. coli*, *B. subtilis*, из низших эукариот — дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, грибы *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, из эукариот также насекомые — *Drosophila melanogaster*, культуры клеток млекопитающих (наиболее часто опухолевые клетки мыши и клетки яичника китайского хомячка), включая первичные культуры клеток человека (лимфоциты периферической крови; учет хромосомных aberrаций или сестринских хроматидных обменов); используются также целые организмы.

В 1989 г. нами (Воробьева и др., 1990), с использованием теста Эймса, впервые была обнаружена антимутогенность пропионовокислых бактерий против азида $\text{Na}(\text{NaN}_3)$ и НГ. И хотя это свойство не относится непосредственно к генетике бактерий, оно связано с регуляцией мутаций и, что очень важно, со снижением генетических изменений у других живых существ. Эта работа выполнялась Т. А. Чердынцевой и Н. В. Воробьевой. Она открыла новое перспективное направление: изучение бактериального антимутогенеза.

До сих пор в качестве источников антимутогенов изучали главным образом высшие растения, а именно соки цитрусовых (Bařa, Grover, 1989), овощей и фруктов (Shinohara et al., 1988; Stolz et al., 1987; Pamukcu et al., 1980), а также некоторые съедобные водоросли (Yamamoto et al., 1982; Yamamoto et al., 1986), морские растения и животных (Sasaki et al., 1985). Имеющаяся в литературе информация об антимутогенных свойствах различных эукариотных организмов обобщена в обзоре Хоцмана (Ностан, 1989).

Прокариоты как потенциальные источники антимутогенов почти не изучались, хотя учитывая, с одной стороны, общие фундаментальные реакции метаболизма прокариот и эукариот, а с другой — способность прокариот осуществлять реакции некоторых уникальных синтезов, нельзя исключить, что бактерии могут стать источником новых и ценных антимутогенов. Подтверждением этого предположения служат результаты исследований стрептомицетов (Osava et al., 1986), среди которых обнаружены два штамма, образующие высокоэффективные антимутогены пептидной природы.

Изучение антимутогенеза (мутагенеза) важно и в другом аспекте, а именно в отношении тех бактерий, которые используют при изготовлении кормов, пищи и кормовых добавок.

Бактерии, как источники антибиомутагенов или десмутагенов, могут быть использованы для предобработки пищевых продуктов

и кормов с целью нейтрализации мутагенных (канцерогенных) веществ, а также как пробиотики.

Пропионовокислые бактерии широко используют на практике: в сыроделии, производстве витамина В₁₂, приготовлении ветеринарного препарата пропиовита, в силосовании кормов (Воробьева, 1984),

Антимутагенность экстрактов. В качестве источников антимутагенов исследовали бесклеточные экстракты пропионовокислых бактерий видов *P. shermanii* ВКМ-103 (дикий штамм), *P. shermanii* КМ-82 мутант — суперпродуцент витамина В₁₂, *P. acnes* и пропионовокислые кокки *P. coccoides*. Первые два штамма представляли классические, а *P. acnes* — кожные пропионовые бактерии. Для определения антимутагенной активности применяли штамм *S. typhimurium* ТА 1535 (мутации замены пар оснований). Принцип метода состоит в том, что под действием мутагена вырастают ревертанты по гистидину, по числу которых определяют мутагенный эффект. Соответственно антимутагены снижают число индуцированных ревертантов.

Порядок проведения эксперимента состоял в следующем: к 2 мл верхнего агара, содержащего 0,5 мм гистидина/биотина добавляли 0,1 мл свежей культуры *S. typhimurium*, 0,1 мл испытуемого мутагена и 0,1 мл испытуемого в качестве антимутагена образца. Смесь быстро перемешивали и выливали на поверхность минимальной агаризованной среды (нижнего агара) в чашки Петри. Путем интенсивного перемешивания достигали равномерного распределения верхнего агара по поверхности нижнего. Чашки инкубировали в течение 48 ч при 37°. Одновременно ставили позитивный контроль, когда в смеси присутствовал мутаген, но не было антимутагена, и отрицательный контроль, когда в смеси не было мутагена, но присутствовал потенциальный антимутаген. Общий объем смеси доводили до 0,4 мл с помощью 0,2 М фосфатного буфера, рН 7,4. Выбор концентрации мутагенов определялся после предварительного проведения эксперимента доза-ответ. Использовали концентрации мутагенов, взятых из линейных частей кривых доза-ответ, что для азида натрия составляло 3,0 мкг/чашку, а для МННГ — 10 мкг/чашку. В ряде случаев проводили прединкубацию мутагена и антимутагена в течение 20 мин при 37°.

После инкубирования культуры подсчитывали число ревертантов в чашках. Эксперименты ставили в трех повторностях и проводили статистическую обработку данных.

Активность антимутагена определяли по формуле

$$\text{активность (\%)} = \frac{(a - b) \times 100}{a - c},$$

где *a* — число гистидиновых ревертантов, индуцированных под действием мутагена, *b* — число гистидиновых ревертантов, индуцированных под действием мутагена в присутствии антимутагена

и с — число ревертантов, вырастающих в присутствии только антимуtagена. Во всех случаях учитывалось и вычиталось число спонтанных ревертантов.

Пропионовокислые бактерии выращивали в синтетической среде «а» и кукурузно-глюкозной среде «б». Состав среды «а» (в %): глюкоза — 2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,3; KH_2PO_4 — 0,25; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,0005; NaCl — 0,002; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; ZnSO_4 — 0,0005; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; витамины (мкг/л): пантотенат Ca — 1000; тиамин — 200; биотин — 1,0. Вода дистиллированная, pH 6,8—7,0.

Состав среды «б» (%): глюкоза — 2; кукурузный экстракт — 1,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,3; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; pH 6,8—7,0; вода водопроводная.

Бактерии выращивали в течение 72 ч при 30° в стационарных условиях с периодической нейтрализацией образующихся кислот раствором NaHCO_3 . Через 48 ч вносили предшественник витамина B_{12} —5,6-диметилбензимидазол. Через 72 ч инкубации биомассу отделяли центрифугированием, дважды промывали ее 0,05M Na-фосфатным буфером, pH 7,4. Отмытые клетки суспендировали в 0,05M Na-фосфатном буфере и разрушали на дезинтеграторе ультразвуком. Осколки клеток удаляли центрифугированием и полученный бесклеточный экстракт диализовали против 0,05M Na-фосфатного буфера, pH 7,4 (Воробьева и др., 1990; Воробьева и др., 1991; Vogobjeva et al., 1991). Испытуемые растворы стерилизовали, пропуская их через миллипоровый фильтр (0,22 мкм). Экстракты сохраняли антимуtagенную активность более 30 дней при хранении их при 10°. Для длительного хранения экстракты лиофилизировали. Оказалось (табл. 24), что бесклеточный экстракт *P. shermanii* ВКМ-103 оказывает сильное антимуtagенное

Таблица 24

Влияние экстракта клеток *P. shermanii* ВКМ-103 на мутагенность азида натрия для *Salmonella typhimurium* TA 1535 (Воробьева и др., 1991)

Разведение экстракта *	Спонтанный фон — 16 Азид натрия (1,5 мкг/0,1 мл/чашка) = 976 ± 5					
	Только экстракт		Мутаген + экстракт			
	диализат	недиализованный	диализат	% ингибирования	недиализованный	% ингибирования
10 ⁻¹	16,0	25,9			483	53,2
10 ⁻²		16,5			688	62,0
10 ⁻³		10,8	254	74,0	370	63,2
10 ⁻³ (прединкубация при 37°, 20 мин)			160	83,6	295	69,8
10 ⁻⁴		12,0			353	63,8

* В исходном экстракте 81,0 мкг/0,1 мл белка.

действие на частоту NaN_3 -индуцированных реверсий, причем при разведении экстракта (вплоть до 10^{-4}) его ингибиторный эффект не только сохраняется, но даже увеличивается. Ингибиторный эффект недиализованного экстракта несколько ниже, чем диализованного. Прединкубация мутагена и экстракта в течение 20 мин при 37° приводит к увеличению влияния экстракта, что может служить указанием на десмутагенный характер действия антимуtagenного фактора (Када, 1986). Поскольку экстракты клеток мутагенного действия не проявляли, можно предположить, что описанное выше наблюдение есть проявление известного правила для многих соединений: снижение или даже противоположное направление их действий при высоких концентрациях. Результаты определения антимуtagenного действия диализованного экстракта в отношении мутагенеза, индуцированного МННГ, представлены в табл. 25. Из данных таблицы, максимальный антимуtagenный эффект проявляется при разведении экстракта до 10^{-5} и составляет 57,9%.

Таблица 25

Влияние экстрактов клеток *P. shermanii* ВКМ-103 на мутагенность N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина для штамма *Salmonella typhimurium* TA 1535
 Спонтанный фон — 14 ± 3
 N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (10 мкг/чашка) — 2088 ± 18

Разведение экстракта	Экстракт + мутаген	% ингибирования
Исходный (81 мкг белка/чашка)	2675 ± 1	-28,1
10^{-2}	1509 ± 126	27,7
10^{-2} , прединкубация при 37° , 20 мин	255 ± 0	87,8
10^{-3}	1414 ± 4	32,3
10^{-5}	880 ± 198	57,9

При дальнейшем разведении ингибиторный эффект снижается, но даже при разведении до 10^{-7} все еще сохраняется и составляет 30%. Вместе с тем концентрированный (исходный) экстракт (81,0 мкг белка/чашка) проявляет некоторое мутагенное действие.

Таким образом, несмотря на различный механизм мутагенного действия азидата натрия (через образование мутагена азидоаланина) и МННГ (метилирование пуриновых оснований ДНК), в обоих случаях антимуtagenный фактор (факторы) при низкой концентрации проявляют высокую ингибиторную активность, а при высокой концентрации усиливают индуцированный мутагенез. Причем для мутагенеза, индуцированного МННГ, эта картина выражена особенно ярко.

Как и в случае с азидом натрия, прединкубирование МННГ с экстрактом значительно увеличивает ингибиторный эффект, действуя как десмутаген.

Для сравнения влияния пропионовокислых бактерий разных видов на мутагенность азидата натрия испытывали экстракты клеток *P. shermanii* ВКМ-103 и его мутанта-суперпродуцента витамина В₁₂ — штамма КМ-82, *P. pentosaceum* ССМ 1859, представляющих классические пропионовокислые бактерии, а также *P. acnes* — представителя кожных пропионовых бактерий, и пропионовокислых кокков (*P. coccoides*), ранее (Воробьева и др., 1983) предложенных включить в род *Propionibacterium*, но имеющих с типовым (реперным) штаммом *P. jensenii* довольно низкую степень гомологии ДНК и ряд отличий в отношении фенотипических признаков (см. выше). Оказалось, что у пропионовокислых кокков антимуtagenная активность отсутствует. Более того, обнаруживается незначительное усиление мутагенного действия азидата натрия. Экстракты клеток классических и кожных пропионовых бактерий проявляют высокую эффективность антимуtagenного действия (рис. 23).

Установление факта антимуtagenности у *P. acnes* служит вспомогательным объяснением ее противоопухолевого действия

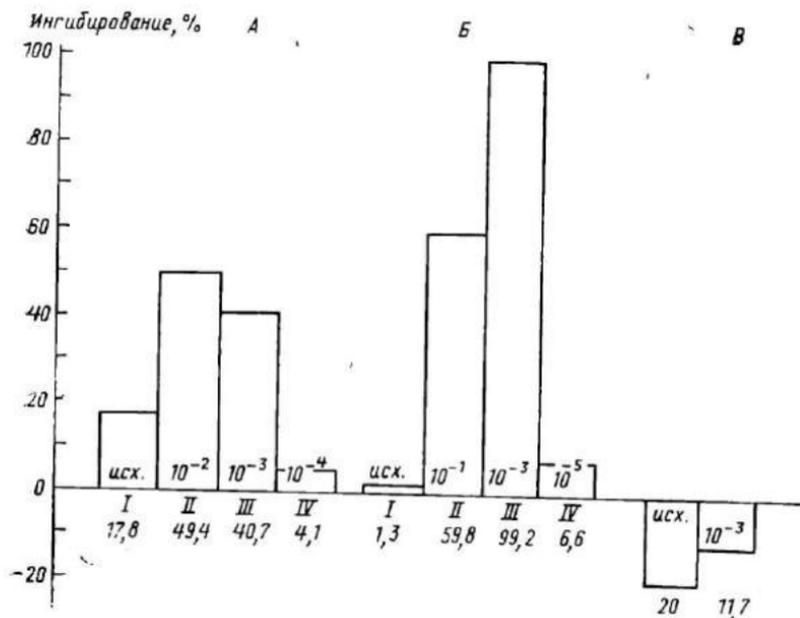


Рис. 23. Влияние диализата клеток пропионовокислых бактерий на мутагенность азидата натрия для штамма *Salmonella typhimurium* TA 1535 (Воробьева и др., 1991):

A — *P. pentosaceum*, B — *P. acnes*, B — *P. coccoides*. I — IV — концентрация белка (мкг/чашку) в диализате: I — 50,0, II — 50,0×10⁻², III — 50,0×10⁻³, IV — 50,0×10⁻⁴

(см. выше), ибо более 80% мутагенов выступают как канцерогены (Абилев, Порошенко, 1986). Установлено, что предъинкубация мутагена с экстрактом *P. shermanii* увеличивает ингибиторный эффект с 37 до 93%. Нагревание экстракта при 70° в течение 10 мин приводит к снижению его ингибиторного действия с 37 до 7,4% (табл. 26). Этот режим нагревания был выбран пото-

Таблица 26

Влияние экстракта клеток *P. shermanii* KM-82 на мутагенность азид натрия для штамма *Salmonella typhimurium* TA 1535
Спонтанный фон — 4±0
Азид натрия — 918±29

Разведение экстракта	Только экстракт	Экстракт + мутаген	% ингибирования
Исходный (30,0 мкг белка/чашка)	3±1	719±79	22,0
10 ⁻¹		493±70	46,0
10 ⁻³		14±2	98,5
10 ⁻⁵		613±7	33,2
10 ⁻⁵ , нагревание при 70°, 10 мин		850±42	7,4
10 ⁻⁵ , нагревание при 100°, 10 мин		915	0
10 ⁻⁵ , прединкубация при 37°, 20 мин		56±2	93,8

му, что он щадит супероксиддисмутазу пропионовых бактерий (Vorobjeva, Краева, 1982), которая может вовлекаться в защиту организмов от действия мутагенов и канцерогенов (Nakatsuma et al., 1986; Реткац, 1987). Поэтому можно предположить, что сохранение ингибиторной активности экстракта после нагревания при 70° в течение 10 мин связано с активностью СОД. Нагревание при 100° 10 мин приводит к полному исчезновению антиму-тагенного эффекта. Ни один из испытанных экстрактов собственным мутагенным действием не обладал.

Сохранение в диализованном экстракте антиму-тагенной активности позволило предположить, что антиму-тагенный фактор (факторы) имеет молекулярную массу более чем 12 тыс. Да (в соответствии с размерами пор диализного мешка) и представляет собой полимер. Чрезвычайно высокий антиму-тагенный эффект экстрактов (кроме кокков), с одной стороны, и полное исчезновение этого эффекта после нагревания при 100° в течение 10 мин — с другой, служило указанием на то, что антиму-таген может иметь пептидную природу и, видимо, является ферментом. С целью проверки этого предположения была определена антиму-тагенная активность белковых фракций, полученных путем высаливания белков сульфатом аммония при насыщении растворов до 0—40% (I), 40—60% (II), 60—80% (III) и >80% (IV).

Как следует из данных, представленных на рис. 24, антимуtagenностью против мутагенности NaN_3 обладают все фракции белков и увеличение ее происходит по мере снижения содержания белка с 30 мкг до 0,0003 мкг/чашка. Супернатант, полученный после осаждения белков сульфатом аммония до 80% насыщения, антимуtagenным действием не обладал. Таким образом, приведенные результаты подтвердили предположение о белковой природе антимуtagenного фактора пропионовых бактерий.

Вместе с тем, как видно из представленных на рисунке данных, фракционное высаливание белков не позволяет выделить одну, обогащенную антимуtagenом, фракцию, хотя фракция II (40—60% насыщения) обладает более высоким антимуtagenным действием, чем фракции I и III, а фракция IV (супернатант) усиливает мутагенное действие азиды натрия. Визуально была отмечена розовая окраска всех фракций. При более детальном разделении белков методом гельфильтрации с использованием гранул «Toyopearl» получили 130 фракций, составивших три главных пика (рис. 25). Антимуtagenная активность обнаружена в белках 2 и 3-го пиков, причем в III розовой фракции низкомолекулярных белков она более высокая, чем во II. Розовая окраска III фракции белков предполагала содержание в них V_{12} -зависимых ферментов. Поэтому было испытано влияние кофермента —

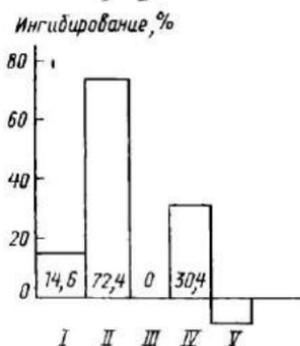


Рис. 24. Влияние белковых фракций, полученных после высаливания сульфатом аммония диализата клеток *Propionibacterium shermanii* КМ-82 на мутагенность азиды натрия для штамма *Salmonella typhimurium* TA 1535 (Воробьева и др., 1991):

I — до высаливания, II — 0—40% насыщения, III — 40—60% насыщения, IV — 60—80% насыщения, V — более 80% насыщения сульфатом аммония. Концентрация белка — 5,0 мкг/чашка

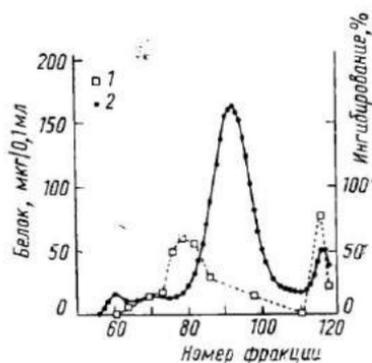


Рис. 25. Антимуtagenная активность фракции белков диализата *P. shermanii* КМ-82 против мутагенности азиды натрия (3 мкг/чашка) для штамма *S. typhimurium* TA 1535 (Воробьева и др., 1991). 1 — процент ингибирования, 2 — содержание белка

V_{12} и витамина B_{12} против мутагенности NaN_3 . Указанные корриноиды в концентрации от 0,01 мкг до 10 мкг/чашка ни антимурагенного ни мутагенного действия не проявляли. Этот факт существенен сам по себе, но он не снимает предположения об антимурагенности V_{12} -зависимых белков. Более того, можно думать, что отсутствие антимурагенности у пропионовокислых кокков, тоже, по крайней мере отчасти, связано с практическим отсутствием V_{12} -зависимых ферментов (содержат в сотни раз меньше корриноидов, чем *P. shermanii*; Воробьева, 1976).

Вместе с тем приведенные выше данные показывают, что в диализате пропионовокислых бактерий присутствует более одного фактора пептидной природы с антимурагенной активностью. Об одном кандидате на эту роль мы уже говорили — это СОД. Антимурагенностью (антиканцерогенностью) обладают и другие антиокислительные ферменты: каталаза и пероксидаза; в специальных экспериментах было показано, что СОД снижает мутагенное действие азида Na и МННГ на тест-штамме *Salmonella typhimurium* ТА 1535 (Воробьева и др., 1993). Наблюдалась корреляция между антимурагенной и СОД активностью (таб. 27).

Таблица 27

СОД- и антимурагенная активность пропионовокислых бактерий (Воробьева и др., 1993)

Образец	СОД-активность		Антимурагенная активность, % ингибирования
	Ед/мкг белка	Ед/мл инкубационной смеси	
ВКМ-101	0,0235	0,012	45
КМ-82	0,286	0,143	60
КМ-63	0,36	0,180	65
Препарат СОД кристаллический	6,5	0,160	11

Однако ингибиторный эффект клеточного экстракта и фабричного препарата СОД со сходной активностью 0,180 и 0,160 Ед/мл составлял соответственно 65 и 11%. Следовательно, кроме СОД в клеточном экстракте пропионовых бактерий присутствуют и другие белки (видимо, ферменты) с антимурагенной активностью.

Известно, что при взаимодействии O_2^- с протонами образуется H_2O_2 , также обладающая мутагенными свойствами, хотя гораздо менее сильными, чем O_2^- (Dahl et al., 1986). Поэтому изучали действие каталазы как предполагаемого антимурагена, в значительных количествах синтезируемого пропионовокислыми бактериями (Воробьева и др., 1968). Однако полученные результаты показали, что каталаза в концентрации 5 и 10 мкг/чашка не оказывает антимурагенного действия против мутагенности NaN_3 для штамма *S. typhimurium* ТА 1535, что косвенно указывает либо

на слабую мутагенность H_2O_2 , либо на незначительное накопление перекиси. Это наблюдение служит также дополнительным подтверждением мнения о том (Owais, Kleinhof, 1988), что каталаза не принимает участия в антимутагенезе против мутагенности, индуцированной NaN_3 .

Как видим, получены первые результаты, которые ставят много вопросов перед исследователями. Пока можно твердо говорить о том, что обследованные штаммы обладают антимутагенностью против NaN_3 и НГ и что антимутагены имеют пептидную (белковую) природу и, видимо, являются ферментами. Защищают ли пропионовые бактерии организмы от мутагенов, вызывающих сдвиг рамки считывания или другие последствия, проявляется ли мутагенность на уровне эукариот и, в частности, на уровне культуры клеток, т. е. присуща ли антимутагенная универсальность пропионовым бактериям. Сегодня эти вопросы еще решаются в лаборатории. Мы ждем их решения и понимаем, сколь важны препараты и средства, позволяющие защитить генофонд растений, животных и людей от пагубного влияния мутагенов и канцерогенов. Антимутагенное действие экстракта пропионовокислых бактерий может найти применение в биотехнологии для стабилизации микробных ферментаций. Показано (Воробьева и др., 1992), что инкубация с клеточным экстрактом пропионовых бактерий перед обработкой МННГ тех же бактерий, а также прорастающих спор актиномицетов и конидий грибов *Penicillium chrysogenum* значительно увеличивает их выживаемость и приводит к снижению индуцированной, а также спонтанной изменчивости по продуктивности в отношении витамина B_{12} у *P. shermanii*, антибиотика канамицина у *Actinomyces kanamyceticus* и пенициллина V у *Penicillium chrysogenum*. На выживаемость клеток, необработанных мутагеном, клеточный экстракт влияние не оказывал. Наиболее выраженное действие прединкубации с клеточным экстрактом проявлялось в случае пропионовокислых бактерий, у которых наблюдали сдвиг продуктивности по витамину B_{12} в сторону плюс-вариантов. Поскольку инкубация конидий грибов, спор актиномицетов, пропионовых бактерий не оказывала влияния на количество вырастающих колоний испытанных штаммов в сравнении с контролем, мы полагаем, что снижение спонтанной и индуцированной изменчивости микроорганизмов в результате предобработки с экстрактом, связано с его антимутагенной активностью.

Десмутагенное действие культуральной жидкости. Было показано также (Воробьева и др. 1993), что кожные и классические пропионовокислые бактерии выделяют в среду вещества с антимутагенной активностью. Фильтрат, полученный после выращивания и отделения бактерий, проявлял десмутагенную активность против 4-нитрохинолин-N-оксида (4NQO) (табл. 28), которая находилась в обратной зависимости от возраста культуры и увеличивалась при увеличении времени прединкубации мутагена и антимутагена, а также концентрации ан-

Десмутагенное действие культуральной жидкости *Propionibacterium shermanii* на мутагенез, индуцированный 4-нитрохинолин-N-оксидом у *Salmonella typhimurium* TA-100 в зависимости от времени культивирования пропионовых бактерий и длительности десмутагенеза (Воробьева и др. 1993)

Время культивирования, ч	Длительность десмутагенеза, ч	Число ревертантов/чашка *		% ингибирования
		только мутаген	мутаген + антимутаген	
24	5	973±10	970±10	0
24	24	742±11	574±11	22,6
24	48	493±15	378±10	23,3
24	72	664±6	390±55	41,3
48	24	742±6	593±31	20,0
48	48	668±27	504±40	24,6
72	24	745±17	689±27	1

* Спонтанный фон: 40±10 ревертантов/чаша

тимутагена. Собственным мутагенным действием вещества культуральной жидкости не обладали. Десмутагенное действие культуральной жидкости проявлялось при выращивании пропионовых бактерий на среде с глюкозой, лактозой и лактатом. Было установлено, что вещества с антимутагенной активностью диализуемы, сохраняют активность после нагревания в течение 10 мин при 92° С и не утрачивают десмутагенные свойства после обработки трипсином (табл. 29), что говорило о том, что мы имеем дело с термостабильным веществом (веществами) непептидной природы с молекулярной массой менее 12 тыс. Да в соответствии с порами диализного мешка. В настоящее время проводятся исследования по выделению и идентификации вещества

Таблица 29

Влияние диализа, температуры нагревания и обработки трипсином на десмутагенную активность культуральной жидкости *Propionibacterium shermanii** (Воробьева и др., 1993)

Мутаген, 4NQO 0,125 мкг/чашка	Антимутаген, характер обработки	Число колоний/чашка	% ингибирования
нет	нет	34±8	—
+	нет	982±15	—
+	недиализованный	68±10	93,1
+	диализованный	1027±9	0
+	недиализованный, нагревание 92 °С, 10 мин	45±15	95,4
+	недиализованный, обработан трипсином	75±24	92,4
+	стерильная среда	880±10	10,4

* Культуральная жидкость сконцентрирована в 6 раз; время десмутагенеза — 96 ч.

культуральной жидкости с антимуутагенной активностью. Установление факта антимуутагенности культуральной жидкости и клеточного экстракта пропионовокислых бактерий открыли новые, ранее неизвестные у них свойства, обуславливающие защиту клетки от внешних и эндогенных мутагенов.

Культуральная жидкость, полученная после выращивания и отделения биомассы пропионовых бактерий, может служить недорогим источником антимуутагенов микробного происхождения, возможно ее введение в рационы лечебно-профилактического питания в качестве компонентов натуральных пищевых продуктов или добавок к ним. С помощью культуральной жидкости пропионовых бактерий возможно осуществление десмутагенизации мутагенов, присутствующих в кормах.

В настоящее время проводятся исследования с использованием других, в том числе не прямых (требующих активации микросомальной фракцией s-9) мутагенов и культуры клеток млекопитающих в качестве тест-системы. Установление десмутагенного действия культуральной жидкости пропионовых бактерий имеет еще особые перспективы в связи с тем, что десмутагенез, обнаруженный на бактериальных системах, часто коррелирует со способностью подавлять канцерогенез у экспериментальных животных, что нельзя сказать о биоантимуутагенах (Kada et al., 1986).

Кроме знаменитой *P. acnes*, в литературе недавно появились сообщения об онкологическом и радиопротекторном действии спор кластридий (Blanca et al., 1989), лактобацилл (Axelsson et al., 1989), *Pseudomonas jananensis* — нового вида *Pseudomonas*, обладающего саркомостатической активностью (Cai et al., 1989). Стоит вспомнить, однако, что на противоопухолевое действие молочнокислых бактерий внимание ученых обращалось уже давно. Богданов с сотрудниками в 1962 г. (Bogdanov et al., 1962) сообщил о противоопухолевом действии экстракта среды, в которой выращивается *Lactobacillus bulgaricus*, по данным американских исследователей (Reddi et al., 1973). йогурт, в приготовлении которого участвуют *Lb. bulgaricum* и *Streptococcus thermophilus*, оказывает ингибирующее действие на пролиферацию асцитной опухоли Эрлиха у мышей.

В 1989 г. японская фирма «Morinaga» сообщила о том, что бактерии, обозначенные как К-303 и встречающиеся только в Японии, синтезируют вещества с антиафлатоксиновой активностью. Афлатоксин, образуемый плесневыми грибами, — ядовитое вещество с мутагенной и канцерогенной активностью. Это вещество, названное антиафлатоксином в 1991 г. будет выпускаться промышленностью в Японии и США для широкого практического применения. Можно предположить, что указанные штаммы обладают антимуутагенным действием, а бактерии в целом представляют богатый источник антимуутагенов (антиканцерогенов). Такие вещества иногда выделяют наружу как в случае двух штаммов стрептомицетов (Osava et al., 1986) и *Bac. cereus* (Пронин и др.,

1989), *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* (Bodana, Rao, 1990, Hosono et al., 1986) и, как мы видели, также пропионовокислых бактерий. Учитывая, кроме того, известные преимущества культивирования микроорганизмов перед выращиванием растений и животных — независимость от погодных и климатических условий, управляемость, высокую скорость роста и др., — можно прогнозировать большие перспективы изучения антимуtagens микробного происхождения.

Реактивация инактивированных ультрафиолетовым (УФ) светом *Escherichia coli* клеточными экстрактами пропионовокислых бактерий. Кроме антимутагенного действия в отношении мутагенеза, индуцированного некоторыми химическими соединениями, клеточные экстракты пропионовых бактерий проявляли, как было показано в наших исследованиях (Воробьева и др., 1993), еще и реактивирующее действие на инактивированные ультрафиолетовым светом клетки *Escherichia coli* АВ 1157. Любопытно, что реактивирующее действие дикого штамма *P. shermanii* проявлялось сильнее, чем его мутантов-суперпродуцентов витамина В₁₂, а также образующего красный пигмент *P. rubrum* (пигментные штаммы, по данным литературы, лучше защищают от действия УФ-лучей, чем атипичные) и даже *Deinococcus radiodurans*, известного своей исключительной устойчивостью к действию радиации. Следовательно, защитное действие экстрактов не обязательно коррелирует с собственной устойчивостью бактерий к УФ-лучам.

Вещества экстракта, обладающие защитным действием диализуемы и имеют молекулярную массу более 12 тыс. Da. Более того, недиализированный экстракт проявляет более низкое защитное действие, чем диализат. Максимальное защитное действие экстракта проявляется при добавлении его в суспензию в количестве 28—30 мкг/мл по белку. Можно допустить, что при более высоких концентрациях экстракта некоторые его компоненты ингибируют поглощение активного агента. Прединкубирование необлучаемой тест-культуры с диализатом в течение 5, 30 и 60 мин не оказывало влияния на число выросших колоний, т. е. мы имели дело с истинным защитным действием веществ экстракта.

Было также установлено, что защитный эффект экстракта не зависит от источника углерода, утилизированного пропионовокислыми бактериями при их выращивании: экстракт, полученный из клеток, выращенных в среде с лактатом и с глюкозой, давал примерно одинаковый защитный эффект.

Почти одинаковое защитное действие экстракта проявлялось как в случае пред- (5 мин), так и постинкубации (30 мин) облученной суспензии клеток. Намного ниже был защитный эффект при непосредственном перед облучением (~1 мин) введением экстракта в суспензию; эти наблюдения в значительной степени исключают экранирующее действие экстракта.

При изучении свойств экстракта в связи с реактивирующим действием была установлена его относительная термолабильность. При нагревании диализата в течение 10 мин при 50° и 70° его реактивирующие свойства соответственно снижались, но все еще сохранялись на довольно высоком уровне при нагревании в кипящей водяной бане (92°) в течение 1 мин, а после 12 мин нагревания снижались в 3 раза по сравнению с нативным экстрактом. Реактивирующие свойства экстракта сохранялись при хранении его до 1,5 мес при температуре — 20° и в течение более года в лиофилизированном состоянии. Обработка диализата липазой не оказывала влияния на его реактивирующие свойства, обработка РНК-азой и особенно ДНК-азой ее снижали, α -амилазой — заметно снижала, а обработка протеиназой К и протеиназой К, а затем трипсином (соответственно) снижала в 5,5 раз и полностью снимала защитные свойства.

Реактивирующее действие обнаружено во фракции растворимых белков и во фракции нуклеиновых кислот и нуклеопротеинов, полученной при осаждении стрептомицином. Следовательно, в диализате присутствует более одного фактора, обладающего защитным эффектом. Ранее было показано защитное действие экстракта *E. coli* также в отношении *E. coli*. При защите от γ -лучей *E. coli* В главную роль придают растворимым белкам собственного экстракта (Mukherjee, Bhattacharjee, 1971).

Вместе с тем другие исследователи (Fisher et al., 1966; Adler et al., 1969) главное значение в защите от летального действия γ -лучей клеток *E. coli* К-12 АВ 1899 с помощью экстракта *E. coli* В/ч (ORNL) связывают с фосфолипидами последней, ассоциированными с мембранами. Имеются сведения (Korgaonkar, Raut, 1967) о том, что защитное действие собственного экстракта стрептомицинчувствительных клеток *E. coli* К-12 от действия УФ-лучей связано с нуклеопротеиновой фракцией. Защитную от действия УФ-света роль придают (Пронин и др., 1989) фракции липотейхоевых кислот, выделяемых в культуральную жидкость грамположительными бактериями, в частности, прорастающими спорами *Bacillus subtilis*, штамма 96. Столь различные выводы, видимо, являются следствием использования разных штаммов бактерий, причем при работе с *E. coli* реактивацию обнаруживали исключительно на филаментных штаммах и связывали это (Adler et al., 1966) с инициацией механизма деления. В нашей работе впервые было показано реактивирующее действие экстракта пропионовых бактерий в отношении нефиламентного штамма (*E. coli* АВ 1157), что допускает возможность активации репарирующих систем, антимуtagenное действие и/или стабилизацию ДНК. Имеются данные (Weiss, 1991) о существовании в клетках спорообразующих бактерий маленьких кислоторастворимых белков, которые, как полагают, защищают ДНК от действия УФ-лучей, изменяя конформацию ДНК так, что тиминные димеры не образуются.

Наши данные показывали, что в диализате клеточного экстракта *P. shermanii* присутствуют полимерные вещества, возможно, белковой природы, обладающие истинно реактивирующим действием на инактивированные УФ-светом клетки.

Обращает на себя внимание очень высокий защитный эффект, достигающий индекса деления 25 (индекс деления — отношение числа колоний в присутствии экстракта к числу колоний в отсутствии экстракта), хотя полного восстановления клеток от инактивации достичь не удавалось. Это обстоятельство, видимо, вызвано тем, что максимальный эффект проявлялся при очень низкой (0,006%) выживаемости, т. е. при высоком летальном исходе.

В связи с перспективами практического использования не менее важным нам представляется установление не только «профилактического» (прединкубация), но и «лекарственного» (постинкубация) действия экстракта.

3.1. БРОЖЕНИЕ

3.1.1. БИОХИМИЯ БРОЖЕНИЯ

Основное энергетическое значение для пропионовых бактерий имеют так называемые ключевые реакции пропионовокислого брожения. Главные продукты брожения — пропионовая, уксусная кислоты и CO_2 , минорные продукты: молочная кислота (Машур и др., 1971; Foschino et al., 1988), формиат, янтарная кислота (Osman, Chenouda, 1971; Машур и др., 1971), ацетоин и диацетил (Antila, 1956/57; Lee et al., 1970; Wood et al., 1956; Tomka, 1949). Другие летучие ароматические соединения: диметилсульфид, ацетальдегид, пропионовый альдегид, этанол и пропанол (Keenan, Bills, 1968; Dykstra et al., 1971).

От других типов брожений пропионовокислое отличается высоким выходом АТФ, участием некоторых уникальных ферментов и реакций. Пропионовокислое брожение осуществляют не только пропионовые бактерии; оно функционирует у позвоночных, у представителей многих видов артропод, у некоторых беспозвоночных в анаэробных условиях (Halankar, Blomquist, 1989). Для эукариот обращенный путь брожения есть способ катаболизма пропионата, который образуется при β -окислении жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, при разложении разветвленных аминокислот (валина, изолейцина), а также из углеводной части метионина, треонина, тимиона и холестерина (Rosenberg, 1983). Ключевую реакцию брожения — превращение *L*-метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА — катализирует кофермент V_{12} (Ado Cbl). Дефицит витамина V_{12} у людей вызывает заболевание под названием пернициозная анемия, когда в крови и в моче накапливается пропионовая и метилмалоновая кислоты (подробнее см. гл. 7). Кроме главного пути превращения пропионата (в сукцинат), в условиях, предотвращающих его работу, у позвоночных функционируют минорные пути, что свидетельствует в пользу жизненной важности этих реакций. У термитов *Zootermopsis angusticollis* высокое содержание V_{12} (Wakayama et al., 1984) возможно благодаря присутствию в желудке микроорганизмов. Есть данные, что термиты могут использовать витамин V_{12} для превращения сукцината в метилмалонат, который затем включается вместо малонил-КоА в метил-разветвленные углеводороды; следовательно, у термитов такой же поток углерода, как и у бактерий, и противоположный тому, что есть у позвоночных, т. е. от сукцината в пропионаты. Из сказанного ясно, что изучение пропионовокислого брожения важно не только для

понимания биохимии пропионовых бактерий, но и многих живых организмов, включая человека.

Пропионовое брожение обнаружено (Haase et al., 1984; Wegner et al., 1967) у бактерий рр. *Propionibacterium*, *Rhodospirillum*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, а также у простейшего *Ochromonas malhamensis*. Только у пропионовых бактерий оно служит главным способом получения энергии, в то время как у других перечисленных организмов это дополнительный способ существования. Видимо, поэтому некоторые существенные и наиболее «уязвимые» реакции у пропионовых бактерий (см. ниже) дублируются разными ферментами, а реакции регенерации восстановительных эквивалентов заключены в цикл, тогда как у эукариот и у многих других бактерий цикл разорван. Известно, что цикличность процесса создает большую автономность, независимость организма от внешней среды, поэтому такие процессы, как ЦТК, фиксация CO_2 у автотрофов, пентозомонофосфатный путь и ряд других, работают как циклические процессы, обеспечивая организмы «обязательными» веществами или реакциями.

Химизм пропионовокислого брожения хорошо изучен и описан (Stjernholm, Wood, 1963; Hettinga, Reinbold, 1972; Воробьева, 1976) (рис. 26).

Выделение и идентификация интермедиатов при брожении глюкозы, доказательство их утилизации бактериями с образова-

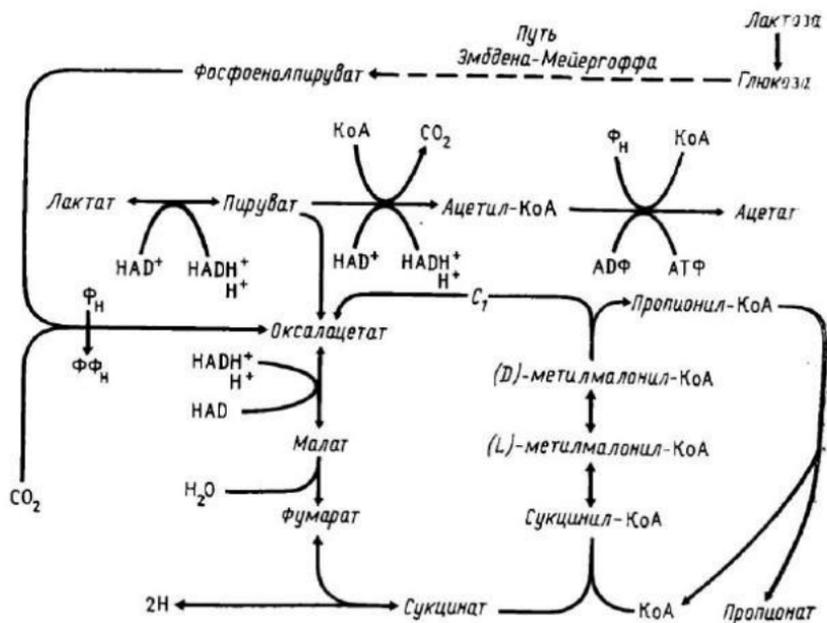


Схема пропионовокислого брожения

Рис. 26. Метаболические пути пропионовокислых бактерий (брожение)

нием обычных конечных продуктов (Wood et al., 1937), а также характер распределения метки в продуктах брожения (Wood et al., 1955) показали, что гликолитическое расщепление глюкозы является основным путем ее разложения. Пропионовые бактерии фосфорилируют глюкозу с образованием гексозомонофосфата (van Niel, 1928; Virtanen, Karströme, 1931) и гексозодифосфата (Pett, Wynne, 1933).

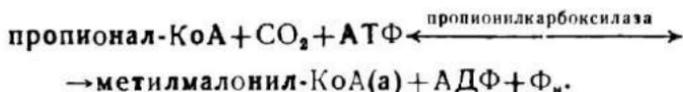
Клетки бактерий содержат гексозофосфатизомеразу (Wood et al., 1963), альдолазу фруктозодифосфата (Sibley, Leninger, 1949; Wood et al., 1963), триозофосфатдегидрогеназу (van Demark, Fukui, 1956). Высушенные ацетоном клетки *P. pentosaceum* образуют фосфорные эфиры глюкозы, арабинозы, глицерина и ряда других субстратов за счет фосфатной группы АТФ (Stone et al., 1937; Barker, Lipmann, 1949). Однако разложение субстратов было относительно нечувствительно к ингибитору гликолиза NaF, а анализ меченых продуктов метаболизма показывал (Wood et al., 1937; Volk, 1954; Leaver et al., 1955; Wiggert, Werkman, 1939), что при разложении глюкозы работает не только путь Эмбдена-Мейергоффа, но и гексозомонофосфатный путь. Пропионовокислые бактерии могут утилизировать глюконат (Fukui, 1952), в бесклеточном экстракте *P. pentosaceum* обнаружены ключевые ферменты гексозомонофосфатного пути — транскетотлаза и трансальдолаза (van Demark, Fukui, 1956), а среди интермедиатов сбраживания пентоз обнаружена D-арабинозо-5-Ф и фермент, изомеризующий D-арабинозо-5-Ф в D-рибулозо-5-Ф (Volk, 1959). Существенно также, что рибозо-1-С₁¹⁴ и глюконат калия, меченный в различных положениях, превращается экстрактами клеток *P. shermanii* в ацетат, пропионат и сукцинат (Stjernholm, Flanders, 1962). На основании распределения метки в продуктах считают (Swick, Wood, 1960), что субстраты в начале претерпевают превращение по гексозомонофосфатному пути, а образованный фруктозо-6-Ф включается далее в гликолитический путь и транскарбоксилирующий цикл. Пировиноградная кислота — обязательное промежуточное соединение в брожении — выделена из культуральной жидкости пропионовокислых бактерий (Wood, Werkman, 1934).

Пируват может быть превращен в пропионат несколькими путями:

- 1) пируват → акрилат → пропионат
- 2) пируват → лактат → пропионат
- 3) пируват + С₁ → сукцинат → метилмалонат → пропионат;

первые две возможности у пропионовых бактерий не реализуются и образование пропионата происходит из дикарбоновой кислоты по третьему пути (Werkman, Wood, 1942). Для такого утверждения имеется большое число экспериментальных данных о способности этих бактерий превращать янтарную кислоту в пропионовую (Hitchner, 1934; Wood, Werkman, 1940).

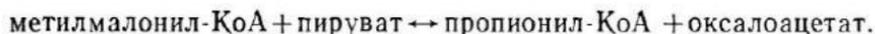
На животных тканях было показано (Flavin et al., 1955), что взаимосвязь пропионатов и C₄-кислот происходит через осуществление пропионилкарбоксилазной реакции



Пропионат сначала активируется с образованием пропионил-КоА, после чего карбоксилируется за счет АТФ с образованием метилмалонил-КоА. Предположительно, что пропионовые бактерии образуют пропионаты путем обращения вышеприведенной реакции (Kaziro, Ochoa, 1964). Однако скорость обратной реакции чрезвычайно низка и не коррелирует с высокой скоростью образования пропионатов. Но пропионовокислые бактерии имеют другую возможность синтеза C₄-дикарбоновых кислот из C₃- и C₁-соединений. Один из них связан с гетеротрофной фиксацией CO₂, впервые открытой именно на пропионовых бактериях видными американскими исследователями Вудом и Веркманом (Werkman, Wood, 1942; Wood, Werkman, 1936, 1938). Фиксация CO₂ происходит особенно активно при росте бактерий в среде с глицерином. NaF ингибировал включение CO₂ клетками и одновременное образование сукцината (Wood, Werkman, 1940).

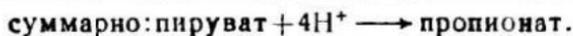
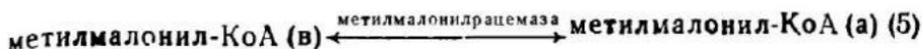
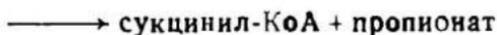
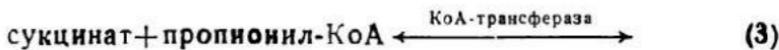
Другой путь конденсации C₃- и C₁-соединений был открыт Свиком и Вудом (Swick, Wood, 1960), показавшими, что пропионовые бактерии содержат транскарбоксилазу, при участии которой происходит образование пропионатов из метилмалонил-КоА.

Открытие Свика и Вуда предшествовали наблюдения Вуда и Ливера (Wood, Leaver, 1953) о том, что пропионовокислые бактерии имеют два механизма фиксации CO₂ и только один из них ингибируется фторидами. Обнаруженный авторами фермент осуществлял новый тип биохимической реакции — транскарбоксилирование между донором карбоксила и акцептором:



Открытие американских исследователей нашло свое подтверждение и в наших исследованиях (Воробьева, 1958, 1976) при подведении баланса по углероду в продуктах жизнедеятельности пропионовых бактерий. Реакции, ведущие к образованию пропионовой кислоты у пропионовокислых бактерий, могут быть представлены следующей последовательностью (Delwiche, 1948; Johns, 1951):

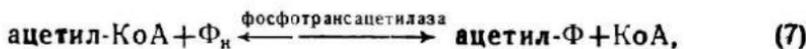
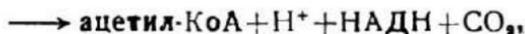
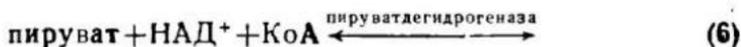




Эта последовательность реакций обратна той, которая имеет место у животных в обмене пропионата и в конечном счете приводит к восстановлению пирувата до пропионата за счет НАДН₂, образованных при гликолизе и окислении триоз до ацетата и СО₂.

Превращение оксалоацетата в сукцинат происходит в результате работы ферментов ЦТК: малатдегидрогеназы, фумаразы и сукцинатдегидрогеназы. Указанные ферменты выделены из клеток *P. shermanii* (Allen et al., 1964) и осуществляют превращение оксалоацетата в сукцинат с достаточно высокой скоростью (Krebs, Eggleston, 1941). Сукцинатдегидрогеназа пропионовых бактерий не ингибируется малонатом в отличие от сукцинатдегидрогеназы ЦТК (Ichikawa, 1955) и катализирует прямую и обратную реакции в равной степени.

Уксусная кислота образуется в результате окислительного декарбоксилирования пирувата:



Восстановительные этапы, включающие редукцию оксалоацетата и фумарата, осуществляются за счет восстановленных НАДН, образованных при окислении фосфоглицеринового альдегида и окислительном декарбоксилировании пирувата. Имеются данные (Sone, 1972), свидетельствующие о том, что сукцинатдегидрогеназа *P. arabinosum* фактически является фумаратредуктазой и катализирует окисление НАДН, α-лактата, α-глицерофосфата (α-ГФ) за счет восстановления фумарата. Образование пирувата из лактата и дигидроксиацетона из α-ГФ в анаэробных условиях полностью зависит от наличия фумарата. Фумаратредуктаза локализована в основном во фракции частиц; α-ГФ-дегидрогенезы локализованы как во фракции частиц, так и в растворимой фракции. Во фракции частиц обнаружен цитохром *b*, негеминное железо, флавопротеиды и липиды. Эти ком-

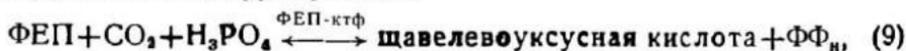
поненты вместе с дегидрогеназами составляют специфический тип системы транспорта электронов, который окисляет НАДН, α -ГФ, лактат. Утилизация O_2 этими субстратами значительно ингибируется добавлением фумарата. Показано (de Vries et al., 1972), что добавление фумарата к суспензии *P. freudenreichii*, окисляющей лактат, приводит к частичному окислению цитохрома *b* и *a*₂. В присутствии ингибитора цитохрома *b* 2н-гептил-4-гидроксихинолин-N-оксида лактатдегидрогеназная активность снижалась на 85%, если фумарат служил акцептором электронов, и только на 25% при наличии метиленовой сини (в последнем случае H_2 переносится на краску без участия цитохрома *b*). Учитывая приведенные данные, пропионовокислое брожение следует рассматривать в связи с гармоничной работой растворимых ферментов и ферментов восстановительной системы, связанной с мембранами. Участие цитохрома *b* в анаэробном транспорте электронов к фумарату служит подтверждением предположения о том (Vauchop, Elsdon, 1960), что у пропионовокислых бактерий на участке от фумарата к сукцинату имеет место окислительное фосфорилирование.

3.1.2. ФЕРМЕНТЫ

Первую реакцию осуществляет карбокситрансфорилаза — уникальный фермент пропионовокислого брожения, зависимый от биотина. В других реакциях переноса C_1 -соединений при участии ФЕП-карбокситрансфосфорилазы и ФЕП-карбоксикиназы не требуется участие биотина, а C_1 -соединение — это CO_2 .

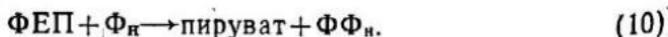
В ФЕП-карбокситрансфорилазной реакции свободная CO_2 не выделяется (Swick, Wood, 1960), хотя пропионовые бактерии способны к декарбоксилированию сукцината с образованием CO_2 в биотинзависимой реакции (Delwiche, 1949, Lichstein, 1958); считают (Cooper et al., 1968), что активированное C_1 -соединение представляет собой HCO_3^- (или H_2CO_3). Если накапливается сукцинат как конечный продукт, то цикл (см. рис. 26) разрывается и шавелевоуксусная кислота образуется путем фиксации CO_2 в ФЕП при участии ФЕП-карбокситрансфосфорилазы (ФЕП-ктф).

ФЕП-карбокситрансфосфорилаза (ФЕП-ктф).
Фермент катализирует реакцию



Реакция, как видим, происходит с затратой макроэргического соединения — ФЕП. Реакция обратима и стимулируется добавлением пирогосфатазы (Siu, Wood, 1961, 1962).

Скорость прямой реакции в семь раз выше, чем обратной. В отсутствие $NaHCO_3$ фермент катализирует необратимое превращение ФЕП и неорганического фосфора в пируват и ФФ_n (Lochmüller et al., 1966):

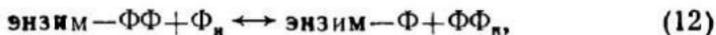
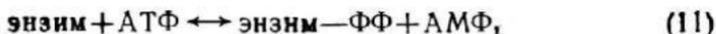


Полагают, что обе реакции катализирует комплекс энзим-ФЕП- Φ_n , CO_2 конкурирует за комплекс, разделяя реакцию на уровне оксалоацетата и снижая, таким образом, скорость образования пирувата. Реакция (10) экспериментально необратима, а (9) обратима и интересна в том отношении, что Φ_n используется для образования ФЕП из пирувата (Davis, Wood, 1966). Следовательно, Φ_n , образующийся при участии АТФ, может быть не гидролизован, а утилизирован, являясь, таким образом, контрольным механизмом для сохранения ФЕП. Поскольку образующийся Φ_n сильно тормозит ФЕП-транскарбоксилазную реакцию, ФЕП может включаться в ЦТК (Frings, Schlegel, 1970).

В условиях подавления транскарбоксилирования фиксация CO_2 в ФЕП становится жизненно важной для бактерий реакцией и количество доступного ФЕП может лимитировать образование C_4 -соединений. Оказалось, что на данный случай природа снабдила пропионовокислые бактерии ферментом пируват-фосфат-дикиназой, осуществляющей прямую реакцию образования ФЕП из пирувата (Evans, Wood, 1968).

Реакцию фиксации CO_2 в ФЕП при участии ФЕП-карбокси-трансфосфорилазы рассматривают как контрольный механизм пропионовокислого брожения (O'Brien, Wood, 1974). Под действием оксалата, малата и фумарата наблюдали расщепление энзиматически активной тетрамерной формы ФЕП-карбокси-трансфосфорилазы, выделенной из *P. shermanii*, в менее активную димерную форму. При этом димеры в большей степени были подвержены действию протеолитических ферментов, чем тетрамеры, особенно в присутствии эффекторов (малата). Таким образом, потеря активности при диссоциации фермента и увеличивающийся протеолиз являются эффективным средством контроля уровня интермедиатов в пропионовокислом брожении. Различную способность пропионовых бактерий фиксировать CO_2 связывают со способностью их осуществлять реакцию $\text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_1$ и образовывать сульфгидрильный комплекс с C_1 (Wood, Leaver, 1953).

Дикиназа катализирует взаимопревращение пирувата, АТФ, Φ_n , с одной стороны, и ФЕП, АМФ и Φ_n — с другой:



Фосфорилэнзим был получен при инкубировании энзима с ^{32}P — ФЕП (Milner, Wood, 1972). Авторы выделили пирофосфорильную форму фермента и экспериментально продемонстрировали «пингпонговый» механизм фосфат-дикиназной реакции (Evans, Wood, 1968). Полагают, что дикиназы играют важную роль в глюконеогенезе (Slack, Hatch, 1967; Reeves et al., 1968):

они были обнаружены у паразитических амёб и *Bacteroides sym. biosis*, у которых отсутствовала обычная пируват-киназа (Reeves et al., 1968). Активность фермента при росте пропионовых бактерий в среде с лактатом в 10 раз выше, чем при росте в среде с глицерином (Evans, Wood, 1968), что предполагает участие фермента в образовании ФЕП из лактата. Реакция сдвигается вправо при утилизации ФЕП и при гидролизе ФФ_n под действием пиروفосфатазы.

Пируваткарбокситрансфосфорилаза (ПКТФ). Фермент катализирует реакцию без затраты энергии;

метилмалонил-КоА + пируват \leftrightarrow пропионил-КоА + оксалацетат. (15)

Пируваткарбокситрансфосфорилаза содержит 1,5 мкг биотина в 1 мг белка. При низкой ионной силе и при щелочной реакции транскарбоксилаза диссоциирует с образованием неактивных субъединиц. Этот компонент состоит из двух частей, из которых одна содержит биотин, а другая металлы — CO и Zn (Wood et al., 1963; Northrop, 1969; Gerwin et al., 1969).

Активность транскарбоксилазы с сукцинил-КоА в 10—15 раз ниже, чем с метилмалонил-КоА. В отношении акцепторов C_1 -фрагмент мало специфичен; K_m для пропионил-КоА — 1,0; для ацетил-КоА — 0,5 для бутирил-КоА — 0,1 и ацетоацетил-КоА — 0,025.

Широкая специфичность к эфирам КоА приводит к тому, что карбоксильная группа оксалацетата может достигать ЦТК или быть утилизирована в синтезе жирных кислот.

Перенос C_1 при транскарбоксилировании имеет известные преимущества для экономики клетки, поскольку при этом нет невыгодных малых скоростей пропионилкарбоксилазной реакции и бесполезной траты энергии для активации CO_2 или свободной кислоты за счет АТФ. Возможно, что сходный перенос C_1 имеет место при синтезе жирных кислот, поскольку и в этом случае нет образования и активации CO_2 , что обуславливает благоприятную кинетику процесса.

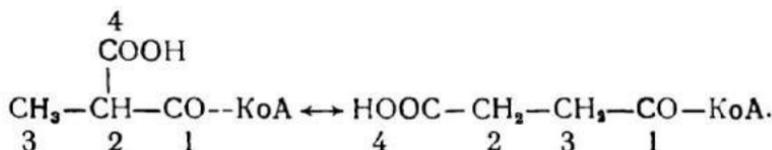
Фермент имеет широкие границы оптимума рН 5,5—7,8 и нечувствителен к реагентам на SH-группы.

Метилмалонил-транскарбоксилаза, как и КоА-трансфераза, обладает стереоспецифичностью в отношении метилмалонил-КоА (а), имеющего асимметричный атом углерода. Субстратом фермента является только метилмалонил-КоА (а), появление которого связано с работой рацемазы.

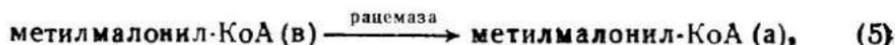
Метилмалонил-КоА мутаза (изомераза). AdoCbl-зависимая метилмалонил-КоА мутаза выделена из клеток *P. shermanii* и очищена до гомогенного состояния (Francalani et al., 1986). Молекулярная масса (м.м.) фермента определена как 165 000, что близко к молекулярной массе мутаза из других источников. Фермент состоит из двух неидентичных субъединиц с

м.м. 79 000 и 67 000 соответственно. Очищенный препарат обычно содержит некоторое количество неактивной мутазы и несет связанные с кобаламином участки. Активность фермента не зависит от SH-групп и от K^+ или NH_4^+ .

В изомеразе животного происхождения кобамидный коэнзим прочно связан с апоэнзимом, в изомеразе пропионовых бактерий легко отделим. Апоэнзим из животной ткани реагирует только с коферментом B_{12} или бензимидазольными коэнзимами; бактериальная изомераза менее специфична. Апоэнзим *P. shermanii* активируется витамином B_{12} , оксикобаламином и даже безнуклеотидным фактором *B* (Overath et al., 1962). Дезаминированные кобаламины, однако, неактивны. Таким образом, модификация в нуклеозиндой части коэнзима приводит к полной потере активности, а вариации в нуклеотидной части допустимы. Реакция изомеризации состоит в разрыве C_1-C_2 и внутримолекулярном переносе всей тиоэфирной группы к C_3 с одновременным переносом H в обратном направлении (от C_3 к C_2):



Рацемеза была выделена и очищена из *P. shermanii* (Allen et al., 1964). Молекулярный вес фермента 27 000 — 29 000. Фермент необычно термоустойчив: после нагревания при 100° в течение 5 мин сохраняется 50% активности. Осуществляет реакцию



Механизм рацемизации в настоящее время связывают с ионизацией и расщеплением α -водородного атома (Overath et al., 1961). Рацемеза с трудом отделяется от транскарбоксилазы, пропионил-КоА трансферазы и метилмалонил изомеразы (мутазы) (Allen et al., 1963).

КоА-трансфераза. Фермент катализирует обратимый перенос коэнзима А от пропионил-КоА или ацетил-КоА к сукцинату:

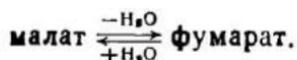


Трансфераза из *P. shermanii* имеет более высокую активность, чем из *P. pentosaceum* и *Micrococcus lactilyticus* (Allen et al., 1964). Оптимум pH в пределах 6,5—7,8; K_m для сукцинил-КоА при реакции с ацетатом — $1,3 \cdot 10^{-4}$ М, а с пропионатом — $6,8 \cdot 10^{-5}$ М. Фермент очень стабилен при хранении.

Малатдегидрогеназа. Фермент катализирует восстановление оксалацетата до малата:



Фумараза. В клетках *P. shermanii* обнаружена (Krebs, Eggleston, 1941) «мощная» фумараза. Фермент катализирует превращение фумарата и малата:



Тиоловые и ртутные реагенты ингибируют фумаразу *P. pentosaeum* (Ayres, Laga, 1962). Активность фермента не изменяется в пределах рН от 5 до 7.

Сукцинатдегидрогеназа. Фермент участвует в восстановлении фумарата до сукцината. В зависимости от используемого акцептора водорода оптимум рН: 7,4 и 7,8; K_m с различными красками находится в пределах $2,2 \cdot 10^{-3}$ — $7 \cdot 10^{-4}$ М (Laga, 1959).

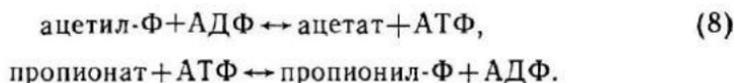
Пируватдегидрогеназный комплекс. Постулировали (Allan et al., 1964; de Vries et al., 1973), что пируватдегидрогеназный комплекс (ПДГ) *P. shermanii* включает пируватдегидрогеназу, утилизирующую тиаминдифосфат как кофермент, дигидролипонтрансацетилазу, содержащую липоевую кислоту и дигидролипонтдегидрогеназу, работающую с НАД и ФАД. Комплекс катализирует реакцию



Пируватдегидрогеназа пропионовых бактерий отличается от таковой у аэробных бактерий, поскольку не зависит от липоата и имеет сходство с пируватцитохром- b_1 -оксидоредуктазой (E.C.1.2.2.2). Позднее (Castberg, Morris, 1978) были получены данные о выделении из клеток *P. shermanii* пируватоксидазной (восстанавливающей 2,6-дихлорфенолиндофенол — 2,6-ДХФИ) и пируватдегидрогеназной системы (восстанавливает НАД). Пируватоксидаза не работала с НАД как акцептором электронов, а НАД-зависимый фермент не транспортировал электроны на ДХФИ. В отличие от пируватоксидазы *E. coli* фермент из *P. shermanii* не активировался в присутствии SDS фосфатидилхолином и для активности очищенного препарата не требовалось присутствия тиаминдифосфата или Mg^{2+} . Авторы считают, что *P. shermanii* не содержит классический пируватдегидрогеназный комплекс при выращивании анаэробно в среде с лактатом. Предполагают (Castberg, Morris, 1978), что в анаэробных условиях пируватоксидаза может участвовать в транспорте электронов от пирувата через цитохром *b* на фумарат.

Ацетилкиназа. В отличие от ацетилкиназы *E. coli* киназа *P. shermanii* имеет одинаковое сродство к ацетату и пропионату. K_m для пропионата и ацетата — 0,1 и 0,14 соответственно.

Фермент имеет оптимум активности при 50° и два оптимума рН — 8,1 и 6,7. Оптимум рН для ацетилкиназы *E. coli* — 7,4 (Pawelkiewicz, Legocki, 1963). Механизм образования ацетата пропионовыми бактериями неизвестен. Фермент катализирует следующие реакции:



Для активности фермента нужен Mg^{2+} ; фермент не ингибируется *N*-этилмаленимидом и иодоацетатом в концентрациях 10^{-2} М.

Лактатдегидрогеназа. Клетки *P. pentosaceum* содержат ферменты, окисляющие лактат в присутствии фумарата (Barker, Liptmann, 1944). Лактатдегидрогеназа пропионовых бактерий была выделена, очищена (Serzedello et al., 1969) и показано (Molinary, Laga, 1960) высокое сродство фермента к метиленовой сини, 2,6-ДХФИ и 1,2-нафтахинону-4-сульфонату. Оптимум рН фермента — 7,7. Фермент термолabile, активируется ионами NH_4^+ , CN^- , F^- и Mg^{2+} , а также малонатом и ингибируется пируватом, оксалатом, тиоловыми реагентами кинакрином, хлорокином, хинином, дикумаролом, витамином K_1 , пентахлорфенолом, тироксином и гидразином. *P. shermanii*, *P. pentosaceum* и *P. technicum* содержат активную лактатдегидрогеназу, причем в отношении *L*-лактата активность ее гораздо выше, чем в отношении *D*-лактата. Очищенный фермент содержит ФАД как единственный флавин.

3.1.3. ВЫХОД ЭНЕРГИИ

Уникальность пропионовокислого брожения обусловлена участием ФЕП-карбокситрансфосфорилазы, — фермента, не обнаруженного у других организмов, синтезирующих пропионат. Благодаря наличию этого фермента брожение, осуществляемое пропионовыми бактериями, работает как циклический процесс (о значении цикличности см. выше). Другая особенность брожения связана со способом образования пропионата, которое сопряжено с восстановлением фумарата до сукцината и окислением пирувата до ацетата и CO_2 . Транспорт электронов, сопровождающий эти реакции, сопряжен с окислительным фосфорилированием и синтезом АТФ. И третьей уникальной характеристикой брожения является высокий выход АТФ, превышающий выход АТФ в других известных брожениях. 3 М АТФ бактерии извлекают из 1,5 М глюкозы при гликолизе. Далее, одна триоза (пируват) под действием ПД-комплекса окисляется до CO_2 и ацетил-Ф, а из последнего в присутствии АДФ и ацетилкиназы образуется ацетат и АТФ. Две другие молекулы пирувата поступают в цикл. В процессе анаэробного транспорта двух

электронов с НАДН на фумарат участвует цитохром *b* (Cox et al., 1970) и в результате окислительного фосфорилирования образуется (von Gent-Ruijters et al., 1975) 2М АТФ. При переносе двух электронов с лактата или глицеро-Ф на фумарат постулируют образование 1 М АТФ.

У этих бактерий может действовать еще один, по-видимому, древний способ добычи энергии, связанный с работой биотинзависимой декарбоксилазы (Dose, 1989). У анаэробных и факультативно анаэробных бактерий установлено два дополнительных механизма получения энергии: первый из них сопряжен с транспортом метаболита (лактата) и прямо дает протондвижущую силу — выход лактата происходит в симпорте с протонами. Этот механизм имеет место у молочнокислых бактерий. Декарбоксилазы работают как электрогенные помпы Na, а свободная энергия реакции декарбоксилирования сохраняется в электрохимическом потенциале ионов Na. Через Na/H-ионный антипорт Na^+ — протон движущая сила может быть превращена в протондвижущую силу и далее в АТФ (рис. 27) или Na^+ -протон-движущая сила может прямо приводить в работу Na^+ -зависимую АТФ-синтазу. Такой способ извлечения энергии предполагается у ряда анаэробных бактерий (Laubinger, Dimroth, 1987; Dimroth, 1988), в том числе и у пропионовых. Они осуществляют декарбоксилирование метилмалонил-КоА и отличаются устойчивостью к NaCl. При декарбоксилировании 2М метилмалонил-КоА можно получить теоретически энергию, соответствующую 2/3 М АТФ. Стало быть, 1,5 М глюкозы могут дать пропионовым бактериям около 6М АТФ — это примерно та величина, которая была рассчитана (Bauchop, Elsdon, 1960) по коэффициентам $Y_{\text{АТФ}}$ и Y_{C} . $Y_{\text{АТФ}}$ г-сухих клеток/моль·АТФ в анаэробных условиях лежит в пределах

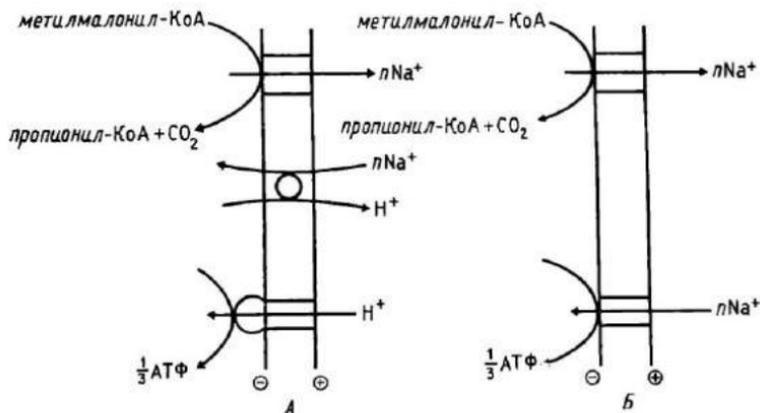


Рис. 27. Сопряжение декарбоксилирования метилмалонил-КоА и образования электрохимического потенциала ионов Na поперек цитоплазматической мембраны, который может быть использован для синтеза АТФ по двум (А и Б) возможным механизмам (Dimroth et al., 1988)

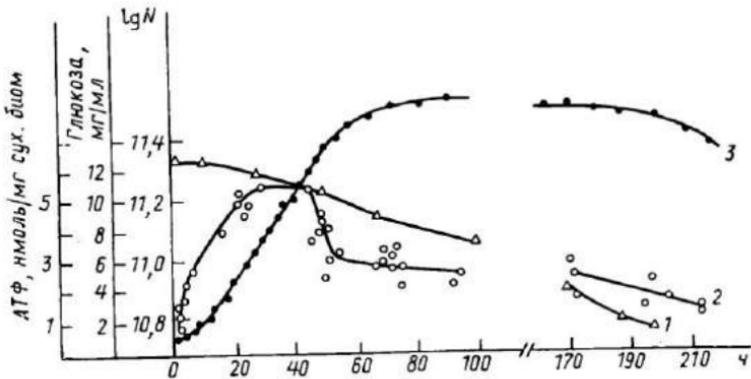


Рис. 28. Содержание АТФ в клетках *P. shermanii* при росте на среде с глюкозой (Гайтан, Воробьева, 1981):

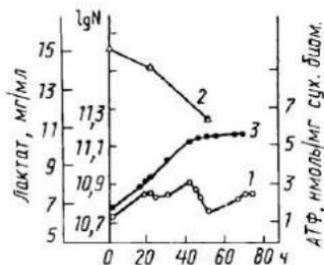
1 — содержание АТФ в клетках (нмоль на мг сухой биомассы); 2 — содержание глюкозы в среде; 3 — кривая роста (\lg числа клеток в мг сухой биомассы)

15,5—16,9 для *P. freudenreichii* (de Vries et al., 1973; Pritchard et al., 1977).

В. И. Гайтан (Гайтан, Воробьева, 1981) проводила непосредственное определение содержания АТФ в клетках бактерий, находящихся в разных стадиях развития, используя люциферин-люциферазный метод (Strehler, McElroy, 1957) и иммобилизованную люциферазу (Бровко и др., 1978). Было показано (рис. 28), что в течение лаг-фазы содержание АТФ увеличивается и максимальный уровень достигает 5 нмоль/1 мг сухой биомассы при росте на среде с глюкозой; при использовании лактата максимальный уровень АТФ — 3 нмоль/мг биомассы (рис. 29). Во время лаг-фазы уровень АТФ изменяется, но не снижается ниже 4 нмоль, причем в начале лаг-фазы он высок, к концу лаг-фазы — снижается; снижение особенно резкое при переходе культуры в фазу линейного роста. В стационарной фазе уровень АТФ стабилизируется. В период прохождения этих двух фаз происходит запасание макроэнергетических соединений в виде полифосфатов (количество их увеличивается). Максимальный уровень АТФ в клетках *P. shermanii* зависит от природы энергетического субстрата и не зависит от удельной скорости роста (табл. 30). Экспоненциальный рост бактерий на среде с лактатом происходит при более низком уровне АТФ (рис. 29), чем на среде с глюкозой. Причем при за-

Рис. 29. Содержание АТФ в клетках при росте на среде с оптимальным содержанием лактата (Гайтан, Воробьева, 1981):

1 — содержание АТФ в клетках; 2 — содержание лактата в среде; 3 — кривая роста



Удельная скорость роста в логарифмической фазе и максимальный уровень АТФ в разных условиях культивирования *P. shermanii* (Гайтан, Воробьева, 1981)

Источник энергии, %	Исходная плотность суспензии, lg N	Удельная скорость роста, μ , ч ⁻¹	Максимальное содержание АТФ в лог-фазе, нмоль/мг сухой биомассы
Глюкоза, 2,2	10,90	0,038	5,3
Глюкоза, 1,3	10,80	0,026	5,0
Глюкоза, 1,5	11,20	0,035	5,2
Глюкоза, 1,2	11,10	0,033	4,7
Лактат, 2,5	10,90	0,014	2,6
Лактат, 1,3	10,80	0,023	3,0

держке роста избытком лактата уровень АТФ существенно не изменяется. Если рост культуры останавливали (азотное голодание), то содержание АТФ в клетках поддерживалось примерно на постоянном низком уровне (брожение продолжалось) (рис. 30), что могло обеспечить энергией эндогенный метаболизм. Но для начала роста голодающей культуры требовался более высокий уровень АТФ (табл. 31): пока этот уровень не достигался, клетки не приступали к делению. Увеличение пула АТФ в лактатной культуре, возобновившей рост, сопровождалось потреблением щелоче- и со- лерастворимой фракции полифосфатов, которые могли принимать участие в поддержании определенного уровня АТФ в клетках и обеспечивать энергией другие процессы (Гайтан, Воробьева, 1981; Гайтан и др., 1982).

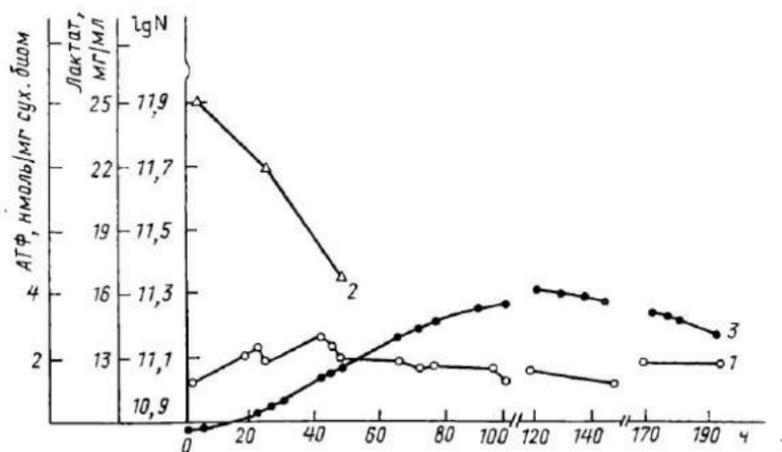


Рис. 30. Содержание АТФ в клетках при ингибировании роста избытком лактата:

1 — содержание АТФ; 2 — содержание лактата в среде; 3 — кривая роста

Содержание АТФ в клетках *P. shermanii*
после добавления сульфата аммония в голодающую по азоту культуру*
(Гайтан, Воробьева, 1981)

Время культивирования	Время после добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Биомасса, мг/мл	Содержание АТФ, нмоль/мг сухой биомассы
43,0 ч	—	0,70	0,94
Сульфат аммония			
43 ч 10 мин	10 мин	0,70	0,89
43 ч 20 мин	20 мин	0,70	0,76
44,0 ч	1 ч	0,70	0,89
48,0 ч	5 ч	0,70	2,56
50,0 ч	7 ч	0,70	2,10
66,0 ч	23 ч	0,83	2,02

* Источник углерода— глюкоза.

Поддержание постоянного пула АТФ в клетках, растущих в среде с избытком лактата, а также в нерастущих клетках (лишенных источника азота) свидетельствует о существовании строгого контроля уровня АТФ.

3.1.4. СБРАЖИВАЕМЫЕ СУБСТРАТЫ И СООТНОШЕНИЕ ПРОДУКТОВ БРОЖЕНИЯ

Характерной особенностью пропионовокислого брожения является образование идентичных продуктов брожения при использовании C_6 -, C_5 -, C_4 - и C_3 -соединений. Соотношение продуктов может быть разное, что в значительной степени зависит от степени окисленности источника углерода. При росте на среде с глицерином, например, отношение пропионовая: уксусная кислота — 2:1, с лактатом — 1:1,5 и пируватом — 1:2 (Воробьева, 1958а).

При использовании бактериями пирувата наблюдали (Воробьева, 1958) образование с постоянной скоростью уксусной кислоты. Количество пропионовой кислоты было в два раза ниже и после четырех суток развития бактерий почти не изменялось (рис. 31). Эквимолярности между образованием ацетата и CO_2 не наблюдали, что может быть связано с активной фиксацией его в органических соединениях с образованием C_4 -соединений.

Иной, «обратный», характер носит пропионовокислое брожение в синтетической среде, где в качестве источника углерода служит глицерин. Глицерин сбраживался бактериями в строго анаэробных условиях только при наличии в среде фумарата в качестве акцептора водорода (Воробьева, 1958б), поскольку использование этого субстрата для конструктивных целей требует его окисления примерно до уровня углеводов. Видимо, поэтому

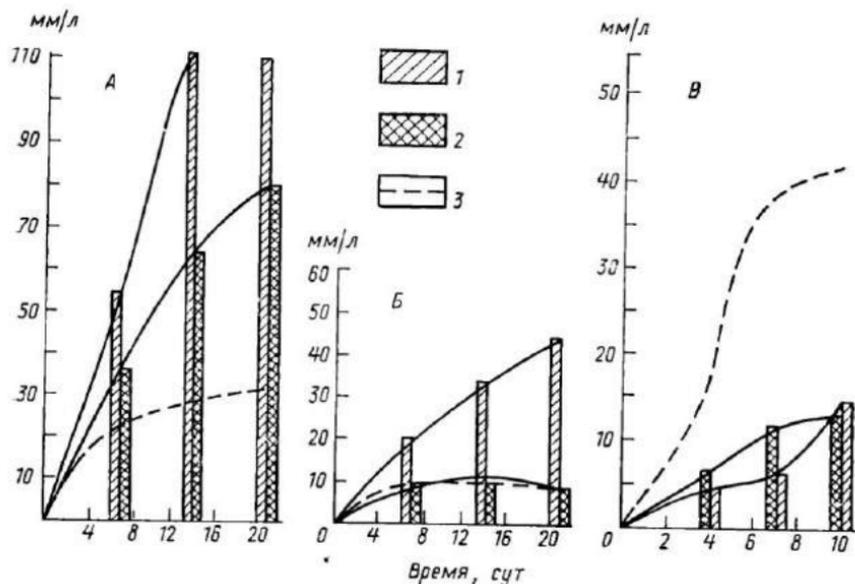


Рис. 31. Динамика роста бактерий на синтетической среде: А — с лактатом натрия; Б — с пируватом натрия; В — с глицерином (добавлено 0,2% аспаргиновой кислоты). 1 — уксусная кислота, 2 — пропионовая кислота, 3 — углерод в клетках (Воробьева, 1958 а).

первая фаза пропионовокислого брожения на среде с глицерином сопровождается образованием не окисленных продуктов (как в случае с лактатом и пируватом), а, напротив, более восстановленного соединения — пропионовой кислоты (рис. 31). Степень восстановленности источника углерода оказывает существенное влияние на соотношении продуктов брожения (которое меняется в динамике развития бактерий) и выход биомассы. На пирувате и лактате только 5 и 7% соответственно углерода сброженного субстрата обнаружено в клетках. При использовании глицерина клетки бактерий содержат около 30% углерода использованного субстрата (рис. 32) (Воробьева, 1958а, б). Следовательно, глицерин является наиболее «выгодным» субстратом для получения биомассы и пропионовой кислоты пропионовокислыми бактериями.

Использование C_3 -соединений, видимо, происходит при участии дикиназы (по крайней мере при утилизации лактата и пирувата), реакций глюконеогенеза, гексозомонофосфатного и дифосфатного путей. Полагают, что разложение глицерина происходит через образование глицерин-Ф и дигидроксиацетона (Stjernholm, Wood, 1963).

При росте бактерий на среде с глицерином необходимо добавление каталитических количеств оксалоацетата (Wood, 1961). Фумаровая кислота и аминокислотные компоненты дрожжевого

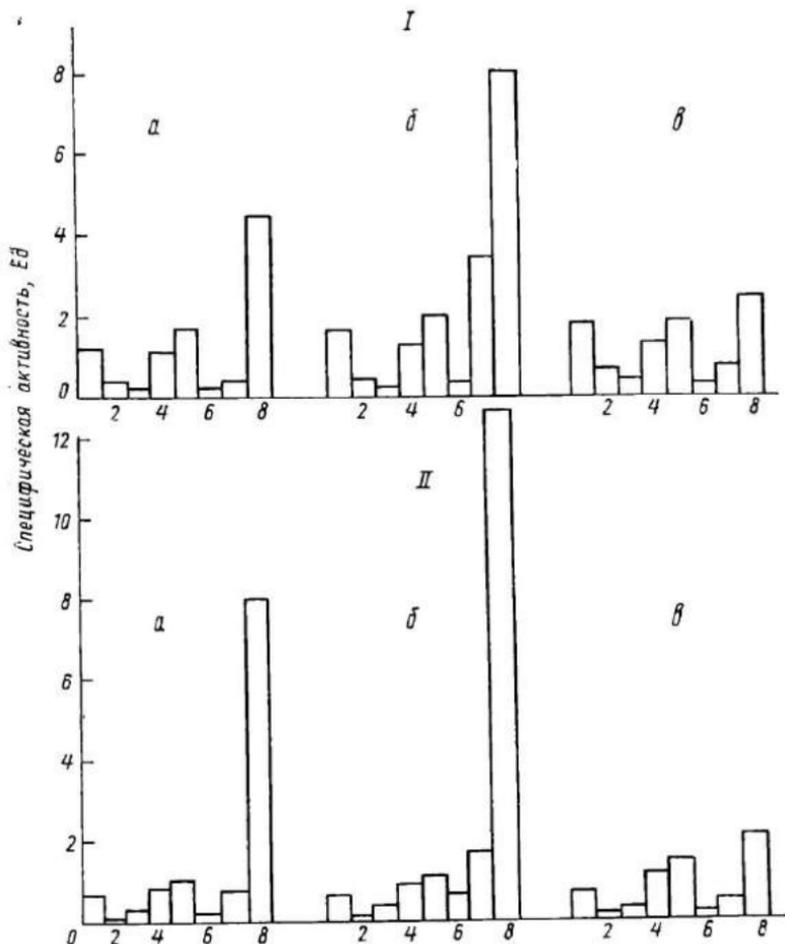


Рис. 32. Специфическая активность ферментов ЦТК у *P. shermanii* (I) и *P. petersonii* (II) (Крайнова, Бонарцева, 1973): а — аэробные условия, б — стационарные условия, в — анаэробные условия. 1 — изоцитратдегидрогеназа, 2 — аконитаза, 3 — α -кетоглутаратдегидрогеназа, 4 — цитратсинтетаза, 5 — сукцинаттиокиназа, 6 — сукцинатдегидрогеназа, 7 — фумараза, 8 — малатдегидрогеназа

экстракта также инициируют развитие, выполняя роль акцепторов водорода (Воробьева, 1959).

P. pentosaceum — один из немногих микроорганизмов, способных к анаэробному росту на средах с C_4 -спиртами, например на эритрите. При сбраживании этим микроорганизмом эритрита из смеси были выделены эритритол-Ф, эритрулозо-Ф, глицерин-Ф, Ф-глицериновая кислота, рибозо-5-Ф, ксилулезо-5-Ф, глюкозо-6-Ф, фруктозо-6-Ф, маннозо-6-Ф; фруктозо-1, 6-дифосфат и седогептулозо-7-Ф (Wawskiewich, Barker, 1968). Появление фор-

мальдегида в брожении авторы объясняют расщеплением эритритола-Ф между C_3 - и C_4 -положением. Они предполагают, что при разложении эритрита бактерии обеспечиваются фосфорилированными C_3 -, C_5 -, C_6 и C_7 -соединениями.

Количественные соотношения между продуктами брожения глицерина, эритрита, адонита и маннита сходны (Wood, Leaver, 1953). Включение меченой CO_2 при сбраживании вышеприведенных соединений и C_3 - и C_6 -субстратов было однотипно; все это указывает на отсутствие особого механизма брожения C_4 - и C_5 -соединений.

При увеличении концентрации ионов водорода в среде изменяется соотношение основных продуктов брожения: образование уксусной кислоты увеличивается ($0,77 \cdot 10^{-2}$ М при рН 6,85 и $1,33 \cdot 10^{-2}$ М при рН 4,95), а пропионовой — заметно уменьшается (с $4,56 \cdot 10^{-2}$ до $2,79 \cdot 10^{-2}$ М) (Ибрагимова и др., 1971). При снижении рН степень диссоциации органических кислот снижена; недиссоциированные молекулы более токсичны для бактерий, чем ионизированные, причем недиссоциированная пропионовая кислота токсичнее, чем уксусная. Авторы (Ибрагимова и др., 1971) считают, что неблагоприятное влияние низких значений рН на клетки нивелируется за счет сдвига процесса брожения в сторону меньшего накопления пропионатов. Под влиянием высоких концентраций лактата (4,6% лактата) и ионов водорода (рН ниже 4,95) происходит холостое сбраживание субстрата без соответствующего синтеза веществ биомассы (Ибрагимова, Сахарова, 1974), т. е. имеет место разобщение энергетического и конструктивного процессов.

Образование восстановленных продуктов увеличивается в присутствии в среде восстановителей (например H_2). В роли восстановителя-интермедиата, переносящего электроны, использовали антрахинон-2, 6-дисульфокислоту и сепальхат кобальта (Emde, Schink, 1990), культивируя бактерии в трехэлектродной системе с постоянным потенциалом в среде с глюкозой. При этом выход пропионовой кислоты был увеличен до 90—100% (против 73% в контроле). Любопытно, что использование электродной системы при выращивании бактерий на среде с лактатом существенного влияния на процесс ферментации не оказывало.

Как уже говорилось, пропионовая, уксусная, янтарная, кислоты и CO_2 являются главными, но не единственными продуктами брожения, вызываемого пропионовокислыми бактериями. Бактерии содержат ферментные системы, ответственные за образование формиата, активность которых различается у разных видов. *P. shermanii* образует до 0,07 мм формиата, а *P. arabinosum* — 0,160 мм при использовании глюкозы (Wood et al., 1956; Машур и др., 1971).

При сбраживании лактата нами было отмечено образование формиата *P. jensenii* в опытах при нейтральной или слабощелочной реакции среды, в конце брожения количество формиата снижалось. Добавление муравьинокислого натрия к лактату стиму-

дировало рост бактерий (Воробьева, 1958а). Незначительное образование формиата отмечалось при сбраживании глюкозы культурами *P. shermanii*, *P. pentosaceum*, *P. rubrum* и *P. petersonii* (Воробьева, 1972).

Формиат служит обычным продуктом при сбраживании полиспиртов пропионовыми бактериями (Wawskiewich, 1968). Многие виды пропионовых бактерий образуют в заметных количествах ацетон и диацетил (Antila, 1956/1957 Lee et al., 1969, 1970, Томка, 1949, Wood et al., 1956). При 21° выход диацетила выше, чем при 32° или при 37° (Lee et al., 1969, 1970), оптимум рН для его образования 4,0—4,5. Диацетил восстанавливается в ацетон и 2,3-бутилендиол. Внесение цитрата в молоко увеличивает выход диацетила и задерживает его превращение в восстановленные продукты. В небольших количествах бактерии образуют ацетальдегид (Keenan, Bills, 1968). Предполагают (Antilla, 1956/57), что указанные нейтральные продукты образуются не в брожении, а в результате конденсации пирувата в α -ацетомолочную кислоту. Пропионовые бактерии содержат систему декарбоксилирования α -ацетомолочной кислоты (Antilla, 1958), с чем могут быть связаны высокие количества образуемой CO_2 .

Некоторые виды пропионовых бактерий при сбраживании глюкозы образуют молочную кислоту. Ее количество варьирует в зависимости от рН, ЕН, состава среды, условий аэрации и природы штамма (Wood et al., 1937, Ichikawa, 1955, Foschino et al., 1988). Значительное количество молочной кислоты образуют разные виды пропионовых бактерий при сбраживании *L*-ксилозы и *L*-арабинозы (Wood, 1961).

3.2. Дыхание

Хотя еще ван Ниль в 1928 г. обратил внимание на окислительную способность пропионовых бактерий, а французские исследователи (Chaix, Fromageot, 1939; Chaix, Anderland, 1940), в 30—40-х годах дали количественную оценку этой способности, до 1958 г. почти никто не пытался их выращивать в аэробных условиях, находясь «в оковах» старого представления об их анаэробности. Но, как известно, «для новой истины нет ничего вреднее старого заблуждения» (Гёте), которое обычно меньше сковывает молодых людей, чем стариков, и, может быть, поэтому наши первые шаги в науке и были связаны с довольно «смелыми» по тем временам исследованиями аэробного метаболизма «анаэробных» бактерий.

Наши наблюдения о том, что пропионовые бактерии включают молекулярный кислород в обмен даже при стационарном выращивании и могут быть адаптированы к росту в аэробных условиях, были встречены скептически некоторыми специалистами, но обратили на себя внимание (если судить по количеству ссылок на работы тех лет), в результате чего последовал ряд сообщений, подтвердивших наши результаты и расширивших прежние представления о способах жизни пропионовых бактерий.

Теперь известно (Canzi et al., 1993*), что отношение пропионовых бактерий к кислороду сильно варьирует среди различных штаммов: из 4^х испытанных штаммов *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, *P. jensenii* и *P. freudenreichii* только два первых могли расти на поверхности агара в присутствии воздуха. Вместе с тем кривые роста всех штаммов почти не различались при культивировании бактерий в ферментере с концентрацией кислорода от 30 до 20 000 ppm (атм. давление), однако в последнем случае наблюдали сильную задержку роста у *P. shermanii*. В аэробных условиях все штаммы утилизировали O₂, и при атмосферной концентрации O₂ увеличивалось соотношение уксусная/пропионовая кислота.

Надо сказать, что этой проблеме «повезло», так как ее разработкой стали заниматься прекрасные специалисты в США, ФРГ, Голландии, Японии, а у нас эти исследования продолжались при участии двух талантливых наших аспирантов Г. А. Бонарцевой и О. А. Крайновой.

3.2.1. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ

ЦТК и глиоксилатный шунт. Известно, что окислительная активность бактерий складывается из слаженной работы ферментов гликолиза, цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), пентозофосфатного пути, переноса электронов в дыхательной цепи и флавинового дыхания. Показано (Крайнова, Бонарцева, 1973; Бонарцева и др., 1973), что *P. petersonii* и *P. shermanii*, выращенные в среде с глюкозой, содержат все ферменты ЦТК (рис. 32) и глиоксилатного шунта. Наиболее высокая активность цитратсинтетазы, изоцитратдегидрогеназы, аконитазы, сукцинаттиокиназы, фумаразы у *P. shermanii* и α -кетоглутаратдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы у *P. petersonii*.

Подавление скорости дыхания специфическим ингибитором ЦТК (ингибитором фумаразы) монофторацетатом в концентрации 5-10⁻³ М у *P. shermanii* на 21%, а у *P. petersonii* на 55% свидетельствует о значении ЦТК в энергетическом обмене пропионовых бактерий.

Установлено (Delwiche, Carson, 1953), что пропионовокислые бактерии способны окислять промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот (ЦТК).

В анаэробных условиях ЦТК также функционирует, при этом его роль может не ограничиваться участием в конструктивном процессе. В этом случае терминальными акцепторами электронов могут выступать нитраты или фумараты, которые пропионовые бактерии способны утилизировать. Известно, что ЦТК обеспечивает микроорганизмы предшественниками для реакций биосинтеза и играет существенную роль как в энергетическом, так и в конструктивном обмене.

* Canzi E., Puppo E. D. et al., Ann. Microbiol. Enzimol, 1993, 43, 147—157.

Интенсивность дыхания (Q_{O_2} , мкг O_2 /мг сухой биомассы/ч) пропионовокислых бактерий при окислении цетилового спирта и н-гексадекана (Воробьева и др., 1979)

Бактерии	Субстрат	Время, мин			
		30	60	90	120
<i>P. globosum</i>	спирт	38,3	43,4	42,0	45,0
	углеводород	18,2	16,0	16,0	20,0
<i>P. pentosaceum</i>	спирт	18,6	30,0	26,4	28,7
	углеводород	11,0	13,3	12,8	14,0

Окисление различных субстратов. В наших исследованиях (Воробьева, 1958а, 1959) было установлено, что *P. jensenii* использует глицерин как единственный источник углерода в синтетической среде только в аэробных условиях. Если к синтетической среде добавляли фумарат натрия, то сбраживание глицерина имело место также в анаэробных условиях: фумарат таким образом брал на себя роль акцептора электронов. Бактерии окисляют и более воосстановленные, чем глицерин, соединения, а именно алканы и длинноцепочечные первичные спирты (табл. 32). Окисление углеводов пропионовыми бактериями подавляется ингибиторами цитохромоксидаз NaN_3 (10^{-4} М) и KCN (10^{-3} М) соответственно на 88 и 96%. Подавление дыхания NaN_3 и KCN на 84 и 94% отмечено и при окислении глюкозы штаммом *P. pentosaceum* (Воробьева и др., 1978). Окисление углеводов и глюкозы пропионовыми бактериями происходит до CO_2 (рис. 33), а интермедиатами окисления гексадекана, видимо, служит цетиловый спирт и пальмитиновая кислота, обнаруженные нами (Воробьева и др., 1979) в инкубационной среде (табл. 33). В гидроксигировании алканов участвуют СО-связывающие белки под общим названием цитохром-Р-450. Поэтому заслуживает внимания факт обнаружения СО-связывающих пигментов у представителей 4 видов пропионовых бактерий (de Vries et al., 1972). Поглощение кислорода при использовании бактериями субстратов разной степени окисленности представлено в табл. 34 (Schwartz, 1973).

Наиболее активно кислород поглощается при использовании Na-лактата и глицерина (табл. 34), в случае других субстратов поглощение O_2 тем меньше, чем более окислен субстрат. Максимальную скорость дыхания име-

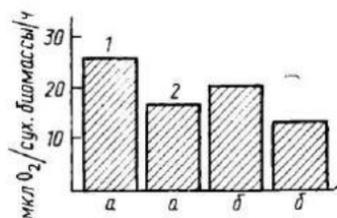


Рис. 33. Образование CO_2 и поглощение кислорода при окислении глюкозы и н-алканов штаммом *P. pentosaceum* (Воробьева и др., 1979): 1 — кислород, 2 — углекислота; а — глюкоза, б — смесь н-алканов

Образование цетилового спирта и пальмитиновой кислоты
(мкг/мг сухой биомассы) пропионовокислыми бактериями
(Воробьева и др., 1979)

Штамм	Цетиловый спирт	Пальмитиновая кислота	Штамм	Цетиловый спирт	Пальмитиновая кислота
<i>P. raffinosaceum</i>	1,5	—	<i>P. thoenii</i>	6,7	—
<i>P. jensenii</i>	7,6	13,0	<i>P. technicum</i>	2,0	1,0

ет культура *P. shermanii*, выращенная в кукурузно-глюкозной среде в стационарных (полуаэробных) условиях, несколько ниже скорость дыхания в анаэробных и в 20 раз ниже в аэробных условиях. В более богатой кукурузно-глюкозной среде клетки дышат интенсивнее, чем в полусинтетической глюкозо-пептонной; чем моложе культура, тем выше скорость дыхания. Скорость дыхания у *P. petersonii* примерно в 10 раз ниже, чем у *P. shermanii* (в кукурузно-глюкозной среде). Двухсуточная культура *P. petersonii*, выращенная в анаэроостате, поглощает кислород активнее, чем культура в аэробных и стационарных условиях (Бонарцева и др., 1973). Аналогичные наблюдения были сделаны Шварцем (Schwartz, 1973), показавшим, что предварительное выдерживание суспензии бактерий в атмосфере азота активирует поглощение ими кислорода (см. табл. 34).

Более высокую скорость дыхания у анаэробно выращенных клеток по сравнению с аэробными связывали (Бонарцева и др.,

Таблица 34

Потребление кислорода (мкМ/мин·г сырой биомассы)
пропионовокислыми бактериями при использовании
различных субстратов (Schwartz, 1973)

Субстрат	Клетки <i>P. shermanii</i>			Клетки <i>P. petersonii</i>		
	контроль	голодающие в атмосфере		контроль	голодающие в атмосфере	
		воздуха	азота		воздуха	азота
Без субстрата	3,1	0,6	0,8	3,0	0,7	0,4
D-глюкоза	4,0	2,5	2,6	3,5	1,5	1,4
D, L-лактат	9,0	5,9	10,1	10,5	4,3	6,7
Глицерин	5,5	2,4	5,3	3,7	0,9	1,4
Пируват	3,7	1,9	1,7	3,1	1,6	1,9
Сульфидат	3,9	1,4	1,4	2,8	1,4	1,7
Пропионат	4,4	1,2	5,7	4,9	0,8	1,5
Ацетат	3,4	0,4	1,0	3,2	0,7	0,5

Содержание флавинов (мкг/г) в культуре *P. shermanii* и *P. petersonii* при различных условиях аэрации (Бонарцева и др., 1973)

Форма флавина	<i>P. shermanii</i>			<i>P. petersonii</i>		
	анаэроб- ные	полу- аэробные	аэробные	анаэроб- ные	полу- аэробные	аэробные
ФАД	151	123	96	48	40	46
ФМН+витамин В ₂	39	52	20	28	16	15
ФАД+ФМН+ +витамин В ₂ (общее количество)	190	175	116	76	56	61

1973) с репрессией кислородом синтеза флавиновых ферментов (табл. 35). По-видимому, флавиновое дыхание является основным способом контакта с кислородом в первую очередь у *P. shermanii*. Высокая потребность в кислороде представляет характерную особенность «флавинового» дыхания, как и низкое число оборотов флавопротеиновых оксидаз.

Культуры, выращенные в аэробных условиях, более чувствительны к ингибитору (например, атебрину), чем анаэробные культуры. Это явление объясняется, вероятно, тем, что гликолитическая система в аэробных условиях сильно подавлена и получение энергии, как и реокисление НАД·Н, находится в большой зависимости от активности флавиновых ферментов. Вместе с тем установлено, что активность флавиновых оксидаз — НАД·Н-оксидазы и особенно пируватоксидазы — у аэробно выращенных культур ниже, чем у анаэробных (Бонарцева и др., 1973). Не только синтез флавинов, но и синтез цитохромов в аэробных условиях у *P. shermanii* и *P. freudenreichii* сильно подавлен (de Vries et al., 1972), видимо, поэтому эти штаммы медленно растут в присутствии кислорода в отличие от *P. rubrum* и *P. pentosaceum* (табл. 36). При переключении *P. freudenreichii* с анаэробного на аэробный рост в среде с лактатом наблюдали прекращение синтеза пропионовой, уксусной и янтарной кислот и аккумуляцию пирувата (рис. 34) (de Vries et al., 1972). Эти наблюдения говорили о том, что в аэробных условиях бактерии получают энергию не в процессе субстратного фосфорилирования, но скорее в результате окислительного фосфорилирования. Была определена средняя величина Y_o (вес сухой биомассы/г-атом поглощенного кислорода), равная 15. U_{ATP} (г сухой биомассы/моль АТФ) у различных микроорганизмов варьирует от 8 до 20 (Forrest, Walker, 1964). Отсюда рассчитывали, что P/O у *P. freudenreichii* должен быть в пределах 1—2 (de Vries et al., 1972).

Влияние аэрации на рост и синтез цитохромов
пропионовокислыми бактериями (de Vries et al., 1972)

Штамм	Условия роста	Скорость роста ($E_{660}/ч$)	Дифференциальная скорость синтеза цитохромов (ммоль/г сухой биомассы)
<i>P. freudenreichii</i>	анаэробные	0,050	0,23
	аэробные	0,013	0,01
<i>P. shermanii</i>	анаэробные	0,050	0,22
	аэробные	0,013	0,01
<i>P. rubrum</i>	анаэробные	0,043	0,16
	аэробные	0,050	0,06
<i>P. pentosaceum</i>	анаэробные	0,044	0,25
	аэробные	0,067	0,05

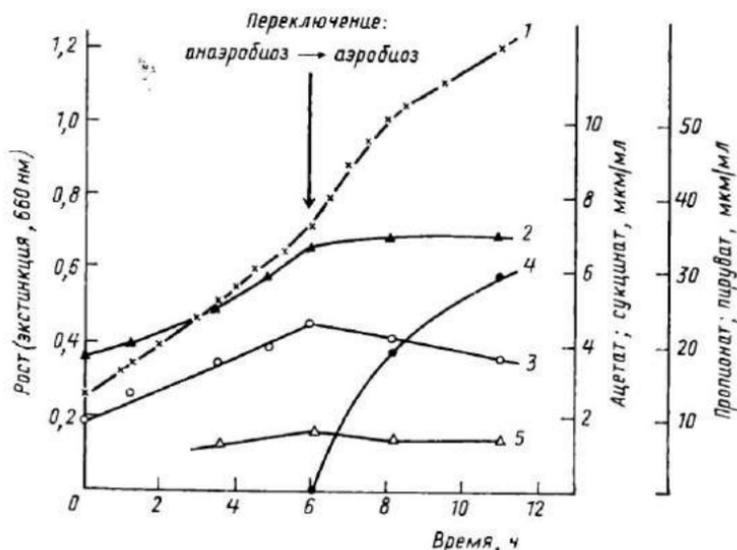


Рис. 34. Влияние переключения с анаэробного на аэробный рост и метаболизм лактата *P. freudenreichii* (de Vries et al., 1972): 1 — рост, 2 — ацетат, 3 — пропионат, 4 — пироват, 5 — сукцинат

3.2.2. ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ

Одним из методов изучения состава дыхательной цепи является использование ингибиторов, хотя дыхательный аппарат бактерий отличается от митохондрий отсутствием единообразия в действии ингибиторов и разобщителей. Дыхательная цепь многих бактерий нечувствительна к азиду, динитрофенолу, антимицину А, олигомицину. При изучении действия KCN и NaN_3 — ингибиторов цитохромоксидаз — на поглощение

Влияние ингибиторов дыхания на поглощение кислорода пропионовокислыми бактериями (Воробьева и др., 1982)

Штамм	Начальная скорость (нМ O ₂ /мг сухой биомассы/мин)	Ингибирование	
		2 мМ KCN	1 мМ NaN ₃
<i>P. coccoides</i>	131,70	6	8
<i>P. globosum</i>	80,30	33	10
<i>P. shermanii</i>	70,10	9	0
<i>P. pentosaceum</i>	75,80	7	5
<i>P. petersonii</i>	70,40	12	5
<i>P. raffinoseum</i>	73,00	9	3

кислорода клетками пропионовокислых бактерий при использовании глюкозы в качестве окисляемого субстрата были получены результаты (Воробьева и др., 1982), представленные в табл. 37. NaN₃ (1 мМ) не оказывает существенного действия, а KCN (2 мМ) проявляет заметное (33%) ингибирующее действие на поглощение O₂ в случае *P. globosum*, менее заметное (12%) — в случае *P. petersonii*; у других бактерий ингибиторное действие KCN и NaN₃ оценивалось в пределах 12—3%. Такой характер действия азида и цианида мог говорить об отсутствии у бактерий типичной цитохромоксидазы или наличии цитохромоксидазы с малой чувствительностью к KCN. Цианид ингибирует (Pritchard, Asmundson, 1980) окисление *D*- и *L*-лактата, а также НАДН-оксидазную активность в мембранных частицах *P. shermanii*. Неингибируемая цианидом (в концентрации KCN—100 мМ) часть поглощения кислорода от всего поглощенного кислорода для *L*-лактата составляла 30%, *D*-лактата — 15%, сукцината — 80% и для НАДН — 10%.

Нечувствительность дыхания к цианидам широко распространена у организмов. Ее относят за счет флавопротеинового дыхания с участием оксидаз (James, Beevers, 1950; Beevers, 1961) и резистентного к KCN, а также объясняют наличием *b*-шунта, т. е. обходного пути к кислороду от цитохрома *b* (см. ниже). Резистентное к KCN, NaN₃ и СО дыхание может быть связано с работой оксигеназ — ферментов, включающих молекулярный кислород непосредственно в субстраты. В присутствии KCN (2,5—5 мМ) наблюдали (Pritchard, Asmundson, 1980) снижение скорости поглощения и увеличение общего количества поглощенного кислорода при окислении 1 М субстрата (НАДН, *D*-, *L*-лактата), мембранной суспензией *P. pentosaceum*.

Увеличение было тем больше, чем выше концентрация KCN. При этом наблюдали (Pritchard, Asmundson, 1980) образование H₂O₂. 30% окисляемого *D*-лактата окислялось через образование H₂O₂. В отсутствие KCN H₂O₂ не образовывался.

Окисление НАДН и *L*-лактата тоже сопровождалось, хотя и меньшим, образованием H_2O_2 , поэтому полагают (Pritchard, Asmundson, 1980), что поглощение O_2 в присутствии KCN в концентрации более чем 20 мМ, по крайней мере отчасти, происходит в пути, связанном с образованием H_2O_2 . По-видимому, это путь транспорта электронов на флавопротеины и FeS-белки в дегидрогеназной системе CN-резистентного дыхания. Поскольку только 30—50% CN-резистентного дыхания дает H_2O_2 , полагают (Pritchard, Asmundson, 1980), что существуют альтернативные CN-нечувствительные оксидазы или пероксидазные системы. Пероксидаза была нами (Воробьева и др., 1986) обнаружена у *P. shermanii*. Поскольку CN-устойчивые оксидазы имеют низкое сродство к кислороду (Pritchard, Asmundson, 1980), считают, что в микроэрофильных условиях роста культуры они не играют существенной роли.

Другие ингибиторы оксидаз — CO и NaN_3 — почти не оказывали влияния на дыхательную активность культур (Бонарцева и др., 1973). Приведенные данные показывают, что пропионовые бактерии не имеют типичной цитохромоксидазы, чувствительной к окиси углерода и азиду натрия.

Особенность дыхания пропионовокислых бактерий состоит также в том (Chaix, Fromageot, 1939), что оно стимулируется H_2S , как у хлореллы, но не так, как это происходит в дыхании других микроорганизмов.

Динитрофенол и грамицидин, разобщители окисления и фосфорилирования в митохондриях, подавляют дыхание пропионовых бактерий.

Особенно чувствительны к действию разобщителей клетки *P. petersonii*: 10 мкг/мл грамицидина полностью подавляют дыхание последних, в то время как подавление дыхания на 93% у *P. shermanii* вызывается 100 мкг/мл грамицидина. 2,4-ДНФ в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М на 40% снижает скорость дыхания *P. shermanii* и нацело подавляет дыхание *P. petersonii*.

Как и следовало ожидать, ингибиторы активности флавопротеинов (атебрин, амитал и ротенон) подавляют дыхание пропионовых бактерий. Ротенон в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М снижает скорость дыхания *P. shermanii* и *P. petersonii* на 38 и 46% соответственно. Ротенон и атебрин подавляют дыхание *P. shermanii* в меньшей степени, чем *P. petersonii*, причем культура, выращенная в аэробных условиях, более чувствительная, к ингибитору, чем анаэробная культура. Это явление, вероятно, связано с тем, что гликолитическая система в аэробных условиях сильно подавлена и получение энергии, как и реокисление НАДН₂, находится в большой зависимости от активности флавиновых ферментов.

Амитал ($1 \cdot 10^{-2}$ М), специфический ингибитор начального участка дыхательной цепи НАДН₂-ФП, также подавлял дыхание *P. shermanii* на 42% и *P. petersonii* — на 50%.

Таким образом, приведенные данные показывают, что дыхание бактерий снижается под действием тех ингибиторов, которые подавляют активность оксидаз, связанных с флавопротеидами. В частности, у *P. shermanii* и *P. petersonii* обнаружена НАДН₂-оксидазная активность (Бонарцева и др., 1973б), которая во фракции фрагментов мембран в несколько раз выше, чем в бесклеточном экстракте, и у первой культуры выше, чем у второй.

Дикумарол ($1 \cdot 10^{-3}$ М) на 65%¹ подавляет НАДН₂-оксидазную активность у *P. shermanii* и на 67% — у *P. petersonii*. Цианид ($1 \cdot 10^{-3}$) полностью подавляет активность НАДН₂ — оксидазы *P. petersonii* и не оказывает заметного влияния в случае *P. shermanii*, антимицин не влияет на активность НАДН₂-оксидазы.

P. shermanii и *P. petersonii* содержат активную пируватоксидазу, относимую к флавиновым ферментам. Активность фермента у культуры, выращенной в анаэробных условиях, почти в 2 раза выше, чем у аэробной культуры. Наличие пируватоксидазы указывает на способность пропионовых бактерий непосредственно окислять субстрат (пируват) кислородом (см. выше), вместе с тем «флавиновое дыхание», видимо, может происходить и в анаэробных условиях за счет иных акцепторов электронов, чем кислород.

3.2.3. ЦЕПЬ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ

Связанная с мембранами электронтранспортная система (ЭТС) катализирует перенос восстановленных эквивалентов с НАДН, глицерофосфата, лактата на кислород и фумарат (Sone, 1972; de Vries et al., 1973, 1977). Клетки *P. pentosaceum* содержат конститутивную нитратредуктазу и восстанавливают нитраты как конечные акцепторы электронов при утилизации лактата. Нитратное дыхание связано с генерацией АТФ (van Gent-Ruijters et al., 1976). Показано (Бонарцева и др., 1973), что активность НАДН₂- и НАДФН₂-дегидрогеназ почти в 10 раз выше во фракции осколков мембран, чем в бесклеточном экстракте, у *P. petersonii* активность НАДН₂-дегидрогеназы — в 3,5 раза, а НАДФН₂-дегидрогеназы незначительно выше во фракции осколков мембран, чем в бесклеточном экстракте (Бонарцева и др., 1973).

Дикумарол ($3 \cdot 10^{-4}$ М) подавляет на 60 и 65% активность НАДН₂-дегидрогеназ и на 82 и 90% — активность НАДФН₂-дегидрогеназ у *P. shermanii* и *P. petersonii* соответственно. Этот факт свидетельствует о том, что указанные дегидрогеназы в цепи переноса электронов пропионовых бактерий связаны с менадионом. Очищенная в 30 раз НАДН₂-дегидрогеназа *P. shermanii* имеет молекулярную массу 215000 и адсорбционный максимум при 408 нм, что свидетельствует о содержании Fe-флавина. Лучшим акцептором электронов, по данным вышеназванных авторов, является феррицианид. Если принять специфическую активность фермента с феррицианидом за 100, то для дихлорфенолиндофе-

нола она выражается величиной 1,2, для менадиона — 0,6, цитохрома *c* — 0,5 и кислорода — 0,001. Имеется как растворимая, так и связанная с частицами НАДН₂-дегидрогеназа. *P. shermanii* и *P. petersonii* содержат глюкозодегидрогеназу и сукцинатдегидрогеназу, прочно связанные в системе дыхательной цепи (табл. 38). Атебрин ($1 \cdot 10^{-3}$ М) подавляет активность сукцинатдегидрогеназы у *P. shermanii* на 50% и у *P. petersonii* — на 40%; этот факт, наряду со способностью сукцинатдегидрогеназы использовать типичный акцептор электронов флавиновых ферментов — 2,6-дихлорфенолиндофенол, указывает на его флавиновую природу.

Таблица 38

Специфическая активность дегидрогеназ дыхательной цепи у *P. shermanii* и *P. petersonii* (Бонарцева и др., 1973)

Фермент	Вид бактерий	Фракция осколков мембран	Бесклеточный экстракт
НАДН ₂ -дегидрогеназа	<i>P. shermanii</i>	8,50	0,85
	<i>P. petersonii</i>	1,43	0,67
НАДФН ₂ -дегидрогеназа	<i>P. shermanii</i>	10,0	1,05
	<i>P. petersonii</i>	2,66	2,38
Сукцинатдегидрогеназа	<i>P. shermanii</i>	2,48	1,43
	<i>P. petersonii</i>	0,14	3,10
Глюкозодегидрогеназа	<i>P. shermanii</i>	13,3	0,95
	<i>P. petersonii</i>	2,3	0,81

Вместе с тем установлено (Бонарцева и др., 1973), что дикумарол ($1 \cdot 10^{-3}$ М) не подавляет активность сукцинатдегидрогеназы пропионовых бактерий, следовательно, в цепи переноса электронов сукцинатдегидрогеназа не связана с витамином К.

В клетках другого вида пропионовых бактерий — *P. arabinosum* — обнаружили НАД-независимую флавопротеиновую оксидазу — глицерол-3-фосфат-дегидрогеназу, локализованную во фракции частиц (Sone, 1972). В состав простетической группы фермента входило негеминовое железо и флавины. Хорошим акцептором электронов для фермента служили дихлорфенолиндофенол, феназинметасульфат и феррицианид; молекулярный кислород был плохим акцептором электронов, и Н₂О₂, образованная при взаимодействии с кислородом, инактивировала фермент. Амитал, п-ХМБ, дипиридил, тиноилтрифторацетон, дикумарол, а также облучение ферментного препарата ультрафиолетом (360 нм) приводило к инаktivации глицеролфосфатдегидрогеназы. Полагают, что менадионы представляют компоненты цепи переноса электронов.

Нами впервые установлено наличие нафтохинонов у пропионовых бактерий (Бонарцева и др., 1973б). Данные о количестве

Содержание хинонов в биомассе пропионовокислых бактерий (Бонарцева и др., 1973б)

Вид бактерий	Условия выращивания	Нафтохиноны, мкг/г сухой биомассы
<i>P. shermanii</i>	анаэробные	43,2
	полуаэробные	45,6
	аэробные	50,4
<i>P. petersonii</i>	анаэробные	42,2
	полуаэробные	43,2
	аэробные	43,2

нафтохинонов у *P. petersonii* и *P. shermanii* представлены в табл. 39. Хиноны реагируют с НАДН₂, флавопротендами, цитохромом *b* и *c*.

Кокс (Cox et al., 1970) показал, что убихиноны в ЦПЭ *E. coli* могут участвовать дважды: до и после цитохрома *b*, при окислении НАДН₂ лактата и малата. Вместе с тем имеются данные о хиноннезависимых путях электронного транспорта.

Возможным компонентом дыхательной цепи может быть негеминоное железо, которое реагирует с кислородом на уровне, близком к флавопротендам, и может служить, таким образом, «альтернативной оксидазой», проявляющей резистентность к цианидам (Allen, Beard, 1965).

Фракция осколков мембран *P. shermanii* и *P. petersonii* содержит негеминоное железо (Бонарцева и др., 1973б). Во фракции мембран *P. petersonii*, более аэробной культуры, содержание негеминового железа выше, чем у *P. shermanii*. В аэробных условиях количество негеминового железа у *P. petersonii* почти в 4 раза больше, чем в анаэробных (табл. 40). Мембраны *P. shermanii* содержат два различных компонента цитохрома *b*: *b*₅₅₆ и *b*₅₆₂.

Мембранные суспензии клеток *P. pentosaceum*, выращенных с лактатом и нитратами, восстанавливали цитохром *b* в присутствии *L*-лактата и НАДН. При добавлении к суспензии нитратов и

Т а б л и ц а 40

Содержание негеминового железа во фракции осколков мембран *P. shermanii* и *P. petersonii* (Бонарцева и др., 1973)

Виды бактерий	Условия выращивания	Fe негем, мкМ/мг белка
<i>P. shermanii</i>	аэробные	2,3
	анаэробные	2,9
<i>P. petersonii</i>	аэробные	11,2
	анаэробные	3,7

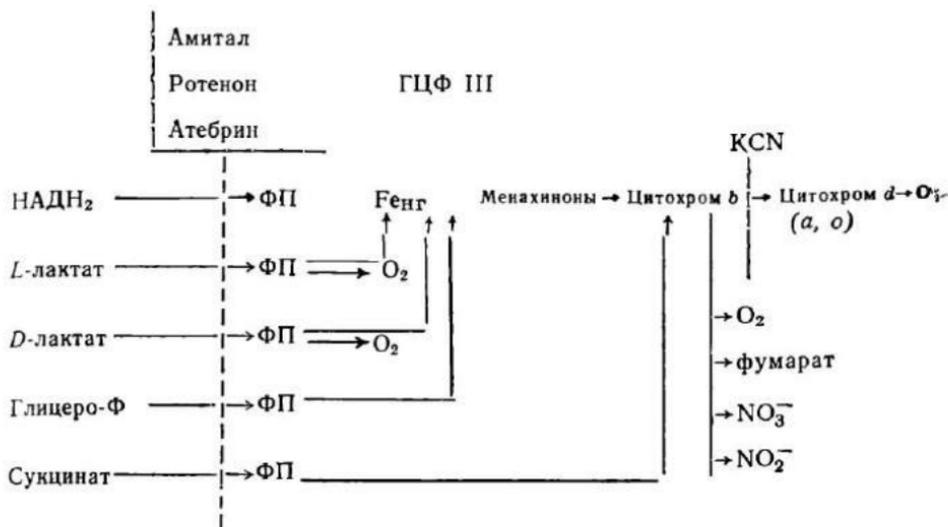
фумарата (van Gent-Ruijters et al., 1976) в анаэробных условиях или при пропуске кислорода (Pritchard, Asmundson, 1980) восстановленный цитохром *b* окислялся. Если мембранную суспензию окисляли кислородом, то восстановление цитохрома такой суспензией быстрее происходило в присутствии НАДН, чем *L*-лактата; это показывает, что НАДН является более эффективным донором электронов для O_2 , чем лактат, из-за более высокой активности НАДН-оксидазы по сравнению с лактатоксидазой у *P. pentosaceum* (van Gent-Ruijters et al., 1976). KCN (10 мМ) ингибирует реокисление восстановленного цитохрома *b* кислородом и не ингибирует его реокисление фумаратом у *P. shermanii* (Pritchard, Asmundson, 1980). Приведенные факты иллюстрируют разные возможные пути транспорта электронов, вовлекающие цитохром *b* у пропионовых бактерий.

На основании спектроскопических исследований считают цитохром *d* (d_{627}) наиболее вероятным кандидатом на роль терминальной оксидазы (Pritchard, Asmundson, 1980), хотя в клетках бактерий обнаруживали (Бонарцева и др., 1973) небольшой пик цитохрома *a* и СО-связывающий цитохром — предположительно цитохром *o* (de Vries et al., 1972). Но относительно высокая концентрация цианида, необходимая для ингибирования оксидазной активности (Pritchard, Asmundson, 1980), более характерна для цитохрома *d*, чем для *a*- и *o*-типа (Arima, Oka, 1965).

Фумаратное дыхание пропионовых бактерий не чувствительно к цианидам (10 мМ) в отличие от кислородного дыхания, если окислению подвергается НАДН, *D*- или *L*-лактат. При десятикратном увеличении концентрации KCN наблюдали сильное ингибирование фумаратредуктазной активности, но с *L*-лактатом в качестве донора электронов — меньшее, чем с двумя другими донорами. Значит, KCN в высокой концентрации вызывает ингибирование иного сайта, чем терминальная оксидаза, и этот сайт может различаться в случае разных субстратов (Pritchard, Asmundson, 1980). Фумарат оказывает сильное ингибиторное действие на поглощение кислорода (Sone, 1972).

В свою очередь, НАД-фумарат редуктазная активность сильно снижена при выращивании клеток с нитратами и еще сильнее — в присутствии кислорода. Нитраты оказывают небольшое ингибирующее действие на активность фумаратредуктазы. Нитратредуктазная активность *P. pentosaceum* обнаруживается у анаэробно выращенных клеток в отсутствие нитратов, так как соответствующая редуктаза является конститутивным ферментом. Но самую высокую нитратредуктазную активность имели клетки *P. pentosaceum* (van Gent-Ruijters et al., 1976), выращенные в присутствии нитрата (в два раза выше, чем без него), а самую низкую — у клеток, выращенных в присутствии низких концентраций кислорода (10 мкМ), следовательно, кислород выступает сильным репрессором фумарат- и нитратредуктазы пропионовокислых бактерий. В качестве конечного акцептора электронов может выступать гексацианоферрат (ГЦФ) (см. ниже).

На основании проведенных исследований ЦПЭ у пропионово-кислых бактерий может быть представлена следующим образом:



Сплошные линии обозначают пути переноса электронов, прерывистые линии — действие ингибиторов.

Электроны от цитохрома *b* могут переноситься на кислород непосредственно. Возможным конечным акцептором электронов служат нитраты и нитриты.

Перенос электронов в приведенной дыхательной цепи пропионовых бактерий может сопровождаться образованием АТФ. Пунктами сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях являются следующие участки цепи: НАД—ФП, нафто(уби)хиноны—цитохромы *b*—*c*, терминальные оксидазы—O₂. У большинства исследованных бактерий отношение P/O оказывалось ниже единицы (Гельман и др., 1972).

3.2.4. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Из вышеизложенного следует, что к 80-м годам накоплено уже немало фактов, свидетельствующих в пользу того, что пропионовые бактерии потенциально экипированы для аэробного существования. Одним из важных фактов было обнаружение у них окислительного фосфорилирования (Брюхачева и др., 1975) в дыхательной цепи.

Эффективность окислительного фосфорилирования определяли с использованием меченого фосфора. Метод основан на анализе распределения радиоактивного фосфора, включаемого фосфорилирующими мембранными частицами в органическую фазу за короткие промежутки времени. Состав реакционной смеси (в мкМ): К-фосфатный буфер pH 7,4—1,0; MgCl₂ — 6,0; глюко-

за — 25,0; АДФ — 0,1; НАД·Н — 1,0; гексокиназа — 43 ед.; неорганический фосфор (^{32}P) без пирофосфата — 12 имп/с; частицы (2,5 мг по белку); буфер трис-НСI рН 7,4; общий объем смеси — 2,0 мл. Радиоактивный фосфор, включенный в органическую фазу (АТФ, глюкозо-6-фосфат), просчитывали на счетчике ПСТ-100.

Количество этерифицированного фосфора определяли по формуле

$$\frac{(\text{имп/мин Р лаб АТФ}) \text{ опыт} - (\text{имп/мин Р}) \text{ контроль}}{\text{имп/мин мк атом ортофосфата среды}} =$$

$$= \text{мкатома терминальной группы АТФ.}$$

Поглощение кислорода определяли спектрофотометрически по окислению НАД·Н₂ при 340 нм. Из полученных данных находили Р/НАД·Н₂ (отношение количеств этерифицированного фосфора к количеству окисленного НАД·Н₂).

Было показано, что прохождение электронов по дыхательной цепи *P. shermanii* и *P. petersonii* сопровождается окислительным фосфорилированием с коэффициентом Р/НАД·Н₂ соответственно 0,34 и 0,49 при выращивании бактерий в аэробных условиях. *P. shermanii* более чувствительна к токсическому действию кислорода, чем *P. petersonii*, но в анаэробных условиях, у обоих штаммов значение Р/НАДН₂ окис снижено и составляет у *P. shermanii* — 0,02, а у *P. petersonii* — 0,26, что соответственно в 17 и в 2 раза ниже, чем в аэробных условиях.

Окислительное фосфорилирование было продемонстрировано также косвенным путем по расходу субстрата на синтез единицы биомассы (Y_c). Из данных табл. 41 следует, что максимальный экономический коэффициент (Y_c) обе культуры имеют в аэробных условиях роста, следовательно, как в случае *P. petersonii*, так и *P. shermanii* кислород увеличивает эффективность использования субстрата. Из сопоставления величин Y_c у одной культуры при аэрации и в анаэробных условиях можно видеть, что у *P. petersonii* кислород увеличивает выход АТФ при использовании единицы субстрата в 2,5 раза.

У *P. shermanii* разница в количестве получаемой энергии в разных условиях аэрации невелики. Поэтому глубокой перестройки метаболизма при переходе от анаэробных к аэробным условиям у *P. shermanii* нет. В анаэробных условиях выход АТФ на 1 моль сброженной глюкозы у *P. shermanii* выше, чем у *P. petersonii*, и достигает 3,5 моль; у *P. petersonii* — 2,03 моль. Отношение Р/НАД·Н₂ окис с фумаратом как акцептором электронов для *P. shermanii* — 0,021 и для *P. petersonii* — 0,32 (в аэробных условиях — 0,34 и 0,49 соответственно).

На основании расчетных данных (Y_c и $Y_{\text{АТФ}}$) считают, что анаэробный транспорт электронов на NO_3^- у *P. pentosaceum* также связан с окислительным фосфорилированием (van Gent-Ruijters et al., 1975). Предполагают, что 1 моль АТФ образуется при

Потребление глюкозы и накопление биомассы *P. shermanii* и *P. petersonii* в разных условиях аэрации* (Брюхачева и др., 1975) (возраст культур — 24 ч)

Вид бактерии	Условия выращивания	Количество потребленной глюкозы, г	Количество выросшей биомассы, г/л	У субстрата/ (г сухой биомассы/моль субстрата)	Количество молей АТФ, образованных на моль использованного субстрата
<i>P. shermanii</i>	аэробные	6,10	1,58	46,7	4,67
	анаэробные	10,90	2,12	35,0	3,50
<i>P. petersonii</i>	аэробные	7,60	1,98	47,0	4,70
	анаэробные	4,12	0,47	20,3	2,03

* Расчет количества образованных молей АТФ на моль использованного субстрата основан на известной величине $Y_{\text{АТФ}}$ вычисленной Бочоп и Эльсденом (Bauchop, Elsdon, 1960), которые установили, что для большого числа микроорганизмов расходу 1 моля АТФ соответствует образование около 10 г сухой биомассы.

переносе $2\bar{e}$ от лактата и глицеро-Ф к NO_3^- ($\text{P}/\text{NO}_3^- = 1$) и 2 моля АТФ — при переносе пары \bar{e} от $\text{НАДН} \rightarrow \text{NO}_3^-$ ($\text{P}/\text{NO}_3^- = 2$).

Поглощение кислорода целыми клетками, клеточным экстрактом и фракцией мембран *P. shermanii* значительно выше, чем у *P. petersonii* (Бонарцева и др., 1973), а величина $\text{P}/\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ окис — ниже. Значит, только часть поглощенного O_2 у *P. shermanii* используется в дыхании, связанном с синтезом АТФ. Другая и большая часть O_2 не связана с накоплением энергии.

Одной из причин низкой эффективности окислительного фосфорилирования у бактерий может быть наличие обходных, нефосфорилирующих путей, что приводит к «свободному окислению». По-видимому, пропионовокислые бактерии имеют такого рода обходные пути, о чем свидетельствует окисление НАДН_2 не только фракцией частиц, но и в растворимой «нефосфорилирующей» фракции (Бонарцева и др., 1973). Растворимая фракция пропионовокислых бактерий не осуществляет окислительное фосфорилирование, причем окисление НАДН_2 нечувствительно к КСН ($1 \cdot 10^{-3}$ М) ингибитору цитохромоксидаз (Брюхачева и др., 1975).

Таким образом, *P. shermanii* и *P. petersonii* осуществляют окисление НАДН_2 как в мембранной, так и в растворимой фракции. Только окисление НАДН_2 во фракции осколков мембран связано с запасанием энергии.

Окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи *P. shermanii* и *P. petersonii* чувствительно к разобщителям и ингибиторам: 2,4-ДНФ в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л снижает $\text{P}/\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ у обеих культур на 20—40%; грамицидин ($1 \cdot 10^{-3}$ М) —

на 60%; о-фенантролин ($1 \cdot 10^{-4}$ М) у *P. shermanii* — на 20%, у *P. petersonii* — на 80%. Значительное подавление окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи *P. petersonii* о-фенантролином по сравнению с *P. shermanii* может свидетельствовать в пользу существенной роли негеминового железа в процессе окислительного фосфорилирования у *P. petersonii*.

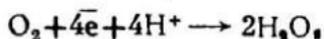
Предварительное облучение мембран УФ приводило к снижению величины Р/НАД·Н₂ у *P. shermanii* (аэробный вариант) на 40%, у *P. petersonii* (аэробный вариант) — на 85%.

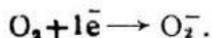
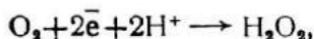
Приведенные выше данные указывают на возможное участие (прямое или косвенное) таких компонентов дыхательной цепи, как витамин К₂, цитохромы, негеминовое Fe в процессе фосфорилирующего окисления у пропионовокислых бактерий.

Кроме нитратов, О₂ и fumarата в качестве конечных акцепторов электронов у пропионовокислых бактерий обнаружен (Emde, Schink, 1990) 3-й путь — гексацианоферрат (III) (ГЦФ, III) в комбинации с регулируемыми потенциал электродами, позволяющим сдвигать брожение в сторону большего образования ацетата. При периодическом культивировании *P. freudenreichii* DSM 20271 в биореакторе с трехэлектронной системой стабилизации потенциала и ГЦФ (III) в концентрации 0,25 мМ в качестве медиатора наблюдали (Emde, Schink, 1990) полное восстановление последнего при использовании лактата и глицерина как субстратов. При увеличении концентрации ГЦФ (III) до 8 мМ выход биомассы увеличивался и брожение сдвигалось в сторону большего образования ацетата. В экспериментах со стабилизированным потенциалом глицерин, лактат и пропионат окислялись до ацетата и СО₂, а электроны количественно переносились на работающий электрод. Выход биомассы при этих условиях составлял 29,0, 13,4 и 14,2 г/моль соответственно глицерина, лактата и пропионата, что указывало на возможное участие окислительного фосфорилирования наряду с субстратным при генерации АТФ. Потенциал \bar{e} , переносимых на ГЦФ (III) — 80—140 мВ. Если принять, что минимум $\Delta E_0 \sim 140$ мВ необходим для транслокации одного протона через цитоплазматическую мембрану, то при окислительном фосфорилировании при окислении глицерина, лактата и пропионата в ацетат выход АТФ должен составлять соответственно 1,0, 0,66 и 0,66М. Экспериментально полученные выходы биомассы находились в соответствии с рассчитанными выходами АТФ. Они также показывали, что восстановление ГЦФ ($F_0 = +430$ мВ) происходит в области потенциала менахинонов.

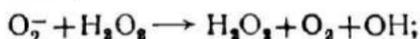
3.2.5. АНТИОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ЗАЩИТА

При контакте биологических систем с кислородом возможно 3 уровня его восстановления:

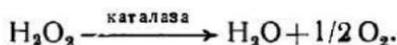
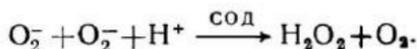




Восстановление до воды происходит при работе дыхательной цепи, завершаемой терминальными оксидазами, восстановление до H_2O_2 связано с участием ФП во флавиновом дыхании, а супероксидные радикалы (O_2^-) возникают при работе дыхательной цепи и в ряде биологических процессов. Перекись водорода токсична для клеток, которые содержат каталазу и/или пероксидазу, ее разлагающие. Супероксидные радикалы не только токсичны для организма, но еще и провоцируют образование продуктов более токсичных, чем они сами — синглетного кислорода и гидроксильных радикалов;



Поэтому почти у всех аэробных и аэротолерантных организмов есть фермент — супероксиддисмутаза (СОД), которая улавливает радикалы



Ферменты СОД, каталазу и пероксидазу рассматривают как антиокислительную защиту клеток. Как следует из вышеприведенных фактов, CN-резистентное дыхание пропионовокислых бактерий ответственно за большую часть поглощаемого клетками кислорода, при котором регистрируется образование H_2O_2 . Это же дыхание служит основным источником супероксидных радикалов. Было показано (Vorobjeva, Краева, 1982), что окисление НАДН мембранными суспензиями трех штаммов, представляющих три различных вида пропионовых бактерий, приводит к образованию супероксидных радикалов (табл. 42). Окисление сукцината не было связано с образованием заметных количеств супероксидных радикалов. Наибольшая скорость супероксидпродукции обнаружена у *P. globosum*, далее у *P. coccoides* и *P. shermanii*. Антимидин ингибировал НАДН-оксидазную активность всех штаммов и одновременно увеличивал продукцию супероксидных радикалов на 32, 36 и 15% соответственно у *P. shermanii*, *P. globosum* и *P. coccoides*; это указывало, что образование супероксидных радикалов у пропионовых бактерий происходит на участке дыхательного пути, предшествующего месту действия антимидина. Удаление радикалов осуществляет СОД, обнаруженная у *P. shermanii* (Schwartz, Sporckenbach, 1975; Pritchard et al., 1977). Применяв электрофорез белков в ПААГ, нам уда-

Таблица 42

НАДН-оксидазная и
супероксидпродуцирующая
активность у

P. coccoides, *P. globosum* и *P. shermanii* (Vorobjeva, Краева, 1982)

Штаммы	НАДН-оксидаза нмоль O ₂ /мин/ мг-белка	Скорость суперпро- дукции, нмоль/мин/ мг-белка
<i>P. globosum</i>	420	36,2±3,2
<i>P. coccoides</i>	330	13,6±1,5
<i>P. shermanii</i>	280	8,4±1,4

Таблица 43

Влияние аэрации на
активность супероксиддисмутазы
(Е/мг белка) пропионовокислых
бактерий (Краева, Воробьева,
1981)

Штаммы	Условия выращивания	
	анаэроб- ные	аэробные
<i>P. coccoides</i>	20	26
<i>P. shermanii</i>	11	17
<i>P. globosum</i>	22	29
<i>P. pentosaceum</i>	11	14
<i>P. petersonii</i>	8	14
<i>P. raffinoseum</i>	9	12

лось (Vorobjeva, Краева, 1982) локализовать СОД из *P. globosum*, *P. shermanii*, *P. coccoides*, *P. petersonii*, *P. pentosaceum* и *P. raffinoseum*, представленные одной изозимной формой; СОД *P. globosum* содержат железо и проявляет устойчивость к действию KCN (10 ммоль), NaN₃ (1 ммоль) на 25—30% ингибирует, а H₂O₂ (5 ммоль) инактивирует фермент. Такое отношение к действию ингибиторов и H₂O₂ характерно для Fe-содержащих СОД. По нашим данным (Vorobjeva, Краева, 1982), молекулярная масса СОД — 45 000±5 000 в нативных условиях; в денатурирующих условиях — 22 000±2 000, следовательно, СОД *P. globosum* состоит из двух идентичных субъединиц, не связанных ковалентно. Фермент термостабилен: при нагревании в течение 10 мин при 70° и pH 7,2 полностью сохраняет активность, а при нагревании при 90° 5 мин активность снижается на 84%. Кипячение в течение 5 мин полностью инактивирует фермент. Оптимум pH фермента 6,1—7,5; СОД *P. globosum* локализована в растворимой фракции клеток и не связана с мембраной (Краева, Воробьева, 1981). Активность СОД у пропионовых бактерий мало зависит от условий культивирования и в аэробных условиях лишь ненамного выше, чем в анаэробных (табл. 43).

В хемостатной культуре *P. shermanii* наблюдали (Pritchard et al., 1977) увеличение активности СОД с возрастанием pO₂ от 0 до 85 мм Hg: при дальнейшем увеличении pO₂ активность СОД снижалась, но проявлялась даже при токсичных для клеток концентрациях кислорода.

Большей активностью СОД (и каталазы) соответствует и большая супероксидпродуцирующая способность штаммов (сравните табл. 42 и 43), что свидетельствует о важной роли этих ферментов в избавлении клеток от супероксидных радикалов. Ниже (гл. 4) представлены данные о свойствах каталазы и пероксидазы пропионовых бактерий, которые в сочетании с СОД создают клеткам антиокислительную защиту.

3.2.6. ЭФФЕКТ ПАСТЕРА.
ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ С АНАЭРОБНОГО НА АЭРОБНЫЙ
ПУТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ЭНЕРГИИ

Эффект Пастера, хотя менее выраженный, чем у дрожжей, был открыт у *P. pentosaceum* еще в 1939 г. (Chaix, Fromageot, 1939). Как известно, он проявляется в том, что в анаэробных условиях дрожжи утилизируют больше субстрата для синтеза единицы биомассы, чем в аэробных. Механизм эффекта Пастера у дрожжей связывают с изменением активности ферментов гексозомонофосфатного пути и состояния клеточной мембраны при переходе от аэробного к анаэробному метаболизму (Doelle, 1980), хотя единого мнения на этот счет нет (Lagukas, 1987). Эффект Пастера у пропионовых бактерий связан с уровнем синтеза катаболических ферментов. Спиртовое брожение у дрожжей рассматривают (Берри, 1985) как способ перенесения неблагоприятных условий (лишение кислорода), в отличие от пропионовокислого брожения у бактерий, являющегося нормальным способом существования, хотя переход к аэробному метаболизму тоже возможен.

Если культуру *P. pentosaceum*, растущую в микроаэрофильных условиях (10 мк/моль O_2) внезапно поместить в анаэробные условия, ее рост почти останавливается, аккумулируется пируват (меньше, чем в аэробных условиях) и начинается образование пропионата и ацетата. Через несколько часов восстанавливается нормальный ход брожения, а также рост и утилизация лактата (van Gent-Ruijters, 1976). Полагают, что задержка в восстановлении брожения связана с репрессией кислородом синтеза цитохрома *b*, фумаратредуктазы и других ферментов комплекса, участвующего в брожении. Следовательно, эффект Пастера у пропионовых бактерий регулируется не на уровне активности, но на уровне синтеза катаболических ферментов.

Если культуру *P. pentosaceum*, растущую в анаэробных условиях, резко переключить на аэробный метаболизм (10 мк/моль O_2), то вначале рост увеличивается, но образование ацетата из лактата и глюкозы снижено, образование пропионата полностью подавлено, а в среде аккумулируется пируват (van Gent-Ruijters et al., 1976; Schwartz et al., 1976). При переходе от анаэробного метаболизма к аэробному (10 мк/моль O_2) наблюдали (van Gent-Ruijters et al., 1976) снижение активности ферментов ЦТК: малатдегидрогеназы, фумаразы, а также НАДН-оксидазы, лактатоксидазы, НАДН-зависимой фумаратредуктазы, лактатзависимой нитратредуктазы.

Культура *P. shermanii*, помещенная в строго аэробные условия (на поверхность чашки Петри), вообще не растет и, как стало ясно (de Vries et al., 1972), отсутствие роста объясняется подавлением синтеза цитохромов (*b*, *d*, *a*), что, в свою очередь, связано с репрессией кислородом синтеза АЛК-синтетазы и АЛК-дегидратазы (Menon, Shemin, 1967).

P. shermanii и *P. freudenreichii* более медленно растут при аэрации, чем *P. pentosaceum* и *P. rubrum*, и (de Vries et al., 1972) степень ингибирования синтеза цитохромов выше у штаммов, более чувствительных к действию кислорода. При полном ингибировании синтеза цитохромов высокими концентрациями кислорода бактерии не могут осуществлять окислительное фосфорилирование и расти. Однако даже анаэробную *P. shermanii* можно адаптировать к существованию в аэробных условиях при длительном хемотратном культивировании. При этом, как оказалось (Pritchard et al., 1977), очень важен определенный уровень содержания кислорода в среде. При парциальном давлении O_2 (pO_2) от 0 до 42 мм Hg наблюдали снижение выхода биомассы, снижение активности ферментов, связанных с мембраной: НАДН-оксидазы, сукцинатдегидрогеназы и двух лактатдегидрогеназ (при pO_2 20—42 мм Hg); активность цитохрома *b* на 25%; активность растворимых ферментов малатдегидрогеназы и фумаразы снижалась при увеличении pO_2 с 10 до 42 мм Hg по сравнению с анаэробными условиями; выращивания, а активность СОД увеличивалась с увеличением pO_2 от 0 до 85 мм Hg. Содержание цитохромов b_{560} , a_{600} и d_{628} было минимальным при pO_2 между 20 и 42 мм Hg. Весьма примечательно, что при увеличении содержания кислорода до 330 мм Hg (pO_2 42—330 мм Hg) наблюдали увеличение выхода биомассы в 3 раза по сравнению с анаэробными условиями, увеличение активности мембраносвязанных ферментов, содержания цитохромов и отношения цитохромов *a* и *d* к цитохрому *b*; отношение b_{560} /общее содержание цитохромов снижалось с 71% (анаэробные условия) до 48%, уровень СО-связывающего цитохрома увеличивался при pO_2 330 мм Hg (Pritchard et al., 1977). 330 мм Hg было наиболее высоким значением pO_2 , при котором устанавливалось стационарное состояние. Более 70% метаболизированного лактата превращалось в ацетат и CO_2 при соответствующем снижении выхода пропионата. Путем расчета Y_{ATP} и Y_C было показано (Pritchard et al., 1977), что синтез АТФ происходил не только при субстратном, но и при окислительном фосфорилировании.

Когда концентрация кислорода превышала способность культуры его утилизировать и кислород оставался в растворенном свободном виде в среде, что имело место при pO_2 520 мм Hg, то рост культуры был подавлен, инактивированы НАДФН-оксидаза и *L*-лактатдегидрогеназа, снижена активность СОД, но активность *D*-лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы сохранялась. Чем объясняется описанный характер поведения хемотратной культуры *P. shermanii*? Считают (Pritchard et al., 1977), что при низком (20—42 мм Hg) парциальном давлении кислорода бактерии оказываются в кислородной «ловушке»; pO_2 достаточно для репрессии ферментных систем, вовлекаемых в анаэробный метаболизм, и разрушения редокс-баланса компонентов клеток, адаптированных к анаэробному существованию, но недостаточно для индукции синтеза ферментов транспорта электронов, необ-

ходимых для аэробного метаболизма. Если pO_2 находится в пределах 40—300 мм Hg, то такая индукция (адаптации) возможна, что позволяет культуре вести энергетически более выгодный аэробный образ жизни.

Предел аэротолерантности пропионовых бактерий достигается тогда (Schwartz, 1973), когда окислительные системы НАДН-оксидаза, *L*-лактатдегидрогеназа, а также СОД инактивируются под действием растворенного кислорода, который аккумулируется в среде.

Глава 4.

КАК БАКТЕРИИ СИНТЕЗИРУЮТ КЛЕТОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

4.1. ПИТАНИЕ

4.1.1. ИСТОЧНИКИ АЗОТА

Пропионовые бактерии могут синтезировать все аминокислоты за счет ассимиляции азота $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Воробьева, 1958а; Кучерас, Гебгардт, 1972). Имеются данные (Joseph, Wixom, 1972) о том, что *P. shermanii* ATCC 9614 не растет, если единственным источником азота в среде является сернокислый аммоний; *P. arabinosum* растет плохо, а *P. pentosaceum* почти также хорошо, как на смеси из 18 аминокислот. Видимо, способность к усвоению неорганического азота зависит от видовой и, возможно, штаммовой принадлежности, количества и возраста инокулята, состава фоновых сред.

Давно было известно, что пропионовые бактерии содержат пептидазы (Berger et al., 1938), при участии которых обеспечивают себя незаменимыми аминокислотами. У 7 штаммов, используемых в производстве швейцарских сыров на стадии созревания, максимумы протеолитической активности наблюдали (Derez et al., 1988) при температуре 15, 30, 37 и 45°. При 21° ни один из штаммов протеолитической активностью не обладал. Полагают, что сложная картина температурной зависимости обусловлена присутствием в микроорганизмах нескольких ферментных систем. РН-оптимум большинства штаммов находится в интервале 5,7—6,1, за исключением *P. acidipropionici*, активность которых слабо зависит от рН в интервале 5,1—6,4. При развитии пропионовых бактерий в финских сырах («эмментальском» и *Gruyere*) наблюдали (Antila, Antila, 1968) накопление пролина, с которым связывают аромат твердых сычужных сыров. Аминокислоты стимулируют рост бактерий, но не существенны для него.

Исключение из синтетической среды, содержащей 18 аминокислот, группы аспарагиновой кислоты (лизина, метионина, треонина, аспарагиновой кислоты), вызвало наименьшую задержку роста *P. shermanii* и *P. arabinosum*; наибольшая задержка роста имела место при извлечении из среды группы глутаминовой кислоты (глутаминовой кислоты, аргинина, пролина). Внесение в среду с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ глутамата, орнитина, цитруллина и особенно аргинина вызывало значительный стимулирующий эффект (Joseph, Wixom, 1972), что предполагает наличие у пропионовых бактерий орнитин-уреазного цикла, связанного с взаимопревращением пептидглеродных аминокислот: глутаминовой → семиальдегида глутаминовой кислоты → орнитина → цитруллина → аргинина → ор-

нитина (Greenberg, Rodwell, 1969). Пролин утилизировался плохо (Joseph, Wixom, 1972).

Бактерии осуществляя реакции трансминирования, могут расти практически на любой из 20 аминокислот, внесенной в среду в качестве единственного источника азота.

В исследовании, проведенном в нашей лаборатории Барановой и Климонтович (1971), показано, что из 15 испытанных аминокислот (табл. 44) только *L*-аргинин и *L*-лизин являются более благоприятным источником азота, чем $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Поскольку орнитин, образующийся из глутамата тем же путем, что и аргинин, не оказывает положительного действия на рост бактерий (при сравнении с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), можно полагать, что стимуляция аргинином связана с преодолением трудностей осуществления реакции на пути от орнитина к аргинину. Указанные реакции включают использование карбамоилфосфата и АТФ (при образовании цитруллина и аргининосукцината) — макроэргических соединений, в которых бактерии могут быть лимитированы во время активно идущих синтезов.

Стимулирующее действие лизина может определяться тем, что его предшественник — мезо-ДАП *P. shermanii* — включает в синтез мурена; предположение основано на том, что треонин и метионин, также происходящие из аспартата, но не через мезо-ДАП, стимулирующего действия на рост бактерий не оказывают.

Гистидин, пролин, фенилаланин, лейцин, глицин, аспарагиновая кислота вызывали такой же рост бактерий, как $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Хуже утилизировались треонин, серин, орнитин и валин. По данным Кучераса и Гебгардт (1972), наиболее эффективна аспарагиновая кислота и пролин, однако самый хороший выход биомассы получен с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, в качестве источника азота. Разноречивые выводы, полученные авторами при изучении аминокислотного метаболизма у пропионовых бактерий, вероятно, связаны с активностью пермеаз, транспортирующих аминокислоты в клетку, деятельностью трансфераз, активность которых для различных аминокислот у пропионовых бактерий сильно отличается (Kenney, Werkman, 1958).

Таблица 44

Рост *P. shermanii* в среде с аминокислотами как единственными источниками азота (Баранова, Климонтович, 1971)

Аминокислота (0,64 мг/мл по азоту)	Биомасса, г/л
<i>D, L</i> -аланин	1,05
<i>D, L</i> -аргинин	2,05
<i>D, L</i> -аспарагиновая кислота	1,10
<i>D, L</i> -валин	0,70
<i>D, L</i> -глицин	1,20
<i>D, L</i> -лейцин	1,23
<i>D, L</i> -метионин	1,30
<i>D, L</i> -глутаминовая кислота	1,10
<i>D, L</i> -орнитин	1,0
<i>D, L</i> -серин	0,9
<i>D, L</i> -треонин	1,0
<i>D, L</i> -фенилаланин	1,4
<i>D, L</i> -пролин	1,35
<i>D, L</i> -лизин	1,53
<i>D, L</i> -гистидин	1,30
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,23

При наличии в среде всех аминокислот рост бактерий облегчается, поскольку аминокислоты включаются в белки в готовом виде. Оказалось, что существенное влияние на рост бактерий имеет способ приготовления гидролизата казеина (Zodrow et al., 1963). Зодров с сотрудниками испытывали влияние смеси аминокислот, полученной в результате щелочного, кислотного и трипсинового гидролиза казеина. Самый высокий урожай бактерий был получен в случае трипсинового гидролиза. Полагают, что в этом случае сохраняется триптофан и образуются пептиды, имеющие особый стимулирующий эффект на рост бактерий.

Нитраты задерживают дезаминирование аминокислот в сырах при участии пропионовокислых бактерий (Peltova, Antila, 1953).

Фиксация молекулярного азота. Учитывая широкое распространение свойства фиксировать N_2 среди прокариот (Postgate, 1982), филогенетическую связь пропионовокислых бактерий с группой актиномицетов и их родственников, некоторые из которых обладают азотфиксирующей и гидрогеназной активностью, мы предприняли работу по изучению этих способностей у пропионовых бактерий, поручив ее выполнение нашему ближайшему помощнику в те годы Н. А. Барановой.

Исследовали две культуры *P. shermanii* и *P. petersonii*, различающиеся по уровню корриноидов в клетках и отношению к кислороду (*P. petersonii* более аэротолерантна и содержит меньше витамина B_{12} , чем *P. shermanii*). Нельзя было исключить, что комплексные соединения кобальта, к которым принадлежат корриноиды, могут участвовать в активации N_2 путем хемосорбции на металл-белковом комплексе. Имелись наблюдения (Шпокаукас, Дачюлите, 1965) о том, что штаммы *Azotobacter* с высокой продуктивностью корриноидов являются наиболее активными азотфиксаторами. Было установлено (Баранова, Гоготов, 1974), что штаммы обоих видов могут расти на безазотистой среде в условиях азотфиксации, при этом клетки включали ^{15}N из $^{15}N_2$, используя пируват в качестве источника энергии и углерода. Клетки *P. shermanii* проявляли более высокую азотфиксирующую активность, чем клетки *P. petersonii*: за 15 ч она составила 32 нМ ^{15}N /мг белка и 6 нМ ^{15}N /мг белка соответственно. Азотфиксирующая активность зависела от природы источника углерода, который использовали для выращивания бактерий, и проведения экспериментов (табл. 45). Более активно восстанавливали ацетилен клетки *P. shermanii*, выращенные с пируватом или с фумаратом, чем с глюкозой. Фиксация имела место и в присутствии НАДН и НАДФН как доноров водорода (табл. 46), причем в последнем случае наблюдали самую высокую активность нитрогеназы. Известно, что нитрогеназная активность сопровождается у азотфиксаторов гидрогеназной активностью. Удалось показать, что клетки *P. shermanii* и *P. petersonii* проявляют гидрогеназную активность, которая в присутствии метилвиологена как акцептора водорода составляла 17,2 и 7,8 мкл $H_2 \cdot ч^{-1}$ мг белка соответственно. Подобно нитрогеназной активности гидрогеназная активность

Влияние соединений углерода в ростовой среде на восстановление ацетилена клетками *P. shermanii* нМ C_2H_4 /мг белка за 5 ч (Баранова, Гоготов, 1974)

Субстрат в опытной среде	Соединения углерода в ростовой среде		
	пируват	глюкоза	фумарат
Нет	10,6	1,8	8,6
Пируват	47,5	7,8	—
Глюкоза	—	6,8	—
Фумарат	—	—	27,0

Примечание. Знак «—» означает, что такие варианты опыта не ставили.

Таблица 46

Фиксация ^{15}N суспензиями пропионовокислых бактерий в присутствии некоторых соединений (Баранова, Гоготов, 1974)

Соединение	<i>P. shermanii</i>		<i>P. petersonii</i>	
	N-NH ₃ в пробе, мкг	^{15}N , ат. % избытка	N-NH ₃ в пробе, мкг	^{15}N , ат. % избытка
Нет	1,9	0,031	2,1	0,033
Пируват	22,0	0,340	16,1	0,320
Глюкоза	16,1	0,310	20,6	0,350
НАДН	39,6	0,340	72,3	0,280
НАДФН	28,9	0,355	28,9	0,340

Примечание. Бактерии выращивали на синтетической среде с глюкозой.

клеток *P. shermanii*, выращенных на среде с пируватом, значительно превосходила таковую клеток, выращенных на среде с глюкозой: 30 и 1510 мкл $H_2 \cdot ч^{-1} \cdot мг^{-1}$ белка.

4.1.2. ВИТАМИНЫ

В пропионовокислом брожении участвует тиамин, биотин, пантотеновая кислота, рибофлавин, витамин B₁₂.

Биотин является простетической группой метилмалонил-КоА-транскарбоксилазы, пантотенат входит в состав КоА; тиамин, имеющий тоже стимулирующий эффект, не является, как у других микроорганизмов, коферментом карбоксилазы (т. е. кокарбоксилазой), поскольку у пропионовых бактерий не находят аце-

тальдегида (следы, правда, недавно обнаружены), однако он может участвовать в окислительном декарбоксилировании α -кетокислот в составе дегидрогеназ. Рибофлавин входит в состав ФАД и ФМН.

Витамины B_{12} и B_2 бактерии синтезируют самостоятельно и в значительных количествах (см. ниже), а в других трех витаминах существует потребность. Некоторые штаммы могут расти в синтетической среде без тиамин (Silverman, Werkman, 1938, 1939; Delwiche, 1949), для других витамин B_1 может быть заменен пара-аминобензойной кислотой.

Рибофлавин стимулирует рост (Wood et al., 1938), но облигатной потребности в нем нет.

Штаммы имеют потребность в биотине и пантотеновой кислоте (Thompson, 1943). Коэнзим А может заменить пантотеновую кислоту для *P. freudenreichii* (Moat, Delwiche, 1953), а дестинбиотин (серу не содержащий предшественник биотина) проявляет большую активность для *P. pentosaceum*, чем биотин (Lichstein, 1955).

Стьернхолму и Вуду (Stjernholm, Wood, 1963) не удалось получить культуры *P. shermanii*, дефицитной по биотину, поскольку в отсутствие биотина бактерии начинали синтезировать его сами. С таким же явлением столкнулись и мы. После трех последовательных пересевов в синтетической среде без биотина рост бактерий увеличился и в конечном счете было получено 0,6 г/л сухой биомассы; на среде с биотином выход биомассы был только в два раза больше.

В наших исследованиях (Коновалова, Воробьева, 1969) получены данные о синтезе тиамин, пиридоксин, фолиевой кислоты, рибофлавина, никотиновой кислоты и кобамидов *P. shermanii* и *P. technicum*. Синтезируемые бактериями витамины обнаружены в клетках и культуральной жидкости. Если среда содержит витамины в достаточном количестве, то дополнительного синтеза их не происходит.

Экстракт картофеля, сок апельсина и дрожжевая вода стимулируют сбраживание глюкозы и образование кислот пропионово-кислыми бактериями (Tatum, et al., 1936). Стимулирующее действие картофельного экстракта связывают с содержанием в нем важных ростовых факторов. Если в синтетическую среду вносят дрожжевой экстракт, то внесение индивидуальных витаминов (биотин, тиамин, пантотеновой кислоты и ПАБ) не требуется (El-Hagarawi, 1960; El-Hagarawi et al., 1957; El-Hagarawi et al., 1954).

В связи со способностью к биосинтезу витаминов предложили добавлять *P. shermanii* в молочнокислые продукты (Карлин, 1966). Например, в кефире, обогащенном *P. shermanii*, увеличилось содержание витаминов B_1 , B_2 , B_6 , PP, B_{12} , пантотеновой, фолиевой и фолиновой кислот; особенно заметно было прибавление последних четырех витаминов.

Накопление биомассы *P. shermanii*
на среде № 2 с различными источниками
серы* (Воробьева, Чарахчян, 1983)

Источник серы	Концентрация, ммоль	Накопление биомассы через 144 ч, мг/мл
Источник серы от- сутствовал	—	0,23
SO_4^{2-}	30	0,82
SO_4^{2-}	2	0,88
SO_3^{2-}	37	0,12
SO_3^{2-}	2,5	0,83
S^{2-}	6	0,67
S^{2-}	30	0,10
$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	5,5—13,5	0,70
S^0	6	0,52

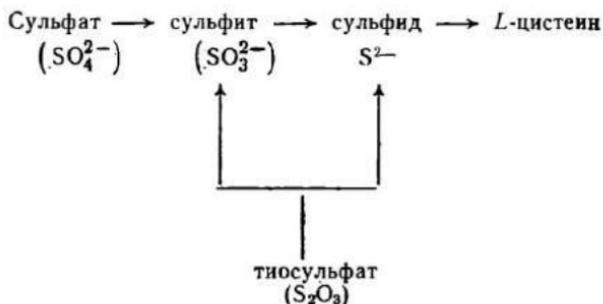
Примечание. Начальная плотность засева 0,1 мг/мл. В табл. приведены средние значения для серии аналогичных экспериментов.

* Сера присутствовала в среде в виде твердой фазы.

Известно, что серусодержащие аминокислоты стимулируют рост (Fromageot, Chaix, 1937), а бактерии устойчивы к высоким концентрациям H_2S в среде (Chaix, Fromageot, 1939). Из серусодержащих аминокислот пептидов молока бактерии образуют диметилсульфид (обладающий, кстати, антимутагенным действием). Имеет способность к биосинтезу сульфитокобаламина (Wagner, Bernhauer, 1964) корриноидное соединение, в котором атом Co связан с SO_3 .

В результате проведения нашей работы (Воробьева, Чарахчян, 1983) были получены довольно интересные факты. Впервые авторы показали, что бактерии могут утилизировать любой источник серы от самого окисленного — сульфата — до самого восстановленного — H_2S (табл. 47), причем хороший рост в присутствии сульфита имел место при концентрации 6 ммоль S^{2-} , что в 10 раз больше, чем та, что выдерживает пурпурная несерная бактерия *Rhodospseudomonas globiformis* (Roy, Trudinger, 1970). Хороший рост штамма *P. shermanii* поддерживал тиосульфат, а также элементарная сера. В последнем случае культура выделяла сульфид. Восстановление S до H_2S может происходить как энзиматическим, так и неэнзиматическим путем. Способность *P. shermanii* утилизировать тиосульфат, сульфит, элементарную серу, сульфид говорит в пользу того, что эти соединения служат интермедиатами ассимиляционной сульфатредукции у пропионовокислых бактерий.

Утилизация элементарной серы может происходить, как и у *E. coli* (Okada et al., 1982) через образование сульфида. При изучении динамики потребления различных источников серы был обнаружен необычный характер этого процесса в случае сульфата. Потребление $^{35}\text{SO}_4$ клетками *P. shermanii* носило осцилляторный характер (рис. 35). В процессе роста культуры наблюдается



чередование периодов потребления и выделения сульфата. Максимальный выброс SO_4^{2-} в среду происходил в период экспоненциального роста культуры (24—48 ч). Было также установлено, что направление перемещения сульфата в клетку или из клетки зависит от его внутриклеточного пула. Клетки с истощенным запасом SO_4^{2-} при перенесении в среду в начале активно поглощают сульфат, после чего начинают его выделять (рис. 36).

Если клетки предварительно выращивали в среде с большим содержанием сульфата, то при пересеве их в свежую среду они могли сразу же выделять сульфат. Любопытно, что осцилляторный характер потребления сульфата не есть свойство всех пропионовых бактерий. Штамм *P. petersonii* — представитель другой группы классических пропионовых бактерий — равномерно поглощал сульфат из среды (рис. 37), в то время как два близких между собой вида *P. shermanii* и *P. freudenreichii* имели осцилляторный характер потребления сульфата, как и далекая к ним в систематическом отношении *E. coli* (рис. 37).

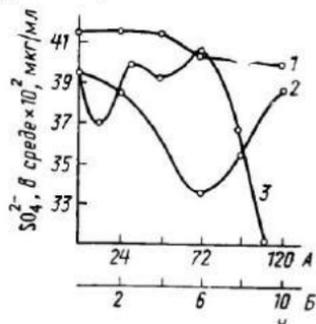
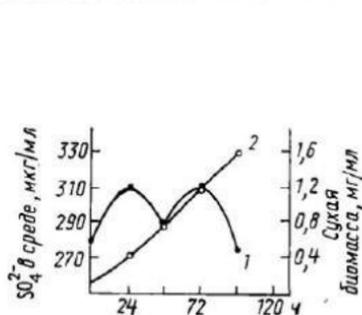


Рис. 35. Потребление сульфата и накопление биомассы культурой *P. shermanii* (Воробьева, Чарахчян, 1983):
1 — содержание сульфата в среде, 2 — сухая биомасса

Рис. 36. Потребление сульфата в динамике развития *P. petersonii*, *P. freudenreichii* и *E. coli* (Воробьева, Чарахчян, 1983). Динамика потребления сульфата из среды пропионовыми бактериями снималась в течение 120 ч (ось А). Динамика потребления сульфата *E. coli* — 52 снималась в течение 9 ч (ось Б). Потребление сульфата культурами: *P. petersonii* (1), *P. freudenreichii* (2), *E. coli* (3)

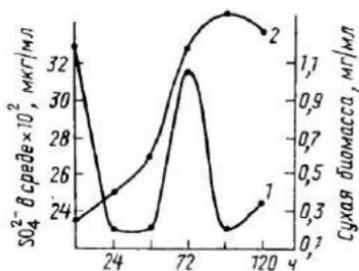


Рис. 37. Потребление сульфата и накопление биомассы культурой *P. shermanii* с истощенным запасом эндогенной серы (Воробьева, Чарахчян, 1983): 1 — содержание сульфата в среде, 2 — сухая биомасса

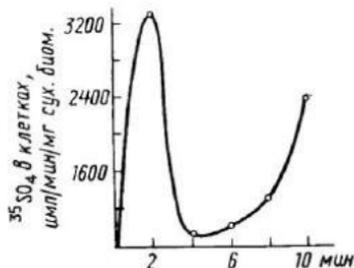


Рис. 38. Потребление $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ суспензией клеток *P. shermanii* (Чарахчян, Воробьева, 1984)

При работе с покоящейся суспензией наблюдали резкое увеличение радиоактивности (^{35}S) клеток в первые 2 мин, последующее ее снижение за счет выхода сульфата в среду и после 6 мин вновь возрастание (рис. 38). Если концентрация сульфата в среде < 50 мкмоль, то выхода SO_4^{2-} в среду не наблюдали при условии, что предварительно клетки выращивались без источника серы. Если клетки во время выращивания не испытывали недостатка в сульфате, то осцилляционный характер потребления сульфата не зависел от наличия сульфата во внешней среде. Выделение сульфата в среду также носило осцилляционный характер (рис. 39). Было установлено, что транспорт сульфата в клетку описывается кинетикой Михаэлиса-Ментен. $K_T = 13,3$ мкмоль. Транспорт сульфата — энергозависимый процесс. Клетки, лишенные источника энергии, через 30 мин голодания потребляли в 3,5 раза меньше сульфата, чем за 15 мин инкубации в среде, содержащей лактат. Начальная скорость потребления сульфата при отсутствии источника энергии снижалась в 5 раз. Зависи-

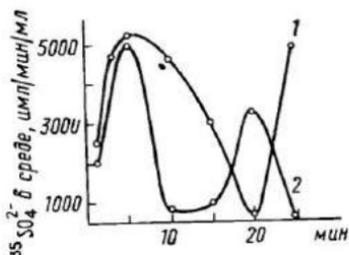


Рис. 39. Выделение $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ клетками *P. shermanii* в среду, содержащую 2 моля Na_2SO_4 (1), не содержащую сульфата (2) (Чарахчян, Воробьева, 1984)

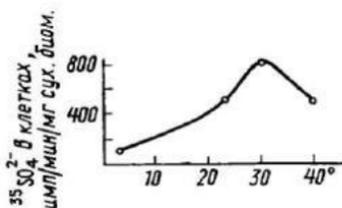


Рис. 40. Потребление сульфата клетками *P. shermanii* в зависимости от температуры (Чарахчян, Воробьева, 1984). Потребление измеряли в суспензии клеток, которые инкубировали с $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 4 мин

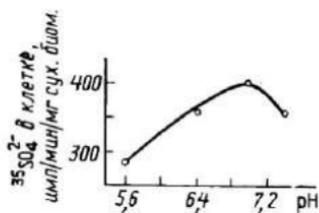


Рис. 41. Потребление сульфата клетками *P. shermanii* в зависимости от величины pH (Чарахчян, Воробьева, 1984). Потребление измеряли в суспензии клеток, которые инкубировали с $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ 3 мин

мость потребления сульфата от температуры представлена на рис. 40; оптимальная температура для потребления SO_4^{2-} — 28—33°.

Таким образом, полученные нами данные показывали, что поступление сульфата в клетки пропионовых бактерий происходит путем активного транспорта, как, впрочем, и у других изученных микроорганизмов. Наиболее активное поступление сульфата происходит в пределах pH 5,5—7,0, а затем быстро снижается. Такая картина (рис. 41) может быть обусловлена высоким сродством протонов к системе транспорта SO_4^{2-} ; на дрожжах было показано (Borst-Pawels, 1981), что потребление SO_4^{2-} происходит в симпорте с протонами.

Сульфат, и особенно тиосульфат, значительно ингибировали транспорт сульфата, в отличие от цистеина, который на потребление сульфата *P. shermanii* заметного влияния не оказывал, а клетки, выросшие в среде с цистеином, утилизировали SO_4^{2-} так же активно, как и клетки, выращенные с SO_4^{2-} . Это значит, что цистеин не имеет особого значения в регуляции транспорта сульфата у пропионовых бактерий, в то время как другие интермедиаты пути биосинтеза могут принимать участие в регуляции. Мы полагаем, что средством регуляции пула сульфата у некоторых пропионовых бактерий может служить также выход последнего в среду, зависящий от внутриклеточного пула сульфата. Не исключено, однако, что периодичность выделения сульфата есть следствие ряда взаимосвязанных процессов в клетке, вырабатывающих ритм, в частности, SO_4^{2-} может выделяться в реакции, катализируемой АФС-аммонийаденилилтрансферазой, заключающейся в замене сульфогруппы аденозин-5-фосфосульфата на аминогруппу; в реакции образуется аденозин-5-фосфоамидат (АФА) и SO_4^{2-} . Предполагают (Schiff, Fankhaueser, 1981), что АФА осуществляет регуляторную связь между азотным и серным метаболизмом.

4.1.4. ИСТОЧНИКИ УГЛЕРОДА И ЭНЕРГИИ

Лактаты. Твердые сычужные сыры представляют собой селективную среду обитания пропионовых бактерий, так как содержат лактаты, образованные при сбраживании лактозы молока молочнокислыми бактериями. В отличие от многих, пропионовокислые бактерии хорошо утилизируют лактаты, поэтому зрелые сыры («Швейцарский», «Советский», «Алтайский») успешно используют для выделения пропионовых бактерий. Когда нам нужно было ответить на вопрос, присутствуют ли пропионовые

бактерии в кишечнике здоровых людей (микробиота которых включает более 400 различных видов бактерий) (Salysers et al., 1985), и подобрать для этой цели селективные условия для их выделения, то такие условия обеспечила минеральная среда, содержащая 4% лактата Na и 1000 мкг/мл сульфаниламида (Воробьева и др., 1987). Пропионовые бактерии лучше всего используют лактат в присутствии дрожжевого экстракта (Antila, 1954), но еще более сильное стимулирующее действие, чем дрожжевой экстракт, проявляет бесклеточный экстракт штаммов молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus* и *Lb. spp.* (Hietaranta, Antila, 1953). Лактат в качестве источника углерода обеспечивает более высокую скорость роста пропионовых бактерий, чем лактоза (El-Nagagawy et al., 1954).

Углеводы и спирты. Способность пропионовых бактерий использовать различные углеводы представлены в табл. 48. В качестве источника углерода для синтезов наиболее благоприятна глюкоза, хотя бактерии неплохо растут на лактозе, лактате, пирувате, глицерине. В этом отношении пропионовые бактерии не представляют исключения среди других организмов, предпочитающих глюкозу, которая в силу особенностей строения термодинамически неустойчива и освобождает большое количество свободной энергии при своем окислении. Рост бактерий усиливается, если глюкоза стерилизуется в составе основной среды, а не вносится асептически в простерилизованную среду (Field, Lichstein, 1955, 1957). Авторы предполагали, что глюкоза может реагировать с фосфатами и аминокислотами при нагревании с образованием фактора, заменяющего CO_2 , который необходим для инициации роста. Эффект, подобный совместному автоклавному глюкозы и основной среды, по данным тех же авторов (Field, Lichstein, 1958a, в), можно получить при добавлении к среде *N-D*-гликозилглицина, глицил-*L*-аспарагина, аспарагина и некоторых дикарбоновых кислот. Пропионовокислые бактерии способны к утилизации углеводов из столь необычной для них среды, какой является белок куриных яиц, обладающий значительной вязкостью (до 50 сантипуаз). Предварительное внесение в жидкий яичный белок 0,1% сульфата аммония и 0,2% фосфата калия способствовали росту бактерий и интенсивности потребления углеводов яичного белка (Стоянова и др., 1979). Эти исследования проводились в связи с изучением возможности использования пропионовых бактерий для обессахаривания яичного белка, что удлиняет сроки его хранения. Подробнее о практических результатах этих исследований изложено ниже (см. гл. 7).

Установлено (Warnecke et al., 1982), что глюкоза, как и 2-дезоксид-*D*-глюкоза, поглощается анаэробно растущими клетками *P. shermanii* с помощью активной энергозависимой транспортной системы. Транспортный обмен и образование *D*-глюкозо-5-фосфата из глюкозы бесклеточными экстрактами зависит от АТФ, а не от фосфоенолпирувата (ФЕП). Ингибитор АТФаз дициклогексилкарбодиамид в концентрации 1 мкмоль ингибирует транспорт

Сбраживание различных углеводов бактериями разных видов рода
Propionibacterium Bergey's Manual of Systematic Bacteriol. 9 ed.
 Williams, Wilkins Comp. 1986

Штаммы Субстрат	<i>P. freudenreichii</i>	<i>P.ensenii</i>	<i>P. thoenii</i>	<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. avidum</i>	<i>P. granulosum</i>	<i>P. lymphophilum</i>
Аденин	d+	d+	d+	+	d+	d+	—	+
Амигдалин	—	d+	d+	—	—	—	—	—
Арабиноза	+	d—	—	+	—	d+	—	—
Целлобиоза	—	d—	—	—	—	—	—	—
Дульцит	—	—	—	—	—	—	—	—
Эритрит	+	+	d+	+	d+	+	—	+
Эскулин	—	—	+	d+	—	—	—	—
Гидролиз эскулина	+	+	+	+	—	+	—	—
Фруктоза	+	+	+	+	d+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+	d+	+	d—	—
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+
Глицерин	+	+	+	+	sk+	+	+	—
Гликоген	—	—	d+	—	—	—	—	—
Инозит	d+	d+	d+	+	d—	d+	—	d+
Инулин	—	—	—	—	—	—	—	—
Лактоза	d—	d+	d—	+	—	d+	—	—
Мальтоза	—	d+	d+	+	—	+	d+	+
Маннит	—	+	—	+	d—	d—	d+	—
Манноза	+	+	+	+	d+	+	+	—
Мелизитоза	—	d+	d+	+	—	d+	d—	—
Мелибиоза	—	+	+	+	—	+	—	—
Раффиноза	—	+	d+	d—	—	d+	d+	—
Рамноза	—	—	—	+	—	—	—	—
Рибоза	+	+	+	+	d+	d+	d—	+
Салицин	—	+	d+	+	—	d+	—	—
Сорбит	—	—	d+	+	d+	—	—	—
Сорбоза	—	—	—	d+	—	—	—	—
Крахмал	—	—	+	+	—	—	—	d+
Гидролизованный крахмал	—	—	d+	—	—	—	—	d—
Сахароза	—	+	d+	+	—	+	+	d—
Трегалоза	—	+	+	+	—	+	d+	—
Ксилоза	—	d+	d+	d+	—	d—	—	—

Примечание. «+» — положительная реакция у 90—100% штаммов; рН 5,7 в 90—100% штаммов; «—» — отрицательная реакция у 90—100% штаммов; или рН 5,7 и > у 90—100% испытанных штаммов; d—, — реакция положительная у 10—14% штаммов, d+, — реакция положительная в 40—90% штаммов.

сахаров на 67%. Поглощение сахаров не зависит ни от мембранного потенциала, ни от протонного градиента. Разобщитель дыхательной цепи (ФККП) в концентрации менее 100 мкмоль вызывал полную деполяризацию мембранного потенциала, но транспорт сахаров ингибировал только на 30% при концентрации 200 мкмоль. Снижение мембранного потенциала под действием валиномицина, индуцирующего приток K^+ в клетки, не оказывало влияния на транспорт сахаров.

Пропионовые бактерии могут использовать цитраты (Hietaranta, Antila, 1953). В присутствии лактата утилизация цитрата задерживается (Hietaranta, Antila, 1954). Клетки пропионовых бактерий способны к окислению ацетата и пропионата. Окисление усиливается в присутствии тиамин, ионов Mg^{2+} и K^+ , проявляющих синергичный эффект (Quaster, Webley, 1942). В отсутствие тиамин Mg^{2+} и K^+ ускоряют окисление сукцината, fumarата, лактата, этанола, пропанола, глюкозы, при этом K^+ усиливает действие Mg^{2+} , как полагают (Quaster, Webley, 1942), за счет увеличения проницаемости клеток для последнего. *P. pentosaceum* может расти в анаэробных условиях за счет эритрита (Wood, Leaver, 1953) — 4-х углеродного полиспирта, который утилизируют очень немногие микроорганизмы. Использование эритрита сопровождается образованием пропионовой, уксусной, муравьиной и янтарной кислот. Путь метаболизма эритрита (как и других источников углерода и энергии) представлен выше.

Кожные бактерии *P. acnes* и *P. avidum* в качестве источников углерода и энергии используют углеводы, липиды, аминокислоты; *P. granulorum*, не обладающий активными протеазами, аминокислоты не утилизирует. *P. avidum* представляет наиболее адаптивный к питательным условиям штамм: он хорошо растет в сложных средах без глюкозы и в то же время отвечает большим накоплением биомассы при добавлении к среде глюкозы, чем два других штамма (Greenman et al., 1981); обладая активными липазами, кожные бактерии расщепляют триглицериды кожного сала *in vivo* и утилизируют глицерин.

Алканы. В 1979 г. (Воробьева и др., 1979) впервые была продемонстрирована способность пропионовых бактерий окислять и расти за счет *n*-алканов. Приуроченность этих бактерий к молочным продуктам, ограниченность в отношении источников углерода, которая для многих штаммов исчисляется тремя-четырьмя углеводами и лактатом, культивирование пропионовых бактерий только в анаэробных условиях в силу «засушливого климата» привычки не допускали даже предположения о возможности использования ими *n*-алканов. Однако теоретически нельзя исключить эту возможность, которая базируется на следующих известных фактах: 1) существует эволюционное родство пропионовых бактерий, микобактерий и коринебактерий, многие из которых способны использовать углеводороды; 2) пропионовые бактерии содержат высокое количество фосфатидилмиоинозита (Brenan, Balou, 1968) и трегалозы (Winder et al., 1967), которые обнаруже-

ны в больших количествах в клетках микроорганизмов, растущих на углеводородах (Jwanny et al., 1974; Rapp, Wagner, 1976); 3) пропионовые бактерии содержат ферменты ЦТК, глиоксилатного шунта, компоненты дыхательной цепи (Бонарцева и др., 1973), оксидазы, в том числе фенолоксидазу (Barksdale, 1970), определяющие окислительные свойства этих бактерий и включение в обмен молекулярного кислорода; 4) среди пропионовых бактерий имеются обитатели кишечного тракта жвачных, где в больших количествах образуется метан.

Было обнаружено (Воробьева и др., 1979), что бактерии 7 различных видов окисляют как смесь *n*-алканов состава (%): додекан — 0,4, тридекан — 4,2, тетрадекан — 15,7, пентадекан — 26,9, гексадекан — 26,8, гептадекан — 17,9, октадекан — 6,2, эйкозан — 0,5, так и индивидуальные *n*-алканы с длиной цепи от 8 до 18 атомов углерода и цетиловый спирт. В результате проведенных манометрических исследований установлено что бактерии (кроме кокков) окисляют *n*-алканы в смеси без заметного латентного периода (рис. 42). Отсутствие латентного периода может быть связано с синергичным действием углеводов, когда окисление одного увеличивается присутствием другого и лаг-период фактически нивелируется. Такой же результат может быть следствием суммирования низких активностей окисления индивидуальных углеводов, составляющих смесь. У пропионовокислых кокков активное поглощение кислорода (превосходящее таковое у других штаммов) наблюдалось после 1—2 ч латентного периода. Интенсивность дыхания *P. technicum*, *P. globosum*, *P. freudenreichii*, *P. pentosaceum*, *P. raffinosaceum* мало изменялась во времени. У штаммов *P. globosum* и *P. thoenii* скорость поглощения

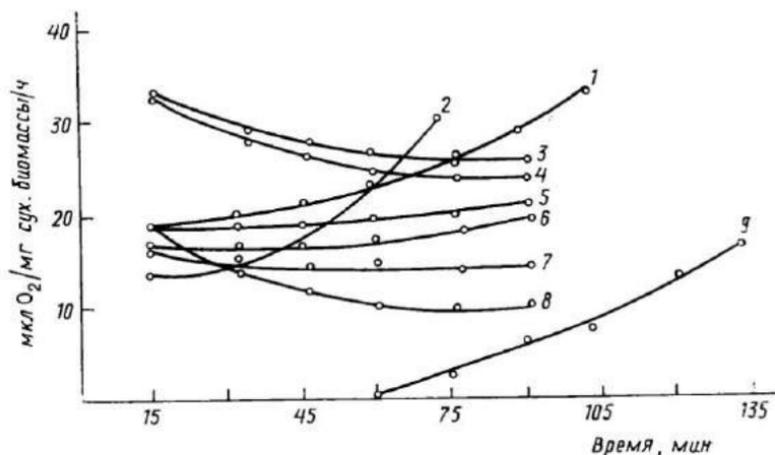


Рис. 42. Окисление смеси *n*-алканов различными штаммами пропионовокислых бактерий (Воробьева и др., 1979):

1 — *P. globosum*; 2 — *P. thoenii*; 3 — *P. technicum*; 4 — *P. globosum* (Сов); 5 — *P. freudenreichii*, 6 — *P. pentosaceum* (ССМ); 7 — *P. raffinosaceum*, 8 — *P. pentosaceum*; 9 — пропионовокислые кокки

кислорода со временем увеличивалась. У штаммов *P. pentosaceum*, *P. acnes* ферменты окисления углеводов предположительно имеют конститутивную природу. Интенсивность дыхания клеток, независимо от того, выращивались ли они предварительно на среде с глюкозой или углеводородами, была приблизительно одинакова (табл. 49).

Хлорамфеникол не препятствовал окислению углеводородов клетками *P. pentosaceum*, но полностью подавлял окисление *n*-алканов пропионовокислыми кокками (рис. 43), ферменты которых, по-видимому, носят индуцибельный характер. Клетки *P. pentosaceum* не окисляли индивидуальные углеводороды с длиной цепи C_8 , C_9 , C_{10} , вероятно, в силу токсичности последних. Лучше других из испытанных (табл. 50) углеводородов окислялся пентадекан и гексадекан. В связи с этим следует заметить, что основной жирной кислотой у *P. pentosaceum* является C_{16} -кислота (Moss et al., 1969). Углеводороды C_{12} , C_{13} и C_{14} окислялись гораздо слабее и тем хуже, чем короче углеродная цепь. Ни один из испытанных индивидуальных углеводородов *P. pentosaceum* не окислял в течение первых 30 мин. В следующие 30 мин начиналось окисление гексадекана и пентадекана и максимум Q_{O_2} после трех часов еще

Таблица 49

Интенсивность дыхания (Q_{O_2}) на смеси *n*-алканов пропионовокислых бактерий, выросших на среде с глюкозой и углеводородами (Воробьева и др., 1979)

Бактерии	Время, мин		
	30	60	90
<i>P. pentosaceum</i> (после глюкозы)	17,5	17,6	18,0
<i>P. pentosaceum</i> (после углеводорода)	20,1	18,0	17,6
<i>P. acnes</i> (после глюкозы)	16,0	16,7	18,7
<i>P. acnes</i> (после углеводорода)	14,7	14,9	15,3

Таблица 50

Окисление индивидуальных *n*-алканов штаммом *P. pentosaceum* (Воробьева и др., 1979)

Время, мин	Интенсивность дыхания, мкл O_2 /мг сухой биомассы/ч				
	додекан	тридекан	тетрадекан	пентадекан	гексадекан
30	0	0	0	0	0
60	0	0	0	1,2	0,8
90	0	0	2,1	4,1	2,2
120	1,2	1,8	3,0	5,4	4,2
150	1,3	2,0	3,2	7,2	5,6
180	1,7	2,0	3,3	10,0	7,3
210	1,9	2,0	3,3	12,5	9,4

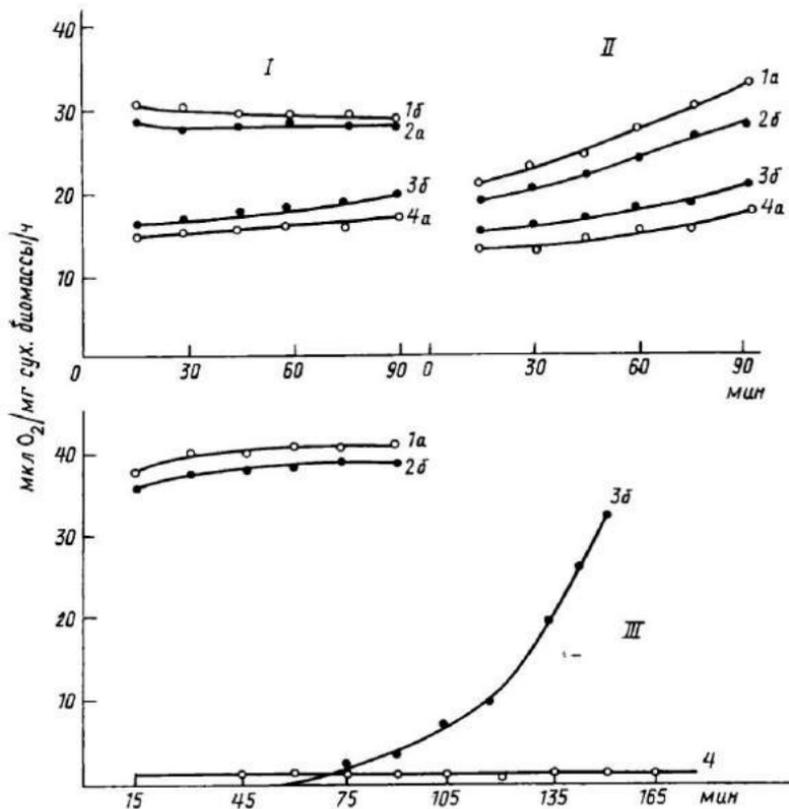


Рис. 43. Действие хлорамфеникола на окисление *n*-алканов и глюкозы пропионовокислыми бактериями (Воробьева и др., 1979). *a* — добавлен хлорамфеникол (100 мкг/мл), *б* — контроль (без хлорамфеникола); 1, 2 — глюкоза, 3, 4 — *n*-алкан. I—II — *P. pentasaceum* (CCM), III — пропионовокислые кокки

не достигался. На других углеводородах лаг-фаза продолжалась 60—90 мин и через полчаса после начала дыхания Q_{O_2} становился постоянным (табл. 49). Представленные данные, как и наблюдения за морфологией клеток, отображенные на рис. 44—47, позволили считать, что *n*-алканы не являются чужеродным субстратом для пропионовых бактерий. Клетки кожных и молочных пропионовых бактерий размножались в среде с керосином, дизельным топливом, гексадеканом, цетиловым спиртом и мало отличались по внешнему виду от клеток, выращенных в среде с глюкозой. На тонком срезе с клеток *P. petersonii* (рис. 47) обнаружены включения, по-видимому, липидной природы. Полная синтетическая среда для роста бактерий представлена в табл. 51. Для получения селективной среды Курманн (Kirmann, 1960) модифицировал ее, добавляя формалин или комбинацию из формалина, Na-тиосульфата, фенола и сульфата таллия.



Рис. 44. Клетки *P. asnes*, выросшие на среде с керосином ($\times 12660$)



Рис. 45. Клетки *P. asnes*, выросшие на среде с дизельным топливом ($\times 42200$)



Рис. 46. *P. technicum* на среде с дизельным топливом ($\times 21100$)



Рис. 47. Срез с клеток *P. petersonii*, выросших на среде с углеводородами ($\times 60000$)

Состав полной синтетической среды для культивирования пропионовых кислотных бактерий (Hettinga, Reinbold, 1972)

I. Соли		<i>DL</i> -гистидин-моноклорид	0,20 г
CH ₂ COONH ₄	4,00 г	<i>L</i> (-) тирозин	0,20 г
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,20 г	<i>DL</i> -метионин	0,20 г
KH ₂ PO ₄	1,20 г	Дистиллированная вода	300,0 мл
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,60 г	Аминокислоты (С)	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 г	<i>DL</i> -цистин	0,05 г
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,01 г	<i>DL</i> -серин	0,20 г
Дистиллированная вода	100 мл	<i>DL</i> -треонин	0,20 г
		Дистиллированная вода	100,0 мл
II. Глюкоза	5,00 г	V. Витамины и ростовые факторы	
Дистиллированная вода	80,0 мл	Тиамин	0,40 г
III. Аминокислоты (А)		Рибофлавин	0,40 г
Глицин	0,05 г	Никотиновая кислота	0,40 г
<i>DL</i> -аланин	0,20 г	Биотин	0,40 г
<i>DL</i> -фенилаланин	0,20 г	Мезо-инозит	0,40 г
<i>DL</i> -валин	0,20 г	Са-пантотенат	0,40 г
<i>DL</i> -лейцин	0,50 г	Р-аминобензойная кислота	0,40 г
<i>L</i> (+) -аргинин	0,20 г	Пиридоксальфосфат	0,40 г
<i>DL</i> -аспарагиновая кислота	0,20 г	Фолиевая кислота	0,40 г
<i>L</i> -глутаминовая кислота	0,50 г	Аскорбиновая кислота	0,40 г
<i>L</i> -триптофан	0,20 г	Холин·HCl	0,40 г
Дистиллированная вода	400,0 мл	Дистиллированная вода	40,0 мл
IV. Аминокислоты (В)			
<i>DL</i> -изолейцин	0,20 г		
(+) лизиндигидрохлорид	0,20 г		
<i>DL</i> -пролин	0,20 г		
<i>L</i> (-) -оксипролин	0,20 г		

Примечание. Значения pH растворов I—IV доводят до 7,0 с помощью раствора NaOH и стерилизуют при 121° 20 мин. Раствор V подвергают холодной стерилизации. Растворы I—IV смешивают (доводят до 1 л) и добавляют 2 мл раствора V, после чего в стерильных условиях разливают в стерильные пробирки.

4.2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РОСТА

Кинетика роста пропионовых кислотных бактерий описывается кривой, изображенной на рис. 48. При развитии бактерий в глюкозо-пептонной среде и инокуляте 10% (*v/v*) длительность лаг-фазы 3,5—4 ч. Средняя удельная скорость роста (μ) в экспоненциальной фазе (18—24 ч) 0,22—0,21 ч⁻¹, в начале стационарной фазы (72—73 ч) — 0,01 ч⁻¹. Вагнер с сотрудниками (Wagner et al., 1967) определяют максимальную скорость роста *P. shermanii* при проточном культивировании в кукурузно-глюкозной среде величиной 0,07, время генерации — 9,9 ч⁻¹.

При непрерывном культивировании изменение скорости роста описывается уравнением Моно¹:

¹ K_M — константа Михаэлиса, равная 1/2 μ_{\max} .

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

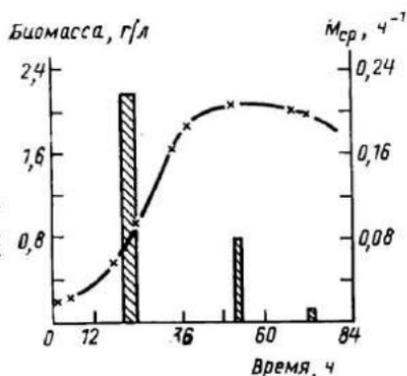


Рис. 48. Динамика и средняя удельная скорость роста *P. shermanii* на среде с глюкозой (средняя удельная скорость роста обозначена штриховкой)

при содержании лактата ниже 1,2%; при более высокой концентрации лактата скорость роста лимитирована образующимися продуктами брожения и, в первую очередь, пропионовой кислотой. Методом остропроточных опытов (Ибрагимова, Сахарова, 1974) показано, что изменение скорости роста при увеличении концентрации пропионата подчиняется уравнению Иерусалимского, аналогичного уравнению неконкурентного торможения:

$$\mu = \mu_0 \frac{K_p}{K_p + P}$$

где μ — удельная скорость роста при отсутствии в питательной среде тормозящего рост соединения; P — концентрация тормозящего рост соединения; K_p — константа, численно равная той концентрации пропионата, при которой $\mu = \frac{\mu_0}{2}$. Зависимость

удельной скорости роста от начальной концентрации субстрата представлена в табл. 52. Увеличение концентрации глюкозы с 1,2 до 2,2% мало отражается на величине μ ; увеличение содержания лактата с 1,3 до 2,5% приводит к снижению удельной скорости роста *P. shermanii* почти в два раза (Гайтан, Воробьева, 1981).

Уравнением Иерусалимского описывается также торможение скорости роста пропионовых бактерий гидроксильными и водородными ионами. Для гидроксильных ионов эта зависимость обнаружена у культуры только в стадии ускорения роста, а для ионов водорода — на более поздних стадиях. Установлено (Ибрагимова и др., 1971), что лимитация скорости роста ионами водорода в непрерывных условиях культивирования проис-

Таблица 52

Удельная скорость роста в логарифмической фазе *P. shermanii* в зависимости от концентрации источника углерода (Гайтан, Воробьева, 1961)

Источник энергии, %	Удельная скорость роста, μ , ч ⁻¹
Глюкоза, 2,2	0,038
Глюкоза, 1,5	0,035
Глюкоза, 1,3	0,026
Глюкоза, 1,2	0,033
Лактат, 2,5	0,014
Лактат, 1,3	0,023

ходит в узких пределах рН от 5,2 до 4,95. При этом ингибиторное действие оказывают как ионы водорода, так и ионы органических кислот и недиссоциированные молекулы пропионовой и уксусной кислот. Вместе с тем показано (Ибрагимова, Сахарова, 1974), что пропионовые бактерии способны регулировать значение рН, сдвигая его в благоприятную для роста сторону, если рН подаваемой в хемостат среды находится в пределах от 7,45 до 4,4.

У трех видов пропионовокислых бактерий *P. jensenii*, *P. acidipropionici* и *P. thoenii* определяли (Babuchowski, 1987) молекулярный экономический коэффициент Y_G при росте в сложной среде с пептоном и дрожжевым экстрактом. Зависимость Y_G от начальной концентрации сахаров описывается двумя разными уравнениями линейной регрессии при низких (менее 1,4 ммоль глюкозы и менее 7 ммоль мальтозы) и высоких (до 22,2 ммоль глюкозы и до 11,7 ммоль мальтозы) концентрациях. Соответствующие кривые не проходят через начало осей координат, что свидетельствует об использовании других, кроме сахаров, компонентов среды. Предполагают (Babuchowski et al., 1987), что метаболизм сахаров различается при их низких и высоких концентрациях.

Влияние концентрации глюкозы на выход биомассы, удельную скорость и активность гидролитических ферментов изучали (Greenman et al., 1981) у трех штаммов, представляющих разные виды кожных бактерий. Выход биомассы *P. acnes*, *P. avidum* и *P. granulosum*, культивируемых в полусинтетической среде в хемостате, увеличивается с увеличением концентрации глюкозы с 0,2% (лимитирующая) до 0,3—0,4% и далее остается постоянным. Причем *P. granulosum* в отсутствие глюкозы дает низкий урожай и растет с низкой μ_{\max} (0,02 ч⁻¹), по-видимому, являясь сахаролитическим штаммом, а *P. acnes* и *P. avidum*, напротив, максимальный выход биомассы и самую высокую μ_{\max} (0,16 и 0,18 ч⁻¹ соответственно) имеют при отсутствии в среде глюкозы. При концентрации глюкозы 0,2 и 0,5% (избыточная) значения μ_{\max} у *P. acnes* и *P. avidum* 0,08 и 0,10 ч⁻¹, что соответствует 1/2 μ_{\max} в среде без глюкозы. При максимальной испытанной концентрации глюкозы (0,5%) у этих штаммов наблюдали самые низкие активности внеклеточной липазы, гиалуронидазы и кислой фосфатазы (подробнее об активности внеклеточных ферментов см. ниже). Полагают, что *P. acnes* и *P. avidum* предпочитают глюкозе пептиды и аминокислоты (присутствовавшие в среде) как источники углерода и энергии. Глюкоза может репрессировать синтез ферментов, необходимых для использования ими аминокислот.

Установлено, что факторы, ингибирующие скорость роста бактерий (высокие концентрации ионов водорода, источника углерода — лактата, продуктов обмена), не снижают содержания РНК, ДНК, полисахаридов и липидов в клетке, но снижают белок — синтезирующую активность (Ибрагимова, Сахарова,

1974), в результате чего содержание белка в клетках уменьшается, т. е. происходит разобщение энергетического и конструктивного процессов. Наиболее чувствительны к действию неблагоприятных факторов клетки, пребывающие в начале экспоненциальной фазы.

Зависимость между белоксинтезирующей активностью и количеством потребленного клеткой субстрата выражают как $X = \frac{C_1}{S_n}$,

где X — белоксинтезирующая активность, S_n — потребленный субстрат в расчете на образованную биомассу, C_1 — коэффициент пропорциональности.

Линейную зависимость между удельной скоростью роста и белоксинтезирующей активностью авторы (Ибрагимова, Сахарова, 1972) выражают следующим образом: $\mu = C_2 X + B$, где C_2 — коэффициент пропорциональности, равный $\operatorname{tg} \alpha$ (угла наклона кривой), B — значение μ , при котором белоксинтезирующая активность практически равна нулю.

Теоретические обобщения, подтвержденные экспериментально, позволили сформулировать следующую закономерность: удельная скорость роста μ прямо пропорциональна белоксинтезирующей активности и обратно пропорциональна количеству субстрата, потребленного на единицу прироста биомассы:

$$\mu = \frac{C_1 \cdot C_2}{S_n} + B.$$

Интерес представляет изучение того молекулярного уровня, на котором происходит задержка в синтезе белка.

Снижение уровня белка в клетках может быть вызвано непосредственным действием ингибиторов на активность (синтез) ферментов, участвующих в синтезе белка. Известно, например, что лактат снижает активность ферментов ЦТК в различных клеточных системах (Гершанович, 1965). Если высокие концентрации лактата имеют такой же эффект и в случае пропионовокислых бактерий, то образование продукта ЦТК — α -кетоглутарата окажется сниженным. Аминирование α -кетоглутарата в глутамат является единственным способом включения аммонийного азота в органические соединения у пропионовокислых бактерий (Воробьева, 1976). Таким образом, низкий уровень α -кетоглутарата может стать «узким» местом в синтезе белка в целом.

Пропионовокислые бактерии характеризуются высокой величиной экономического коэффициента

$$\left(Y_c = \frac{\text{количество образованной биомассы}}{\text{моль потребленного субстрата}} \right),$$

показывающего, какая доля использованного субстрата превращается в вещество клетки, и определяющего степень сопряженности энергетических и конструктивных процессов.

Из данных, представленных в табл. 53, следует, что *P. shermanii* и *P. petersonii* в аэробных условиях используют субстрат более эффективно, чем в анаэробных, что служит косвенным указанием на осуществление бактериями окислительного фосфорилирования. У *P. petersonii* Y_c в аэробных условиях более чем в два раза выше по сравнению с анаэробными. У *P. shermanii*, видимо, не наблюдается резкой перестройки метаболизма в связи с условиями аэрации, но эффективность использования глюкозы при брожении в 1,5 раза выше, чем у *P. petersonii* (Y_c 35 и 20,3 соответственно).

Таблица 53

Потребление глюкозы и накопление биомассы в связи с условиями аэрации пропионовокислых бактерий (Брюхачева и др., 1975)

Вид	Условия аэрации	Количество потребленной глюкозы, мг	Биомасса, мг	Y_c г сухой биомассы моль субстрата
<i>P. shermanii</i>	анаэробные	10,90	2,12	35
	полуаэробные	10,45	2,12	36,5
	аэробные	6,10	1,58	46,7
<i>P. petersonii</i>	анаэробные	4,12	0,47	20,3
	полуаэробные	5,05	0,58	20,7
	аэробные	7,60	1,98	47,0

Полагают (de Vries et al., 1972), что в аэробных условиях окислительное фосфорилирование является единственным способом получения энергии *P. rubrum*, *P. pentosaceum*, *P. shermanii*, *P. freudenreichii*.

4.3. УСЛОВИЯ РОСТА

Бактерии растут в пределах температуры 15—40°, хотя есть данные (Park et al., 1967), что рост происходит и при более низкой t° — 2,8—7,2°, что важно учитывать при изготовлении твердых сычужных сыров. Относительная термоустойчивость бактерий также имеет существенное значение для сыроделия, технология которого предусматривает второе нагревание сырной массы при 55° в течение 30—40 мин. Классические пропионовые бактерии обычно культивируют при 28—30°, а кожные — при 37°. Максимальное образование пропионовой кислоты штаммом *P. shermanii* происходило при 24° при инкубировании культуры в течение 16 дней, а максимальный синтез корриноидов — при 18—27° (Zodrow, Stefaniak, 1963).

Оптимальное значение pH для роста 6,5—7,0; при pH 5,0 рост практически отсутствует, при pH ниже этого критического уровня жизнеспособность бактерий сильно снижается (Kurtz et al., 1958, 1959). При искусственном подкислении среды с молочной

сывороткой до pH 5,0 путем добавления раствора HCl штамм *P. jensenii*, используя лактозу, образовывал больше, чем при pH 7,0, пропионовой кислоты за счет снижения количества уксусной, что сохраняло тот же уровень (5,0) pH (Foschino et al., 1988); у штамма *P. freudenreichii* subsp. *globosum* в тех же условиях обнаружили только CO₂ и D-лактат в качестве единственных продуктов брожения, а pH при этом был снижен до 4,4. Если pH среды доводили до 5,0 с помощью L-молочной кислоты, то *P. freudenreichii* subsp. *globosum* утилизировал L-лактат, а образовывал D-лактат и CO₂ (pH изменялось незначительно), а *P. jensenii*, утилизировав L-лактат и в небольших количествах лактозу, аккумулировал в среде ацетат, пропионат и CO₂ (pH при этом 4,65). Таким образом, пропионовые бактерии путем изменения соотношения продуктов метаболизма могут регулировать pH, если его значение не ниже критического уровня и *P. jensenii* в этом отношении более адаптирован, чем *P. freudenreichii*.

Пропионат Na оказывает большее ингибирующее действие, чем пропионат Ca (Antila, Nietaranta, 1953), и пропионаты сильнее подавляют рост, чем ацетат (Неронова, Ибрагимова, 1967).

Пропионовокислые бактерии относят к солеустойчивым бактериям. Показано (Peltola, 1940), что при содержании в лактатной среде 4% NaCl происходит нормальный рост и брожение. Пропионовокислые кокки выдерживают до 6,5% NaCl в среде (Vogobjeva et al., 1990). У быстрорастущих штаммов задержка роста при pH 7,0 и 5,2 происходит при концентрации NaCl 6 и 3% соответственно; медленно растущие штаммы выдерживают более высокие концентрации NaCl при pH 5,2, чем при pH 7,0 (Rollman, Sjöstrom, 1946).

Влияние аэрации на некоторые физиологические показатели штамма *P. shermanii* ВКМ-103 при выращивании в среде с дрожжевым автолизатом и лактатом в острых опытах показано в табл. 54.

При насыщении среды кислородом от 0,5 до 12% наблюдали (Ибрагимова, Шульговская, 1979) увеличение удельной скорости роста, экономического коэффициента и окислительной активности клеток. Причем при 12% насыщения продукты брожения —

Таблица 54

Изменение некоторых физиологических свойств культуры *P. shermanii* в зависимости от условий аэрации (Ибрагимова, Шульговская, 1979)

Насыщение среды воздухом, %	$\mu, \text{ч}^{-1}$	Y, г/г	Q _{O₂} , мкл/мг/ч	Летучие кислоты, г/г	
				пропионовая	уксусная
0,5	0,095	0,065	24,25	7,18	2,50
1,7	0,112	0,083	25,65	3,76	1,99
12,0	0,166	0,100	26,23	0,87	0,58

пропионовая и уксусная кислоты — практически отсутствовали, что свидетельствовало о переключении метаболизма с брожения на дыхание. Величина K_S в анаэробных условиях — 1,9 г/л, при насыщении среды воздухом до 0,5—1,25 и до 1,7%—0,9 г/л. Это значит, что при увеличении аэрации до 1,7% происходит увеличение сродства субстрата (лактата) к ферменту (лактатдегидрогеназе). Кислород оказывает неодинаковое влияние на различные штаммы пропионовых бактерий. При насыщении дрожже-лактатной среды воздухом рост *P. freudenreichii* subsp. *globosum* задерживается, а *P. jensenii* — нет (Foschino et al., 1988). В аэробных условиях при выращивании на сывoroточной среде оба штамма образуют ацетат, CO_2 , *L*- и *D*-лактат (но не пропионат) из лактозы. При искусственном повышении редокс-потенциала (до +250 — +300 мВ) среды и выращивания *P. jensenii* в анаэробных условиях наблюдали картину, аналогичную (см. выше) той, что была в аэробных условиях. *P. freudenreichii* subsp. *globosum* в приведенных выше условиях проявлял очень слабую ферментативную активность, но образование CO_2 и изменение редокс-потенциала происходило примерно так же, как в анаэробных условиях (исходный редокс-потенциал 100—150 мВ). Поэтому авторы (Foschino et al., 1988) сделали вывод, что *P. jensenii* более чувствителен к уровню редокс-потенциала, а *P. freudenreichii* — к O_2 .

4.4. АНАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Для биосинтеза клеточных компонентов необходимо снабжение микроорганизмов соответствующими низкомолекулярными компонентами, сахарами, органическими кислотами, аминокислотами. Многие из 2-, 3- и 4- и 5-углеродных соединений образуются в результате катаболических реакций. Для пропионовых бактерий эти реакции составляют пропионовокислое брожение, ЦТК и пентозомонофосфатный шунт. Последний снабжает клетки эритрозо-4-Ф, рибозо-5-Ф и восстановительными потенциалами (НАДФН₂), необходимыми для многих синтезов. Эритрозо-4-Ф используется в образовании *p*-аминобензойной кислоты и ароматических аминокислот: фенилаланина, триптофана, тирозина. Рибозо-5-Ф включается в азотистые основания.

Пентозофосфатный шунт и пропионовокислое брожение, как уже отмечалось, имеет ряд общих предшественников и ферментов. Включение общих предшественников в один или другой путь регулируется уровнем АТФ (Лабори, 1970), и эта регуляция фактически определяет соотношение энергетических и конструктивных процессов в клетке. ЦТК снабжает клетку органическими кислотами, при этом сукцинат включается в синтез геминовых соединений, а α -кетоглутарат аминирован в глутамат; фумаровая и щавелеуксусная кислоты — в аспарагиновую. Считали (Carson, Delwiche, 1952; Delwiche, Carson, 1956), что реакции ЦТК у

пропионовых бактерий имеют значение только для конструктивных процессов, однако эта точка зрения верна только отчасти, поскольку есть виды пропионовых бактерий, у которых активность ЦТК увеличивается под действием кислорода.

Регуляция активности ЦТК определяется уровнем ФЕП, возникающим в реакциях (дикиназной и гликолитической) пропионовокислого брожения. Таким образом, через этот макроэрг также осуществляется согласованность конструктивных и энергетических реакций.

4.4.1. АМИНОКИСЛОТЫ

Сравнительное изучение влияния различных солей аммония на рост *P. shermanii* показало (Бонарцева, 1973), что наиболее благоприятен уксуснокислый и щавелевокислый аммоний) наименее — NH_4NO_3 ; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, цитрат $\text{H}(\text{NH}_4)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4HCO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ являются равноценными источниками азота для пропионовых бактерий.

Известны три главные реакции, с помощью которых ион аммония включается в органические соединения. Эти реакции катализируют глутаматдегидрогеназа, аланиндегидрогеназа и аспартат-аммиак-лиаза. *P. petersonii* и *P. shermanii* (штамм К) содержат активную НАДФ-зависимую глутаматдегидрогеназу. По-видимому, это единственный фермент, который включает аминокруппу в аминокислоты, так как аланиндегидрогеназа и аспартат-аммиак-лиаза обнаружены не были. Пути биосинтеза различных групп аминокислот изучены мало, однако некоторые сведения имеются. Установлено (Wixom et al., 1971), что *P. shermanii* и *P. arabinosum* содержат изомероредуктазу α -ацетогидроксикислот, катализирующую превращение α -ацетолактата в α , β -дигидроксиизовалерат. Этот же фермент катализирует синтез α , β -диокси- β -метилвалериановой кислоты. Пропионовые бактерии содержат также дегидратазу, специфический субстрат которой *DL*-дигидроксивалерат превращается в α -кетоизовалериановую кислоту.

P. pentosaceum содержит *L*-треониндегидратазу, ингибируемую *L*-изолейцином по типу ретроингибирования (Joseph, Wixom, 1972). Наличие у пропионовых бактерий указанных ферментов позволяет предположить существование у них валин-изолейцинового пути, как у *E. coli*.

Биосинтез белков пропионовыми бактериями сопровождается созданием пула из 16 аминокислот: цистина, гистидина, аргинина, аспартата, глутаминовой кислоты, глицина, серина, треонина, β -аланина, тирозина, валина, метионина, пролина, фенилаланина и лейцина (Osman, Chenouda, 1971).

С возрастом культур количество метионина, глутаминовой кислоты и валина снижается, а серина увеличивается. При этом в клетках *P. shermanii* и в среде обнаруживают пируват и α -кетоглутарат (Osman, Chenouda, 1971).

В среде находили ацетоуксусную и пировиноградную кислоты (Воробьева, 1972); количество кетокислот постоянно снижается в связи с включением их в синтезы. Канопкайте и сотрудники (1965) обратили внимание на содержание в составе биомассы *P. shermanii* на всех стадиях роста заметных количеств фосфоросодержащих белков, функция которых неизвестна. Нам представляется, что фосфопротенды могут быть промежуточными продуктами субстратного и окислительного фосфорилирования у пропионовых бактерий. Из митохондрий выделено четыре промежуточных продукта окислительного фосфорилирования, в том числе белок, который содержал фосфогистидин. Гистидиновая группа была первичным пунктом фосфорилирования, причем образование фосфогистидина нечувствительно к ДНФ (Boyer et al., 1962).

4.4.2. липиды

Пропионовокислые бактерии синтезируют значительные количества жирных кислот, липидов и фосфолипидов (Коновалова, Воробьева, 1972), состав которых, как уже говорилось, является таксономическим признаком.

Среди жирных кислот — основная у *P. shermanii* и *P. freudenreichii* 12-метилдекановая кислота ($a-C_{15}$); кроме $a-C_{15}$ в клетках обнаружены 13-метилдекановая ($i-C_{15}$), пентадекановая, гексадекановая и C_{11} -насыщенная жирная кислота. Некоторые штаммы *P. shermanii* синтезируют также кислоты с C_{20} , C_{21} , C_{22} , C_{23} . У пяти других видов пропионовых бактерий — *P. arabinosum*, *P. jensenii*, *P. pentosaceum*, *P. thoenii*, *P. zaeae* — основной жирной кислотой является C_{16} ; кроме того, синтезируется небольшое количество упомянутых выше кислот (Moss et al., 1969).

В работе Коноваловой (1970), проведенной в нашей лаборатории, показано, что добавление в среду липидов (извлеченных ранее из *P. shermanii*), твина-80 и глицерина приводит к увеличению образования липидов пропионовыми бактериями.

Эти наблюдения говорили о том, что бактерии содержат эстеразы и липазы, расщепляющие липиды, что впоследствии доказал Отерхолм и др. (Otherholm et al., 1970; Мельникова, 1987). Авторы обнаружили высокую специфическую активность для липазы и гидролазы глицериновых эфиров, что, как они полагают, обуславливает высокое содержание жирных кислот в сырах.

Липиды пропионовых бактерий, по-видимому, не только входят в структурные элементы клеток, но играют еще роль защитных компонентов против действия некоторых антибиотиков.

Под влиянием полимиксина М. Л. Коновалова (1970) наблюдала увеличение образования липидов и фосфолипидов у *P. shermanii* на 30% по сравнению с контролем (рис. 49).

Фосфолипиды у пропионовых бактерий составляют около 10% от общего количества липидов и (Lancelle, Asselinau, 1968) представлены в основном фосфотидилмономанноинозитом.

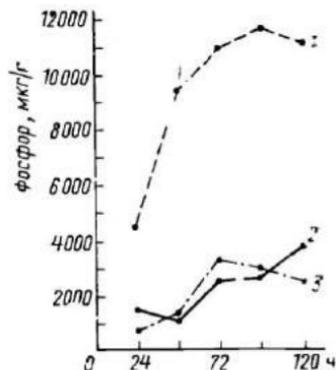
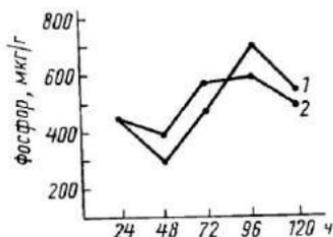


Рис. 49. Изменения содержания фосфолипидов в динамике развития *P. shermanii* (Коновалова, Воробьева, 1972):
1 — в среду добавлен полимиксин М (50 мкг/мл); 2 — без полимиксина

Рис. 50. Изменения содержания полифосфатов в клетках в динамике развития культуры *P. shermanii* (Коновалова, Воробьева, 1972):
1 — фракция, растворимая в 1 н. горячей хлорной кислоте, 2 — щелочерастворимая фракция, 3 — солерастворимая фракция

4.4.3. ПОЛИФОСФАТЫ

Пропионовокислые бактерии в значительных количествах синтезируют полифосфаты. Полифосфатные гранулы выявлены цитохимическими методами и обнаружены на срезах бактерий под электронным микроскопом (Воробьева, 1972). Содержание кислоторастворимых полифосфатов очень мало (менее 20 мкг/г биомассы) и основной тип полифосфатов представлен высокомолекулярными (кислотонерастворимыми) соединениями, которые содержат от 70 до 500 остатков фосфорной кислоты. Менее полимерные полифосфаты находятся внутри клетки, более полимерные — на цитоплазматической мембране и принимают участие в переносе сахаров в клетку через мембрану.

Солерастворимые полифосфаты могут участвовать в синтезе нуклеиновых кислот. Количество солерастворимых полифосфатов у *P. shermanii* достигает максимума к 72 ч (3 мг/г биомассы), после чего их количество снижается (рис. 50). Содержание щелочерастворимых полифосфатов после незначительной убыли в первые сутки культивирования постоянно увеличивается в культуре и достигает к 120 ч 4 мг/г биомассы (см. рис. 46). Основной удельный вес приходится на высокомолекулярные полифосфаты, растворимые в горячей 1 н. хлорной кислоте; содержание их в клетках постепенно увеличивается и к 96 ч составляет 11 мг/г биомассы (см. рис. 46) (Коновалова, Воробьева, 1972).

Кулаевым (1968) показано, что древние организмы *Micr. lysodecticus* и *P. shermanii* наряду с АТФ-зависимой обладают полифосфатсинтезирующей системой, зависимой от гликолиза.

Позднее было установлено (Бобык, 1971; Кулаев и др., 1973), что биосинтез полифосфатов пропионовокислыми бактериями может происходить как за счет терминального фосфора АТФ, так и фосфора 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-ДФГК).



Клетки *P. shermanii* содержат полифосфаткиназу и полифосфатглюкокиназу, незначительное количество полифосфатфосфоглицераткиназы и большое количество АТФ-3-Ф-глицераткиназы (Wood et al., 1985).

Добавление неорганического фосфора или короткоцепочечных полифосфатов (ПФ) стимулирует скорость синтеза ПФ из АТФ примерно в 10 раз. У пропионовокислых бактерий ПФ участвуют в фосфорилировании глюкозы. Активность АТФ-глюкокиназы = $1,2 \pm 0,4$ Е, а ПФ-глюкокиназы = $5,6 \pm 2,1$ Е/г клеток *P. freudenreichii*. Считают (Wood et al., 1987), что единственный путь синтеза ПФ у *P. shermanii* связан с ПФ-киназной реакцией. ПФ-глюкокиназа имеет гораздо более низкое значение K_m для длинноцепочечных ПФ, чем для коротких, поэтому можно предполагать, что фермент предпочтительнее использует длинноцепочечные ПФ для фосфорилирования. При этом будут аккумулироваться короткие цепи ПФ, что и наблюдается. Если длинноцепочечные ПФ лимитируют рост, то становится понятным, почему для его начала (см. выше) требуется определенный уровень первых. В исследованиях Гайтан (Гайтан, Воробьева, 1981) показано, что экспоненциальный рост возможен лишь при достижении определенного «критического» уровня АТФ, так что клетки приступают к делению при гарантии энергетической обеспеченности. Судьба полифосфатов на необычной культуре *P. shermanii*, которая находилась в условиях азотного голодания, была прослежена В. И. Гайтан в 80-х годах. Гайтан заинтересовалась физиологией клеток, голодающих по азоту. В то время в «моду» входили иммобилизованные клетки, для практического использования которых очень не хватало теоретической базы. Иммобилизованные клетки (подробно см. ниже) — это клетки, голодающие по азоту. Их искусственно и постоянно обеспечивают источником энергии и углерода, но не источником азота, поэтому конструктивные процессы у таких клеток подавлены. Клетки *P. shermanii*, голодающие по азоту, моделировали иммобилизованные клетки. Об энергетическом состоянии таких клеток мы расскажем чуть позже, а для настоящего контекста интерес представляют взаимопревращения полифосфатов и АТФ (Гайтан и др., 1982).

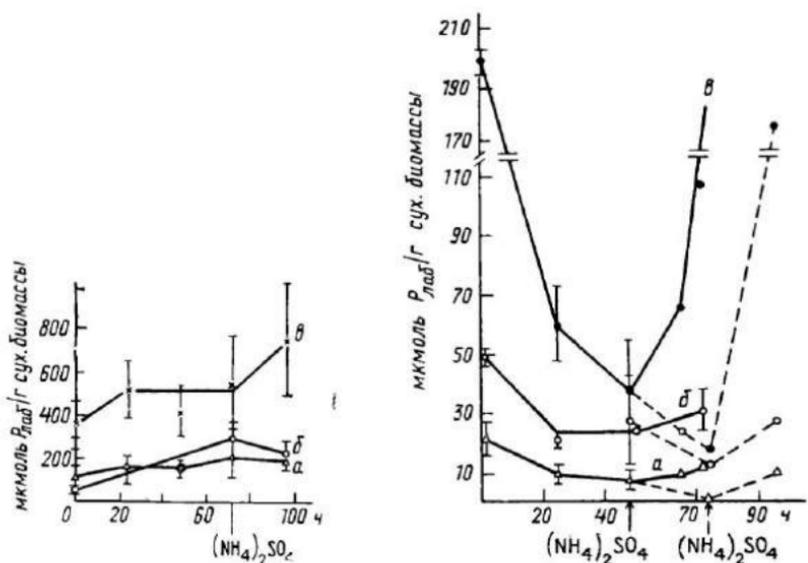


Рис. 51. Содержание полифосфатов в клетках на среде с лактатом в условиях азотного голодания и после добавления сульфата аммония (А) (Гайтан и др., 1982):

а — кислотолабильный фосфор в щелочерастворимой фракции, мкмоль Р/г сухой биомассы; б — кислотолабильный фосфор в солерастворимой фракции; в — кислотолабильный фосфор во фракции, экстрагируемой горячей хлорной кислотой; Б — содержание полифосфатов в клетках на среде с глюкозой в условиях азотного голодания и после добавления сульфата аммония (Гайтан и др., 1982). Штриховой линией обозначены результаты варианта опыта, когда сульфат аммония добавляли через 74 ч

В процессе азотного голодания культуры на среде с лактатом за первые сутки происходит увеличение содержания в клетках всех трех исследуемых фракций полифосфатов (рис. 51, А). Далее, наиболее полимерная фракция, экстрагируемая горячей хлорной кислотой, оставалась на прежнем уровне, а содержание солерастворимых и щелочерастворимых полифосфатов продолжало увеличиваться. Пул АТФ в условиях азотного голодания неуклонно снижается (табл. 55). Энергетический субстрат (в данном случае лактат) при этом сбраживается до конечных продуктов. По-видимому, образующаяся при замедлении и остановке роста АТФ идет на синтез полифосфатов, чем объясняется повышение их содержания на среде с лактатом.

При утилизации бактериями глюкозы наблюдалась иная картина. В течение всего периода голодания (48 г) происходило потребление субстрата, снижение содержания АТФ и всех трех фракций полифосфатов (табл. 56, 57, рис. 54, Б).

Различное отношение к полифосфатам лактатной и глюкозной культуры может быть связано с активной утилизацией полифосфатов (и АТФ) фосфорилирующими ферментами глюкозной культуры (Wood et al., 1985). Показано, что образование глюкозо-фосфата у

Накопление биомассы и содержание АТФ в клетках *P. shermanii* в условиях азотного голодания при потреблении лактата (Гайтан и др., 1982)

Время культивирования, ч	Биомасса, мг/мл культуры	Содержание в среде лактата, мг/мл	Содержание в клетках АТФ, мкмоль/г сухой биомассы
0	0,18	10,4	1,84
24	0,35	—	1,26
48	0,37	3,3	1,11
72	0,32	1,8	0,97
(NH ₄) ₂ SO ₄ 96	0,42	0,14	4,73

Таблица 56

Накопление биомассы и содержание АТФ в клетках в условиях азотного голодания при потреблении глюкозы (Гайтан и др., 1982)

Время культивирования, ч	Биомасса, мг/мл	Содержание в среде глюкозы, мг/мл	Содержание в клетках АТФ, мкмоль/г сухой биомассы
0	0,26	20,0	2,40
24	0,34	16,0	1,55
48	0,38	—	0,89
(NH ₄) ₂ SO ₄ 72	0,49	14,0	2,02

Таблица 57

Содержание кислотонерастворимых полифосфатов (в мкмольях Р_{лаб}/г сухой биомассы) в клетках *P. shermanii* в разных условиях культивирования (Гайтан и др., 1982)

Условия культивирования	Время культивирования, ч					
	исходные	19	24	48	66	74
Голодание по азоту в среде с глюкозой	269,1	—	90,4	69,9	—	28,7
Голодание по азоту на среде с лактатом	514,7	—	614,7	759,6	—	1078,7
Рост в полной среде с глюкозой	147,8	327,9	—	—	169,9	147,8

Примечание. Знак «—»: определения не проводили.

P. arabinosum, *P. freudenreichii* и *P. shermanii* происходит независимо от стадии роста более эффективно в присутствии полифосфата (ПФ), чем АТФ. Синтез ПФ у изученных бактерий осуществляется через полифосфаткиназу. Активность фосфофруктокиназы у трех видов бактерий в присутствии ПФ была в 30—200 раз выше, чем с АТФ. Активности пируваткиназы и пируватфосфаткиназы проявлялись только с АТФ. Карбокситрансфосфорилаза специфична только с ФФ_n и Ф_n и не специфична в отношении ПФ и АТФ. Глицерокиназа специфична к АТФ. Изменения специфичности ферментов в зависимости от фазы роста не обнаружено. Когда в голодающую по азоту в течение 70 ч лактатную культуру добавляли сульфат аммония, то наблюдали снижение внутриклеточного содержания соле- и щелочерастворимых полифосфатов и увеличение наиболее полимерной фракции (см. рис. 47). Соле- и щелочерастворимые полифосфаты могли расходоваться на синтез нуклеиновых кислот и АТФ, пул которого сильно увеличивался (табл. 57).

Добавление $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ в голодавшую «глюкозную» культуру приводит к увеличению внутриклеточного содержания всех трех фракций полифосфатов, после чего возобновляется рост. Следовательно, тактика обращения с соле- и щелочерастворимыми полифосфатами у *P. shermanii* зависит от природы (механизма) утилизации источника энергии, но в любом случае начало роста сопровождается накоплением высокомолекулярных полифосфатов.

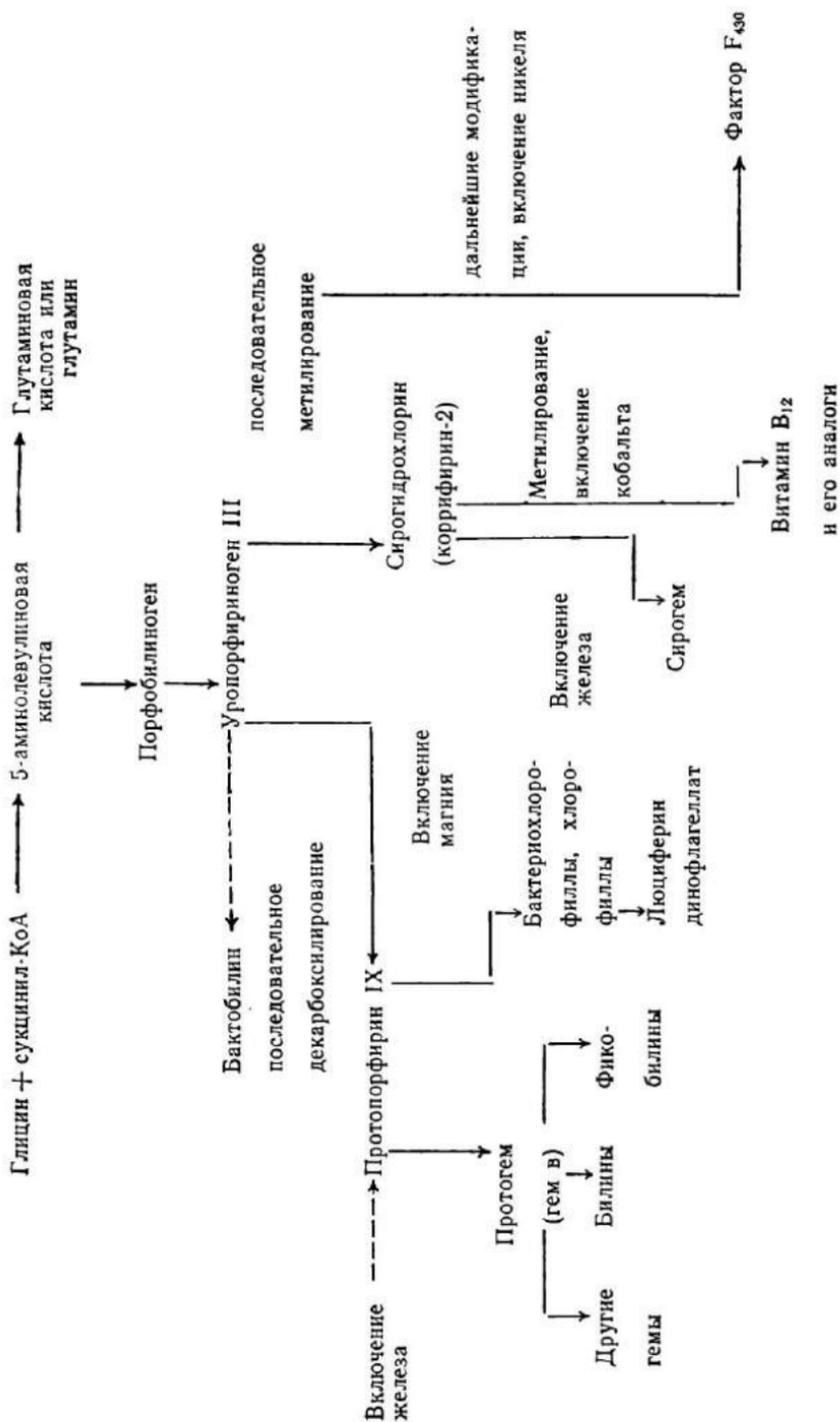
4.4.4. АНТИВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ И БАКТЕРИОЦИНЫ

В 1960 г. появилось сообщение (Cutting et al., 1960) о том, что экстракты *P. freudenreichii* проявляют активность против вируса *Columbia SK*. Активный фактор был назван пропионином. Впоследствии ряд веществ с антивирусной активностью было выделено, очищено (Furusawa et al., 1967; Ramanathan et al., 1969) и отнесено к семейству пропионинов (*A, B, C, D*). Пропионин *D* оказался полипептидом с большой молекулярной массой (Ramanathan et al., 1968 а, б), действие которого связывают с подавлением специфического летального иммунного ответа, вызванного инфекцией вируса лимфоцитарного хориоменингита у мышей. Установлено, что прямого ингибирования репликации вируса пропионин *D* не проявляет.

Классические пропионовокислые бактерии образуют ряд белковых бактериоцинов (Glatz, 1992). Штамм *P. thoenii* образует белок с молекулярной массой ~ 10 тыс. Да и ингибирует ряд грамотрицательных, грамположительных бактерий, а также различные дрожжи и плесени (Lyon, Glatz, 1991). *P. jensenii* образует термостойчивый белок с низким молекулярным весом и с ингибиторной активностью против ряда молочнокислых бактерий.

4.4.5. ТЕТРАПИРРОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Биогенез. Пропионовокислые бактерии синтезируют целый ряд тетрапиррольных соединений: корриноиды, гем,



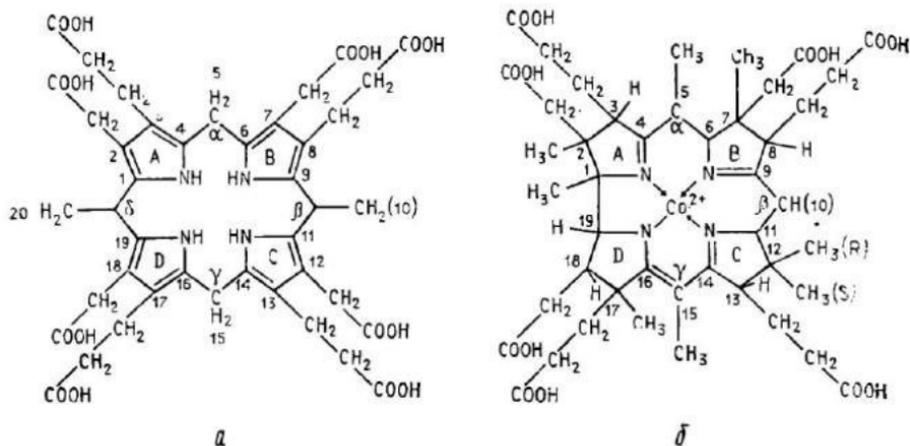
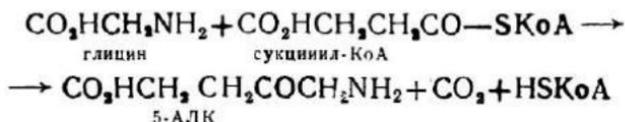


Рис. 52. Уропорфириноген III (а) и кобириновая кислота (б)

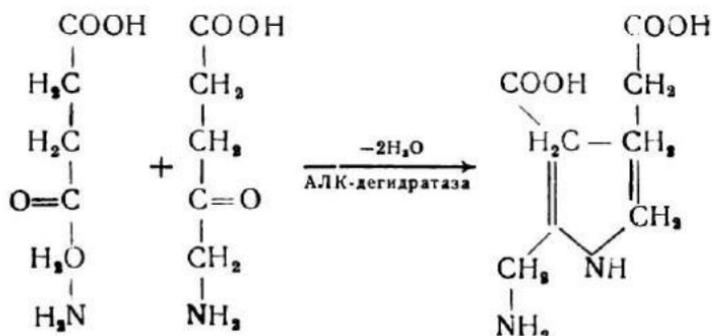
гемовые ферменты, цитохромы и линейные тетрапирролы. Тетрапиррольные пигменты имеют общий путь биосинтеза (до уровня уропорфириногена III), представленный ниже (рис. 52, а).

Биосинтез тетрапиррольных соединений у всех организмов, включая микроорганизмы, проходит через образование 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК), порфобилиногена (ПБГ) и циклический тетрапиррольный предшественник — уропорфириноген III (УПБ III, уrogen III). Из 4 возможных изомеров уропорфириногена в природных объектах встречаются только производные УПБ III. Дальнейшая модификация УПБ III приводит к образованию всех гемов, хлорофиллов, корриноидов и других тетрапиррольных пигментов. Расхождение путей, ведущих к синтезу протопорфирина IX и сирогидрохлорина, происходит с уровня УПБ III. Железосодержащие комплексы протопорфирина IX и сирогидрохлорина составляют простетическую группу гемопротеинов, включающих гемоглобин, миоглобин, леггемоглобин, пероксидазу, катализу, хлорпероксидазу, цитохром P₄₅₀, цитохромы типа *a*, *b*; Mg-содержащие производные протопорфирина IX представлены хлорофиллами и бактериохлорофиллами. Метилированное производное УПБ III хлорина приводит к синтезу сирогидрохлорина, от которого расходятся три ветки: к сирогему (при включении железа), к корриноидам (при включении кобальта) и к фактору F₄₃₀, содержащему никель (фактор метаногенов). 1-й общий предшественник синтеза тетрапирролов образуется в реакции, катализируемой АЛК-синтетазой:



АЛК-синтетазная активность показана у многих бактерий, включая *P. shermanii*. У облигатных анаэробов существует альтернативный путь синтеза 5-АЛК из глутамата (Oh-Nama et al., 1988).

Образование порфибилиногена является следующей ступенью биосинтеза коррина (и порфирина) и может быть представлено следующим образом:



АЛК-дегидратаза выделена и очищена из клеток *P. shermanii* (Dieterle, 1971; Rapp, 1971). АЛК-дегидратаза активируется глутатионом и цистином и ингибируется солями тяжелых металлов (Gibson et al., 1955; Gibson, Scott, 1961) и меркаптидами, что является указанием на важную роль SH-групп в катализе.

АЛК-дегидратаза из *P. shermanii* активна в нейтральных и щелочных условиях и отличается высокой термостойкостью. Оптимум t для активности АЛК-дегидратазы *P. shermanii* (Müller, Bezold, 1969) — около 60° . Активность фермента не зависит от возраста культуры и несколько снижена при культивировании *P. shermanii* в аэробных условиях (Menon, Shemin, 1967).

По данным Мюллера и Безольда (Müller, Bezold, 1969), активность АЛК-дегидратазы покоящейся суспензии пропионовых бактерий в аэробных и анаэробных условиях одинакова.

На основании того, что Zn^{2+} оказывал ярко выраженный стимулирующий эффект на активность АЛК-дегидратазы, заключают (Зайцева, 1970), что фермент является цинксодержащим или цинкактивируемым.

Полагают (Быховский и др., 1969а), что АЛК-дегидратаза имеет аллостерическую природу. Активность АЛК-дегидратазы ингибируется гемом, конечным продуктом биосинтетического пути; витамин B_{12} не оказывает ингибирующего действия.

При конденсации четырех молекул ПБГ (природного изомера III) образуется УПГ III. В реакции принимает участие два фермента: ПБГ-деаминаза и уропорфириноген III — косинтетаза. Показано (Müller et al., 1986) образование цинксодержащего производного — уропорфина I в бесклеточных экстрактах *P. shermanii*. Его функция пока не установлена. На следующем этапе биосинтеза, ведущего к образованию копропорфина, четыре остатка уксусной кислоты молекулы УПГ III подвергаются декарбок-

силированию. Последовательное декарбокислирование катализирует фермент уропорфириногендекарбоксилаза. Дальнейшее превращение копропорфириногена III в протопорфирин IX и далее в геммы и гемовые ферменты описаны в ряде обзоров (Быховский, Зайцева, 1983, 1989).

Пропионовые бактерии синтезируют в значительных количествах метилированные производные УПГ III — коррииноиды и 1-я корриновая кольцевая структура представлены кобириновой кислотой (рис. 52). Для получения биологически активного коррииноида из УПГ III требуется произвести около 30 ферментативных превращений. Полагают (Schneider, 1987), что эти превращения включают следующие последовательные этапы.

1. Удаление C₂₀-углерода и присоединенной СН₂-группы с образованием прямого мостика между кольцами A и D.

2. Включение кобальта.

3. Декарбокислирование уксусной кислоты при C₁₂.

4. Метилирование при C-1, C-5, C-12, C-15 и C-17. S-аденозилметионин (SAM) служит донором метильных групп, но соответствующий фермент не выделен. Метилирование при C-12 и C-17 сопровождается восстановлением пиррольных колец C и D. Последовательность метилирования неизвестна.

5. Присоединение к кобальту 5'-дезоксаденозина.

Метилированные производные уропорфириногена III были выделены (Быховский, Зайцева, 1976) из культуральной жидкости *P. shermanii*, ингибируемой в средах, не содержащих солей кобальта. Эти метилированные УПГ были названы коррифиринами: коррифирин I (фактор 1) содержит одну метильную группу, коррифирин-II (фактор 2, сирогидрохлорин) имеет две метильные группы и коррифирин III (фактор 3, триметилбактериохлорин) несет три метильные группы, причем одна из них локализована при C-20, которая в последующих реакциях удаляется с образованием корриновой структуры. Путь от коррифирина III к кобириновой кислоте пока не установлен и промежуточные продукты не выделены.

Работая с клетками *P. shermanii*, группа Бернгауэра (Bernhauer et al., 1968) показала, что остатки уксусной и пропионовой кислот кобириновой кислоты амидируются. Кобириновая кислота несет семь карбоксильных групп, из которых шесть (Schneider, 1987) амидируются аммонием, а 7-я — 1-амино-2-пропанолом. Последовательность амидирования и стадия включения аминопропанола точно неизвестны. Получены данные (Быховский и др., 1982; Елисеев и др., 1988), позволяющие предположить, что у пропионовых бактерий донором амидных групп может выступать глутамин (его амидная группа) и что глутаминсинтезирующая система участвует в амидировании кобириновой кислоты. Амидная группа глутамина в 4 раза более эффективно используется для амидирования, чем аминная. С бесклеточным экстрактом *P. shermanii* показано (Ford, Friedman, 1976), что источником 1-амино-2-пропанола (АП) служит L-треонин.

Амидирование кобириновой кислоты пропорционально концентрации аминного азота в среде *P. shermanii* (Rapp, 1968). Полностью амидированную кобириновую кислоту, не содержащую изопропанола (ИП), называют кобировой. Момент включения ИП не зависит от концентрации азота в среде, но зависит от способности *P. shermanii* синтезировать корриноиды. У активных культур включение ИП происходит уже после амидирования в положении «с», но в основном в три- и дикарбоновые кислоты и в кобировую кислоту (Rapp, 1968). Фридрих и Сандек (Friedrich, Sandeck, 1964), работая с мечеными карбоксильными производными, показали, что ИП включается только в кобировую кислоту. К такому же выводу пришла группа Павелкевича (Bartosinski et al., 1967), изучая превращение корриноидных соединений в динамике развития *P. shermanii*.

По данным польских авторов, 87% монокарбоксильных производных кобириновой кислоты представлено кобировой кислотой. Кобировую кислоту с ИП называют кобиновой, а ее амид — кибинамидом, который считали интермедиатом в биосинтезе кобаламина.

Однако кибинамид был обнаружен в следовых количествах среди промежуточных корриноидных соединений *P. shermanii* (Bartosinski et al., 1967), вследствие чего не кибинамид, а кобировая кислота является предшественником кибинамидгуанозиндифосфата — интермедиата кобаламинов.

В настоящее время трудно сказать, будет ли кобировая кислота обязательным интермедиатом в биосинтезе корриноидов. Однако следует учитывать, что она широко распространена в природе (Bernhauer et al., 1960). *P. shermanii* трансформирует добавленный в среду меченый кибинамид в кобировую кислоту (Friedrich, Sandeck, 1964). Следует иметь в виду, что эндогенное превращение карбоксильных корриноидов может отличаться от их экзогенных превращений. Кроме того, степень амидирования карбоксильных кислот зависит от состава среды. В синтетической среде, например, отношение кобировой кислоты к общему количеству корриноидов выше, чем в богатой естественной среде (Rapp, 1968), видимо, в связи с тем, что в первой среде возможности для амидирования ниже, чем во второй (поэтому аминпропанол может быть включен в неполностью амидированную кобириновую кислоту).

Таким образом, имеющиеся данные не дают основания точно определить стадии включения АП, а также отдать предпочтение кобировой кислоте или кибинамиду как обязательным интермедиатам при биосинтезе молекулы витамина В₁₂. В отсутствие кобальта биосинтез корриноидов останавливается на стадии сирогидрохлорина (Вукховску, 1979). Существует фермент кобальтохелатаза, катализирующий включение кобальта в порфирины. Микроорганизмы очень эффективно поглощают ионы кобальта из окружающей среды. *P. shermanii* количественно поглощает [⁶⁰Co] Co²⁺ даже при столь низкой его концентрации, как 10⁻¹²М. Поглощение Co²⁺ клетками *P. arabinosum* сильно ингибируется ионами Mn²⁺ (4·10⁻⁵ М), Mg²⁺ (5·10⁻⁵ М), менее сильное ингибирующее действие оказывает

Zn ($2 \cdot 10^{-4} \text{M}$) и Pb^{2+} ($2 \cdot 10^{-3} \text{M}$). Cu^{2+} и Hg^{2+} проявляют стимулирующее действие при концентрации 10^{-2}M (Schneider, 1987).

Образование полных (содержащих нижний нуклеотидный лиганд) корриноидов происходит через следующие этапы.

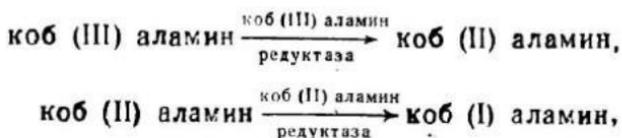
1. Кобинамид + АТФ \rightarrow кобинамид-Ф + АДФ.
2. Кобинамид-Ф + ГТФ \rightarrow ГДФ-кобинамид.
3. ГДФ-кобинамид + α -рибазол-5-Ф \rightarrow кобаламин-5-Ф.
4. Кобаламин-5-Ф \rightarrow кобаламин + Ф_n.

Кобинамидкиназа обнаружена в экстракте *P. shermanii* (Renz, 1968). Вторая реакция катализируется ферментами из клеток *P. arabinosum* и *P. shermanii* в присутствии ионов Mg^{2+} , глутатиона или другого восстановителя (Bernhauer, Wagner, 1962; Ronzion, Barker, 1967).

У *P. shermanii* кобинамид и кобинамид-ГДФ присутствуют в молодых клетках, растущих в анаэробных условиях. У пропионово-кислых бактерий нижний лиганд полных корриноидов (кобаламинов) представлен 5,6-диметилбензимидазолом. При аэрации способность к синтезу 5,6-диметилбензимидазола (5,6-ДМБ) усиливается, что видно из табл. 58.

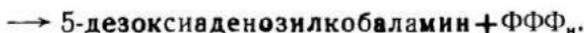
Если в культуру вводят синтетический 5,6-ДМБ, то аэрации не требуется. Клетки *P. shermanii* содержат термостабильный фермент, катализирующий включение нуклеотидного основания в корриноид. Образование α -рибазол-5-Ф в результате гликозидазной реакции и его включение в ГДФ-кобинамид требует участия рибосом и L-18 рибосомальных белков (Walerich, Pezacka, 1979). Нуклеотидное ядро синтезируется независимым путем. Непосредственным субстратом 5,6-ДМБ выступает флавиномононуклеотид (Renz et al., 1974). У многих микроорганизмов, включая пропионовые бактерии, в значительных количествах синтезируются неполные корриноиды. Специфическая фосфатаза (четвертая реакция) не была обнаружена; коэнзимная форма витамина B_{12} -5-Ф является активным кофактором в B_{12} -зависимых реакциях (Schneider, Friedman, 1972). Витамин B_{12} (цианкобаламин, $\text{CN}-\text{B}_{12}$) функционирует в двух своих коферментных формах 5-дезоксаденозилкобаламина (Ado-кобаламина, AdoCbl и метил-кобаламина (CH_3Cbl), при этом 5-дезоксаденозин и метильная группа замещают верхний лиганд кобальта (в природных формах он представлен окси-группой, а в витамине B_{12} — CN -группой). Аденозилирующие системы проявляют широкую специфичность по отношению к корриноидным субстратам.

Включение аденозинового лиганда в молекулу витамина B_{12} (B_{12}) требует, чтобы кобальт находился в восстановленном состоянии (Co^{1+}). Последовательность реакций выглядит следующим образом:



Влияние состава среды и аэрации на образование кобаламина
видами рода *Propionibacterium* (по Schneider, 1987)

Виды	Температура инкубации	Состав среды	Объем среды	Аэрации	Выход
<i>P. freudenreichii</i>	30°	глюкоза, гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, лактат	150 мл	нет	3,4 мг/л за 90 ч
<i>P. freudenreichii</i>	30°	глюкоза, пептон, дрожжи, CoCl_2 , фосфатный буфер	15 л	слабая	2,4 мг/л за 96 ч
<i>P. freudenreichii</i> , <i>L. casei</i>	30°	сухая молочная сыворотка, гидролизат казеина, CaCO_3 , MnSO_4 , CoCl_2	2,5 л	нет	2 мг/л за 96 ч
<i>P. shermanii</i>	30°	дрожжевой экстракт, глюкоза, CoCl_2 , NaOH (до pH 7,0)	100 мл	нет	2,8 мг/л за 96 ч
<i>P. freudenreichii</i>	30°	автолизат дрожжей, свекловичная меласса, NH_4OH (pH 7,0)	10800 (галлоны)	слабая	4 мг/л за 96 ч
<i>P. freudenreichii</i>	30°	глюкоза, дрожжевой экстракт, CaCO_3 , CoCl_2 , NaOH (до pH 7,0)	4 л	89 ч анаэробно 24 р аэробно	13 мг/л за 113 ч
<i>P. freudenreichii</i>	30°	кукурузный экстракт, глюкоза, CoCl_2 , NH_4OH (до pH 7,0)	9500 (галлоны)	82 ч анаэробно 58 ч аэробно	24 мг/л за 168 ч
<i>P. shermanii</i>	30°	кукурузный экстракт, глюкоза, CoCl_2 , $(\text{NH}_4)\text{OH}$ до pH 7,0		70 ч анаэробно 98 ч аэробно	23 мг/л за 168 ч
<i>P. technicum</i>	30°	кукурузный экстракт, глюкоза, CoCl_2 , NH_4OH (до pH 7,0)		70 ч анаэробно 98 ч аэробно	21 мг/л за 168 ч



Восстановление корриноида осуществляется двумя восстановленными НАДФ (или НАД)-зависимыми флавопротеинами. Аденилирующий фермент имеет низкую специфичность по отношению к корриноидам и может аденилировать, кроме кобириновой кислоты и кобаламина, все Со-содержащие предшественники витамина В₁₂ и большое число В₁₂-производных, включая даже содержащие родий вместо кобальта в корриновом кольце. Низкая специфичность проявляется и в отношении к нуклеозидному донору (Gray, Shemin, 1958; Corcoran, Shemin, 1957).

Фермент присутствует не только у бактерий, но и у животных, что объясняется чувствительностью к свету Со—С-связи — довольно необычной связи для координационной химии. При врожденных дефектах аденозилирующего фермента у людей витамин В₁₂ не может выполнять коэнзимной функции, вследствие чего возникают серьезные заболевания. Оптимум рН АТФ-зависимой аденозилтрансферазы у *P. shermanii* — 8,0. Ингибирующее действие оказывает трифосфат и пирофосфат. АТФ, как донор аденозина, нельзя заменить на аденозин или АМФ. Большая часть корриноидов у пропионовокислых бактерий представлена Адо-кобаламином. СН₃-кобаламин обычно присутствует в клетках в малых количествах. Доминирующая форма корриноидов представлена псевдовитаминном, содержащим адениновый нуклеотид в качестве нижнего лиганда.

СН₃-кобаламин образуется в реакции S-аденозилметионина (SAM) с кобаламином, у которого атом кобальта находится в одновалентном состоянии.

Витамин В₁₂ + SAM → СН₃-кобаламин + S-аденозилгомоцистеин. Реакция неферментативная; специфической ферментативной системы не обнаружено.

Более детально биогенез тетрапиррольных соединений изложен в обзорах (Schneider, 1987; Leeper, 1989; Быховский, Зайцева, 1989; Buttersby, 1985; Scott, 1990).

Ранние стадии биосинтеза тетрапиррольных соединений ингибируются гемом и полной формой витамина В₁₂. При этом гем ингибирует образование 5-АЛК и урогена III, а полная форма витамина В₁₂ (но не его интермедиата) репрессирует метилирование урогена III. (Vykhovsky, 1979).

Освещение суспензии покоящихся клеток светом 2000—2500 люкс в течение 48—72 ч приводит (Yeliseev, Vykhovsky, 1990) к резкому снижению аккумуляции корриновых предшественников витамина В₁₂ — кобириновой кислоты и ее амидов и сопровождается значительным увеличением синтеза порфиринов (главным образом копропорфирина III). Важным этапом в регуляции биосинтеза витамина В₁₂ является амидирование кобириновых кислот (Быховский, Зайцева, 1989; Елисеев и др., 1988). Нарушение метилирова-

ния приводит к накоплению поликарбокислых корриноидов, которые подавляют стадии, предшествующие синтезу корриноидов, включая метилирование уропорфириногена III.

Порфирины. Пропионовокислые бактерии синтезируют в значительных количествах соединения с порфириновой структурой, которые аккумулируются и в клетках и в среде (Müller et al., 1970). Порфирины представлены в основном копропорфирином III, что свидетельствует о высокой активности уропорфириноген III декарбоксилазы и относительно низкой активности ферментов последующих этапов превращения копропорфирина III в гемовую структуру. В растущей культуре пропионовокислых кокков обнаружены также уропорфирин III и коррифирины (Быховский и др., 1987). Штаммы видов *P. shermanii* и *P. technicum* накапливают значительные количества внеклеточных порфиринов как в виде свободных карбоновых кислот, так и в виде металлокомплексов. Эти же виды характеризуются высокой витамин В₁₂-синтезирующей активностью. Виды *P. rubrum*, *P. thoenii*, *P. jensenii* синтезируют незначительные количества порфиринов и корриноидов. Таким образом, у пропионовых бактерий прослеживается корреляция между способностью к синтезу порфиринов и корриноидов. *P. shermanii* М-82 (суперпродуцент витамина В₁₂) в оптимальных условиях роста синтезирует более 2,0 мг/л порфиринов без добавления предшественника (5-АЛК) и ~3,5 мг/л при внесении в среду 5-АЛК. Максимальный синтез порфиринов наблюдается при содержании в среде глюкозы — 2%, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,5 мг/л и 5-АЛК — 20 мг/л. При культивировании бактерий в кукурузно-глюкозной среде синтезируется примерно в 2 раза больше порфиринов, чем при культивировании в глюкозо-пептонной среде. Наиболее перспективен штамм *P. shermanii* М-82 (образует до 10 мг/л в оптимальных условиях). Соли железа подавляют образование порфиринов культурой *P. shermanii*, как и культивирование бактерий в аэробных условиях (Быховский, Зайцева, 1989) в связи с подавлением АЛК-синтетазы и АЛК-дегидратазы (Menon, Shemin, 1967), участвующих на первых этапах общего пути образования тетрапирролов. Порфирины синтезируют растущие, покоящиеся и иммобилизованные клетки пропионовокислых бактерий, что весьма существенно для получения этих веществ на практике (см. ниже). Суспензии покоящихся клеток (*P. shermanii*, *P. technicum* и *P. coccoides*) аккумулируют в инкубационной среде копропорфирин III и коррифирины. Наибольшее образование порфиринов (главным образом копропорфирина III) из экзогенной 5-АЛК наблюдается у *P. shermanii* М-82, *P. technicum*, *P. coccoides* и *P. shermanii*; *P. rubrum* и *P. thoenii* практически не используют добавленную АЛК (Полулях и др., 1991). Высокое накопление порфиринов бактериями коррелировало с высокой активностью АЛК-дегидратазы и порфобилигеназного комплекса. С использованием штамма М-82 наиболее высокий синтез порфиринов покоящимися клетками наблюдали (Полулях и др., 1991) при концентрации глюкозы 0,5% и клеток 2,5—2,8 мг/мл. Эти условия способствовали наиболее полной тран-

сформации (14,2—14,5%) АЛК в тетрапирролы. Причем при низкой концентрации биомассы большая часть порфиринов обнаруживалась вне клеток, а при увеличении содержания биомассы до 2,8 мг/мл и выше увеличивалось содержание внутриклеточных порфиринов от 40 до 2020 мкг/л, а общее содержание — от 500 до 2940 мкг/л. Накопление порфиринов возрастало при увеличении содержания 5-АЛК в среде от 5,0 до 100,0 мг/л, но относительная корреляция между количеством образованных порфиринов и содержанием АЛК наблюдалась при концентрации предшественника в пределах 5,0—20,0 мг/л.

Количество образованных порфиринов и степень использования экзогенной АЛК клетками, предварительно выращенными в присутствии кобальта, соответственно в 2 и 3 раза выше, чем у клеток, выращенных в среде без кобальта. Коррифирины — метилированные восстановленные производные уропорфирина III — образуются при строгом анаэробнозе, исключении из среды солей кобальта и добавлении DL-метионина и восстановленного глутатиона (Полулях, 1987) и при использовании бактериальной суспензии повышенной плотности (Полулях и др., 1991).

Любопытно, что при длительных сроках инкубации, а также при повышении температуры иммобилизованные клетки *P. shermanii* синтезируют копропорфирин I (Полулях, 1987).

Недавно показано (Выговская и др., 1990), что *P. shermanii* (штамм МУ-512) образует как внеклеточные, так и внутриклеточные порфирины (уро-, копро- и протопорфирины) без добавления экзогенного предшественника при культивировании в средах, содержащих углеводороды. Из цитоплазмы и из мембран *P. shermanii* выделен (Познанская, Елисеев, 1984) кобальт-порфирин-белковый комплекс и показано, что кобальт в составе этого комплекса способен акцептировать электроны с электрода. Вообще функции порфиринов и порфирин-белковых комплексов у пропионовых бактерий не изучены. Можно пока только предполагать, по аналогии с показанной функцией этих соединений у *Desulfovibrio desulfuricans*, их участие в переносе электронов.

Кожные пропионовые бактерии *P. acnes* и *P. granulosum* также образуют тетрапиррольные пигменты, представленные в основном копропорфирином III, а также уропорфирином III и протопорфирином IX (Lee et al., 1978).

P. granulosum за 80 ч культивирования в строго анаэробных условиях накапливает в среде 3,2 мг/г порфиринов; у *P. acnes* в тех же условиях образуется 0,46 мг/г порфиринов. На аккумуляцию порфиринов кожными бактериями сильное стимулирующее действие оказывало внесение в среду 5-АЛК. При этом выход порфиринов достигал 26,8 мг и 13,1 мг на 1 г сухой биомассы *P. granulosum* и *P. acnes* соответственно. Высокий выход порфиринов у *P. granulosum* позволяет видеть в этом штамме перспективного промышленного продуцента порфиринов.

Гемсодержащие ферменты (каталаза, пероксидаза). Пропионовокислые бактерии синтезируют значительные

**Влияние аэрации на активность каталазы (Е/мг белка)
у пропионовокислых бактерий (Краева, Воробьева, 1981)**

Штаммы	Условия выращивания		
	анаэробные	микро-аэрофильные	аэробные
<i>Propionibacterium</i>			
<i>coccoides</i>	2800	2800	2900
<i>P. globosum</i>	1800	1900	1900
<i>P. shermanii</i>	1500	1500	1700
<i>P. pentosaceum</i>	1100	1100	1200
<i>P. petersonii</i>	600	800	800

количества каталазы (Sherman, 1921; Воробьева и др., 1968; Simon, 1968), что выделяет их из числа других анаэробных микроорганизмов. Аэрация не оказывает заметного влияния на синтез фермента (табл. 59) и в анаэробных условиях бактерии проявляют довольно высокую каталазную активность, наивысшую — у *P. coccoides* и самую низкую — у *P. petersonii*. При дефиците ионов железа в среде каталаза не синтезируется (Кузнецова и др., 1983) и в культуральной жидкости накапливается H_2O_2 (до 1,74 ммоль/л). У обеспеченных железом культур H_2O_2 не обнаруживалась. Каталазная активность на 83% ингибировалась цианистым натрием и на 90% азидом натрия (Воробьева и др., 1968), что служило косвенным указанием на геминую природу фермента. Основная активность каталазы как и супероксиддисмутазы) обнаруживалась в цитоплазме *P. globosum*, *P. shermanii* и *P. coccoides* (Краева, Воробьева, 1981).

Можно предположить, что одновременное присутствие супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы внутри бактериального матрикса позволяет клетке удалять супероксидные и пероксидные радикалы, образованные в окислительных реакциях.

Пероксидазная активность и пероксидаза у пропионовых бактерий была впервые обнаружена в нашей лаборатории Н. И. Краевой, которая в начале 80-х годов занималась изучением СОД. Для локализации СОД она использовала метод разделения белков в плоском геле, где наряду с основной полосой (СОД) всегда обнаруживалась и вторая полоса, менее окрашенная, чем главная (рис. 53). В присутствии цианида минорная полоса пропадала. Обе полосы различались в отношении R_f , однако в грубом экстракте оказалось невозможным определить пероксидазную активность либо из-за ее низкого значения, либо из-за низкой концентрации фермента. Уже после осаждения белков сульфатом аммония и получения определенной фракции удалось провести измерение удельной и общей пероксидазной активности, которая составляла 0,076 Е/мг

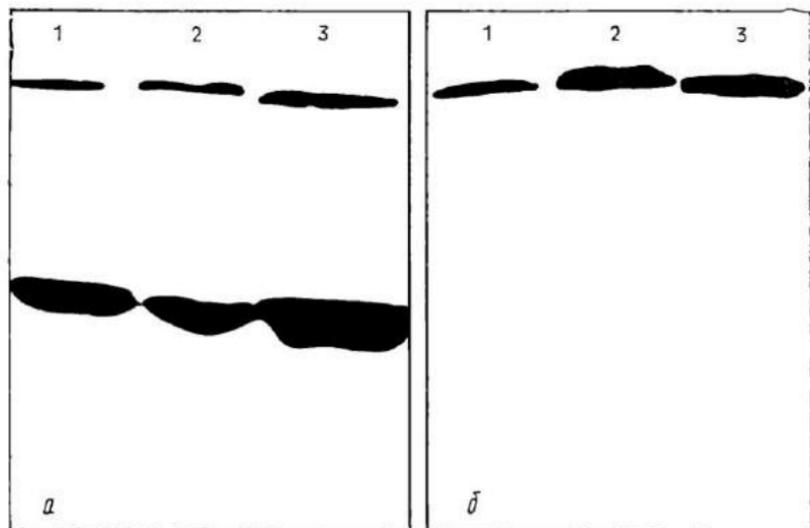


Рис. 53. Обнаружение супероксиддисмутазной и пероксидазной активности после электрофореза бесклеточных экстрактов в полиакриламидном геле (Vorobjeva, Kraeva, 1982). *a* — гель, окрашенный по методу Beauchamp, Fridovich для обнаружения супероксиддисмутазы (нагрев): 1 — *P. coccoides*, 2 — *P. shermanii*; 3 — *P. globosum*; *b* — гель, окрашенный по методу Gregory, Fridovich для обнаружения пероксидазы:
1 — *P. coccoides*, 2 — *P. shermanii*, 3 — *P. globosum*.

белка, и 1,50 Е/мг белка соответственно (Воробьева и др., 1986). Некоторые физико-химические характеристики пероксидазы *P. shermanii* были получены с высокоочищенной фракцией, полученной после гельфльтрации на сефадексе G-100. Было показано, что скорость окисления о-дианизидина (субстрата пероксидазы, используемого в экспериментах) достигает максимума при концентрации H_2O_2 0,03 мМ, а K_m для H_2O_2 равно 15 мкМ; подобно другим пероксидазам микробного происхождения, пероксидаза пропионовых бактерий обладает высокой специфичностью к перекиси водорода.

Максимальная стабильность пероксидазы наблюдалась при температуре от 20 до 30°. Нагревание в течение 10 мин при 100° вызывает полную инактивацию фермента, что свидетельствовало о белковой природе пероксидазы. Оптимум рН находится в пределах 6,8—7,0, в то время как другие пероксидазы характеризуются оптимумом рН от 4,5 до 5,5. Ингибирование активности пероксидазы сульфидом натрия, азидом натрия и цианидом калия (табл. 60) позволяет предположить, что пероксидаза *P. shermanii* относится к гемсодержащему ферменту. Ее функция у пропионовых бактерий точно неизвестна.

Корриноиды. Витамин B_{12} имеет наиболее сложную структуру из всех тетрапиррольных пигментов и даже из всех неполимер-

Влияние ингибиторов на пероксидазную активность
P. shermanii (Воробьева и др., 1986)

Ингибитор	Концентрация, моль/л	Ингибирование *, %
Na ₂ S	1·10 ⁻⁴	75
	1·10 ⁻⁵	64
NaN ₃	1·10 ⁻¹	60
	1·10 ⁻²	3
KCN	1·10 ⁻¹	95
	1·10 ⁻²	50

$$* E_{\text{без инг}} - E_{\text{с инг}}/E_{\text{без инг}} \times 100.$$

ных соединений. Он был первым металлоорганическим соединением, выделенным из биологических систем (рис. 54).

Центральный атом кобальта (Co³⁺) находится в центре макроцикла, который отличается от других пигментов наличием прямой связи между кольцами A и D и большого числа метильных групп по периферии. Молекулярная масса Aдо-кобаламина — 1355 дальтон. В случае кобаламинов нижний лиганд (Co-α) представлен диметилбензимидазолом, связанным с рибозо-Ф, который, в свою очередь, присоединен к D-пиррольному кольцу через аминоксирит. Биологическую активность у высших организмов проявляют только кобаламины. Верхний (Co-β) лиганд в случае коэнзима представлен 5-дезоксаденезином, но может сильно варьировать, что не оказывает влияния на связь с белками или на биологическую активность, но даже незначительные изменения в корриновом кольце или Co-α связи приводят к серьезным изменениям биологической активности и связывания с белками у высших организмов. Два фосфито-Ф-кобаламина, — фторметилфосфито-Ф-кобаламин и диметилфосфито-Ф-кобаламин, — получение путем частичного химического синтеза, в эксперименте с *Ochromonas malhamensis* и с *E. coli* 215 были столь же активны, как и CN-кобаламин, а Fe (III)-кобаламин и фактор VA (имеет измененный корриновый макроцикл, полученный из активированных сточных вод) проявляли очень слабую активность (Kamikubo et al., 1982). Микробиологическая активность коррелировала со способностью связываться с внутренним фактором млекопитающих.

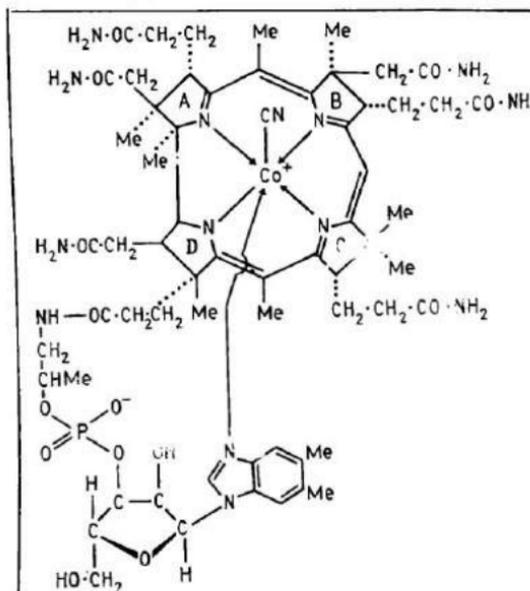
Корриновое кольцо и нуклеотидное ядро синтезируют только бактерии и некоторые водоросли, а β-лиганды могут также присоединяться к кобальту ферментными системами животных и человека. Синтез предшественников в адекватных количествах часто нарушается, поэтому наряду с биологически активными корриноидами микроорганизмы содержат неполные формы корриноидов, особенно те, у которых отсутствует нуклеотидное ядро (табл. 61): кобировая кислота, кобинамид, кобинамид-Ф и кобинамид-ГДФ.

Фенотипы Сов I, Сов II и Сов III-мутантов
Salmonella typhimurium (Jeter et al., 1987)

Генотип	Анаэробный рост в минимальной среде с добавлением:					
	минимальная среда	метионин	B ₁₂	кобинамид	ДМБ	ДМБ и кобинамид
Met E	+	+	+	+	+	+
Met E Сов I	—	+	+	+	—	+
Met E Сов II	—	+	+	—	+	+
Met E Сов III	—	+	+	—	—	—

Примечание. «+» — есть рост, «—» — роста нет при добавлении указанного вещества. Met E—B₁₂ независимый фермент, катализирующий конечные этапы синтеза метионина.

При неблагоприятных условиях для синтеза нуклеотидного ядра доминируют неполные формы, особенно кобинамид. Содержание полных форм увеличивается в старых клетках (или аэрируемых) за счет неполных форм. Природные, содержащие основание, корриноиды могут быть разделены на 3 группы, содержащие: 1) бензимидазольное кольцо, 2) пуриновое основание, 3) безазотистое вещество, как фенол и паракрезол. Паракресол-кобамид и фенолил-кобамид выделены из клеток гомоацетогенных бактерий *Sporotus ovala* (Stupperich, Esinger, 1990). Пурин (аденил)-кобамид-(псевдовитамин B₁₂) и 2-метиладенин-кобамид (фактор А) *P. shermanii* и *P. freudenreichii* синтезируют в малых количествах и в условиях неблагоприятных для синтеза бензимидазола, образуют кобамид без нижнего основания — фактор В (Boretti, 1960). *P. arabinosum* и бактерии, живущие в пищеварительном тракте человека и животных, синтезируют преимущественно пуринсодержащие кобамиды. Если к кормам добавляют 5,6 ДМБ, то в желудке животных увеличивается синтез кобаламинов (Rickard et al., 1975). Обнаружение у бактерий и водорослей (Neujahr, Fries, 1966) неполных



корриноидов служит указанием на то, что биосинтез идет с трудом. Кобинамид, псевдовитамин В₁₂, фактор А и фактор III — ростовые факторы для микроорганизмов, а если они содержат нуклеотид, то проявляют активность в энзиматических реакциях у животных.

Аденозилкобаламин участвует в реакциях, в которых происходит разрыв С—С-связи (Babiog, 1975), а метил-кобаламин вовлекается в транспорт метильных групп (Poston, Stadtman, 1975). Для высших организмов неактивны такие аналоги, как: кобинамид, — состоит только из корринового кольца с амидными боковыми цепями,

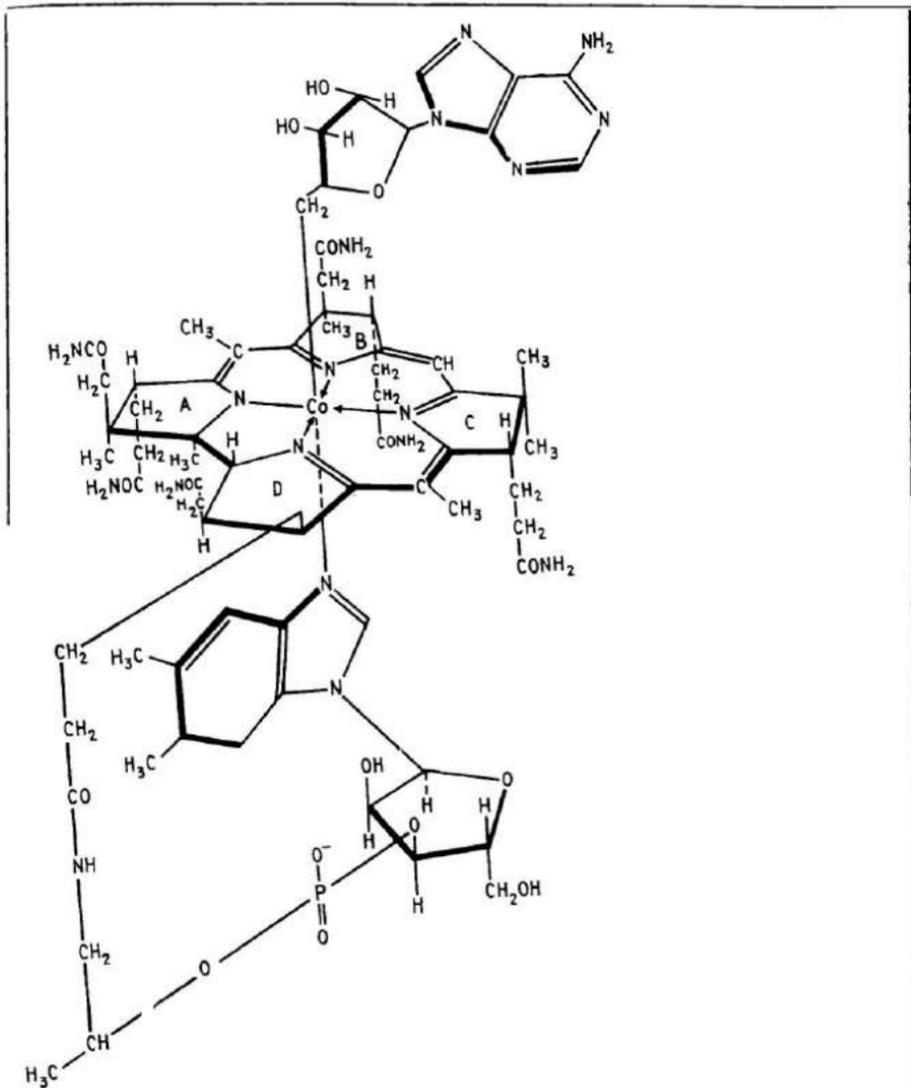


Рис. 54. Витамин В₁₂ (а) и дезоксиаденозилкобаламин (AdoCbl) (б)

но без Со- α -связанного основания; кобамиды, в которых диметилбензимидазол замещен на бензимидазол, аденин или другие основания, и ряд других корриноидов.

У пропионовокислых бактерий V_{12} -зависимые ферменты участвуют по крайней мере в 3 каталитических реакциях: изомеризации сукцинил-КоА в метилмалонил-КоА (в брожении), восстановлении рибонуклеотидтрифосфата в 2-дезоксинуклеотидтрифосфат (синтез ДНК) и, возможно, в переносе метильных групп на гомоцистеин с образованием метионина.

Общий путь биосинтеза на основе ростовых характеристик мутантов разделяют на 3 главные ветви (Jeter et al., 1987). Первую часть пути (Сов I) определяют как синтез кобинамида, который содержит корриновую структуру, Со³⁺ и боковую цепь (1-амино-2-пропанол), к ней присоединяется ДМБ. В этой части пути, видимо, участвует большая часть ферментов синтеза кобаламиновых коферментов (всего около 30). Это есть та часть биосинтеза, которая не работает в присутствии кислорода, что связано с чувствительностью кобинамидных предшественников к окислению (Battersley, Reller, 1984) или к блокированию пути под влиянием O₂. Многие бактерии, синтезирующие витамин В₁₂ в аэробных условиях, имеют средства защиты интермедиатов (Beck, 1982; Kusel et al., 1984). Вторая часть пути (Сов II) включает синтез ДМБ. Третья часть (Сов III) включает использование мононуклеотида никотиновой кислоты как донора рибозы для ДМБ и присоединение этого нуклеотида к кобинамиду с образованием кобаламина. Можно говорить и о четвертом участке пути, который включает синтез аденозилкобаламина (Адокобаламина) из экзогенного витамина. Фенотипы Сов I, Сов II и Сов III мутантов *Salmonella typhimurium* представлены в табл. 61. Все мутанты, полученные к настоящему времени, имеют дефект в небольшой области, находящейся в 42 мин против часовой стрелки от his-оперона на карте *S. typhimurium*. Между his и Сов-генами отсутствуют существенные гены, поэтому первые оказалось возможным сблизить. В анаэробных условиях в присутствии глицеринфумарата транскрипция Сов-генов в 215 раз превышает таковую при аэробном росте на глюкозе (Jeter et al., 1987). Сделан вывод о том, что Сов-гены хорошо транскрибируются в анаэробных условиях; при увеличении уровня цАМФ при аэробном росте транскрипция Сов-генов примерно та же, что и при анаэробном росте, но синтез витамина В₁₂ отсутствует несмотря на стимулирующее действие цАМФ (Jeter et al., 1987).

Образование витамина В₁₂ регулируется по крайней мере тремя контрольными механизмами: 1) репрессией витамина В₁₂, 2) репрессией кислородом, 3) стимуляцией цАМФ. Регуляция ответа на O₂ не зависит от уровня цАМФ. Экспрессия Сов I-генов в 5 раз репрессируется экзогенным В₁₂. На выход витамина В₁₂ у *P. shermanii* стимулирующее влияние оказывают ионы аммония.

В табл. 62 приведены данные (Pedziwilk, 1962) по образованию разных корриноидов штаммами пропионовокислых бактерий при

Образование корриноидов представителями различных видов пропионовокислых бактерий (Pedziwilk, 1962)

Вид	Корри-ноиды	Содержание аналогов			
		CN-коба-ламины	псевдови-тамин В ₁₂	фактор А	фактор В
<i>P. shermanii</i>	7,0	8,7	2,7	1,7	86,9
<i>P. freudenreichii</i>	5,3	7,6	1,9	0,0	91,1
<i>P. petersonii</i>	8,7	8,0	1,8	0,0	90,2
<i>P. thoenii</i>	4,7	1,9	86,1	6,6	5,4
<i>P. rubrum</i>	3,2	4,2	76,6	0,0	19,2
<i>P. jensenii</i>	2,7	0,0	43,4	19,6	37,0
<i>P. sanguineum</i>	5,6	0,0	61,4	17,9	20,7
<i>P. raffinosaceum</i>	1,2	2,8	78,5	0,0	18,7
<i>P. arabinosum</i>	4,7	3,7	85,1	4,2	7,0
<i>P. pituitosum</i>	2,5	6,9	62,0	0,0	31,1
<i>P. wentii</i>	1,4	12,9	34,7	9,9	42,5
<i>P. pentosaceum</i>	2,0	0,0	76,2	23,8	0,0
<i>P. technicum</i>	1,7	7,0	28,5	5,3	59,2
<i>P. zeae</i>	3,0	1,6	55,3	17,3	25,9

их развитии в течение 20 сут при 30° в анаэробных условиях. Наиболее активными продуцентами являются штаммы *P. shermanii* и *P. freudenreichii*, которые используют на многих промышленных производствах. Как следует из данных табл. 62, большая часть синтезируемых бактериями корриноидов представлена не кобаламинами, а факторами В. А, псевдовитамин В₁₂, которые в присутствии 5,6 ДМБ могут быть трансформированы в кобаламины всеми штаммами, кроме *P. petersonii*. Некоторые штаммы — *P. freudenreichii* (ATCC 6207), *P. shermanii* (ATCC 8262, ATCC 9614—9617) и *P. technicum* (ATCC 14073—14074) — могут самостоятельно синтезировать 5,6 ДМБ в аэробных условиях (Perlman, 1959, 1978). Поэтому рекомендованы способы получения витамина, где первую фазу осуществляют в анаэробных условиях, а вторую — в аэробных. Влияние аэрации и состава среды на выход кобаламинов штаммами *P. shermanii* и *P. freudenreichii* представлено в табл. 54.

В результате индуцированного мутагеназа и ступенчатой селекции получены (Воробьева и др., 1973; Грузина и др., 1973; Pedziwilk et al., 1983) высокоактивные продуценты. Штамм *P. shermanii* М-82 синтезирует больше 50 мг/л витамина В₁₂ (Грузина и др., 1973) и используется для получения витамина В₁₂ в нашей стране.

В японском патенте описан штамм, синтезирующий 65 мг/л витамина В₁₂ (Pat. 87920. Nippon Oil Co., Ltd. Eur., 1983). Путем приучения бактерий к повышенным концентрациям соли кобальта в Венгрии получили штамм *P. shermanii* 104в, образующий 28 мг/л витамина В₁₂ (Pat. 1032333. Brit., 1965).

Из клеток *P. freudenreichii*, *P. shermanii*, *P. arabinosum* (Skupin, 1979) и из культуральной жидкости *P. shermanii* (Смит, 1962) вы-

Образование корриноидов представителями различных филогенетических групп архебактерий (Stupperich, Eisinberg, 1990)

Архебактерии	Кобамида	Содержание (нМ/г сухой массы)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	фактор III	120
<i>Methanobolus tindaris</i>	фактор III	1400
<i>Methanococcus volta</i>	псевдо-В ₁₂	145
<i>Desulfurolobus ambivalens</i>	витамин В	15
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> (VC-16)	5-метилбензимидазол	100
<i>Pyrodiction occultum</i>	не определяли	<1

делены кобаламин-пептидные комплексы. Комплексы из клеток индуцировали синтез метионина из гомоцистеина.

Витамин В₁₂ следует относить к первичным метаболитам пропионовых бактерий. Он нужен для роста, и биосинтез корриноидов происходит с небольшим отставанием параллельно росту (Воробьева, 1976). Другие критерии, характеризующие (Bennet, Bentley, 1989) первичные метаболиты, следующие: 1) образуются у большинства микроорганизмов, 2) не накапливаются в больших количествах, 3) образуются в ограниченном числе метаболических путей. В отношении первого критерия следует сказать, что многие микроорганизмы (а может быть, и все), которые не синтезируют сами корриноиды, требуют их для роста; 64% бактериальных штаммов и 66% актиномицетов, выделенных из почвы и навоза, обладают способностью синтезировать корриноиды (Perlman, 1959; Kusubiak et al., 1957). Корриноиды синтезируют представители различных групп архебактерий (табл. 63), что служит указанием на оптимизированные структурно-функциональные отношения в корриноидах, допускающие их работу в разных условиях, включая и те, что имели место на ранних этапах эволюции жизни на Земле. Далее, у большинства прокариот, являющихся единственными синтетиками корриноидов в природе, последние образуются, как правило, в небольших количествах. Исключение составляют некоторые природные штаммы пропионовых бактерий, которые могут быть рассмотрены как природные мутанты с нарушенной регуляцией синтеза корриноидов или как штаммы с высокой физиологической потребностью в корриноидах. Мы придерживаемся второго предположения (Воробьева, 1976). В отношении третьего критерия. У всех изученных организмов синтез корриноидов происходит по единому пути, различия касаются деталей.

Как уже отмечалось, параллелизм кривой роста и накопления витамина В₁₂ имеет место не с начала логарифмической фазы

рис. 55. Накопление биомассы и витамина В₁₂ (Воробьева, Баранова, 1966): А — в среде после предварительного культивирования *Mycobacterium luteum*, Б — в среде без предварительного культивирования микобактерий; 1 — биомасса, 2 — витамин В₁₂

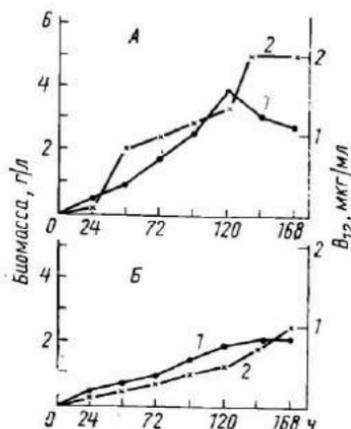
(рис. 55). В первые 10—14 ч рост бактерий, видимо, происходит за счет эндогенного витамина инокулята. Следовательно, в первые часы роста культуры нет условий или существуют препятствия для синтеза витамина В₁₂ de novo. Условиями для синтеза витамина помимо целостности клеточных структур является определенный уровень таких метаболитов, как сукцинил КоА, глицин, метионин, НАД, АТФ, ГТФ, флавины.

Молодая развивающаяся культура содержит больше этих соединений, чем старая, но именно молодая культура, активно осуществляющая конструктивные процессы, с большой скоростью утилизирует указанные соединения. Таким образом, на раннем этапе развития возникает нечто вроде конкуренции процесса биосинтеза витамина В₁₂ и других анаболических процессов за общие предшественники, ибо АТФ, НАД и ФАД входят в молекулу витамина как структурные единицы.

Показано, что культура *P. shermanii* отзывается повышением синтеза витамина В₁₂ при добавлении в среду АТФ и РНК (Канопкайте, Гибавичус, 1965). Добавление АТФ (до концентрации 3·10⁻⁴ М) увеличивает синтез витамина на 32%, а РНК (до концентрации 0,005 мг/мл) — на 65%. Приведенные результаты показывают, что синтез витамина В₁₂ в клетке лимитирован указанными соединениями. Биосинтез витамина В₁₂ культурой *P. shermanii* усиливается в период замедленного роста бактерий (Иванова, Сахарова, 1967; Работнова, Иванова, 1971).

Можно предполагать, что при снижении скорости роста бактерий и при условии сохранения того же уровня энергетических процессов часть предшественников включается в молекулу витамина В₁₂.

Тот же результат может быть получен при отсутствии должного сопряжения катаболических и анаболических процессов. Катаболизм происходит с нормальной скоростью независимо от того, может ли организм использовать энергию для биосинтеза или нет. Такие факторы, как изменение температуры (Forrest, 1969), состава среды (Forrest, 1969), концентрации ионов водорода (Ибрагимова и др., 1971), избыток субстрата (Ибрагимова, Сахарова, 1972) нарушают сопряженность энергетических и конструктивных процессов и часть метаболитов (АТФ, НАД, ФАД и др.) может при этом включаться в молекулу витамина В₁₂.



Многие наблюдатели говорили, что это именно так и есть. Факторы, снижающие скорость роста бактерий и нарушающие сопряжение процессов анаболизма и катаболизма независимо от места их приложения в метаболизме, — низкая температура (Воробьева, Козырева, 1967), замена органических источников азота минеральными (Шапошников, Воробьева, 1963) и др., — приводят к увеличению продуктивности клеток по витамину V_{12} .

Для изучения этой закономерности удобно применение антибиотиков. С помощью антибиотиков удалось показать (Коновалова, Воробьева, 1970), что факторы, снижающие начальную скорость роста бактерии, независимо от их химической природы и механизма действия, приводят к увеличению содержания в клетках витамина V_{12} . Важным условием синтеза и активности ферментов, участвующих в образовании витамина V_{12} , являются низкие значения Eh .

Синтез витамина de пово начинается при более низких значениях Eh , чем деление клеток. Во многих исследованиях, проведенных под руководством профессора Работновой (1957), показано, что путем добавления редуцирующих веществ удается сократить или полностью снять лаг-период. Это явление имело место и в случае пропионовых бактерий (Воробьева, 1976).

На процесс накопления витамина V_{12} влияние концентрации ионов водорода и гидроксила носит сложный характер, оно складывается из действия на процессы синтеза ферментов, активность ферментов и аккумуляирование витамина V_{12} в клетках (при значениях pH ниже 5,5 происходит вымывание витамина из клеток). Вообще процесс биосинтеза витамина V_{12} более чувствителен к значениям pH , чем рост бактерий. Этот факт имеет важное практическое значение, так как возникает проблема поддержания постоянного значения pH при промышленном получении витамина. В производстве постоянство pH достигается путем автоматической нейтрализации образованных кислот едкой щелочью. У этого способа есть ряд недостатков: щелочь подает нестерильной, что часто вызывает инфицирование ферментаций и увеличивает объем обрабатываемой культуральной жидкости.

Постоянство pH может быть достигнуто при выращивании бактерий на среде с лактатом в качестве источника углерода. Однако выход биомассы и витамина V_{12} в среде с лактатом обычно ниже, чем с глюкозой. В связи с активным кислотообразованием при росте бактерий в среде с глюкозой с помощью буферных смесей, выбранных на основании уравнения Гендерсона-Хассельбаха, не удается стабилизировать pH на благоприятном уровне в течение всего периода развития. Однако приготовление среды на основе буферной смеси, в состав которой входит лимонная кислота, приводит к тому, что значение pH до 48 ч развития изменяется незначительно (с 7,35 до 6,92 и с 6,9 до 5,2 в случае лимонно-фосфатного и лимонно-щелочного буфера соответственно). (Воробьева, 1972; Бонарцева, 1973).

Поддержание значений pH на благоприятном уровне важно в первые сутки развития бактерий. Изучение роста бактерий во

времени показало, что добавление буферных смесей, содержащих соли лимонной кислоты, вызывает незначительную задержку роста (о значении этого фактора мы уже говорили) в течение первых 24 ч. Если в контрольных вариантах за 24 ч образовано 1,65 г/л сухой биомассы, то в случае с лимонно-фосфатным буфером — 1,5 г/л, а лимонно-щелочным — 1,45 (исходная концентрация). Чем выше концентрация буфера, тем больше задержка роста.

Адаптация к определенной концентрации лимонной кислоты за 24 ч заканчивается и уже через 48 ч количество биомассы в вариантах с лимонно-фосфатным буфером выше, чем в контрольных.

Положительное действие буферов, приготовленных на основе цитрата, может быть связано также с тем, что в присутствии цитрата происходит задержка в образовании пропионовой кислоты и более полная утилизация глюкозы (Osman, Chenouda, 1971). Авторами показано, что в присутствии NH_4 -ацетата образование пропионатов происходит к 48 ч и глюкоза утилизируется на 54%; если NH_4 -ацетат заменить на NH_4 -цитрат, то накопление токсичных для бактерий концентраций пропионатов происходит только к 96 ч, а глюкоза в брожении утилизируется на 62%. Цитраты бактериями почти не используются.

Положительное влияние лимонно-фосфатного буфера на выход витамина B_{12} позволило рекомендовать его для использования в производстве витамина B_{12} (Бонарцева, 1973). Применение лимонной кислоты помимо забуферивания создает элективность среды, которая в обычных условиях часто заражается посторонней микрофлорой. И, наконец, приготовление сред (любых) на лимонно-фосфатном буфере снимает необходимость периодической нейтрализации и приводит к тому, что объем культуральной жидкости не меняется в течение ферментации.

По данным польских авторов (Zodrov et al., 1967), для роста бактерий оптимальна температура 18° ; в этих же условиях отмечено наибольшее накопление корриноидов. Однако максимум роста культуры и количества витамина достигается после 14 сут., что неэкономично для промышленного производства. Мечта производителя — получить максимум биомассы с высоким содержанием истинного витамина в короткие сроки ферментации. Изучение температурных условий для роста и накопления корриноидов *P. shermanii* показало следующее (Воробьева, Козырева, 1967). При 48° развитие бактерий подавляется полностью. При 37° скорость роста выше, чем при 30 и 22° , но максимальное количество витамина обнаружено в биомассе, выросшей при 30° .

В условиях поддержания постоянных значений pH рост культуры лимитирован образующимися продуктами обмена: пропионовая кислота в концентрации $4,3 \cdot 10^{-2}$ моль/л останавливает рост, уксусная кислота менее токсична. В связи с этим благотворное действие на рост бактерий и биосинтез витамина оказывает замена части среды свежей порцией. В результате такого способа выращивания выход корриноидов удалось поднять до 30 мг/л (Czarnoska-Rocznikowa, 1966). В свете этих данных важное значение приоб-

ретает проточная ферментация, особенно для *P. freudenreichii*, *P. shermanii* и *P. technicum* (Неронова, Иерусалимский, 1959). Применяют систему из двух сосудов. В первом сосуде создают анаэробные условия; стерильную среду при этом подают с такой скоростью, которая обеспечивает постоянный уровень клеток и витамина В₁₂, анаэробные условия сохраняют до 100 ч. Во втором сосуде, соединенном с первым, условия аэробные. Этот режим соответствует двухфазности процесса витаминобразования пропионовокислыми бактериями. В анаэробных условиях, благоприятных для роста бактерий, накапливается основная биомасса, содержащая неполные факторы, в аэробной фазе неполные факторы превращаются в полные корриноиды. При непрерывном процессе получали витамина 213 мкг/л в один час, а в стационарных условиях — 141 мкг/л в один час (Mervin, Smith, 1964). Однако считают (Mervin, Smith, 1964), что проточное культивирование имеет смысл в тех случаях, когда бактерии растут быстро и продукт образуется в значительных количествах за относительно короткое время.

При проточном культивировании пропионовых бактерий в производственной (кукурузно-глюкозной) среде за короткий промежуток времени наблюдали более интенсивную, чем в стационарных условиях, утилизацию некоторых компонентов кукурузного экстракта и глюкозы, но компоненты кукурузного экстракта утилизировались по-разному и некоторые из них неполностью — явление, которое обычно не имеет места в стационарных условиях (Mervin, Smith, 1964).

С целью освобождения культуральной жидкости от продуктов обмена было предложено (Воробьева, Баранова, 1966) культивирование на отходах пропионовокислого брожения быстрорастущих микобактерий (микобактерии являются постоянными спутниками пропионовых бактерий в сырах). Установлено, что за 48—72 ч *Myc. luteum* нацело использует пропионовую (2 г/л) и уксусную (3 г/л) кислоты, накопив при этом до 15 г сухой биомассы ценного аминокислотного состава (Самойлов и др., 1968) в одном литре культуральной жидкости. Полученная биомасса и культуральная жидкость после развития микобактерий содержали витамины группы В. Если в культуральную жидкость после роста микобактерий добавить глюкозу, то можно получить благоприятную среду для развития и биосинтеза витамина В₁₂ пропионовокислыми бактериями.

Таким образом, с помощью биологической очистки от токсических продуктов обмена удастся трижды использовать среду для пропионовых бактерий, добавив в нее только источник углерода.

С целью получения витамина В₁₂ нами (Воробьева, Баранова, 1966) предложено совместное культивирование пропионовых бактерий и микобактерий. Была выбрана культура *Myc. luteum* (поскольку в комплексе с ней образуется в два раза больше витамина, чем в чистой культуре) и изучены условия совместного выращивания (рис. 55).

Для микобактерий оптимальны аэробные условия, пропионовые бактерии принадлежат к факультативным анаэробам и плохо пе-

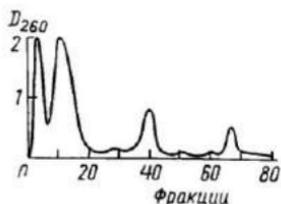
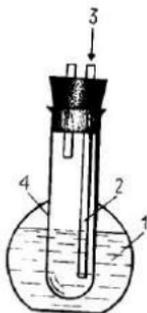


Рис. 56. Приспособление для совместного выращивания пропионовых бактерий и микобактерий (Воробьева, Баранова, 1966): 1 — культура пропионовых бактерий, 2 — культура микобактерий, 3 — стерильный воздух, 4 — полупроницаемый мешок

Рис. 57. Разделение пептидов культуральной жидкости микобактерий на ДЭАЭ-сефадексе, А-25 (Баранова, Воробьева, 1971)

реносят перемешивание (Борисова, Гоферман, 1967; Борисова и др., 1971). Для создания условий, благоприятных для роста обеих культур, был использован метод их разделения полупроницаемой пленкой (рис. 56) (Воробьева, Баранова, 1966).

Пропионовые бактерии выращивали в колбе, а микобактерии — в трубке из полупроницаемой целлюлозной пленки (фирмы Arthur, Thomas, Co, США), опущенной в культуру пропионовых бактерий. Пленка пропускает низкомолекулярные вещества и не пропускает белки и бактериальные клетки. Через культуру микобактерий начали пропускать стерильный воздух через 48 ч культивирования. В условиях разделения культур полупроницаемой пленкой выход витамина B_{12} в 2 раза выше, чем в монокультуре, однако продуктивность клеток на 30—40% ниже, чем при культивировании стационарно *P. shermanii*, что может быть вызвано отрицательным влиянием кислорода на активность АЛК-дегидратазы.

Стимулирующее действие микобактерий проявляется в основном при росте *P. shermanii* на синтетических средах, в которых единственным источником азота служит $(NH_4)_2SO_4$. При этом продуктивность клеток по витамину оказывалась в 2 раза выше, чем в производственной среде с кукурузным экстрактом.

Установлено (Воробьева, Баранова, 1966; Воробьева и др., 1966; Баранова, 1970; Баранова, Воробьева, 1971), что благотворное влияние культуральной жидкости связано с содержанием в ней аминокислот, витаминов, пептидов и, возможно, специфических стимуляторов синтеза витамина, поскольку содержание витамина в клетках увеличивалось намного больше, чем биомасса. Хотя аминокислоты оказывают существенное влияние на синтез витамина B_{12} , полная культуральная жидкость микобактерий более эффективна, что связано с комплексным влиянием многих метаболитов, выделяемых в логарифмической фазе роста.

Особый интерес представляют полипептиды микобактерий, выделяемые в культуральную жидкость и имеющие специфический стимулирующий эффект на биосинтез витамина В₁₂. В результате разделения пептидов была получена картина, представленная на рис. 57.

Специфическим стимулирующим действием обладали 10-, 11- и 12-я фракции. В этих фракциях в больших количествах содержались аргинин и L-гистидин, которые относят (Арешкина и др., 1971) к «стресс»-факторам пропионовых бактерий. В двух других фракциях пептидов, не оказывавших влияния на синтез корриноидов, указанных аминокислот не обнаружено.

Для получения высоких выходов витамина В₁₂ необходимо использование технологии, обеспечивающей создание оптимальных условий биосинтеза витамина В₁₂ и высокоактивных продуцентов витамина. Применяв специальное оборудование, позволяющее постоянно удалять из культуральной жидкости пропионовую кислоту, удалось увеличить накопление биомассы с 3,14 до 227 г/л, а выход витамина В₁₂ — с 2,14 до 52 мг/л (Hatajaka et al., 1988).

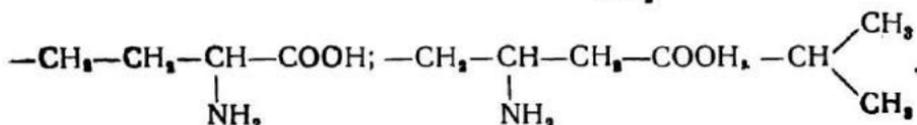
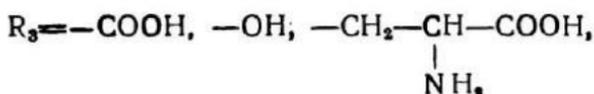
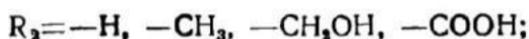
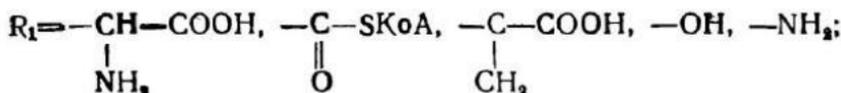
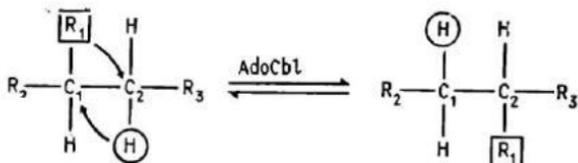
94,6% витамина В₁₂ в форме A_{do}, -СН₃-и ОН-кобаламина обнаружено (Елисеев и др., 1985) в цитоплазме, а 5,4% — в виде A_{do}-кобаламина во фракции мембран и рибосом. A_{do}-кобаламин — пептидный комплекс с молекулярной массой 10516 дальтон, состоящий из 15 аминокислот, локализован в цитоплазме *P. shermanii*.

**МЕТАБОЛИЗМ ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ
БАКТЕРИЙ НАСТРОЕН НА ВЫСОКИЙ
УРОВЕНЬ ВИТАМИНА В₁₂****5.1. В₁₂-ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ**

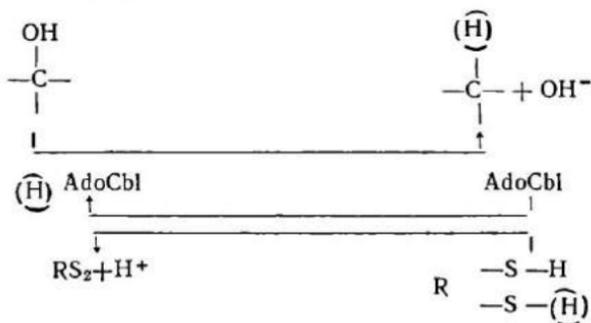
Как уже говорилось, корриноиды включают в группу тетрапиррольных соединений, несущих важные жизненные функции и потому называемых (Buttersby, 1984) «пигментами жизни»; это хлорофиллы, гемоглобин, цитохромы и кобаламины. Ионы металлов в этих соединениях находятся в комплексе с органическими лигандами, а в коферментах В₁₂ (Co-V₁₂, AdoCbl и CH₃Cbl) атом Со связан с углеродом, Co-V₁₂ — единственное металлоорганическое соединение, обнаруженное в живых организмах. Это уникальный биокатализатор. Металлоорганические соединения с Со—С-связями известны в органической химии как очень неустойчивые. Co-V₁₂, напротив, является одним из наиболее стабильных комплексов переходного металла (Schrauzer, 1968).

Энзиматический гемолиз Со—С-связи приводит к образованию очень реактивных веществ, способных отрывать атомы водорода от неактивированных метильных групп. Предотвращение быстрой стабилизации реакций в растворе или в газовой смеси, содержащей эти высокореактивные вещества, провоцирует протекание других очень быстрых реакций, которые в иных случаях должны были бы быть подавлены (Reley, 1990).

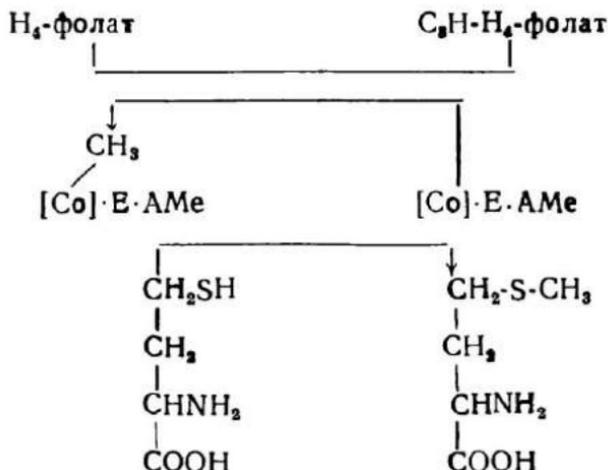
От родственных тетрапиррольных соединений корриноиды отличается полифункциональность. Большое число известных реакций, катализируемых кобамидными коферментами делят на AdoCbl- (1-я группа) и CH₃-Cbl-зависимые (2-я группа). Реакции 1-й группы включают перенос атома водорода от одного атома С к соседнему атому С молекулы и замена его другой соседней группой и восстановление рибонуклеотидтрифосфата до 2-дезоксинуклеотидтрифосфата, CH₃-Cbl-зависимые реакции — это реакции переноса метильных групп. В 1-ю группу реакций включают: а) мутазные реакции, направленные на перестройку аминокислотного скелета (глутамата, α-метилглютарата, Dα-лизина, Lβ-лизина, орнитина, 2,3-аминолейцина, а также метилмалоната; б) дегидратазные реакции, субстратом которых служат диолы (пропандиол) и глицерин; в) дезаминазные реакции, в которых дезаминированию подвергаются аминокислоты. Схематично эти реакции представляют так:



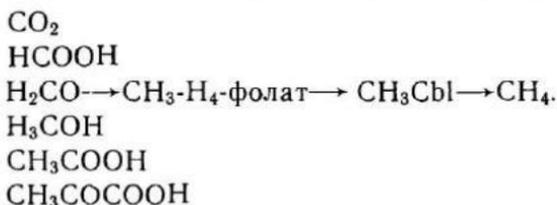
В реакции, катализируемой рибонуклеотидредуктазой (RNP), требуется экзогенный донор водорода, в качестве которого могут выступать различные дитиолы.



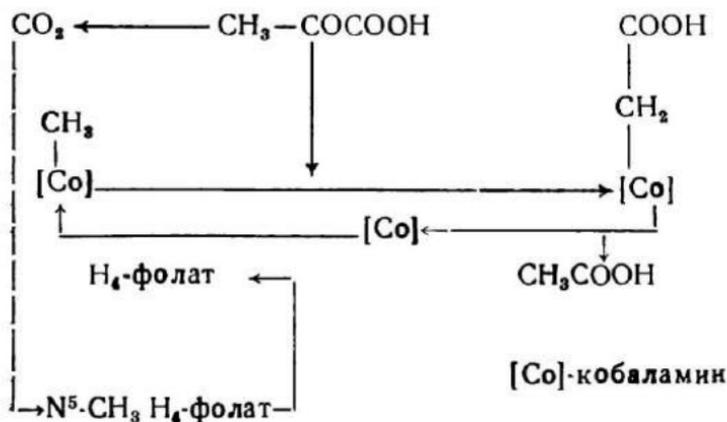
В реакции имеет место специфический обмен водородом между (5'5—H₂) AdoCbl и воды через тиоловую группу и замещение гидроксила у C-2 субстрата водородом из C-5 AdoCbl с сохранением конфигурации; взаимодействие AdoCbl/фермент/дитиолы и аллостерический сайт/активный центр, которое приводит к гомолитическому расщеплению Co—C-связи и образованию Сов(II) аламина и дезоксиаденозилного радикала. Разрыв Co—C-связи происходит при участии дитиоловых соединений. Разбору кобамидзависимых реакций посвящен ряд обзоров (Barker, 1967; Hogencamp, 1968; Stadtman, 1971; Babior, 1975; Polston, Stadtman, 1975; Hamilton et al., 1972; Orme—Johnson et al., 1974). Метилкобамидные коферменты участвуют в переносе метильных групп. Реакции 2-й группы катализируют метионин-, метан- и ацетатсинтетаза. Метионин-синтетаза участвует в синтезе метионина из гомоцистеина:



Метансинтетаза присутствует в клетках метаногенных бактерий: *Methanosarcina barkeri* (Baylock, 1968); *Methanobacillus omelianskii* (Wood, Wolfe, 1966), *Methanobacterium* (McBride, Wolfe, 1971; Bryant et al., 1968) и катализируют следующие превращения:



Ацетатсинтетаза обнаружена у *Clostridium thermoaceticum*, *Cl. formicoaceticum*, *Acetobacter woodii*. Активные формы фермента (MeCbl, (Ado) MeCbl (5'-метокси-ВЗА)MeCbl катализируют следующую реакцию:



Открыты (Frey et al., 1988) новые функции кобамидных коферментов, в частности, кобамидзависимое восстановление эпоксикиуозина (oQ) до кiuозина (Q) в тРНК *E. coli* и *S. typhimurium*. Киуозины обычно замещают гуанозин в антикодоне тРНК эубактерий и в цитоплазматической и митохондриальной тРНК низших и высших эукариот (за исключением дрожжей). De novo кiuозин синтезируют только эубактерии, а кинин (не содержит нуклеотида) служит питательным фактором для эукариот. Производное Q (содержит 2,3-эпокси-4,5-дигидроксициклопентановое кольцо oQ) обнаружили (Frey et al., 1988) в рРНК *E. coli*. При участии кобаламина oQ превращается в кiuозин. oQ возникает из рибозы; о других новых функциях Cbl-зависимых ферментов, обнаруженных у пропионовых бактерий, см. ниже.

5.1.1. B_{12} -ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ У ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

У этих бактерий витамин B_{12} участвует в реакции изомеризации сукцинил-КоА в метилмалонил-КоА, называемой ключевой реакцией пропионовокислого брожения. Она определяет завершенность брожения и образование пропионата как конечного продукта. Витамин B_{12} участвует в синтезе ДНК, а также в регуляции активности РНР; имеются косвенные указания на участие B_{12} в синтезе метионина (Skurip et al., 1970), в стабилизации тиоловых групп ферментов (Воробьева, 1976), в метилировании цитозиновых остатков в ДНК (Jordan et al., 1979), в глутаматмутазной реакции (Тошеу, 1961). Некоторые, главным образом склонные в анаэробию, дикie штаммы способны к синтезу очень больших количеств кобаламинов. Что представляют собой эти штаммы: мутанты с нарушенной регуляцией синтеза B_{12} или форму проявления физиологической потребности организма в высоких количествах корриноидов? Уже простое перечисление B_{12} -зависимых реакций могло говорить в пользу второго предположения, а ниже представлены данные, его подтверждающие.

Исследование по изучению роли B_{12} в энергетических и конструктивных процессах проводилось В. Машуром и Е. П. Иордан. Кобаламиновый кофермент был хорошим катализатором ее роста. Изящное исследование в этой серии работ было выполнено аспиранткой Н. И. Петуховой (Иордан и др., 1986); она обнаружила ряд новых фактов, главные из которых — наличие дублирующих систем восстановления нуклеозидтрифосфатов и установление регулирующей роли AdoCbl в работе этих систем у пропионовых бактерий. Однако чем глубже мы проникали в физиологию пропионовых бактерий, тем больше рождалось новых вопросов, что, впрочем, закономерно, ибо, как писал Н. Бердяев (1949), «познание тайны есть углубление подлинной тайны». При выполнении этих исследований проводилось сравнительное изучение различных сторон метаболизма полноценных по содержанию витамина B_{12} клеток и клеток, дефицитных по витамину B_{12} -клетки, 10 мкг/г витамина

V_{12} . Путем изменения содержания солей кобальта в среде получали клетки с разной концентрацией витамина: от 2000 мкг/г до ~2 мкг/г биомассы (клетки с глубоким дефицитом) (табл. 64).

Таблица 64

Содержание витамина V_{12} в клетках *P. shermanii*, растущей в среде при разных концентрациях хлористого кобальта (Иордан и др., 1984)

Концентрация $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ в среде, мг/л	Содержание витамина V_{12} , мкг/г		
	минимальная среда		минимальная среда с триптоном (0,03%)
	72 ч	96 ч	72 ч
Нет	следы	следы	10
0,01	—	—	100
0,05	—	—	200
0,10	—	—	600
0,25	—	—	—
0,50	650	730	—
1,00	1020	1200	900
3,00	1500	1700	1100
5,00	1760	1820	—

Примечание: «—» не определялось.

5.2. КАТАБОЛИЗМ И ВИТАМИН V_{12}

Главный способ получения энергии пропионовокислыми бактериями связан с брожением (см. выше). V_{12} -зависимая метилмалонил-КоА-мутаза (ЕС 5.4.9.9.2) катализирует реакцию изомеризации сукцинил-КоА в метилмалонил-КоА. Активность фермента не зависит от SH-групп. Молекулярная масса 56000. Фермент имеет высокое сродство к своему коферменту и субстрату; значения K_m для AdoCbl — $3,5 \cdot 10^{-8}$ М, L-метилмалонил-КоА — $8 \cdot 10^{-5}$ М и сукцинил-КоА — $3,48 \cdot 10^{-5}$ М, K_{eq} (для сукцинил-КоА) — 23,5 (Stroinski, 1987).

Оптimum pH ~7,4, и активность немного снижается при pH 6,0 и 8,0 (Kellermeyer et al., 1964). Реакцию изомеризации называют ключевой реакцией брожения, хотя она непосредственно не связана с генерацией АТФ. Но при участии V_{12} -зависимого фермента готовится субстрат, подвергающийся далее декарбоксилированию, которое сопровождается синтезом АТФ, выделением CO_2 и пропионата. Если реакция декарбоксилирования не происходит, то бактерии осуществляют реакцию карбоксилирования ФЕП, затрачивая при этом один макроэрг. Следовательно, при слаженной работе метилмалонил-КоА мутазы и биотинзависимой декарбоксилазы пропионовые бактерии получают выигрыш в энергии в 2 М АТФ на 1,5 М сброженной глюкозы, при этом интенсификация реакции декарбоксилирования способствует общему увеличению вы-

хода энергии. В этой связи надо понимать ключевую роль в брожении изомеразной реакции. В работе (Машур и др., 1971) использовали три штамма вида *P. freudenreichii* и представителей других видов, а также мутантный штамм *P. shermanii*, синтезирующий следы корриноидов (Машур, и др., 1971; Воробьева, 1976). Метилмалонил-КоА-мутаза имеет очень высокое число оборотов, поэтому, как показали наши исследования (Воробьева, Иордан, 1973), 2 мкг/г витамина В₁₂ достаточно для осуществления реакции. Из данных, представленных в табл. 65, следует, что культуры *P. pentosaceum*, *P. freudenreichii* (штамм 5), *P. shermanii* (штамм 6) образуют 10—11 мМ/100 мл пропионовой кислоты, в то время как содержание в их клетках витамина В₁₂ различается очень сильно: 56,0, 1650, 1070 мкг/г соответственно.

В условиях, ингибирующих биосинтез витамина В₁₂, образование пропионовой кислоты подавлено и основным продуктом брожения в этом случае становится уксусная или смесь уксусной и муравьиной кислот.

Некоторое соответствие наблюдалось между образованием витамина В₁₂ и отношением пропионовая кислота/уксусная кислота. У видов, синтезирующих мало витамина В₁₂, это отношение ниже.

При анализе продуктов брожения культуры *P. shermanii*, растущей в синтетической среде с кобальтом и на бескобальтовой (с добавлением метионина) среде, было обнаружено, что соотношение уксусная/пропионовая кислота на 6-е сутки развития в первом случае равно 1:2, а во втором — 4:1. Пропионовые бактерии, выращенные в аэробных условиях, содержат гораздо меньше корриноидов, чем при выращивании их в анаэробных условиях (Menon, Shemin, 1967), что отражается на составе жирных кислот, в котором пропионовая кислота представлена в очень незначительном количестве. Если к экстрактам клеток, выращенных аэробно, добавляли АдоСb1, то пропионат-сукцинатное превращение восстанавливалось с 30 до 50% по отношению к экстрактам анаэробно выращенных клеток (Menon, Shemin, 1967).

Бактерии с глубоким дефицитом витамина (менее 2 мкг/г биомассы) лучше растут в аэробных условиях, чем полноценные по витамину В₁₂. Культура переключается на аэробный тип существования за счет работы ЦТК и дыхательной цепи. Подавление брожения может быть связано с низкой активностью (или отсутствием) метилмалонил-КоА мутазы, SH-зависимой (Ayres et al., 1962) фумаразы и ФЕП-карбокситрансфосфорилазы (фермент требует присутствия Со⁺² и имеет к нему необычайно высокое сродство (Davis et al., 1969), но кобальт в данном случае в среде и в клетках отсутствует).

Мутантная форма *P. shermanii*, не синтезирующая кофермент В₁₂, не образует пропионовой кислоты, основным продуктом брожения становится уксусная кислота, кроме того, как и в случае исходной формы, отмечено образование муравьиной кислоты.

Образование различными штаммами и видами пропионовокислых бактерий* при сбраживании глюкозы кислот, биомассы и витамина В₁₂ (Воробьева, 1976)

Продукты обмена	<i>P. shermanii</i>						<i>P. freudenreichii</i>			<i>P. petersonii</i>	<i>P. pentosaceum</i>	<i>P. gabrum</i>		<i>P. acidoides</i>	<i>P. acetone</i>
	6	4	1	2	К	3	5	7	11	—	13	14	15	—	
Муравьиная кислота, мМ/100 мл	0,140	1,700	0,260	нет	следы	0,240	нет	0,260	0,460	0,750	0,10	0,460	0,330	0,14	
Уксусная кислота, мМ/100 мл	4,150	3,530	5,600	4,880	6,0	7,570	4,390	5,520	5,6	4,850	1,60	1,960	6,008	3,8	
Пропионовая кислота, мМ/100 мл	10,340	7,440	11,850	12,060	12,0	24,160	11,016	11,820	9,85	10,040	4,00	4,790	11,560	7,9	
Биомасса, г/л	8,5	8,0	8,0	8,6	7,0	9,2	8,1	7,4	3,5	4,8	—	3,8	2,8	7,5	
Витамин В ₁₂ , мкг/г биомассы	1070	1125	600	825	600	640	650	800	55,0	56,0	160	170	20—30	700	

* Культуры выращивали в течение 96 ч.

Полученные данные подтверждают точку зрения В. Н. Шапошникова о том, что пропионовая кислота не является обязательным продуктом брожения пропионовокислых бактерий. Один из факторов, регулирующих образование пропионовой кислоты, — это нормальный синтез кофермента V_{12} .

Сравнение активности V_{12} -зависимой метилмалонил-КоА-мутазы из исходного штамма *P. shermanii* и V_{12}^- -штамма показало, что активность фермента у первого штамма не изменяется при внесении в инкубационную смесь экзогенного витамина, в то время как у второго штамма она проявлялась только при условии внесения AdoCbl (Машур и др., 1971).

Культура, не содержащая в клетках кофермент V_{12} , не может в нормальных условиях проводить реакцию изомеризации с образованием метилмалонил-КоА, следовательно, транскарбоксилирование пирувата за счет метилмалоната у такой культуры отсутствует. Было показано, что удельная активность КоА-трансферазы (2.8.3.6) такой культуры очень низкая (0,046) и в 10 раз ниже, чем удельная активность контрольной культуры. Можно предположить, что образование оксалацетата в этом случае происходит в результате фиксации углекислоты в фосфоенолпирувате. Сравнительное изучение активности фосфоенолпируваткарбоксилазы (4.1.1.38) показало, что кофермент-несинтезирующая культура в 3 раза превосходит контрольную.

Активность фосфоенолпируваткарбоксилазы *P. shermanii*, выращенной в бескобальтовой среде и не синтезирующей V_{12} , была также выше в 2,5 раза, чем в среде, содержащей кобальт.

Далее оказалось, что развитие культуры, не синтезирующей кофермент V_{12} , зависит или во всяком случае заметно стимулируется экзогенной углекислотой. На развитие контрольной культуры добавление в среду $NaHCO_3$ стимулирующего действия не имело.

Таким образом, в условиях дефицита V_{12} ФЕП-карбоксилазная реакция



приобретает существенное значение, поскольку приводит к синтезу щавелевоуксусной кислоты, поддерживая работу цикла дикарбоновых кислот и высокий выход энергии. В этой связи может быть рассмотрена потребность V_{12} -дефицитной культуры в восстановленных соединениях серы. Дело в том, что в присутствии тиолов бикарбонат подавляет (Wood et al., 1969) пируватную реакцию $\text{ФЕП} + \text{Ф}_H \longrightarrow \text{пируват} + \text{ФФ}_H$ и ФЕП оказывается доступным для ФЕП-карбоксилазы. В экспериментальных условиях пируватная реакция необратима (Davis et al., 1969).

5.3. АНАБОЛИЗМ И ВИТАМИН В₁₂

5.3.1. УСЛОВИЯ РОСТА В₁₂-ДЕФИЦИТНЫХ БАКТЕРИЙ

Рост клеток *P. shermanii*, дефицитных по В₁₂, возможен в анаэробных условиях, с доступом воздуха — в том случае, если среда содержит одно из соединений с восстановленной серой: метионин, цистеин, тиосульфат, восстановленный глутатион или смесь аминокислот в виде триптона (Воробьева, Иордан, 1976) (рис. 58). Внесения указанных веществ не требуется, если культу-

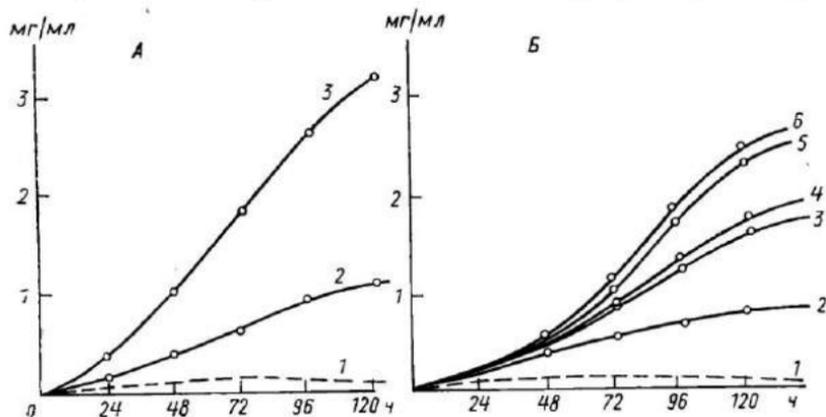


Рис. 58. Рост *P. shermanii* в минимальной синтетической среде (А) и после добавления соединений с восстановленной формой серы (Б) при разных уровнях образования витамина В₁₂ (Иордан и др., 1984). А:

1 — ионы кобальта отсутствуют (в клетках — 10 мкг/г витамина В₁₂); 2 — то же в атмосфере аргона; 3 — в среде содержится 3 мг/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (в клетках эксп. фазы — 1500 мкг/г В₁₂). Б:

1 — ионы кобальта отсутствуют, В₁₂-дефицитный вариант (~10 мкг/г В₁₂). В среду В₁₂-дефицитного варианта культуры добавлен (0,03%) восстановленный глутатион (2), тиосульфат Na (3), цистеин (4), метионин (5), триптон (6)

вирование ведут в строго анаэробных условиях, препятствующих окислению SH-групп. Непосредственное определение уровня SH-групп показало (Иордан и др., 1974), что при дефиците витамина В₁₂ их общее количество в 1,5 раза ниже, чем при содержании его в количестве 200 мкг/г биомассы. При старении культуры уменьшение количества SH-групп происходит заметнее в случае отсутствия в клетках витамина В₁₂. Таким образом, в проведенных нами исследованиях были получены прямые данные о важной роли витамина В₁₂ в поддержании в клетках определенного уровня сульфгидрильных групп.

Установлено также (Иордан и др., 1974), что активность ряда ферментов, 3-фосфоглицеральдегиддегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, в аллостерическом или активном центре которых находятся SH-группы, снижена при отсутствии витамина в клетках. Полученные нами

Чувствительность клеток к ультрафиолетовым лучам в зависимости от содержания витамина В₁₂ (Воробьева, Иордан, 1976)

Доза облучения, эрг/см ²	Контроль		В ₁₂ -дефицитные клетки		В ₁₂ -дефицитные + Ко-В ₁₂ , без цистеина
	с цистеином	без цистеина	с цистеином	без цистеина	
72000	6·10 ⁻³	3,6·10 ⁻⁴	1,6·10 ⁻⁴	9·10 ⁻⁵	8·10 ⁻⁴
108000	4·10 ⁻⁴	1,5·10 ⁻⁴	0,6·10 ⁻⁴	9·10 ⁻⁶	1,2·10 ⁻⁴

данные позволяют предположить также, что функция стабилизации SH-групп требует высоких концентраций витамина В₁₂. Возможно, в данном случае витамин В₁₂ работает не как катализатор, а скорее как реагент. Показано (Цукерман и др., 1992), что MeCbl предотвращает окисление SH-групп в печени крыс при белково-холиновой недостаточности.

Выживаемость В₁₂-дефицитных клеток (в %) при воздействии ультрафиолетовых лучей (УФЛ) на порядок ниже, чем контрольных (табл. 66).

Известно (Самойлова, 1967), что тиоловые соединения обладают защитным действием против УФЛ. Однако защитный эффект Ко-В₁₂ превышает таковой цистеина и выживаемость В₁₂-дефицитных клеток, в суспензию которых вносили Ко-В₁₂ (2 мкг/мл), выше, чем выживаемость тех же клеток без цистеина и с цистеином в отсутствие Ко-В₁₂. Следовательно, защитное против УФЛ действие Ко-В₁₂ неидентично защитному эффекту тиоловых соединений и может быть связано с увеличением числа нуклеотидов в клетках. Следствием дефицита витамина в клетках может быть снижение синтеза ферментов, участвующих в репарации лучевых повреждений, поскольку дефицит витамина В₁₂ вызывает задержку синтеза белка и ДНК (см. ниже).

Наиболее высокая скорость роста культуры во второй половине экспоненциальной фазы наблюдается при содержании в клетках 800—1000 мкг/г витамина, что соответствует концентрации хлористого кобальта в среде, равной 1 мг/л. Снижение или увеличение содержания корриноидов в клетках приводит к снижению скорости роста (Иордан и др., 1984) (рис. 59). Задержка или остановка (при отсутствии витамина В₁₂) роста служит указанием на его важную физиологическую роль; что касается отрицательного влияния на скорость роста избыточного синтеза витамина, то оно может быть понято в связи с конку-

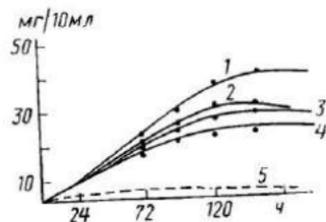


Рис. 59. Рост *P. shermanii* в минимальной синтетической среде с разными концентрациями хлористого кобальта (Иордан и др., 1984), мг/л: 1 — 1; 2 — 3; 3 — 5; 4 — 0,5; 5 — среда очищена от ионов кобальта

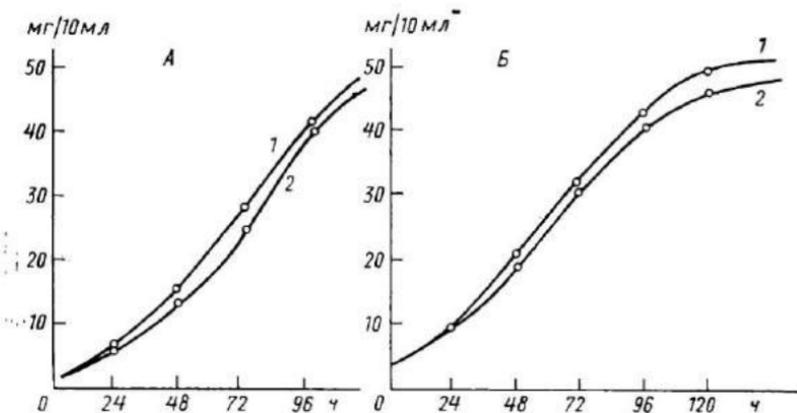


Рис. 60. Рост *P. shermanii* в среде, содержащей хлористый кобальт и триптон (0,03%) (Иордан и др., 1984). А: 1 — мг/л; 2 — 0,1 мг/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Б: 1 — 1 мг/л; 2 — 3,0 мг/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

ренцией конструктивных процессов за общие метаболиты (Воробьева, 1976). Существует целый ряд наблюдений, свидетельствующий о том, что избыточный синтез витамина B_{12} имеет для клеток определенные пределы, за которыми (1000 мкг/г биомассы) он вступает в конкуренцию с другими конструктивными процессами за общие предшественники, ибо компоненты АТФ, НАД и ФАД входят в молекулу витамина как структурные единицы. Видимо, поэтому факторы, задерживающие рост и нарушающие сопряженность энергетических и конструктивных процессов, могут приводить к усилению синтеза B_{12} (Коновалова, Воробьева, 1970; Коновалова и др., 1972; Ибрагимова, Сахарова, 1972). Добавление в среду АТФ увеличивало синтез витамина B_{12} (Канопкайте, Гибавичус, 1965). Аналогично, внесение в минимальную среду аминокислот вызывает «сближение» скоростей роста культуры, синтезирующей «оптимальный» для роста (физиологический) и избыточный уровень витамина B_{12} (рис. 60).

5.3.2. СИНТЕЗ БЕЛКА

Конкуренция синтеза витамина B_{12} и белков за аминокислоты проявляется на белоксинтезирующей активности клеток (рис. 61). Клетки, содержащие корриноиды выше и ниже физиологического уровня, имеют и более низкую, чем последние, белоксинтезирующую активность (Иордан и др., 1984).

Витамин B_{12} , по-видимому, сам опосредованным путем участвует в синтезе белка, поскольку содержание белка в клетках со «следами» витамина составляет 67% от уровня полноценных по витамину клеток. Снижение содержания белка в клетках могло быть следствием ингибирования синтеза и активности многих и прежде всего SH-ферментов в условиях дефицита B_{12} .

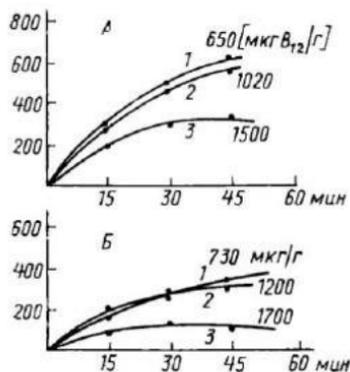


Рис. 61. Белоксинтетическая активность клеток *P. shermanii* (имп/мин·мг белка) с разными уровнями образования витамина B_{12} при росте культуры в минимальной среде в течение 72 (А) и 96 (Б) ч. А: 1 — 650, 2 — 1020, 3 — 1500 мкг B_{12} /г биомассы; Б: 1 — 730, 2 — 1200, 3 — 1700 мкг B_{12} /г биомассы

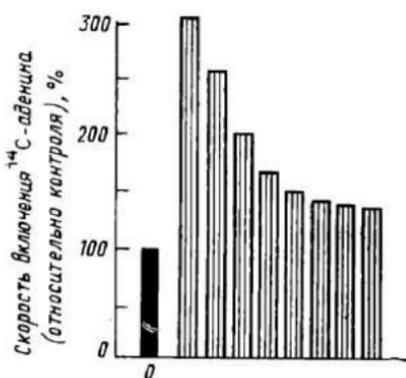


Рис. 62. Влияние аденозилкобаламина на скорость синтеза ДНК B_{12} -дефицитных клеток пропионовокислых бактерий (Vorobjeva et al., 1985) (относительно соответствующего контроля). 0 — B_{12} -дефицитные клетки (контроль). Введение аденозилкобаламина: 1 — *P. freudenreichii* ssp. *globosum*; 2 — *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii*; 3 — *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*; 4 — *P. acidipropionici*; 5 — *P. acnes*; 6 — *P. thoenii*; 7 — *P. jensenii*; 8 — *P. coccoides*

5.3.3. СИНТЕЗ ДНК

Дефицитные по B_{12} клетки содержат на 30—45% меньше ДНК, чем клетки с физиологическим уровнем витамина (Воробьева, Иордан, 1976). При внесении AdoCbl в растущую при дефиците Со культуру наблюдали (Иордан и др., 1983) увеличение содержания ДНК в клетках на 80% (табл. 67).

В исследованиях, проведенных в нашей лаборатории Петуховой и Иордан (Vorobjeva et al., 1985), была показана прямая зависимость между степенью увеличения синтеза ДНК B_{12} -дефицитными клетками под воздействием AdoCbl и уровнем природной способности различных штаммов синтезировать витамин B_{12} (рис. 62). У штаммов, потенциально способных к образованию высоких количеств корриноидов, стимулирующее действие AdoCbl проявляется в большей степени, чем у слабосинтезирующих штаммов. *P. acnes* составляла исключение из этого правила: имея потенциально высокую способность к синтезу B_{12} , она слабо «откликнулась» на введение в среду AdoCbl.

Включение 3H -аденина в ДНК находится в прямой зависимости от содержания в клетках витамина B_{12} (рис. 63). Однако дефицитные по витамину B_{12} клетки (содержат следы витамина) имели

Влияние экзогенного AdoCbl* на содержание ДНК в клетках *P. shermanii* (Иордан и др., 1983)

Содержание витамина B ₁₂ в клетках, мкг/г сухих клеток	Содержание ДНК, мкг/г сухих клеток
1100	18,0
следы	9,5
следы+ (в мкг/л)	
500	16,0
1000	17,2
2000	14,4

* AdoCbl вносили на третьи сутки развития культуры в среде без кобальта. Определение ДНК проводили в клетках четырехсуточной культуры.

Радиоактивность ДНК *P. shermanii* за 40 мин инкубации суспензии клеток с меченым аденином (Иордан и др., 1983)

Содержание витамина B ₁₂ в клетках трехсуточной культуры, мкг/г	Общая радиоактивность ДНК в единице биомассы, имп/мин	Удельная радиоактивность ДНК, имп/мг
	мг биомассы	мкг ДНК
1100	2110	116
600	1625	91
200	1340	79
100	1242	98
Следы	1102	122

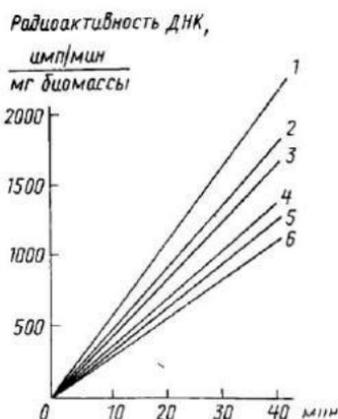


Рис. 63. Интенсивность включения ³H-аденина в ДНК в зависимости от уровня содержания витамина B₁₂ в клетках *P. shermanii* (Иордан и др., 1983). В клетках 3-суточной культуры содержится витамина B₁₂ (мкг/г): 1 — 1100, 2 — 900, 3 — 600, 4 — 200, 5 — 100, 6 — следы (~10)

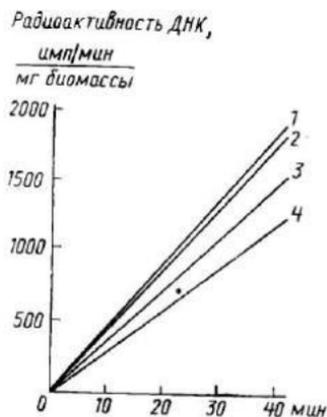


Рис. 64. Влияние экзогенного тимина на скорость включения ³H-аденина в ДНК *P. shermanii* при различных уровнях содержания витамина B₁₂ в клетках (Иордан и др., 1983): 1, 2 — клетки содержат 900 мкг/г витамина B₁₂; 3, 4 — клетки содержат следы; 1, 3 — добавлен тимин; 2—4 — тимин не добавлен. Тимин (5 мкг/мл) был добавлен в среду за 4 ч до «острого» опыта. В суспензию клеток также вводили тимин (1 мкг/мл)

примерно такую же радиоактивность ДНК, что и исходная культура (1100 мкг/г витамина) (табл. 68).

Известно, что рибонуклеотидредуктаза (РНР) микроорганизмов может в качестве кофактора использовать AdoCbl, Fe и Mn (Thelander et al., 1979; Reichard, 1985). Активность металлозависимой РНР подавляется оксимочевинной. Ингибиторное действие оксимочевины на активность РНР имело место только в случае *P. coccoides*. У представителей других видов в условиях нормального синтеза В₁₂ ингибиторное действие оксимочевины обнаружено не было, что послужило дополнительным указанием на работу у них AdoCbl-зависимой РНР.

Задержка синтеза ДНК у В₁₂-дефицитных клеток связана не только с пониженной активностью РНР, ответственной за образование дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Известно (Андреева, 1974), что витамин В₁₂ в форме СН₃-Cbl участвует в образовании тиминового предшественника ДНК. При добавлении тимина в среду с В₁₂-дефицитными клетками увеличивается содержание в них ДНК (~на 30%) (табл. 65) и скорость включения меченого аденина в ДНК (рис. 64). Для полноценных по В₁₂ клеток добавление экзогенного тимина не оказывало влияния на скорость синтеза ДНК (Jordan et al., 1979).

Внесение в среду растущей В₁₂-дефицитной культуры тимидина не приводило к повышению уровня содержания ДНК (табл. 69), возможно, вследствие того, что он не проникал в клетки. Следовательно, РНР пропионовых кислотных бактерий находится в двойной зависимости от кобамидного фермента — по линии синтеза дезоксирибозидов и тимина; не исключено, что есть и третья точка прило-

Таблица 69

Влияние тимина на содержание ДНК в В₁₂-дефицитных клетках *P. shermanii* (Иордан и др., 1983)

Тимин, мкг/мл среды	ДНК, мг/г сухой биомассы	Тимидин, мкг/мл среды	ДНК, мг/г сухой биомассы
Без тимина	9,68	без тимина	9,68
1	9,42	1	9,60
10	12,02	10	9,10
20	9,50	20	9,30
Контроль: В ₁₂ -полноценные клетки	19,20		19,20

Примечание. Тимин и тимидин вносили в среду на третьи сутки развития культуры. Определение ДНК проводили через 24 ч.

жения V_{12} -зависимых ферментов к синтезу зрелой ДНК, и такое предположение мы делаем на основании исследований метилирующей активности клеток.

5.3.4. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Было установлено (Jordan et al., 1979), что V_{12} -дефицитные клетки содержат 0,28 мол. % метилцитозина в ДНК против 0,59 мол. % у дикого штамма *P. shermanii*, что означало снижение в первом случае уровня метилирования, необходимого для созревания ДНК (ДНК из V_{12} -дефицитной и контрольной культур не различались по нуклеотидному составу). При внесении в инкубационную смесь V_{12} -дефицитных клеток метилазы и контрольных клеток CH_3Cbl наблюдали увеличение уровня метилирования ДНК до исходного (табл. 70), т. е. ДНК V_{12} -дефицитных кле-

Таблица 70

Метилирование ДНК в присутствии CH_3V_{12} и других производных витамина V_{12} *in vitro* (Антошкина и др., 1979)

Компоненты инкубационной системы		Уровень метилирования V_{12} -дефицитной ДНК, м% 5 мц	Уровень метилирования контрольной ДНК, м% 5-мц
корриониды	другие компоненты		
—	—	0,28±0,04	0,59±0,05
CH_3V_{12}	+метилаза	0,60±0,05	0,62±0,06
CH_3V_{12}	—	0,35±0,03	0,61±0,04
—	+метилаза	0,29±0,03	0,59±0,04
CoV_{12}	то же	0,27±0,05	0,58±0,03
Фактор В	>	0,26±0,04	0,60±0,06
CH_3V_{12}	+метилаза+ CF_2ClB_{12}	0,35±0,05	0,61±0,07
CH_3V_{12}	+метилаза+s-аденозилгомоцистеин	0,39±0,06	0,57±0,05

ток была «недометилирована». На уровень метилирования ДНК контрольных клеток внесение CH_3Cbl не сказывалось, так как все доступные ДНК-метилазе положения на полинуклеотидной цепи уже были прометилированы. Небольшое включение метильных групп из CH_3Cbl в ДНК дефицитных клеток происходило и в отсутствие ферментной системы, но при добавлении метилазы оно заметно увеличивалось, что служит указанием на энзиматический характер процесса. В отсутствие CH_3Cbl «дометилирование» не происходило. Оно также прекращалось, если в инкубационную смесь вносили ингибитор CH_3Cbl — CF_2ClB_{12} , что указывало на специфичность CH_3Cbl как донора метильных групп. Для метилирования *in vitro* требовалось небольшое количество S-аденозилметионина (S-AM), его конкурентный ингибитор — аденозилгомоцистеин, добавленный в инкубационную смесь наряду с CH_3Cbl , нарушал перенос метильных групп на ДНК. Далее было показано (Антошкина и др., 1981), что экстракты клеток, полноценных по вита-

мину V_{12} , активно включали метку из CH_3Cbl в метилцитозин (МЦ) и метиладенин (МА). Метилтрансферазная активность V_{12} -дефицитных клеток была гораздо ниже в отношении МЦ. Оказалось также, что два типа клеток различаются также в отношении использования донора CH_3 -групп. Метилаза V_{12} -дефицитных клеток проявляет большее сродство к 5-аденозилметионину (S-AM) и эффективно катализирует метилирование как МЦ, так и МА. Метилаза дикого штамма метилирует МА, но не МЦ за счет S-AM. Возможно, что в отсутствие CH_3Cbl S-AM служит естественным донором метильных групп для метилирования нуклеотидных оснований. Можно предположить, что при наличии CH_3Cbl в клетках происходит дополнительное метилирование, специфическое для нуклеотидных последовательностей V_{12} -зависимой метилтрансферазы. Не исключено также, что клетки содержат одну метилтрансферазу с двумя сайтами связывания: для S-AM и CH_3Cbl .

Во всяком случае, было показано (Антошкина и др., 1981), что у *P. shermanii* существуют различные механизмы метилирования цитозиновых остатков ДНК. У V_{12} -дефицитных клеток работает механизм и метилаза, использующая S-AM в качестве донора метильных групп, а у клеток, полноценных по витамину, — CH_3Cbl . В последние годы предполагавшееся нами участие CH_3Cbl в метилировании МЦ подтвердилось (Piohl-Lezkowicz et al., 1991). По данным этих авторов, витамин V_{12} , CH_3Cbl и AdoCbl значительно усиливают метилирование ДНК de novo у *Micrococcus luteus* в присутствии метилазы ДНК поджелудочной железы крысы и S-AM в концентрации вплоть до 1 мкМ; при более высоких концентрациях кобаламины ингибировали метилирование.

S-AM не ингибировал включение метильных групп в ДНК при участии CH_3Cbl , что предполагает, что S-AM и CH_3Cbl не действуют на одних и тех же энзиматических сайтах. Предположение поддерживается тем (Bester et al., 1988), что крысиная метилаза содержит две области: одну для связывания S-AM, а другую — для CH_3Cbl . Авторами показано, что CH_3Cbl ведет себя как конкурентный ингибитор реакции метилирования (K_i —15 мкМ, K_m для S-AM — 8 мкМ). Более того, подтверждены также наши данные о том, что CH_3Cbl может выступать в качестве донора CH_3 -групп в реакции метилирования ДНК. Ранее единственным донором CH_3 -групп в метилировании ДНК считался S-AM.

Итак, мы видим, что физиологический уровень корриноидов в клетках *P. shermanii* очень высокий — ~1000 мкг/г, (~1000 мкг/л), что на порядок выше, чем у других хороших продуцентов (Воробьева, 1982). Такие клетки *P. shermanii* имеют определенные преимущества перед V_{12} -клетками, будучи более устойчивыми к токсическому действию кислорода, летальному действию УФЛ, литического действию фага, и в присутствии источников питания имеют более высокую скорость синтеза белка и ДНК, чем V_{12} -дефицитные клетки. Но мы также знаем, что для биосинтеза физиологического уровня V_{12} требуется ~1 мг/л соли кобальта. Таких количеств кобальта в природных условиях, как правило, не бывает.

Содержание Co^{2+} в почве колеблется от 1 до 40 р.р.т. (Mengel, Kirkby, 1980). Поскольку растения требуют кобальт как микроэлемент, они конкурируют с бактериями за ионы Co^{2+} , конкуренция особенно сильная в почвах, бедных кобальтом.

В луговых почвах содержится наиболее высокое количество кобаламинов — до 53,6 нг/г, а в подзолистой лесной, где доминируют грибы, — до 0,05 нг/г сухой почвы; в пересчете на 10^6 бактериальных клеток это соответствует 2,3 и 0,08 нг кобаламинов, на глубине более 15 см от поверхности почвы содержание B_{12} еще ниже (Duda et al., 1957; Allavinyte et al., 1982).

В природных водах (морях и в пресных водоемах) содержание кобаламинов от 0,1 до 30 нг/л (Zochhed, 1958; Iwasaki et al., 1968), т. е. уровни кобаламинов примерно в 1000 раз ниже, чем в почвах. За счет выделения водорослями значительных количеств растворимых белков (Lochhead, 1958; Schneider, 1987), сходных с белками (внутренним фактором и кобалофилином), связывающими кобаламины у млекопитающих, происходит активное поглощение кобаламинов в воде, вследствие чего они оказываются недоступными для организмов (бактерии активно поглощают не только Co^{2+} , но и кобаламины).

Рассмотрим другие места естественного обитания пропионовых бактерий. В травах, основных кормах сельскохозяйственных животных, содержание Co^{2+} ниже определенного лимита — $\sim 0,08$ р.р.т. (Underwood, 1971), поэтому кобальт часто выступает как лимитирующий элемент, и если соли кобальта специально не добавляют к кормам, то животные испытывают дефицит по кобаламинам. Животные обеспечиваются корриноидами главным образом через биосинтетическую деятельность бактерий. При добавлении к кормам 1 мг Co /день в сухом остатке лигнина желудка жвачных содержится 0,59—1,0 мкг/г кобаламинов; если Co^{2+} специально не вносят, то уровень кобаламинов на порядок ниже — 0,082—0,108 мкг/г (Smith et al., 1970).

При этом содержание B_{12} во всех тканях и жидкостях тела животного оказывается низким, поэтому концентрация витамина в мясе, молоке и других продуктах, получаемых из животного, зависит от содержания кобальта в кормах. Естественным местом обитания пропионовых бактерий служат также сыры и силос. Содержание кобаламинов в этих продуктах представлено в табл. 71. Если учесть, что в сыре содержится минимум 10^5 клеток/г, то становится ясно, что бактерии сыра существуют при дефиците по кобаламинам. То же касается бактерий, обитающих в силосе. Содержание кобаламинов в силосе 0,1—2 мкг/100 г (Smith, 1965). Результаты прямых определений биосинтетической активности бактерий, обитающих в желудке жвачных животных и не получающих дополнительно солей кобальта, представлены в табл. 72. По-видимому, типичный компонент жвачных бактерий *P. acnes* включен в категорию неназванной группы, и мы видим, что эти бактерии существу-

Содержание витамина В₁₂ в
пище и других биологических
материалах (Adams et al., 1973)

Источник	Мкг витамина В ₁₂ в 100 г (или 100 мл) сырого материала
Молоко (козье)	0,01 (Smith, 1965)
Молоко (людей)	0—0,24 (Neujahr, 1960)
Молоко цельное (жоровье)	0,39 (Adams et al., 1973)
пастеризо- ванное Сыр «Чеддер»	0,77 (Adams et al., 1973; Farguharson et al., 1976)
Сыр «Эдамский»	1,7—2,6 (Adams et al., 1973)
Силос	0,1—2 (Smith; 1965)

Образование витамина В₁₂*
микрофлорой желудка жвачных
(коров) (Dryden et al., 1962)

Виды	Кобаламины, нг/мл
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	0,14±0,04
<i>Peptostreptococcus elsdenii</i>	0,24±0,26
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0,15±1,26
Неизвестная группа	0,41±0,01

* Определяли с *O. malhamensis*

ют при низком уровне кобаламинов. Следовательно, можно предполагать, что в природных условиях пропионовые бактерии ведут в большинстве своем «маловитаминный» образ жизни, хотя при соответствующих условиях охотно переходят к метаболизму, настроенному на высокий уровень корриноидов. Но если принять, что «маловитаминный» стиль жизни в природе доминирует, то трудно объяснить, как бактерии находят, например в почве, водоемах и др. местах, вещества с восстановленной формой серы или строго анаэробные условия, необходимые, как было нами показано, для размножения и такого рода существования. Такая стратегия в природе маловероятна и другая возможность в таком случае связана с эксплуатацией бактериями иных систем, дублирующих В₁₂-зависимые. Показано (Воробьева, 1976), что при недостатке витамина метаболизм пропионовых бактерий перестраивается таким образом, что концентрация неорганического фосфора в клетках снижается. Это достигается меньшим потреблением фосфора из среды и увеличением количества высокополимерных полифосфатов (и, видимо, также нуклеозидтрифосфатов). Вследствие такого рода перестройки одновременно со снижением активности ферментов гликолиза (Лабори, 1970) происходит активизация ферментов пентозного пути, в результате чего в клетке накапливаются восстановительные потенциалы НАДФН и глутатион, обеспечивающие ее реполяризацию, необходимую для работы многих ферментов анаболизма и катаболизма.

Полученные данные являются дополнительным, хотя и косвенным, указанием на важную роль корриноидов в реполяризации клетки. Нам представляется эта роль корриноидов важной в обме-

не веществ пропионовых бактерий. Именно поэтому в отсутствие витамина B_{12} весь метаболизм клеток перестраивается на возмещение этой функции за счет работы другой (или других) системы, а бактерии становятся ауксотрофными по соединениям, содержащим восстановленную форму серы.

Наблюдаемая нами меньшая зависимость активности метилмалонил-КоА-мутазы от концентрации витамина B_{12} , видимо, объясняется тем, что этот энзим, в отличие от других корриноидных энзимов, не содержит SH-групп.

Анализ фактов, касающихся синтеза ДНК B_{12} -дефицитными клетками, подводил нас также к мысли о том, что у таких клеток может действовать B_{12} -независимая система. С целью ее обнаружения были проведены исследования, результаты которых обобщены в диссертации Н. И. Петуховой (1988) и в ряде публикаций (Петухова, 1988; Иордан и др., 1986; Иордан, 1992).

При длительных пересевах штамма *P. shermanii* в среде, тщательно очищенной от ионов кобальта (имитировали длительное существование бактерий в соответствующих природных условиях), наблюдалась такая перестройка метаболизма клеток с глубоким дефицитом B_{12} (~ 2 мкг/г B_{12} , условно B_{12}^- -клетки), что синтез ДНК перестал зависеть от B_{12} . Получали адаптированные к таким условиям клетки. И далее сравнивали условия синтеза и активности РНР у полноценных по витамину клеток B_{12}^+ -клеток (800—1000 мкг/г), дефицитных (~ 10 мкг/г) и клеток с глубоким дефицитом B_{12} (~ 2 мкг/г) или адаптированных к глубокому дефициту клеток (B_{12}^-).

В B_{12}^- -клетках содержание ДНК было примерно таким же, как в полноценных по витамину клетках. Было показано (рис. 65), что у клеток специфический ингибитор металлзависимой РНР—оксимочевина — подавляет активность РНР, в отличие от клеток с нормальным уровнем B_{12} (~ 1000 мкг/г). Более того, активность РНР

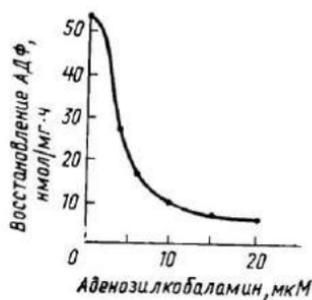
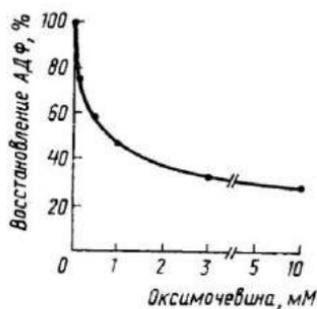


Рис. 65. Действие оксимочевины на активность рибонуклеотидредуктазы II экстрактов B_{12} -дефицитных клеток *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* без экзогенного донора водорода (Vorobjeva et al., 1985)

Рис. 66. Влияние аденозилкобаламина на активность рибонуклеотидредуктазы экстрактов B_{12} -дефицитных клеток *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* в отсутствие экзогенного донора водорода (Vorobjeva et al., 1985)

V_{12}^- -клеток снижается при внесении в инкубационную смесь $AdoCbl$ (рис. 66). При этом требуются достаточно высокие количества $AdoCbl$. Далее, РНР-активность клеток с глубоким дефицитом V_{12} проявляет абсолютную потребность в ионах Fe^{3+} и работает с эндогенным донором водорода, так как дитиотреитол, донор H_2 для V_{12}^+ -клеток, не требовался. Cbl -независимая РНР (Me -РНР, РНР-II) имеет оптимум рН 7,8—8,0, а Cbl -зависимая (РНР-I)—7,0.

В экстрактах V_{12}^+ -клеток в оптимальных условиях активность Cbl -РНР (рН 7,0) достигала 80 нмоль восстановленных АДФ/мг белка·ч в присутствии АДФ—0,5, ДТТ — 30 ммоль (эффективным восстановителем служит также глутатион), ионы Mg практически не требовались.

В этих же экстрактах обнаруживали (Иордан, Петухова, 1989) также активность РНР с оптимумом рН 8,0, которая была примерно в два раза ниже (40—45 нмоль/мг белка·ч), чем у Cbl -РНР (рН 7,0) при концентрациях: АДФ — 3, ДТТ — 30 и ацетата магния — 3 ммоль. В присутствии восстановленного глутатиона наблюдалась низкая активность (~10 нмоль/мг·ч). Удельная активность Me -зависимой V_{12}^- -клеток была достаточно высокой — выше 50 нмоль/мг·ч. В условиях глубокого дефицита витамина V_{12} синтез апофермента Cbl -зависимой РНР прекращался. Если в растущую V_{12}^- -культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, добавить $AdoCbl$ (6 мг/л), то синтез Cbl -зависимой РНР возобновлялся; в присутствии хлорамфеникола этот синтез не происходил.

В экстрактах V_{12} -дефицитных клеток активность РНР (рН 8,0) была примерно такой же, что и у V_{12}^+ -клеток. Активность РНР (рН 7,0, Cbl -зависимой) практически не определялась, но при добавлении $AdoCbl$ в реакционную смесь проявлялась и достигала уровня экстракта V_{12}^+ -клеток. Величина стимулирующего эффекта $AdoCbl$ сохранялась в присутствии ингибиторов синтеза белка и РНК. Это говорило о том, что у V_{12} -дефицитных клеток синтезируется апофермент Cbl -зависимой РНР, хотя содержание витамина V_{12} в таких клетках снижено на два порядка по сравнению с полноценными по витамину.

С полной определенностью пока трудно сказать тем не менее, существуют ли в клетках пропионовых бактерий две различные РНР или один фермент с двумя сайтами связывания для $AdoCbl$ и Me , поскольку исследования проводились с неочищенными препаратами, хотя и в селективных специфических условиях определения ферментативной активности. Но независимо от этого уже сегодня можно сделать два важных заключения: клетки *P. shermanii* могут проявлять как Cbl -зависимую, так и Cbl -независимую РНР-активность. Вторая система имеет более низкую активность и проявляется у клеток с глубоким дефицитом V_{12} (содержат ~2 мкг/г). У клеток, содержащих ~10 мкг/г витамина, могут работать обе системы, хотя синтез ДНК, как мы видели, снижен на 50% по сравнению с исходным штаммом (~1000 мкг/г витамина), что, по-видимому, связано со снижением активности V_{12} -зависимой РНР и час-

тичным подавлением аденозилкобаламином металлзависимой системы.

Для проявления регулирующей роли и синтеза B_{12} -зависимой, более эффективно работающей РНР, требуются высокие концентрации AdoCbl в клетках *P. shermanii*.

Аналогично для проявления регулирующей (ингибирующей) роли S-AM-зависимой метилирующей ДНК системы требовалась более высокая концентрация кобаламинов (см. выше), чем при их собственном участии в реализации метилирования в качестве кофактора и донора CH_3 -групп (CH_3Cbl).

Иммобилизация служит способом культивирования микроорганизмов, позволяющих многократно использовать биокатализатор (будь то ферменты или целые клетки), и создает предпосылки для автоматизированного проточного процесса получения ценных продуктов. Наиболее значительная проблема при использовании биокатализаторов возникает в связи с масс-переносом. Для аэробных систем низкая растворимость кислорода в носителях, особенно в некоторых гелях и полимерах, может понизить эффект работы биокатализатора, поэтому пропионовые бактерии, не требующие аэрации, имеют преимущества перед аэробами. В промышленности уже применяют 8 различных процессов с использованием иммобилизованных ферментов и клеток. Это главным образом одно-двухстадийные процессы, применяемые в производстве пищевых продуктов и фармацевтических препаратов (Воробьева, 1982). К недостаткам иммобилизованных биокатализаторов относится постепенная утрата ферментативной активности. Стабильность биокатализатора обычно измеряется периодом полужизни. Время полужизни исчисляется от нескольких дней до нескольких лет. Другая важная характеристика — продуктивность реактора. Неживые клетки обычно имеют продуктивность от 500 до 2000 молей продукта в одном литре объема реактора за период двух полужизней. Для стабилизации и удлинения срока работы биокатализатора необходимо знать физиологические особенности иммобилизованных клеток.

С помощью пропионовых бактерий возможно получение ряда практически ценных веществ, являющихся продуктами как синтетических, так и каталитических реакций. К таким веществам относятся летучие жирные кислоты — пропионовая и уксусная, — порфобилиноген, порфирины, витамин В₁₂, аспарагиновая и яблочная кислоты, нуклеотиды и их производные. Теперь известно, что эти продукты могут быть получены как со свободными, так и с иммобилизованными клетками, и первым процессом, осуществленным с иммобилизованными клетками *P. shermanii*, был многоступенчатый синтез пропионовой кислоты (Воробьева, 1978). После установления принципиальной возможности использования иммобилизованных клеток пропионовых бактерий была проведена серия методических и физиологических исследований, позволяющих оптимизировать процессы с использованием иммобилизованного биокатализатора.

6.1. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК; ОБРАЗОВАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Для иммобилизации клеток *P. shermanii* описаны различные способы (Scholl, 1976). Чаще всего используют клетки и ферменты, иммобилизованные в полиакриламидный гель (ПААГ), коллаген или инкапсулирование в нейлоновые капсулы (Scholl, 1976). При этом в некоторых случаях, ограниченных одноступенчатыми процессами (получение аспарагиновой кислоты и ПБГ), не требуется, чтобы иммобилизованные клетки были жизнеспособными. Многоступенчатые сложные синтезы (пропионовой кислоты, витамина В₁₂, рибонуклеотидов) осуществляют только живые клетки. Их структурная и функциональная целостность является необходимым условием работы биокатализатора. Следовательно, возникал вопрос сохранения жизнеспособности в течение длительного времени в условиях, не способствующих размножению бактерий (в инкубационной среде отсутствовал источник азота и витамины). Такие голодающие по азоту клетки, как было ранее (см. гл. 3) показано, осуществляют эндогенный метаболизм, поддерживая определенный низкий уровень АТФ, необходимый, в частности, для осуществления кругооборота белков и поддержания критического роста. Блокируя кругооборот белков путем внесения в суспензию голодающих клеток хлорамфеникола (100 мкг/мл), наблюдали двухкратное снижение выхода кислот и жизнеспособности, поскольку кругооборот включает не только распад, но и ресинтез белков.

Иммобилизацию клеток осуществляли в ПААГ общепринятым методом, описанным ранее (Воробьева, 1978). Иммобилизованные клетки инкубировали при периодической замене инкубационного раствора, содержащего источник энергии и MgSO₄ и нейтрализации образующихся кислот (Воробьева и др., 1978). Перед перенесением гранул в свежий раствор их многократно промывали физиологическим раствором.

В качестве сбраживаемых субстратов иммобилизованные клетки могут использовать глюкозу, лактат, лактозу сырной сыворотки, энзиматический гидролизат соломы (Vogobjeva et al., 1984) (табл. 73). В результате брожения образуются типичные продукты: пропионовая, уксусная кислоты и небольшое количество пировиноградной (Воробьева и др., 1977; Иордан и др., 1979). Максимальный выход органических кислот — 4,5 г/л — достигался при использовании лактата. Отношение пропионовая/уксусная кислота выше при 37°, чем при 30°. Необычно выглядит картина динамики образования летучих кислот (рис. 67). В отличие от постепенного и неуклонного снижения кислотообразования свободными клетками, у иммобилизованных клеток снижение (240 ч) сменялось подъемом и этот ритм повторялся в течение 20—25 дней культивирования. Волнообразный вид имела также кривая (рис. 68), отражающая жизнеспособность и аспартазную активность

Субстраты, которые могут быть превращены в летучие жирные кислоты пропионовыми бактериями (Vorobjeva et al., 1984)

Субстраты	Иммобилизованные клетки штаммов
Лактат натрия, лактоза сырной сыворотки, глюкоза	<i>P. technicum</i> , <i>P. shermanii</i> , <i>P. coccoides</i> , <i>P. arabinosum</i>
Энзиматический гидролизат соломы	<i>P. technicum</i> , <i>P. pentosaceum</i>
Негидролизанный крахмал	<i>P. technicum</i> , <i>P. arabinosum</i> , <i>P. coccoides</i>

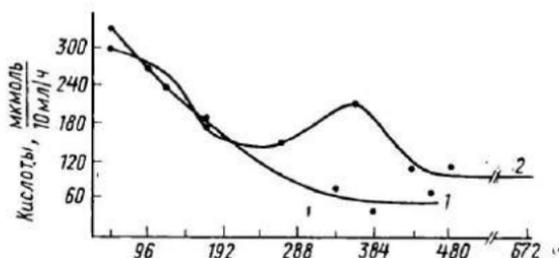


Рис. 67. Образование кислот свободными (1) и иммобилизованными клетками (2) *P. shermanii* при длительном инкубировании (Иконников, 1985)

иммобилизованных в ПААГ клеток (Калда, Воробьева, 1980, 1981). Такой характер кислотообразования, отражающий жизнеспособность клеток, по-видимому, связан с критическим ростом («подъем» кислотности) за счет веществ части отмирающих (спад) клеток. В ячейках геля создаются более высокие концентрации таких веществ, чем в суспензии свободных клеток. Поэтому иммобилизованные клетки отличали две особенности: они дольше со-

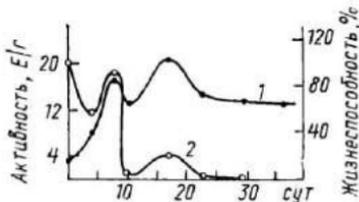


Рис. 68. Активность и жизнеспособность иммобилизованных в ПААГ клеток *P. shermanii* в зависимости от времени инкубации в 1 мол. растворе fumarата аммония при 30° (Калда, Воробьева, 1980): 1 — активность, 2 — жизнеспособность

храняли свою жизнеспособность (ее определяли высевом бактерий, извлеченных из геля, на плотную среду в чашках, помещенных в анаэростат), чем свободные клетки; при частой (через 24 ч) смене инкубационного раствора их жизнеспособность снижалась раньше, чем при более редкой (через 48 ч), вследствие более быстрого вымывания питательных веществ из гранул геля. Эти наблюдения подсказали простой способ реактивации биокатализатора путем его периодической экспозиции в питательной среде.

Работа с иммобилизованными клетками *P. shermanii* продемонстрировала их преимущества перед использованием ферментов. Клетки осуществляли брожение без добавления к инкубационной среде витаминов; необходимые кофакторы брожения содержались в клетках, правда, периодическая экспозиция клеток с раствором витаминов несколько повышала уровень кислот (рис. 69). Но особенно резкий «всплеск» кислотообразования происходил при помещении биокатализатора в раствор с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ или в полноценную кукурузно-глюкозную среду (рис. 70). При дальнейшей периодической реактивации клеток этими растворами наблюдали

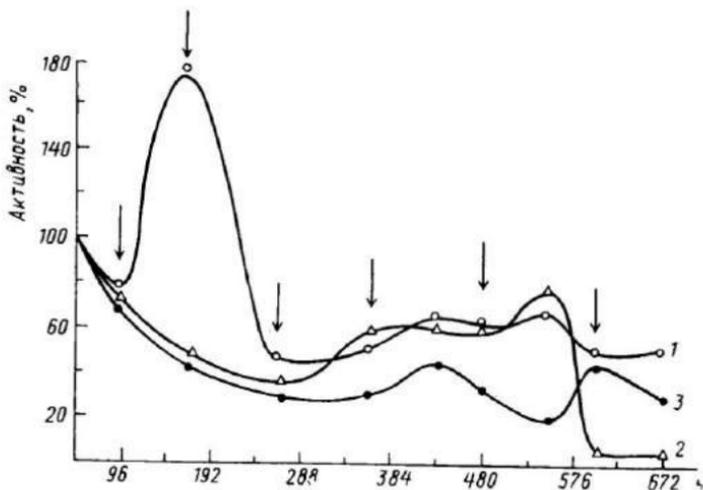


Рис. 69. Реактивация биокатализатора отдельными компонентами питательной среды (Vorobjeva et al., 1984):

1 — реактивация 0,1% сульфатом аммония, 2 — реактивация витаминами, 3 — контроль. Стрелки обозначают точки реактивации

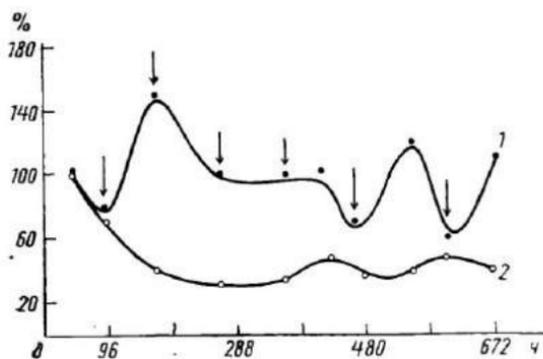


Рис. 70. Реактивация биокатализатора полноценной питательной средой для размножения клеток (Vorobjeva et al., 1984):

1 — питательная среда с кукурузным экстрактом, 2 — инкубационный раствор (контроль). Стрелки показывают обработку гранул с клетками (18 ч) соответствующим раствором

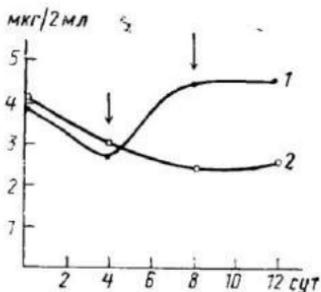


Рис. 71. Динамика содержания РНК в иммобилизованных клетках *P. shermanii* (Иконников и др., 1982): 1 — биокатализатор, активированный полноценной средой с кукурузным экстрактом, 2 — без активации. Стрелки обозначают точки реактивации

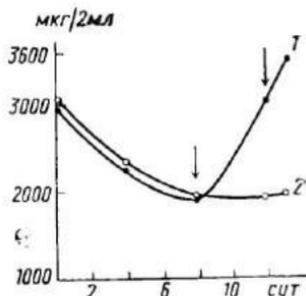


Рис. 72. Динамика содержания ДНК в иммобилизованных клетках *P. shermanii* (Иконников и др., 1982): 1 — биокатализатор, активированный полноценной средой с кукурузным экстрактом, 2 — без активации. Стрелки обозначают точки реактивации

волнообразный характер активности кислотообразования, которую таким способом удалось сохранить на уровне 100% от исходной после 672 ч работы биокатализатора.

О происходящих в клетках процессах деградации, ресинтеза и обновления клеточных полимеров свидетельствует прослеженная (Иконников и др., 1982) динамика содержания РНК, ДНК (рис. 71, 72) и белков. Эндогенный метаболизм после четырех суток инкубирования сопровождается снижением содержания нуклеиновых кислот в клетках, которые (особенно РНК) могут быть использованы для анаболических целей. При реактивации клеток уровень нуклеиновых кислот и белка сильно увеличивался, указывая на интенсификацию конструктивных процессов.

Иммобилизация увеличила термостабильность клеток *P. shermanii*, которые сохраняли способность к кислотообразованию при 70°, в то время как свободные клетки полностью теряли эту активность после нагревания при 62° (Иордан и др., 1979).

Снимки клеток в сканирующем и просвечивающем электронном микроскопе показывали (рис. 73, 74), что они сохраняют свой обычный вид сразу после иммобилизации (рис. 73, А); через 190 ч работы плотность клеток в геле снижается, но остается достаточно высокой (рис. 73, Б). Клетки сохраняют структурную целостность, хотя поврежденные клетки тоже встречаются. Через 20 сут. работы биокатализатора с реактивацией в популяции возникают раздутые клетки с разреженным содержанием, но большая часть клеток имеет нормальный вид и клеточные структуры.

Возникает вопрос, как долго могут вообще работать иммобилизованные клетки пропионовых бактерий. Мы (Воробьева и др., 1977) регистрировали изменение рН (ΔрН) у клеток, работающих в течение семи месяцев, что находится в соответствии с данными (Meganathan, Ensign, 1976) о неизменной активности ферментов,



А



Б

Рис. 73. Вид клеток *P. shermanii* в сканирующем микроскопе:
А — после иммобилизации в полиакриламидный гель; Б —
после работы в течение 192 ч ($\times 6612$)

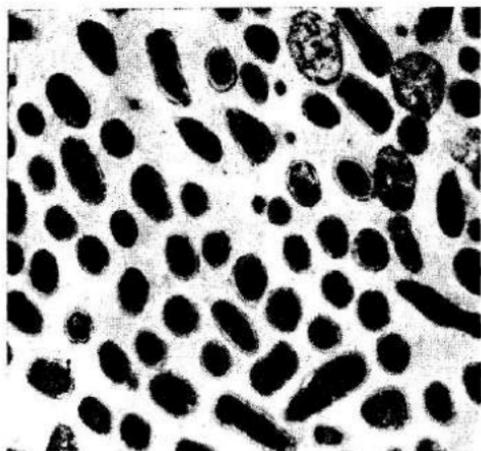


Рис. 74. Ультратонкий срез с клеток *P. shermanii* после иммобилизации в полиакриламидном геле в течение 192 ч ($\times 150000$)

метаболизирующих глюкозу, в условиях длительного голодания микроорганизмов по источникам азота и углерода. Для установления способности к росту и делению клеток, находившихся в течение семи месяцев в иммобилизованном состоянии, гранулы растирали в ступке, отделяли клетки от геля и высевали на поверхность твердой среды. После 9 сут роста в анаэробате в чашках Петри были обнаружены типичные для пропионовых бактерий колонии.

Клетки, находившиеся в течение семи месяцев в иммобилизованном состоянии,

морфологически неодинаковы: встречаются сильно раздутые клетки, клетки с большим числом вмятин или раздробленные на концах, в отличие от морфологически однородных контрольных клеток.

На ультратонких срезах, сделанных с клеток, находившихся в течение семи месяцев в полиакриламидных гранулах, видно (рис. 75) много «пустых», с разорванной клеточной стенкой клеток, видимо подвергшихся глубокому лизису.

Однако целые клетки сохраняли основные черты строения контрольных клеток: в них различимы клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, мембранные структуры.

Деградацию ультраструктур в клетках *Bacillus megaterium* Луста с сотрудниками (1976) наблюдали уже на пятые сутки после иммобилизации, что сопровождалось снижением 20 α -оксистероиддегидрогеназной активности. Видимо, явление деструкции пропионовых бактерий происходит медленно и затрагивает не все клетки, поэтому происходит накопление кислот после столь длительного пребывания их в иммобилизованном состоянии.

Наблюдения за поведением иммобилизованных клеток позволили выработать оптимальный режим работы колонки (16×500 мм): количество геля в колонке — 40 г, скорость протока — $0,25 \text{ ч}^{-1}$, температура — 42° , концентрация глюкозы — $0,8\%$ MgSO_4 — $0,1\%$, в растворе $0,05 \text{ M}$ К- Na-фосфатного буфера, pH 7,0 (Иордан и др., 1978) (табл. 74). Биокатализатор с иммобилизованными клетками может быть рекомендован для непрерывного получения пропионовой и уксусной кислот — хороших консервантов для пищевой промышленности и сельского хозяйства (см. гл. 7).



Рис. 75. Ультратонкий срез с клеток *P. shermanii* после иммобилизации в полиакриламидном геле в течение 7 мес ($\times 15000$)

Таблица 74

**Образование пропионовой, уксусной и пировиноградной кислот
иммобилизованными клетками *P. shermanii* при проточном
инкубировании* (Иордан и др., 1978)**

Источник углерода	Количество биомассы (пасты) в 10 мл полимеризационной смеси, г	Летучие кислоты, мкмоль/100 мл инкубационного раствора			Пировиноградная кислота, мкмоль/100 мл
		общее количество	пропионовая	уксусная	
Глюкоза, 2%	1,75	1448 \pm 25	872 \pm 10	630 \pm 9	17 \pm 3
	1,00				
Лактат Na, 1%	1,75	5640 \pm 21	2730 \pm 12	2810 \pm 16	38 \pm 7
2%	1,75				
Сухая молочная сыворотка, 10%**	1,75	4480 \pm 42	2958 \pm 24	1450 \pm 15	34 \pm 4

* Условия инкубирования: $t=37^\circ$, в колонку помещали 40 г геля, инкубационный раствор содержал источник углерода, К- Na-фосфатный буфер pH 7,0 0,05 М, $MgSO_4$ — 0,1%. Предварительно гранулы с клетками находились в полноценой для роста культуры среде II с соответствующим источником углерода (18 ч).

** Молочная сыворотка (лиофильно высушенная) была получена с Быстрянского сырного завода Алтайского края.

6.2. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Как уже говорилось, иммобилизованные клетки изучают главным образом с практических позиций, поскольку они обеспечивают целый ряд экономических преимуществ перед использованием растущих клеток или клеточных суспензий. Получение органических кислот — одна из перспектив применения иммобилизованного биокатализатора. Другая связана с выделением иммобилизованными клетками нуклеиновых оснований и некоторых нуклеозидов.

В условиях азотного голодания, в которых находятся иммобилизованные клетки, происходит снижение содержания всех метаболитов и прежде всего пула нуклеотидов (Leps, Ensign, 1979). При периодическом инкубировании в безазотистой среде иммобилизованных клеток *P. shermanii* наблюдали (Иконников и др., 1982) выделение веществ белковой и нуклеиновой природы, количество которых снижалось в процессе инкубирования, в отсутствие глюкозы (в 4—5 раз) и после нагревания биокатализатора при 70° 10 мин. Эти наблюдения свидетельствовали в пользу того, что выделение белков и производных нуклеиновых кислот является энергозависимым процессом, а не следствием простого разрушения клеток. Осцилляторный характер выделения дериватов нуклеиновых кислот (рис. 76) не только реактивированными полноценной средой, но и нереактивированными клетками предполагает активную регуляцию этого процесса.

Основным источником выделяемых веществ нуклеиновой природы служила рибосомальная РНК (рРНК); уменьшение содержания рРНК происходило с большей скоростью, чем содержание общей РНК (Иконников, 1985), поэтому ионы Mg, стабилизирующие рибосомы, препятствовали выделению нуклеиновых производных. В процессе работы иммобилизованные клетки выделяют в

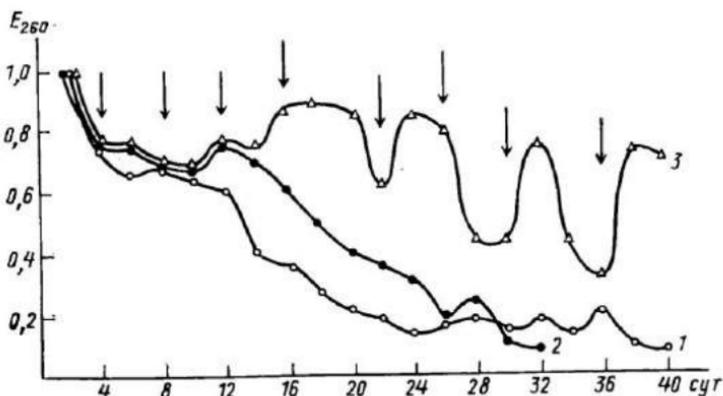


Рис. 76. Динамика выделения производных нуклеиновых кислот иммобилизованными клетками *P. shermanii* (Иконников и др., 1982). 1 — без активации, 2 — активация синтетической средой, 3 — активация полной средой с кукурузным экстрактом. Стрелки обозначают точки реактивации

среду основания: аденин, гуанин, цитозин, урацил, а также нуклеозиды — аденозин и гуанозин (рис. 77). Суммарный выход производных нуклеиновых кислот за первые 48 ч достигает 45 ± 5 мкг/мл, и это немало. Реактивация биокатализатора, особенно полноценной кукурузно-глюкозной средой, увеличивает выделение нуклеиновых соединений и приводит к его стабилизации (рис. 76). Периодическая реактивация позволяет сохранить 60—70% первоначального уровня экскреции через 40 дней работы биокатализатора, стимулирующее действие синтетической среды гораздо слабее.

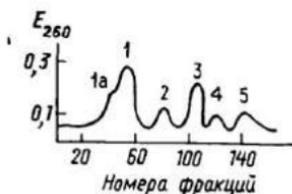


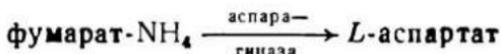
Рис. 77. Профиль элюции нуклеотидов с колонки с аннионитом АВ-17 (СОО-форма) (Иконников и др., 1982): 1 — АМФ, 2 — ГМФ, 3 — ГТФ, 4 — АДФ, 5 — смесь нуклеозид-дифосфатов, 1а — ЦМФ.

Нуклеозиды ГМФ, ИМФ и КСМФ усиливают аромат пищи. В комбинации с глутаматом Na они проявляют синергичное действие (Demain, 1968). Инозин (отечественное название «рибоксин») — лекарственное средство и применяется при лечении различных болезней сердца и печени. Производные нуклеотидов рекомендованы для лечения тромбозов. Адениновые основания и рибозиды поддерживают высокий уровень АТФ в эритроцитах. Основной промышленный процесс получения нуклеотидов связан с энзиматическим гидролизом дрожжевой РНК до четырех составных нуклеотидов с последующим дезаминированием АМФ до ИМФ; ЦМФ и УМФ служат отходами промышленности. Разрабатываются микробиологические способы, предусматривающие экскрецию производных РНК, прямую ферментацию и выделение нуклеотидов, не являющихся производными РНК, и резервный (Salvage) путь (достройка выделяемого бактериями основания или нуклеозида до нуклеотида; например, из гипоксантина, выделяемого мутантом *Brevibacterium ammoniagenes*, получают ИМФ). Обычно используют мутанты с нарушенной регуляцией синтеза и проницаемости клеток для нуклеотидов. Проведенные исследования с иммобилизованными пропионовыми бактериями должны привлечь к ним интерес как к возможным продуцентам нуклеозидов и их производных. Свободные клетки пропионовых бактерий, которые используют в сыроделии, изготовлении молочных напитков, в заквасках для хлеба, видимо, вносят вклад в усиление аромата этих продуктов.

6.3. СИНТЕЗ АСПАРАГИНОВОЙ И ЯБЛОЧНОЙ КИСЛОТ

В Японии существует промышленное производство аспарагиновой кислоты с использованием нежизнеспособных имму-

билизованных клеток *E. coli* и фумарата аммония как субстрата одноступенчатой реакции:



Время полужизни биокатализатора — 120 дней. Яблочную кислоту тоже получают с использованием иммобилизованных клеток *E. coli* осуществляющих реакцию: фумаровая кислота $\xrightarrow{+\text{H}_2\text{O (фумараза)}}$ яблочная кислота. Время полужизни — 35 дней

(Березин и др., 1976). Клетки анаэробных бактерий отличает большая стабильность эндогенного метаболизма (Иконников, 1985) и потому биокатализатор на основе иммобилизованных клеток *P. shermanii* сравнивали с клетками *E. coli* в отношении вышесприведенных реакций. *P. shermanii* обладали наиболее высокой аспартазной активностью по сравнению с *P. pentosaceum*, *P. petersonii* и *P. technicum* (Калда, Воробьева, 1980).

После 3 сут работы биокатализатора в периодическом режиме с непрерывным перемешиванием при 37°, рН 8,5, степень конверсии субстрата — фумарата аммония (использовали одномолярный раствор 0,02 MgCl₂), достигала у клеток *E. coli* К-12 — 95—96%, а у *P. shermanii* — 75—90%. Наряду с аспарагиновой кислотой, реакционные смеси обеих штаммов содержали также яблочную кислоту. После тепловой обработки биомассы *P. shermanii* (30° 1,5 ч, рН 5,0) аспартазная активность сохранялась, а фумаразная — полностью утрачивалась (Калда, Воробьева, 1980, 1981). Таким образом, путем тепловой инактивации фумаразы удалось превратить фумарат-NH₃ в L-аспарагиновую кислоту с выходом 96—98% при сокращении времени инкубации, поскольку в этом случае субстрат непосредственно трансформируется в продукт, а не через интермедиат в виде малата. Препарат *P. shermanii* имеет ряд преимуществ перед *E. coli* как биокатализатором, будучи более стабильным (Калда, 1984); выращивание пропионовых бактерий не требует азарации, осуществляется на более дешевых питательных средах, чем те, что нужны для выращивания *E. coli*, и дает большую биомассу, чем последняя.

Живые клетки *P. shermanii* могут быть использованы и для синтеза яблочной кислоты. Выход яблочной кислоты за 5 дней достигает 72% по отношению к фумарату при соблюдении следующего режима культивирования (Калда, 1984): 7 г биомассы *P. shermanii* в одном литре раствора фумарата-Na, рН 8,5.

L-аспарагиновую кислоту используют в медицине и в пищевой промышленности, яблочную — в пищевой промышленности, как заменитель лимонной. Иммобилизованные в ПААГ клетки *P. shermanii* рекомендованы для получения в производстве L-аспарагиновой кислоты, при этом ожидается снижение себестоимости продукта на 25%.

6.4. СИНТЕЗ ПОРФОБИЛИНОГЕНА (ПБГ)

Существует 4 способа получения ПБГ: 1) выделение из мочи больных людей и лабораторных животных; 2) химический синтез из аминолевулиновой кислоты (АЛК); 3) ферментативный метод с использованием АЛК-дегидратазы. Ферментный препарат выделяют из эритроцитов, клеток *P. shermanii* и *Rhodospseudomonas sphaeroides* и 4) микробиологический метод с использованием термически обработанных клеток *P. shermanii*, инкубируемых в среде, содержащей АЛК (Scholl, 1976). Химический синтез ПБГ, основанный на получении пирролов, включает более 10 ступеней и дает выход продукта 25%. При химическом синтезе из АЛК выход ПБГ — 10%. Микробиологический способ с использованием АЛК как субстрата весьма перспективен, поскольку выход продукта может достигать 54%. Пропионовокислые бактерии представляют особый интерес для получения ПБГ, поскольку обладают высокой природной способностью синтезировать тетрапиррольные соединения, для которых ПБГ служит общим обязательным предшественником.

При инкубировании клеточной суспензии *P. shermanii* (100 мг/мл 0,05 М трис-НСl буфера, рН 8,0) при 70° наблюдали (Scholl, 1976) превращение 60—70% добавленной АЛК в ПБГ, но при высоких температурах ПБГ не стабилен и превращается в уропорфирины. Если суспензию предварительно инкубировать 30 мин при 70°, а затем в среду внести АЛК и инкубировать при 30°, то выход кристаллического ПБГ увеличивается с 21 до 54% (Scholl, 1976). Из сказанного ясно, что АЛК-синтетаза и АЛК-дегидратаза, ферменты *P. shermanii*, ответственные за синтез ПБГ из АЛК, термостабильны, а их работа не зависит от жизнеспособности клеток. Поэтому в гранулы ПААГ особым образом включали (Scholl, 1976) термически обработанные клетки *P. shermanii*. В 10 г геля содержался 1 г клеток *P. shermanii*, помещенных в 20 мл буфера, содержащего АЛК. Имобилизованные клетки встряхивали в течение 30 ч при 30°. Фиксированные клетки периодически реактивировали компонентами питательной среды либо полной кукурузно-глюкозной средой. Активирование производили при встряхивании гранул на качалке в течение 90 ч. Наиболее высокий выход ПБГ получали при реактивации полной средой и 12%-ной кукурузной мукой, что согласуется с приведенными нами ранее данными по реактивации клеток, катализирующих образование кислот. Экспозиция биокатализатора с растворами дрожжевого экстракта, глюкозы, минеральных солей оказывала меньший стимулирующий эффект. Динамика синтеза ПБГ при периодическом культивировании фиксированных клеток при 30° представлена на рис. 78. Максимум продуктивности клеток приходится ~ на 25 ч при рН смеси 8,7 и на 30—35 ч — при рН 9,2. После этого срока продуктивность клеток снижается. Примечательно, что если для свободных клеток оптимум рН — 7,2 создаваемых трис/НСl, буфером, то для фиксированных клеток он выше

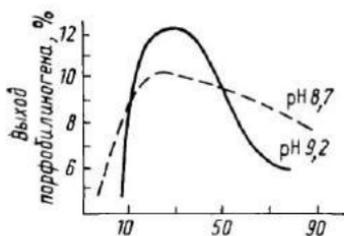


Рис. 78. Образование порфобилиногена иммобилизованными клетками *P. shermanii* (Scholl, 1976)

и зависит от природы используемого буфера: 9,2 в случае бис/НСI и 11,0 в случае $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$. Это еще раз демонстрирует (сравните отношение к температуре, см. выше), что иммобилизация изменяет свойства некоторых ферментов.

6.5. СИНТЕЗ ВИТАМИНА B_{12}

В 1982 г. появилось сообщение (Yongsmith et al., 1982) о том, что витамин B_{12} можно получать с помощью иммобилизованных в уретан (преполимер PU—9) клеток *Propionibacterium* при периодическом культивировании их в полноценной среде, содержащей глюкозу, казаминовые кислоты, бактотриптон, дрожжевой экстракт, минеральные соли, включая CoCl_2 , предшественник 5,6 ДМБ и витамины. При смене среды каждые 3 дня клетки (5 г) штамма *P. ar* 1 АКУ-1251 удавалось культивировать 18 дней, в течение которых они синтезировали 900 мкг витамина, причем большая часть витамина экскретировалась в среду. Витамин представлен в основном OH—Cbl . С иммобилизованными клетками можно проводить 5—6 последовательных ферментаций при сохранении первоначальной активности и получать 180 мкг витамина/г сырых клеток за 18 дней. После 18 дней культивирования продуктивность клеток снижается на 50%.

Существенно то обстоятельство, что свободные клетки штамма АКУ-1251 выделяли синтезированный витамин наружу, хотя авторы (Yongsmith et al., 1982) не исключают, что большая часть витамина, экскретируемого иммобилизованными клетками, есть результат их автолиза. Внутри геля бактерии размножались, так как среда содержала все необходимые для роста компоненты.

Преимущество такого способа получения витамина перед традиционным состоит в том, что клетки используются многократно, а витамин извлекается из культуральной жидкости, поэтому не требуется сепарирование биомассы с последующей экстракцией и многоступенчатой очисткой витамина.

ПРИМЕНЕНИЕ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ
И МЕДИЦИНЕ

На практике используют продукты, выделяемые бактериями при брожении: пропионовую и уксусную кислоты и продукты синтеза, включая биомассу. В зависимости от целей производства используют энзиматически активную либо энзиматически неактивную биомассу. Энзиматически неактивная биомасса применяется как белок одноклеточных, богатый у пропионовокислых бактерий серосодержащими аминокислотами, особенно метионином, а также треонином и лизином, витаминами группы В (Stasinska, 1977). Пропионовокислые бактерии допущены к применению в пищевой промышленности и в животноводстве. В корм животным рекомендуют добавлять биомассу *P. freudenreichii* (Vuorigen Mantegre-Alhonen, 1982), положительный эффект которой обусловлен, в частности, обогащением корма микроэлементами, находящимися в биологически активной форме, витаминами и белком. Биомасса неживых (термически обработанных) бактерий служит источником витамина В₁₂, поскольку он выдерживает нагревание. Убитые нагреванием кожные бактерии (*P. acnes* и *P. granulosum*) рекомендованы для производства иммуностимулирующего препарата (см. ниже), а *P. granulosum* — как источник порфиринов.

Вторая категория производств основана на выращивании и получении энзиматически активной биомассы. Это — производство заквасок для сыроделия, хлебопечения, силосования, изготовления ветеринарного лечебного препарата, обессахаривания белка куриных яиц, в других производствах энзиматически активная биомасса служит источником выделения ферментов — СОД и каталазы (табл. 75).

Сыроделие и производство витамина В₁₂ — крупные промышленные производства, действующие во многих странах; витамин В₁₂ с использованием пропионовых бактерий выпускают в России, Великобритании, Венгрии; твердые сычужные сыры («Швейцарский», «Эмментальский», «Советский», «Алтайский» и др.), в изготовлении которых обязательно участие пропионовых бактерий, производят повсеместно. Применение биомассы как компонента заквасок для хлебопечения (США, СНГ), силосования (СНГ), получение пропионовой кислоты как фунгицида (Германия) имеют ограниченные масштабы. К перспективным производствам относится получение СОД, каталазы, обессахаривание белка куриных яиц.

**Действующие и перспективные производства,
использующие пропионовые бактерии**

Производство	Действующие		Усовершенствование или автор рекомендуемого способа	Пер- спек- тивные
	в мире	в СНГ также		
Сырodelие	+	+	применение сухой многоштаммовой закваски пропионовых бактерий (Алексеева и др., 1983)	
Производство витамина В ₁₂	+	+	получение высокопродуктивного мутанта (Грузина, 1974, Ганичева, Воробьева, 1991) Разработка экспресс-метода отбора сверхпродуцентов (Воробьева, 1976)	
Препарат для животноводства «Пропиовит»	+	+	Сизова, Волкова, 1974	
Белок однокле- точных	—	—		+
Препараты для силосования	+	+	Ильина, Беседина, 1966 Коноплев, Щербаков, 1970	
Закваска для хлебопечения	+	+	Богатырева и др., 1987	
Обессахаривание белка куриных яиц	—	—	Воробьева и др., 1979	+
Получение про- пионовой кислоты	+	—	Воробьева и др., 1977 Воробьева, 1978	
Получение СОД	—	—	Воробьева, Краева, 1981	+

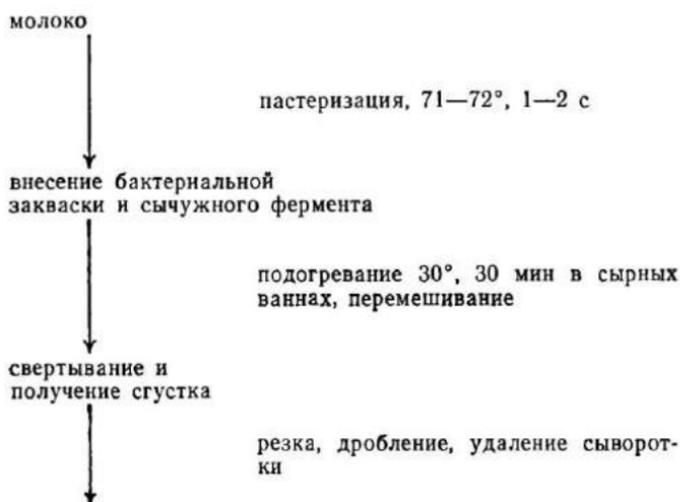
7.1. СЫРОДЕЛИЕ

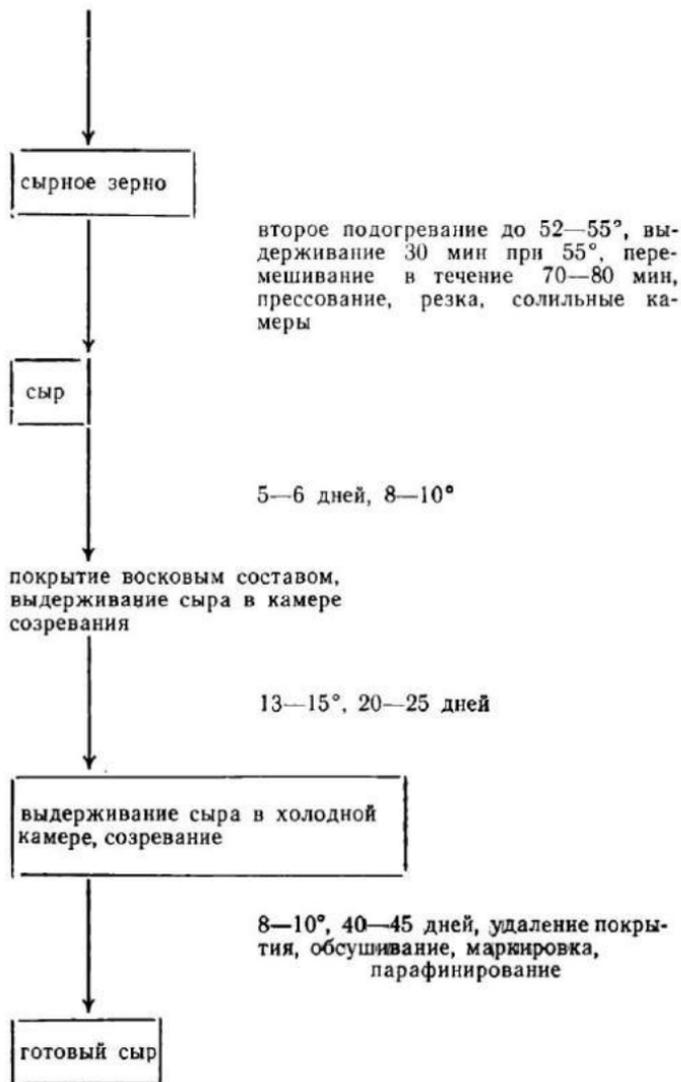
Сырodelие — наиболее древняя биотехнология, использующая биохимическую активность пропионовокислых бактерий, если вспомнить, что возраст первого сыра равен ~9000 лет и связан с одомашниванием овец в Иране. Предполагают (Marth, 1982), что древний человек собирал желудки животных и использовал их как емкости для жидкостей. Когда свежедобытый желудок был использован для молока, то комбинация реннина, некоторых бактерий, повышенной температуры могла дать продукт, похожий на современный сыр. Питательность и вкус хороших сыров всегда находили себе высокую оценку; «десерт без сыра — как девушка без улыбки» (Brillat-Savarin, 1755—1826) — так выражались ощущения удовольствия при употреблении этого отличного продукта.

Первые исследования пропионовокислых бактерий были связаны с изучением их роли в созревании сыров. Наиболее высоки*

ми органолептическими качествами и длительными сроками хранения обладают твердые сычужные сыры с высокой температурой второго нагревания, при изготовлении которых принимают участие пропионовокислые бактерии. Общее правило, касающееся использования этих бактерий в созревании сыров, гласит: вреден как недостаток, так и избыток пропионовых бактерий, но без их участия сыр нужного качества изготовить невозможно; могут получаться «слепые» (Siewert, 1989), т. е. сыры без глазков или с другими дефектами. Для нормального развития пропионовых бактерий рекомендуют (Siewert, 1989) использовать молоко с высоким содержанием белка (3,3%), при концентрации мочевины менее 4 мМ нужно обеспечивать преобладание стрептококков над молочнокислыми бактериями введением смешанной термофильной культуры с соотношением микроорганизмов 10:1. Существуют и другие условия, несоблюдение которых подавляет деятельность в сырах пропионовых бактерий. Установление этих условий создает научную базу сыроделия, о которой речь идет ниже.

Независимо от сорта получаемого сыра, весь процесс сыроварения можно разделить на 9 этапов (Козиковский, 1985): 1) подготовка молока, 2) свертывание молока и образование сгустка, 3) измельчение сгустка, 4) нагревание сыворотки, 5) отделение лишней сыворотки, 6) посолка сырной массы, 7) введение специальных микроорганизмов, 8) прессование, 9) созревание сыра (последовательность может немного меняться в зависимости от сорта сыра). Кроме молока, используют специальные штаммы бактерий, молокосвертывающий агент, NaCl. Вариации этих основных компонентов, использование дополнительных ингредиентов и вариации в окружающих условиях позволяют получать сотни сортов сыра. Общая схема приготовления сыра («Советского») с высокой температурой второго нагревания выглядит следующим образом:





Созревание сыра — сложный биохимический процесс, протекающий при участии сычужного фермента, ферментов молока, молочнокислых и пропионовых бактерий. Происходят enzymатические изменения в белках, жире, аминокислотах. Формируется аромат, внешний вид, консистенция сыра. Высокая температура второго нагревания содействует развитию термофильных молочнокислых стрептококков и пропионовых бактерий. Посолка оказывает сдерживающее влияние на интенсивность развития микрофлоры сыра: задерживается рост молочнокислых палочек и пропионовых бактерий. Физиологические особенности пропионовых бактерий: термоустойчивость, отсутствие роста при высоких температурах,

при >4,5% концентрациях NaCl, задержка роста при 9°, способность сбраживать лактаты, находятся в соответствии с технологическим режимом сыроварения. После второго нагревания большая часть молочнокислых мезофильных палочек погибает, а образованный ими лактат начинает активно сбраживаться пропионовокислыми бактериями. В созревании сыров, прессуемых с низкой (40—42°) температурой второго нагревания (сорта «Голландский», «Костромской», «Ярославский», «Российский»), пропионовокислые бактерии не участвуют. Вкусовые качества сыров зависят от того, какие микроорганизмы играли ведущую роль в их созревании.

Из высококачественного «Советского» сыра и молока было выделено (Алексеева и др., 1973) 25 штаммов пропионовокислых бактерий, из которых 17 штаммов представлены *P. freudenreichii*, а остальные отнесены к *P. acidipropionici* и *P. jensenii*, так что основным штаммом «Советского» сыра является *P. freudenreichii*. Кроме того, на ранней стадии созревания сыра были выделены пропионовокислые кокки (см. выше). Основная роль пропионовых бактерий в созревании сыров состоит в использовании лактатов, образованных молочнокислыми бактериями при сбраживании лактозы молока, при этом лактаты превращаются в пропионовую, уксусную кислоту и CO₂. Кислоты обеспечивают специфический острый вкус сыров и участвуют в консервации молочного белка — казеина; гидролитическое расщепление липидов с образованием жирных кислот важно для развития органолептических свойств сыра; образование пролина и других аминокислот, а также летучих веществ: ацетона, диацетила, диметилсульфида, ацетальдегида, участвующих в формировании аромата сыра; образование углекислоты в процессе пропионовокислого брожения лактата и декарбоксилирования аминокислот (главным образом); CO₂ участвует в создании рисунка сыра (глазков); образование витаминов и в первую очередь витамина B₁₂.

Вместе с тем требуется регуляция активности пропионовых бактерий, которые не должны, в частности, развиваться и образовывать CO₂ при низких температурах, что может привести к разрывам и трещинам в сырах.

Для обнаружения и учета числа пропионовых бактерий в сыре предложена (Drinan, Cogan, 1992) специальная среда состава (%): лактат натрия — 1, дрожжевой экстракт — 1, триптон — 1, КН₂РО₄ — 0,5, агар — 1, рН — 7,0. В среду вносят антибиотик клоксациллин (0,4 мкг/мл) для подавления роста мезофильных стрептококков — главной микрофлоры сыров с низкой температурой второго нагревания. На этой среде растут также некоторые незаквасочные бактерии (мезофильные лактобациллы, энтерококки, *Clostridium tyrobutyricum*), но их колонии легко отличить от колоний пропионовых бактерий по размеру, окраске и отсутствию каталазы.

Классическая технология изготовления «Швейцарского» сыра не предусматривала специального внесения пропионовых бакте-

рий (закваска), поскольку использовали сырое молоко хорошего качества, вытяжку из сычуга молочных телят (источник реннина), где содержалось достаточное количество пропионовых бактерий. В настоящее время в сыроделии используют пастеризованное молоко, но при пастеризации при 71° за 15 с погибают почти все пропионовые бактерии (Алексеева и др., 1983), а норма предусматривает содержание в 1 г сыра после прессования $2 \cdot 10^3$ — $4 \cdot 10^3$ пропионовых бактерий, поэтому при изготовлении «Советского» сыра требовалось внесение пропионовокислых бактерий с высокой кислото-, газообразующей способностью, липолитической активностью, устойчивостью к действию различных ингибиторов (включая постороннюю микрофлору) при развитии в сыре и совместимостью с молочнокислыми бактериями, входящими в состав закваски для сыров. Так, из 22 штаммов молочнокислых бактерий 9 штаммов оказались антагонистами пропионовых бактерий, при этом *Str. lactis* и *Str. diacetilactis* имели наибольший спектр подавления (Алексеева и др., 1983). *Str. cremoris*, *Str. thermophilus* и *Lbm. helveticum* отнесены к штаммам, совместимым с *P. freudenreichii* и *P. shermanii*. При учете совместимости штаммов в закваске качество сыра повышается и по общему среднему баллу превышает качество сыра высшего сорта (Алексеева, 1974). Среди обитателей сыра есть и такие, которые стимулируют биохимическую активность пропионовых бактерий. Так, под действием микрококков сыра на 20% увеличивается выход CO_2 пропионовокислыми бактериями (Ritter et al., 1967); *Micrococcus caseolyticus* ингибирует активность бактерий кишечной палочки при выработке и созревании сыров (Лайпанов, 1989), что создает благоприятные условия для развития пропионовых бактерий. Для созревания и получения сыра высокого качества важное значение имеет фосфолипазная активность пропионовокислых бактерий. Бактерии содержат внутри- (А) и внеклеточную (С) фосфолипазу (Уманский, Мельникова, 1986). В некоторых штаммах присутствуют обе липазы вместе, но для сыроделия важна внеклеточная фосфолипазная активность. Фосфолипазы С пропионовых бактерий специфичны по отношению к молочным фосфолипидам — фосфосфингозину, фосфатидилхолину и фосфатидилэтаноламину. Под действием фосфолипазы С происходит значительный гидролиз фосфолипидных компонентов сыра (обнаружено 8 таких компонентов) без образования лизосоединений, обнаруженных наряду с фосфатидными кислотами в прогорклых образцах сыров, а также в сырах с привкусом сала (Уманский, Мельникова, 1986). Наибольшее число фосфолипидов выявлено (Мельникова, 1985) среди штаммов *P. globosum*. Сыр, выработанный с бактериальной закваской с высоким уровнем фосфолипазы С, имел наиболее высокие вкусовые показатели, консистенцию, рисунок; штамм рекомендован для включения в состав закваски для «Советского» сыра.

Усовершенствованием в технологии сыроварения можно назвать создание многоштаммовой сухой закваски пропионовых

бактерий (Алексеева и др., 1982) из трех штаммов вида *P. freudenreichii*. Многоштаммовая закваска превосходила монокультуру в отношении газо- и кислотообразования. Общая оценка опытных сыров, изготовленных с применением сухой многоштаммовой закваски, по сравнению с контрольными была на 4,2 балла выше. Установлена возможность непосредственного внесения сухих культур в перерабатываемое молоко без предварительного их перевода в активное состояние. Сухая закваска удобнее, чем ранее применявшаяся жидкая закваска, при транспортировке. Многоштаммовая сухая закваска внедрена в производство «Советского» сыра.

7.2. ВИТАМИН В₁₂

7.2.1. ПОЛУЧЕНИЕ

В настоящее время витамин В₁₂ производится только путем ферментаций. Производство его методом химического синтеза практически невозможно. Промышленность выпускает два типа препаратов витамина В₁₂: медицинский и кормовой концентрат В₁₂ (КМБ-12) для животноводства. Медицинские препараты получают с использованием мутантных штаммов *P. shermanii* и *P. freudenreichii*, активных продуцентов витамина В₁₂ (в США используют для той же цели мутант *Pseudomonas denitrificans*). Кормовой концентрат изготавливают на основе метаногенных бактерий.

Биосинтез витамина В₁₂ пропионовокислыми бактериями, как мы видели, происходит почти параллельно росту в анаэробных условиях, накапливается в клетках (описанные выше случаи экскреции касаются, по-видимому, специальных мутантных штаммов) главным образом в виде коферментных форм неполных корриноидов. Указанные особенности учтены при промышленном производстве витамина В₁₂.

Культуру выращивают в анаэробных условиях в среде, содержащей глюкозу, кукурузный экстракт, сернокислый аммоний, соль кобальта, которая включается в молекулу витамина В₁₂. Образующиеся в процессе роста культуры кислоты нейтрализуют раствором NaOH, непрерывно поступающего в ферментер. Чтобы получить полные клинически активные формы корриноидов, через 72 ч ферментации, в среду вносят предшественник витамина В₁₂—5,6 ДМБ, включаемый бактериями в молекулу. Ферментацию заканчивают через 96—110 ч. Предшественник можно вносить и после окончания ферментации, даже в суспензию нерастущих клеток, но только не в начале ферментации, поскольку Сbl подавляет свой собственный синтез. По окончании брожения биомассу сепарируют, выделяют из нее витамин, экстрагируя его горячей подкисленной (до pH 4,5—5,0) водой, содержащей стабилизатор (NaNO₂ или KCN). Если получают AdoCbl, то стаби-

лизатор не добавляют, а экстракцию проводят в затемненном помещении или при красном свете. После экстракции витамина биомассу отделяют, водный раствор витамина охлаждают, доводят рН до 6,8—7,0, из раствора коагулируют белки, добавляя $Al_2(SO_4)_3$ и $FeCl_3$, и после фильтрации осуществляют очистку раствора витамина с использованием ионообменника СГ-1, для этого раствор витамина подкисляют до значения рН 2,5—2,7 и наносят на последовательно соединенные колонны с сополимером СГ-1, и сорбированный витамин элюируют раствором аммиака. В аммиачный раствор витамина вносят активированный уголь, десятикратный объем воды и 0,9% NaCN по отношению к массе угля. Массу два часа перемешивают, подкисляют соляной кислотой и после фильтрования и промывки угля витамин B_{12} десорбируют с угля изопропиловым спиртом. Изопропиловый спирт упаривают и витамин B_{12} подвергают дополнительно резорциновой очистке и кристаллизации. Такая схема выделения витамина принята в нашей стране.

Возможна модификация метода (Воробьева, 1989а), по которой, в частности, 5,6 ДМБ не вносят, но вторую фазу ферментации осуществляют в аэробных условиях, способствующих самостоятельному синтезу бактериями предшественника. У нас медицинские препараты витамина B_{12} производят в г. Кургане на Комбинате медицинских препаратов и изделий «Синтез» и в качестве продуцента используют мутантный штамм *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, синтезирующий более 25 мг/л витамина. К настоящему времени выход витамина увеличен (Ганичева, Воробьева, 1991) в результате проведения дополнительных мутаций и отбора суперпродуцентов.

По-видимому, потенциальные возможности пропионовых бактерий намного превышают этот высокий уровень, если судить о способности мутантного штамма *P. shermanii* синтезировать до 216 мг/л витамина (патент Франции № 2209842, 1984). Штамм был получен под воздействием горчичного газа, антибиотиков и соли Mn , который, как известно, увеличивает проницаемость клеточной мембраны для многих соединений.

Для выращивания бактерий предложено (Marwaha et al., 1983) использовать молочную сыворотку — отход пищевой промышленности. Бактерии потребляют лактозу сыворотки и образуют более 5 мг/л витамина. Мировая продукция витамина B_{12} в 1980 г. исчислялась в 12 тыс. кг, из которых 54% расходуется для людей (фармацевтика и диетические добавки), остальные 41% — как ростовой фактор в кормах для животных. Большую часть этой

продукции производят три фирмы: Merck а. Со, Glaxo Lab. и Rhone-Pouleng. Фирма Rhone-Pouleng дает больше 50% объема на мировом рынке. Стоимость CNCbl составляет 1,8—6 долл./г (Быховский, 1984).

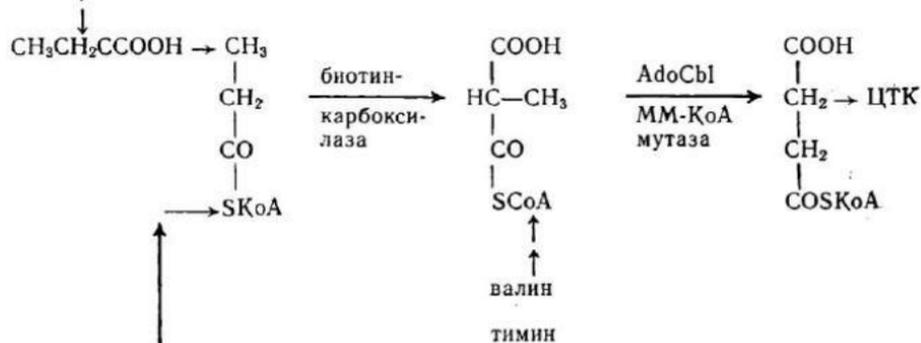
Отечественная промышленность выпускает препараты витамина в виде CNCbl в 0,9% растворе NaCl в ампулах, таблетки CNCbl в смеси с фолиевой кислотой (муковит) и CNCbl с мукопротеином.

7.2.2. ПРИМЕНЕНИЕ

Медицина. У людей и животных AdoCbl в составе метилмалонил-КоА мутазы (ММ-КоА мутазы) катализирует реакцию изомеризации метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА (у бактерий эта реакция имеет противоположную направленность). Реакция связана с катаболизмом аминокислот и липидов.

метионин

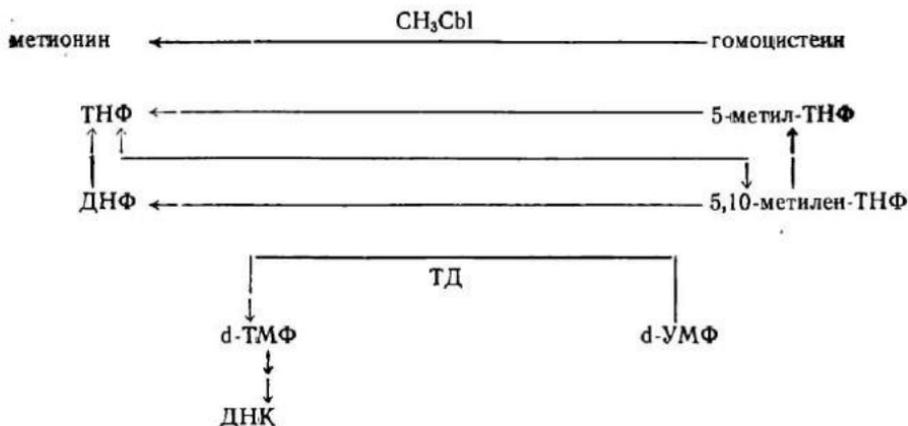
треонин



↑
жирные кислоты
с нечетным числом
атомов углерода,
холестерин,
изолейцин

При блокировании ММ-КоА мутазной активности лимитируется катаболизм некоторых аминокислот, жирных кислот и тимина; увеличивается внутриклеточное содержание ММ-КоА и пропионил КоА, что может оказывать влияние на синтез жирных кислот. В ряде случаев обнаружено (Kishimoto et al., 1972) увеличение содержания C₁₅ и C₁₇ жирных кислот и разветвленных жирных кислот в глицеролипидах нервной системы.

Вторая реакция с участием кобаламинов у высших животных — это синтез метионина из гомоцистеина при участии второй коферментной формы — CH₃Cbl.



- УМФ — дезоксиуридин-Ф
- ТМФ — дезокситимидин-Ф
- ТНФ — тетрагидрофолат
- ДНФ — дигидрофолат
- ТД — тимидилат синтетаза

Снижение или отсутствие активности CH_3Cbl -зависимой метионин синтетазы или мембранного транспорта N^5 -метилтетрагидрофолата приводит к аккумуляции фолата в виде N^5 -метилтетрагидрофолата («метилфолатная ловушка»), а это создает недостаток активности тимидилатсинтетазы и отражается на подавлении синтеза ДНК. AdoCbl и CH_3Cbl взаимозаменяемы и синтезируются в организме из кобаламинов — некоферментных форм, которые должны поступать в готовом виде.



В организме людей обнаружены также ОНСbl , SO_3Cbl и CNCbl . Витамин B_{12} устойчив к кипячению в чистых растворах, очень лабилен в присутствии белков, особенно содержащих тиоловые остатки. Наиболее стабилен AdoCbl и CH_3Cbl ; ОНСbl менее стабилен; CNCbl наиболее стабилен к нагреванию, но в сырой пище его нет. Он может возникать у курильщиков, во время фагоцитоза, при употреблении особых диет и инъекции CNCbl .

В теле человека содержится 3—5 г CbI , главным образом в печени. Концентрация CbI с возрастом снижается, что диктует необходимость увеличивать содержание витамина в диетах.

Здоровые люди получают витамин B_{12} с пищей (печень, мясо). В зеленой части растений не обнаружен витамин B_{12} , поэтому его нет в хлебе, пшеничной муке, рисе, фруктах, овощах. Водоросли и другой планктон содержат значительные количества кобаламинов (Schneider, 1987). Люди не утилизируют корриноиды, образующие микроорганизмами кишечника.

Чтобы оградить себя от неактивных корриноидов, млекопитающие приобрели в процессе эволюции селективную адсорбционную систему, которая не поглощает некобаламины, например псевдовитамин B_{12} .

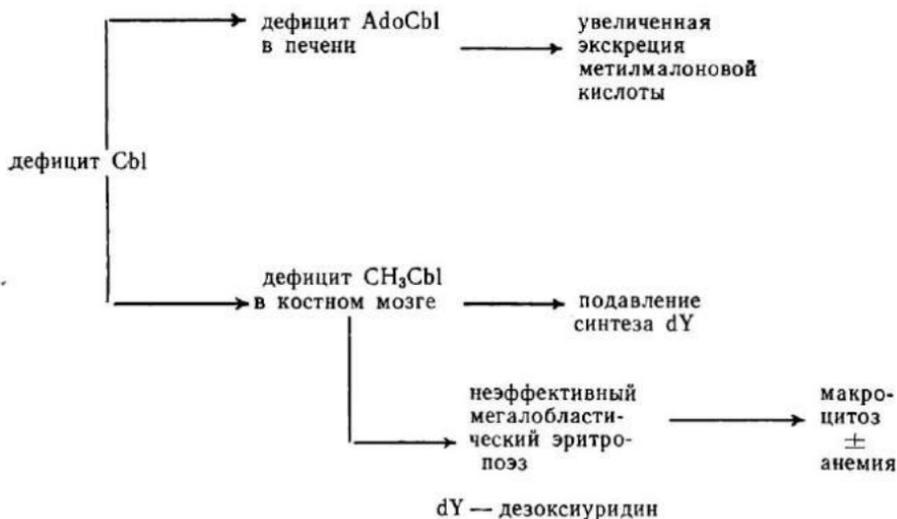
Таблица 76

Причины возникновения дефицита витамина B_{12} у людей (Stroinski, 1987)

Фаза адсорбции	Причина дефицита
События в желудке	дефицит в пище, нарушенное выделение витамина из пищи, дефицит ВФ: — дефицит секрета, — секрета аномального ВФ, — аутоиммунологические реакции, — хирургические операции;
События в кишечнике	конкуренция с паразитами: бактериальный гипер-рост, глисты (солитеры), панкреатическая недостаточность;
Адсорбция в тонком кишечнике	хирургические операции, заболевания, отсутствие двухвалентных ионов, нефункционирующая транспортная система через мембраны, лекарства, дефицит внутриклеточных связывающих белков.

Адсорбция и транспорт витамина тканями происходит при участии трех белковых переносчиков: внутреннего фактора (ВФ), транскобаламина (ТК I и ТК II) и кобалафилина (КФ), которые к настоящему времени выделены и охарактеризованы (Stroinski, 1987). ВФ и КФ — гликопротеины, ТК I и ТК II — изопротеины, с м.м. 120000. ТК I участвует в транспорте через мембрану эндогенного витамина в крови, ТК II не связывает CbI *in vivo*, но только *in vitro*. Многие расстройства вызываются не дефицитом B_{12} , а дефицитом этих белковых ферментов. Различные причины (негенетические) дефицита витамина в организме перечислены в табл. 76, из которой видно, что их достаточно много и устранению их способствует введение витамина B_{12} внутримышечно или перорально.

Описан ряд заболеваний, являющихся в конечном счете следствием отсутствия или дефицита в организме человека витамина B_{12} , и среди них мегалобластическая анемия, которая проявляется в изменении морфологии крови, нарушении функций крови и клеток костного мозга.



Тяжелое заболевание крови (пернициозная анемия) протекало со смертельным исходом до 20-х годов XX в., когда два американских врача Мино и Марфи обнаружили, что больные, получающие печеночную диету, поправляются. Антипернициозным фактором печени оказался витамин В₁₂. В кристаллическом виде витамин В₁₂ был выделен в 1948 г. Л. Смитом. Мино, Марфи и Виклу в 1934 г. были вручены Нобелевские премии за большой вклад в деле спасения жизни людей.

Терапевтический витамин В₁₂ используют в микрограммовых количествах при лечении пернициозной анемии, при питательном дефиците и периферических невритах и невралгиях. Поскольку витамин не токсичен, он широко используется во многих типах неизлечиваемых хронических недугах, как артриты и псориазы. Его также используют как средство, снимающее утомление, другие недомогания и боли.

Учитывая актуальность создания лекарственных средств для лечения инфекционных заболеваний, вызванных иммунодефицитом человека, синтетическим путем получили (Березов, Юркевич, 1991) производные витамина В₁₂, содержащие в своей молекуле азидотимидин либо его производное. Среди производных Cbl получены такие, которые в своей молекуле содержат цитостатические группировки. Благодаря существованию индивидуальной селективной транспортной системы для кобаламинов цитостатические группировки высвобождались в клетке-мишени.

Животноводство. Диета, недостаточная по кобальту, главным образом травы (менее 0,08 р.р.п., может быть причиной серьезных потерь поголовья животных и проводить к дефициту В₁₂ у людей. Животные потребляют относительно небольшие количества витамина—0,05—0,5 мкг/кг веса, но и концентрация его в диете большинства животных тоже очень низка.

Утилизация витамина с высокой эффективностью происходит благодаря высокому сродству связывающих белков к своему субстрату. Низкая продуктивность кобаламинов в рубце жвачных связана также с коротким временем ферментации и анаэробными условиями, не благоприятствующими синтезу кобаламинового предшественника — 5,6 ДМБ. Если 5,6 ДМБ добавляются в диету овец, то синтез кобаламинов бактериями увеличивался за счет других форм, как и поглощение витамина животными. Поэтому 5,6 ДМБ рекомендуют добавлять к кормам (Smith et al., 1970). Вводить кобаламин в корма считают нецелесообразным, поскольку микроорганизмы в желудке жвачных превращают большую часть добавляемых кобаламинов в неактивные формы корриноидов до того, как животные его поглощают (Marston, 1970; Smith et al., 1970). Но в промышленном животноводстве, где диета состоит только из растительного материала, витамин В₁₂ включают в корма в количестве 10—15 мг/г.

Если бы пропионовые бактерии использовались только для получения витамина В₁₂, их можно было бы уже отнести к наиболее полезным микроорганизмам, но их применение шире.

7.3. ПОРФИРИНЫ

Некоторые штаммы пропионовокислых бактерий синтезируют в больших количествах порфирины, выход которых сильно увеличивается при добавлении АЛК (см. выше). В последние годы широко практически используют порфирины и их металлокомплексы (Быховский, 1985, 1989), как красители и пигменты, включая красители для пищевых целей: катализаторы электрических реакций окисления-восстановления; катализаторы реакций передачи в цепи при радикальной полимеризации метакрилатов; катализаторы реакций окисления углеводов, меркаптанов в нефти и нефтепродуктах; полупроводники и фотопроводники; комплексообразователи для обогащения радиоактивных изотопов. Порфирины могут найти применение в медицине. Они содержатся в белом веществе головного и спинного мозга (Кубатиев, 1973). Поскольку в этих областях нервной системы содержится мало цитохрома *c*, полагают, что порфирины заменяют его и цитохромоксидазу (см. гл. 4) в функциональном отношении там, где последние отсутствуют (Чарный, 1961). Они могут применяться как диагностические и лечебные препараты. Для промышленного получения порфиринов перспективен штамм *P. granulosum*.

7.4. ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЖИВОТНОВОДСТВА

Полезные бактерии, обитающие в желудочно-кишечном тракте животных, оказывают значительное влияние на расщепление корма, обладая соответствующей энзиматической активностью, синтезируют аминокислоты, витамины, улучшают

усвоение питательных веществ. Фактором «животного белка» называют (Букин и др., 1971) витамин В₁₂. Добавление его к растительным кормам повышает их усвоение и способствует значительному увеличению продуктивности животных и птиц. Применение антибиотиков и других лекарственных препаратов в современном промышленном животноводстве приводит не только к подавлению патогенных бактерий, но и полезных, симбиотических; нарушается состав нормальной кишечной микрофлоры, возникают дисбактериозы.

Пропионовые бактерии относятся к естественной микрофлоре желудка (рубеца) жвачных. Их полезность для животных несомненна: они снижают избыточную кислотность переокисленных силосов, вызывающих у животных ацидоз (кетоз); образующиеся в брожении пропионовая и уксусная кислоты хорошо утилизируются животными; у жвачных из пищеварительного тракта усваивается лишь незначительное количество глюкозы (10—15% от потребностей) и основным источником глюкозы служит глюконеогенез из С₃-соединений, а главным предшественником в рубце является пропионовая кислота (Курилов, Севастьянова, 1978). При недостатке пропионовой кислоты в крови животных накапливаются кетоновые тела, вызывающие заболевание кетоз. Подсчитали, что при окислении всасывающихся в организме животного органических кислот образуется 23,5 ккал/ч, при этом окисление уксусной кислоты дает 40%, пропионовой — 24 и молочной — только 10% (Курилов, Севастьянова, 1978) этой энергии.

Липолитическая и протеолитическая активность некоторых штаммов способствуют перевариванию кормов; бактерии образуют в больших количествах витамин В₂ и особенно В₁₂.

Пропионовые бактерии устойчивы к пенициллину, хлортетрациклину, хлормицетину, стрептомицину, эритромицину, грамицидину С и полимиксину, поэтому возможно совместное применение указанных антибиотиков и пропионовых бактерий при лечении некоторых заболеваний животных.

Перечисленные полезные свойства пропионовых бактерий и полное отсутствие у них токсичности позволило рекомендовать их в качестве лечебно-профилактических ветеринарных препаратов. На практике применяют следующие способы дополнительного обогащения кормов животных и птиц пропионовыми бактериями и продуктами их метаболизма: вводят препарат ПАБК, представляющий собой бульонную культуру пропионовых бактерий и ацидофильных палочек или препарат «Пропиовит» — живые клетки: *P. acnes*; скармливают силос, заквашенный с использованием препарата ПКБ (пропионовых бактерий) или бинарного бакконцентрата ПКБ + АМС (амилолитический молочнокислый стрептококк); скармливают белковый концентрат, обогащенный пропионовыми бактериями.

ПАБК и пропиовит. Препарат ПАБК содержит клетки *P. shermanii*, выделенной из сыра, и *Lbm. acidophilus* он приготовлен на кровяносывороточном бульоне; помогает при лечении

гиповитаминозов, алиментарной анемии, желудочно-кишечных расстройств у молодняка животных и птиц (Сергеева и др., 1959). Препарат выпускался в виде жидкости и имел небольшой срок хранения (2—3 мес при 2—10°); к недостаткам относится также сложный состав питательной среды, включающей свежую кровь. Эти недостатки удалось избежать путем высушивания препарата и использования обраты в качестве питательной среды (Лагода и др., 1970). Другой препарат — «Пропиовит» — изготовлен на основе клеток *P. acnes*, выделенных из рубца коровы, и в этом его преимущество перед ПАБК. Препарат содержит рубцовые бактерии, выращенные в среде, включающей глюкозо-белковый концентрат (отход промышленности), ферментативный гидролизат кормовых дрожжей, сернокислый аммоний, соль кобальта (Волкова, 1980). В 1 г сухого препарата содержится до $5 \cdot 10^9$ клеток живых бактерий, витамины группы В (мкг/г): В₁₂ — 400—500, пиридоксин — 33,0—51,0, никотиновая кислота — до 350, пантотеновая кислота — до 330, рибофлавин — 60—140, фолиевая кислота — 3,2. Влажность препарата не превышает 5—6%.

Оптimum температуры для развития *P. acnes* 37—38° (у *P. shermanii* — 30°), бактерии приживаются в рубце жвачных. Положительным свойством *P. acnes* для изготовления на их основе препарата является их термоустойчивость, позволяющая осуществлять высушивание без потери биохимической активности клеток. «Пропиовит» обеспечивает животных витамином В₁₂, компенсирует недостаток витаминов В₁, В₂, В₃ и В₆, помогает при желудочно-кишечных заболеваниях, в 2 раза сокращает потери от заболеваний и гибели, повышает привесы, сопротивляемость. Препарат обладает длительным действием, а в сухом виде сохраняет свою активность по крайней мере 12 мес.

Силосование корма. Только очень небольшое число бактерий, выделенных (Woolford, 1973) из разных типов силосов, были способны сбраживать лактаты: *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *M. lactiliticus* и некоторые клостридии. При этом пропионовые бактерии и *M. lactiliticus* сбраживали лактаты лучше, чем клостридии, и в отличие от последних на их бродильную активность присутствие сахаров влияние не оказывало. Все указанные бактерии относятся к анаэробным, и именно в анаэробных условиях происходят важные биохимические процессы при силосовании. В условиях, имитирующих силосование, пропионовые бактерии сбраживали, пс-видимому, не только лактаты, но и сахара, при низких рН (<4,0), при этом значение рН повышалось незначительно и вторичный рост клостридий не имел места (Woolford, 1975). Со свежих трав пропионовые бактерии не выделялись, а из силосов выделялись, но в очень небольшом количестве, поэтому полагают (Woolford, 1975), что их истинное участие в силосовании в природных условиях сильно нивелировано. При внесении пропионовых бактерий (ПКБ) в силосуемые растения и прежде всего с высоким содержанием сахаров (кукуруза) получили корм более высокого качества, чем контрольный (без внесения ПКБ).

Он имел низкую кислотность, был обогащен витаминами В₂ и В₁₂, пропионовой кислотой (Ильина, Беседина, 1966; Коноплев, Щербатов, 1970) и не подвергался плесневению. В результате скармливания такого силоса в течение трех месяцев повысилась яйценоскость птиц, выводимость цыплят, сохранность молодняка животных, в крови которых увеличивается содержание каротина и снижается содержание аммиака (Домрачева, Кононов, 1970). В одном грамме бакконцентрата «Казахсил» ПКМ содержится 10⁹ жизнеспособных клеток и в 1 т силосуемой массы рекомендуются внести 1,5 г препарата. Особенно высокоэффективный эффект достигается при использовании одновременно трех бакконцентратов: ПКБ, АМС и ПМБ (пентозосбраживающие молочнокислые бактерии).

Бактериальные закваски для силосования представлены в табл. 77. Все они разрабатывались в Институте микробиологии и вирусологии Казахстана. До создания специальных заквасок использовали главным образом химические консерванты (табл. 78), в состав которых входит от 1 до 3 органических кислот, являющихся также метаболитами пропионовых бактерий, правда, доля муравьиной кислоты превалирует в составе химических консервантов и очень мала в биологических.

Таблица 77

Бактериальные закваски для силосования

Название	Место создания	Штаммы	Силосуемые растения
АМС «Казахсил»	Институт микробиологии и вирусологии АН Казахстана	<i>Streptococcus laclis diastaticus</i> (сухой)	трудно силосуемые (бобовые, злаковые, травосмеси, тростник)
ПКБ	»	<i>Propionibacterium shermanii</i>	высокосахаристые, легко силосуемые (кукуруза, подсолнечник)
ПМБ	»	<i>Lactobacterium pentoaceticus</i>	солома и грубостебельчатые остатки растений
Смешанные закваски: АПП (АМС, ПКБ, ПМБ)	»	<i>Str. lactis diastaticus</i> , <i>P. schermanii</i> , <i>L. pentoaceticus</i>	кукурузная солома
Силамп (АМС, ПКБ)	»	<i>Str. lactis diastaticus</i> , <i>P. shermanii</i>	легкосилосуемые, высокосахаристые
АПП (АМС, ПМБ)	Институт микробиологии и вирусологии АН Казахстана	<i>Str. lactis diastaticus</i> , <i>L. pentosus</i>	многолетние и однолетние травы с соломой; бобовые, солома

Химические консерванты для силосов

Название	Состав, %	
ВИК 1	муравьиная кислота	—27
	уксусная кислота	—27
	пропионовая кислота	—26
	H ₂ O	—20
АИВ-2	муравьиная кислота	—80
	ортофосфорная кислота	— 2
	H ₂ O	—18
ВИК 11	муравьиная кислота	—80
	уксусная кислота	— 9
	пропионовая кислота	—11

Белковые концентраты. Этот тип препарата предложен сотрудниками Института микробиологии АН Латвии (Рамниене и др., 1981). Он изготавливается на основе биомассы *P. shermanii*, выращиваемых в коричневом соке различных растений: травяной смеси, кукурузы, листьев сахарной свеклы, люцерны. Коричневый сок остается после отделения белка путем термической коагуляции из зеленого сока растений и используется для разных

целей: выращивания дрожжей, как удобрения на полях, для питания животных (Рамниене и др., 1981). Авторы показали, что в коричневом соке из разных растений могут расти пропионовые бактерии, достигая $5 \cdot 10^9$ клеток/мл в люцерновом соке (где имел место наилучший рост). В соке накапливались уксусная (0,1—0,3%) и пропионовая кислоты (0,3—0,4%). Таким образом, этот тип препарата представляют собой обогащенный летучими жирными кислотами и белком сок зеленых растений.

В качестве кормовой добавки предложено (Sobczak, Kongo-gowska, 1984) использование высушенной культуральной жидкости *P. acnes*, выращенной в нестерильных условиях в среде с мелас-сой, сывороткой или на их смеси. Показано, что штамм *P. acnes*, выделенный из рубца, синтезирует больше биомассы (~4 г/л), летучих жирных кислот (до 2%) и витамина В₁₂, чем музейные штаммы *P. shermanii*.

7.5. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОПИОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Вредители уничтожают 15% мирового урожая во время хранения. При влажности более 14% зерно начинает нагрываться и плесневеть, поскольку во влажной среде прорастают зародыши семян, усиливается их дыхание и жизнедеятельность микрофлоры зерна. Такие способы сохранения зерна, как его сушка, хранение при низкой температуре или в герметичных условиях, в реальной жизни трудно достигаемы. Но существует еще один способ, уже применяемый в некоторых странах и испытанный у нас, предусматривающий обработку (опрыскивание) зерна слабым раствором (0,5—1%) пропионовой кислоты. Пропионовая кислота останавливает рост семян, убивает микроорганизмы, и

прежде всего плесневые грибы (это фунгицид); как показано выше, питательные качества такого корма повышаются, а вероятность заболевания животных микозом и микотоксикозом снижается. Препарат «Pgorcogп» на основе пропионовой кислоты применяют в Англии для хранения зерна и комбикормов в США. Зерно, обработанное пропионовой кислотой, в течение 12 мес. хранится без потерь при влажной погоде под легким навесом.

В процессе пропионовокислого брожения в типичном случае (Allen et al., 1964) из 1,5 М глюкозы образуется 2 М пропионовой и 1 М уксусной кислоты: $1,5 \text{ М глюкозы} + 6 \text{ Ф}_n + 6 \text{ АДФ} \rightarrow 6 \text{ АТФ} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 + 2 \text{ М пропионовая кислота} + 1 \text{ М уксусная кислота}$.

Пропионовую кислоту в промышленности получают химическим методом из нефтепродуктов. Микробиологический способ получения может сосуществовать и даже быть предпочтительнее, чем химический, но для этого требуется высокая продуктивность штамма и возможность использовать для конверсии дешевые субстраты. Если используют *P. shermanii*, сбраживающий лактозу, то таким субстратом можно рассматривать подсырную сыворотку. При концентрации сухих веществ 12% только 50% лактозы используется *P. shermanii* с образованием 1,6—2,2% пропионовой кислоты (Bodie et al., 1987). При совместном культивировании *P. shermanii* и *Lactobacillus casei* вся лактоза утилизируется и образуется 3% пропионовой кислоты за 52 ч при периодическом культивировании; при отъемно-доливном культивировании образуется 4,5%, а при увеличении концентрации сухих веществ в сыворотке — до 18%, выход пропионовой кислоты достигает 6,5% в смешанной культуре.

Для получения пропионовой кислоты в промышленности перспективно введение в среду некоторых восстановителей (см. выше, гл. 3), позволяющих сдвигать брожение в сторону увеличения выхода пропионовой кислоты (Emde, Schink, 1990).

Среди пропионовых бактерий известны штаммы, способные сбраживать полимерные углеводные субстраты и пентозы, главные составные части растительного сырья. Сравнивали (Babuchowski, Hammond, 1987) пять штаммов видов *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, *P. jensenii* в отношении степени конверсии мальтозы, крахмала и лактата натрия в пропионовую кислоту. Наиболее высокая концентрация пропионовой кислоты и отношение пропионовая/уксусная кислота получены при сбраживании лактата, что находится в соответствии с вышеприведенными данными о стимулирующем действии *Lbm casei*, образующим лактат, на продукцию пропионата штаммом *P. shermanii*. Вместе с тем показано (Babuchowski, Hammond, 1987), что с помощью всех пяти штаммов можно получать пропионовую кислоту, используя гидролизированный крахмал, в одностадийном процессе.

Источником пропионата и ацетата служит фильтрат культуральной жидкости пропионовокислых бактерий, используемых для промышленного получения витамина В₁₂. После отделения био-

массы в ферментер может быть помещен анионит, связывающий все кислые продукты, которые далее могут быть с него элюированы (Воробьева и др., 1979). Как было показано, для целей консервирования полезно сочетание пропионовой и уксусной кислот: консервирующие свойства последней давно и широко используются на практике; если действие этих кислот окажется более эффективным, чем одного пропионата, то разделение их не потребует и на базе промышленного производства витамина В₁₂ окажется возможным получать полезный консервирующий агент.

Экономически выгодной оказалась ферментация (Clausen, Gaddy, 1980) гидролизата фруктовых трав в пропионовую кислоту штаммом *P. acidipropionici*. Проточная культура сбраживала смесь глюкозы и ксилозы, причем глюкоза не ингибировала утилизацию ксилозы. За 75 ч 80% обоих субстратов подвергались конверсии. Получение 32 млн кг в год уксусной и пропионовой кислот (растворов смеси, составляющих примерную потребность США) указанным методом обходится дешевле 1/4 стоимости этого продукта на рынке. При необходимости из смеси (1—5%) может быть получена чистая пропионовая кислота путем экстракции или упаривания и кристаллизации, но при этом стоимость продукта сильно возрастет. Процесс получения смеси кислот из гидролизатов трав вполне подходит для целей хранения зерна, кормов, хлеба, сливочного масла (продукты заворачивают в бумагу, пропитанную пропионовой кислотой). Но он может быть также рассмотрен как альтернативный процесс для получения химикалий из нефти.

Смесь пропионата и ацетата натрия можно получать также с использованием иммобилизованных клеток *P. shermanii* и *P. technicum* путем проточного культивирования. В качестве источника углерода используют крахмал негидролизированный и гидролизированный бактериальной амилазой. Скорость накопления кислот на глюкозе и гидролизованном крахмале штаммом *P. shermanii* одинакова. Гранулы ПААГ проницаемы для негидролизованного крахмала, который сбраживается иммобилизованными клетками *P. technicum* до пропионовой и уксусной кислот (Воробьева, 1978). Разделение кислот (если требуется) после их освобождения из солей проводят (Воробьева и др., 1977) методом адсорбционной хроматографии на колонке с ионно-обменной смолой Amberlite-IRC-50 (подробнее см. гл. 6). Протекание процесса без аэрации выгодно для его масштабирования.

Разработан (Lewis et al., 1992) процесс получения пропионовой кислоты из лактозы с помощью *P. acidipropionici* ATCC 4875, иммобилизованной на хирургическом волокнистом материале из хлопка и помещенный в биореактор. Продуктивность процесса почти на 100% удалось увеличить за счет непрерывной селективной экстракции пропионовой кислоты раствором третичного амина (40% аламин в 2-октанол). Выделение пропионовой кислоты и регенерацию экстрактанта осуществляли путем добавления небольшо-

го количества раствора 1 и NaOH. В качестве продукта получали концентрированную соль пропионата.

Как альтернатива получению пропионовой кислоты из сахаров с помощью пропионовокислых бактерий предложен (Tyree et al., 1991) процесс с использованием двух культур: *Lactobacillus xylosus* и *P. shermanii*. Чистые культуры объединяют в смешанную культуру таким образом, чтобы предотвратить лимитирование по питательным веществам. Превращение сахара в пропионовую кислоту проводят в системе из двух сосудов реакторов. Лактат образуется *L. xylosus* в непрерывном реакторе с перемешиванием и поступает во второй реактор с иммобилизованными клетками *P. shermanii*, осуществляющими синтез пропионата. Система характеризуется высокой общей продуктивностью в отношении синтеза пропионата. Два технических препятствия ограничивают возможность промышленного получения пропионовой кислоты путем ферментации: 1) относительно низкая продукция кислоты и ингибирование образования кислот вследствие их аккумуляции и 2) трудности выделения кислот из разбавленных растворов. В конце типичного брожения концентрация пропионовой и уксусной кислот составляет ~2 и 1% соответственно (вес/об.).

Выход кислот можно увеличить путем приучения штаммов к повышенному содержанию пропионовой кислоты в среде. Таким образом, был селектирован штамм *P. acidipropionici*, значительно превосходящий родительский штамм. Ингибиторное действие кислот на их образование преодолевают при ведении проточного культивирования, особенно иммобилизованных в полимерный матрикс клеток, поскольку культивирование растущих клеток чревато в большой степени опасностью заражения посторонней микрофлорой.

Выделение органических кислот из разбавленных растворов представляет определенные трудности. Традиционный способ отгонки кислот связан с затратой большого количества энергии, что сильно увеличивает себестоимость продукта. Можно было бы экстрагировать кислоты органическим растворителем, введением его в культуральную жидкость, но он может оказывать ингибиторное действие на клетки и их кислотообразующую активность. Альтернативная технология предусматривает применение жидких мембран, поры которых заполнены органическим растворителем, селективно растворяющим органические кислоты культуральной жидкости. При таком культивировании культура циркулирует по одну сторону мембраны и поглощает кислоты раствор (например, раствор оснований), находящийся по другую сторону мембраны. Органические кислоты поступают в растворитель, а затем в поглощающий раствор, откуда они выделяются в виде солей, которые в мембране не растворяются.

Использование пропионовой кислоты для ингибирования роста плесеней также связано с рядом проблем. Пропионовая кислота очень коррозивна для оборудования, из которого она подается на опрыскиваемое зерно. Кроме того, добавление пропионо-

вой кислоты или ее соли к пище в качестве консерванта нарушает принятую в наше время установку «только все натуральное». Для сохранения зерна необязательно использовать чистый раствор пропионовой кислоты. В наших исследованиях (Vorobjeva et al., 1984) было показано, что обработка семян культуральной жидкостью (0,5% летучих кислот) двух штаммов пропионовых бактерий приводит почти к полному уничтожению бактерий, дрожжей и плесневых грибов (табл. 79). Смесь кислот, образованных пропионовокислыми кокками, оказывала более сильное фунгицидное действие, чем смесь, образованная *P. shermanii*, по-видимому, вследствие более высокого содержания пропионовой кислоты: отношение пропионовая/уксусная кислота у кокков 8,0, а у *P. shermanii* 2,0.

Можно выращивать пропионовые бактерии в естественной среде, например в молочной или сырной сыворотке, затем высушивать культуральную жидкость вместе с клетками и использовать как консервант. Примером такого продукта служит «*Microgard*», получаемый при сбраживании обезжиренного молока. Его используют как консервант козьего сыра для ингибирования роста грамотрицательных бактерий, некоторых грибов, включая дрожжи. *Microgard* обладает более широким спектром антимикробного действия, чем пропионовая кислота, так как помимо кислот содержит другие ингибиторные вещества: диацетил, белковый бактериоцин, ингибирующий рост ряда грамположительных, грамотрицательных бактерий, а также различных грибов.

Таблица 79

Микрофлора риса и подсолнечника после обработки раствором летучих кислот, образованных пропионовокислыми бактериями (Vorobjeva et al., 1984)

Штаммы *	Концентрация кислот, %	Число микроорганизмов в 1 г зерен ($\times 10^6$)		
		бактерии	плесневые грибы	дрожжи
<i>P. shermanii</i>	0	4500	1400	0,08
<i>P. shermanii</i>	0,1	3000	1,2	0,2
<i>P. shermanii</i>	0,5	2,1	0,05	0,004
<i>P. coccooides</i>	0,1	280	0,81	2,1
	0,5	17	0,04	0,01
<i>P. shermanii</i> **	0	9200	18	2,7
	0,1	8000	2,2	0,12
	0,5	40	0,13	0,02
<i>P. coccooides</i>	0,1	750	4,3	0,60
	0,5	88	0,06	0,03

* — обработка зерен риса; ** — обработка зерен подсолнечника.

7.6. ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ

7.6.1. ХЛЕБОПЕЧЕНИЕ

Пропионовые бактерии, наряду с молочнокислыми бактериями и дрожжами, вводят в некоторые закваски для теста с целью образования в процессе ферментации помимо молочной и уксусной кислот еще и пропионовой. Такой хлеб содержит до 0,28% пропионовой кислоты и имеет увеличенное время хранения в связи с ингибирующим действием пропионовой кислоты на рост плесневых грибов (Pelshenke, 1950). Этот эффект может быть достигнут только в том случае, если количество пропионовых бактерий достигает $250 \cdot 10^6$ клеток в одном грамме сырого теста. Смешанная культура гетероферментативных молочнокислых бактерий *Lactobacillus brevis* ТКК 105-6-1 и *P. acidi-propionici* ТКК 114-3-1 после трех дней совместного культивирования при 30°C в среде, содержащей гидролизованную α -амилазой пшеничную муку, дрожжевой экстракт и минеральные соли, использовалась (Javanainen et al., 1987) как закваска для хлеба; рН культуры поддерживали на уровне 5,0—5,8 благодаря присутствию в среде мела (20 г/л). Почти вся молочная кислота, образуемая молочнокислыми бактериями, превращалась в пропионовую и уксусную кислоты. В выпеченном с такой закваской хлебе содержалось 0,1% уксусной, 0,2% молочной и 0,1% пропионовой кислоты (по отношению к весу муки). Это количество пропионовой кислоты обеспечивало хороший фунгицидный эффект без заметного влияния на вкус и аромат выпекаемого хлеба. Вместе с тем, если использовать другую смешанную культуру *P. acidi-propionici* и *L. plantarum*, в которой содержание молочной кислоты достигает почти 4% и выше, пропионовая кислота почти не образуется. Путем внесения пропионовых бактерий в закваски можно обогащать хлеб витамином В₁₂; это особенно важно для вегетарианцев и лиц, страдающих различными заболеваниями (см. выше), причиной которых служит дефицит витамина В₁₂ в организме. Путем изменения уровня соли кобальта, который вносят в среду для выращивания пропионовых бактерий, регулируют содержание в клетках витамина В₁₂ (см. гл. 5), а следовательно, и в хлебе, выпеченном с соответствующей закваской.

7.6.2. КИСЛОМОЛОЧНЫЕ НАПИТКИ

С целью обогащения витамином В₁₂ в кефир и другие молочнокислые продукты вносили (Карлин, 1966) пропионовые бактерии, повышая таким образом питательные свойства и лечебную ценность этих продуктов. В нашей стране изготовлен кисломолочный напиток (Романовская и др., 1985), закваска которого включает уксуснокислые бактерии *Acetobacter lovaniense*, вязкие расы молочнокислых стрептококков и *P. shermanii* в соотношении штаммов (2,5—3,5):(9—11):(3—4). Сырьем служит смесь молока с творожной сывороткой в соотношении 9:1—7:3. Разбав-

ление молока творожной сывороткой приводит к экономии молока, но вместе с тем и к разбавлению его, вследствие чего содержание в продукте сухих веществ, витаминов, белка снижается. Эти неизбежные потери компенсируются использованием в составе закваски бактерий, синтезирующих белки, витамины, внеклеточные полисахариды, увеличивающие вязкость продукта. Активными продуцентами внеклеточных полисахаридов служат некоторые штаммы уксуснокислых бактерий.

В симбиозе со стрептококками образование внеклеточных полимеров увеличивалось. *P. shermanii* и *A. lovaniense* в виде монокультур не росли в молоке, а в смеси росли и вызывали его свертывание за 32—36 ч, обогащая молоко витамином В₁₂ и другими витаминами группы В. Однако при совместном культивировании с молочнокислыми стрептококками наблюдали снижение содержания витаминов, которые, по-видимому, последними утилизировались. Поэтому при изготовлении напитка уксуснокислые и пропионовокислые бактерии выращивают в сыворотке (где они хорошо растут), а молочнокислые и уксуснокислые бактерии — в молоке с последующим смешиванием компонентов. Такой способ раздельного сквашивания молока рекомендован (Романовская и др., 1985) для производства высоковитаминизированного напитка.

7.6.3. ОБЕССАХАРИВАНИЕ БЕЛКА КУРИНЫХ ЯИЦ

Эта проблема возникла в связи с хранением сухого яичного белка. В свежем белке имеется активный лизоцим, обладающий бактерицидным действием, однако в процессе хранения активность лизоцима снижается и белок становится уязвимым для многих, и прежде всего гнилостных, бактерий, вызывающих его порчу. Вследствие накопления продуктов разложения белка и окислительных процессов он оказывается непригодным для употребления в пищу. Для консервирования яичного белка применяют очищенные ферментные препараты — каталазу и глюкозооксидазу в присутствии перекиси водорода. Этот способ направлен на удаление углеводов в белке, что способствует его консервации. Однако полностью углеводы при этом не удаляются, а часть белков подвергается денатурации. Кроме того, использование очищенных ферментных препаратов повышает стоимость продукта. В качестве альтернативного был предложен способ консервации белка с использованием пропионовокислых бактерий (Стоянова и др., 1979). Он основан на установлении способности пропионовокислых бактерий расти в жидком курином белке, сбраживая за 24 ч углеводы с образованием консервантов — пропионовой (более 3,5 мг/г) и уксусной кислот (Воробьева и др., 1979). Внесение в яичный белок серноокислого аммония в сочетании с фосфорнокислым калием или фосфорнокислого аммония усиливают рост, ускоряют потребление углеводов и изменяют направленность пропионовокислого брожения в сторону образования пропионовой кислоты (Стоянова и др., 1979) (рис. 79); питательная ценность

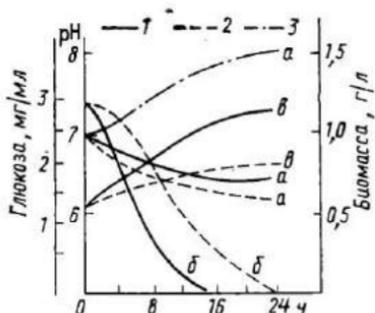


Рис. 79. Накопление биомассы, изменение pH и потребление глюкозы при росте *P. shermanii* в яичном белке (Стоянова и др., 1979): а — изменение pH, б — изменение содержания глюкозы, в — биомасса; 1 — культивирование с добавлением K_2HPO_4 и $(NH_4)_2SO_4$, 2 — культивирование в жидком яичном белке без солей, 3 — контроль (яичный белок без бактерий)

нени сухого порошка. Было также установлено (Воробьева и др., 1979), что в результате ферментации пропионовых бактерий число посторонних бактерий в белке снижается почти в 3 раза. При этом полностью исчезают бактерии *pp. Salmonella, Staphylococcus, Proteus* и увеличивается титр *E. coli*, т. е. санитарно-бактериологическое состояние сухого яичного белка улучшается. Ферментированный яичный белок приобрел более высокие для пекарского дела физико-химические свойства по сравнению с неферментированным (Стоянова и др., 1975); увеличилась стойкость пены, снизился ее удельный вес и возрос в 2 раза объем. В прямой зависимости от устойчивости пены находится объем выпеченных кексов. Кексы, выпеченные после предварительной ферментации в белке *P. shermanii*, отличаются приятной белизной и ароматом, хорошей структурой и высокой пористостью.

7.7. СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА (СОД)

Пагубное действие на организмы многих радиационных излучений и многих химических мутагенов связано с возникновением свободных радикалов (Дубинин, 1976; Petkau, 1987; Порошенко, Абилов, 1988). Потенциальными биологическими мишенями для радикальной атаки служат липиды, белки, нуклеиновые кислоты. Свободные радикалы часто вовлекаются в активацию многих типов прокарциногенов и промутагенов, превращая их в карциногены и мутагены и связывая эти активированные формы с ДНК (Pruog, 1986). Пероксидный радикал может вызывать повреждения ДНК, а система, продуцирующая супероксид-

белка увеличивалась за счет выделения бактериями свободных аминокислот, и прежде всего глутамин-аспарагиновой, цистеиновой, а также аланина и метионина, и витаминов B_{12} и B_2 . Свободные аминокислоты препятствуют реакции меланоидинообразования, в результате которой изменяется цвет белка, его органолептические и физические свойства. Белок яйца штаммом *P. shermanii*, который был рекомендован, не затрагивался; более того, он обогащался бактериальным белком, так что общее количество альбуминов увеличилось на 5,5%. Благодаря липолитической активности пропионовых бактерий происходило расщепление жиров белка, присутствие которых способствует порче при хранении

ные радикалы, провоцирует возникновение гидроксильных радикалов (и опасный синглетный кислород), образующих радикальные сайты на ДНК. Лучевая болезнь, многие формы рака и ряд других тяжелых заболеваний связаны прямо или косвенно с образованием радикалов. Свободные радикалы содержатся в сигаретном дыме (Pryor, 1985), являющимся опухолеродным агентом.

В слюне и человеческой сыворотке содержится СОД, пероксидаза и каталаза — антиокислители, снижающие уровень H_2O_2 и O_2 и представляющие собой одну из форм естественной защиты организма от действия мутагенных факторов (Nishioka, Nunoshi-ba, 1986). Клинические исследования показали, что СОД оказывает высокий положительный эффект при лечении сердечных приступов, связанных с повреждениями сердечной мышцы (Fass, 1987). СОД имеет перспективы применения не только в медицине, но и в пищевой промышленности, где в сочетании с каталазой и пероксидазой может использоваться для предотвращения окисления липидов и других ценных компонентов пищи (Taylor, Richardson, 1974). СОД, получаемая из некоторых морских бактериальных штаммов, рекомендована (Mickelson, 1977) для защиты ряда окисляемых систем от аутоокисления. Промышленное производство СОД и антиокислительных ферментов пока отсутствуют, а препараты СОД для лабораторных целей получают из эритроцитов крови.

Пропионовокислые бактерии служат довольно хорошим источником СОД, и их ценность в этом качестве возрастает в связи с возможностью комплексной переработки биомассы. Нами (Краева, Воробьева, 1981) разработан простой метод выделения и очистки СОД до гомогенного состояния, этапы которого показаны в табл. 80. Выход фермента из биомассы *P. globosum* составляет 10% по активности и 0,28% по белку. При очистке используется тепловая обработка препарата, поскольку СОД — термостабильный белок, что значительно сокращает число стадий очистки. В

Таблица 80

Этапы выделения и очистки до гомогенного состояния СОД
P. globosum (Краева, Воробьева, 1981)

Стадия очистки	Общая актив-ность, Ед	Общий белок, мг	Удельная актив-ность, Ед/мг белка	Выход, %
Бесклеточный экстракт	58560	2500	23	—
Осаждение сульфатом аммония (50—80% насыщения)	81820	216	379	100
Тепловая обработка (70°, 5 мин)	75750	180	416	92
Хроматография на ДЭАЭ-52	36826	36	1023	45
Препаративный гель-электрофорез и ре-хроматография на ДЭАЭ-52	8213	7	1100	10

процессе очистки модификации фермента не происходит. СОД из *P. globosum* сохраняет активность в 50%-ном глицерине в течение 4 мес при -13° . Свойства СОД описаны выше (гл. 4).

Поскольку пропионовые бактерии допущены к применению в пищевой промышленности, то для этой цели может быть рекомендован (Воробьева и др., 1979) препарат; полученный из биомассы после экстракции из нее витамина B_{12} 20%-ным водным раствором этанола. Полученную после извлечения витамина биомассу дезинтегрируют одним из доступных методов. Фильтрат после отделения разрушенных клеток содержит каталазу, пероксидазу и СОД и может быть использован как антиокислительный препарат. Таковы действующие и перспективные производства, создаваемые на основе продуктов жизнедеятельности пропионовых бактерий.

7.8. ПРИМЕНЕНИЕ *CORYNEBACTERIUM PARVUM* (*P. acnes*) И ДРУГИХ АНАЭРОБНЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ

Первые указания на сильное стимулирующее действие *C. parvum* (*P. acnes*) на ретикулоэндоплазматическую систему (РЭС) относятся к началу 60-х годов (Halpern et al., 1964, 1966). С годами накапливалась информация об иммуноусиливающих свойствах этой бактерии: увеличении синтеза антител, стимуляции иммунитета, опосредованного клетками, а также об антивирусных и антибактериальных активностях.

В ряде лабораторий установлено, что *C. parvum* ингибирует и значительно замедляет рост различных (включая злокачественные) опухолей, а также инвазию опухоли за счет усиления защитных реакций организма. Но может быть, еще более поразительный факт состоит в том, что *C. parvum* ингибирует распространение метастазов в организме (Bomford et al., 1975). Иммунотерапия рака, в том числе с использованием *C. parvum*, наиболее эффективна (Bomford, Olivotto, 1975) после операций, поскольку при этом удаляются источники диссимиляции опухолевых клеток, а также после химиотерапевтической ремиссии лейкемии.

В экспериментальных исследованиях животным (в том числе и приматам) вводят отмытые раствором NaCl и убитые нагреванием и формалином клетки *C. parvum* (или других исследуемых бактерий), инокулируют животное культурой различного типа опухолей и изучают реакцию организма, сравнивая ее у контрольных животных. В таких экспериментах был сделан очень важный для клиники вывод об отсутствии фармакологической и органной токсичности у различных лабораторных животных, даже при введении вакцины в дозах, намного превышающих ту, что применяют в терапии и при лечении хронических заболеваний.

Наблюдения проводились и на людях: они подтвердили безопасность *C. parvum* для клинического применения. Поскольку

применяют убитые бактерии, опасность их последующего оживления и восстановления в организме хозяина исключена. Важно отметить, что большая часть результатов получена при введении животным *S. parvum* до, либо одновременно, либо сразу же после инокулирования опухоли, хотя имеется сообщение (Fisher et al., 1975) о действии *S. parvum* и на уже привитую опухоль.

Показано, что противоопухолевое действие связано с усилением иммунитета, опосредованного клетками: обнаружено увеличение числа макрофагов, стимулируется их хемотаксис, выделение лизосомальной кислой гидролазы (Wilkinson, 1975), следовательно, происходят не только количественные, но и качественные изменения иммунных адъювантов. Активированные макрофаги приобретают новые биологические активности: модулируют функции Т-клеток и увеличивают число Т-лимфоцитов в селезенке (Toijas et al. 1975), стимулируют функции В-клеток, ингибируют деление клеток опухоли, участвуя в иммунном ответе хозяина, макрофаги активируют лимфоциты, действующие как эффекторные клетки и убивающие опухолевые клетки-мишени при прямом контакте (Baum, Breeze, 1976).

Под электронным микроскопом наблюдали (Puvion et al., 1975) тесный мембранный контакт опухолевых клеток УС-8 и активированных макрофагов. Многие опухолевые клетки, фиксированные макрофагами, имели полости и, возможно, не были живыми. Такой картины с необработанными макрофагами никогда не наблюдали. Наиболее сильное действие *S. parvum* оказывает на иммуногенные опухоли, которые индуцируются химическими карциногенами.

S. parvum восстанавливает и стимулирует образование колоний клеток костного мозга и селезенки (Dimitrov et al., 1975). При этом увеличиваются также размеры колоний и вес селезенки (Baum, Breeze, 1976). Восстановление предшественников кроветворящих клеток имеет особую важность в тех случаях, когда при лечении больных применяют химио- и иммунотерапию. Использование *S. parvum* позволяет применять более высокие дозы цитотоксических агентов (Dimitrov et al., 1975) без риска аплазии клеток костного мозга. Считают (Baum, Breeze, 1976), что стимуляция клеток костного мозга — ключ к пониманию уникального свойства штамма *S. parvum* оказывать противоопухолевое действие. С бактериями, не обладающими противоопухолевым действием, такой эффект на клетки костного мозга мышей не был показан.

При экстракции горячим водно-феноловым раствором убитых нагреванием клеток *P. acnes* (*S. parvum*) получили (Saino et al., 1976) фракцию нерастворимого среднего слоя, которая при внутривенной инъекции мышам (как и убитых нагреванием клеток) предотвращала образование опухоли (саркомы-180), проявляла адъювантное действие при иммунном ответе, а также фагоцитарное действие (стимуляцию РЭС). Химический анализ показал (Saino et al., 1976), что активная фракция содержала в основном поли-

сахариды и мукопептиды, т. е. составные части клеточных стенок, включающих полисахаридные, мукопептидные ядра и небольшое количество жирных кислот (Azuma et al., 1975).

Многообещающие результаты получены при лечении людей. При ежедневном введении внутривенно 4 г *S. parvum* отмечено улучшение состояния онкологических больных без применения химиотерапии (Israel, 1975). У группы, включающей 414 больных, получавших подкожно *S. parvum*, снижалась смертность и наблюдалось повышение состояния здоровья. Отмечали (Israel, 1975) синергизм положительного действия вакцины *S. parvum* и BCG, а также *S. parvum* и химиотерапевтических агентов. *S. parvum* делает более доступными белые кровяные тельца и таким образом увеличивает устойчивость организма к химиотерапевтическим средствам (Israel, 1975); кроме того, как мы уже говорили, бактерии активируют макрофаги и лимфоциты и усиливают специфический иммунный ответ против рака. Но как отмечал профессор Хальперн (Halpern, 1975), результаты клинических исследований носят еще предварительный характер, хотя выводы экспериментальных исследований убедительно доказаны. Их главный итог состоит в установлении неспецифического усиления иммунитета хозяина под влиянием *S. parvum*, *S. granulorum* и *S. avidum*. И это открытие оценивают как прорыв в фундаментальной и прикладной иммунологии и особенно в онкологии. Под специфической иммуностимуляцией понимают (Schwarzenberg, Mathe, 1975)

Таблица 81

Активность кислой фосфатазы после 6 дней внутривенного введения цыплятам убитых нагреванием микроорганизмов (White, 1975)

Организм	Серологическая группа	Кислая фосфатаза, Ед/мл
<i>Mycobacterium avidum</i>		238
Анаэробные коринсбактерии		
<i>P. avidum</i> 4982	4	196
<i>C. parvum</i> 3085	1	166
<i>C. avidum</i> 0589	4	162
<i>C. parvum</i> 0208	1	125
<i>C. liquefaciens</i> 814	1	118
<i>C. parvum</i> В	0	96
<i>P. granulorum</i> 0507	3	69
Классические пропионовые бактерии		
<i>P. freudenreichii</i> 10470		41,6
<i>P. jensenii</i> 5960		28,6
<i>P. rubrum</i> 8901		25,6
<i>P. arabinosum</i> 5958		19,6
Раствор соли (контроль)		19,6

Хемотактическая активность анаэробных
коринебактерий и классических
пропионовых бактерий по отношению
к перетониальным макрофагам морской
свинки (White, 1975)

Штамм	Миграция к бактериальной суспензии (1500·10 ⁴ клеток/мл)
Группа I (<i>P. acnes</i>)	
<i>C. parvum</i> 0208	40
<i>C. parvum</i> 3085	90
<i>C. parvum</i> 1383	120
<i>C. liquefaciens</i> 814	30
<i>P. acnes</i> 737	50
<i>C. parvum</i> A	50
Группа II (<i>P. granulosum</i>)	
<i>C. parvum</i> 10387	40
<i>C. parvum</i> C	60
<i>P. granulosum</i> 0507	40
Группа III	
<i>C. diphterooides</i> 2764	10
<i>C. anaerobicum</i> 578	40
<i>C. parvum</i> 10390	30
<i>C. parvum</i> B	20
Группа IV (<i>P. avidum</i>)	
<i>P. avidum</i> 0575	50
<i>P. avidum</i> 4982	120
<i>P. avidum</i> 0589	90
Классические пропионовые	
<i>P. freudenreichii</i>	30
<i>P. jensenii</i>	не опр.
<i>P. rubrum</i>	10
<i>P. arabinosum</i>	20
Негативный контроль (раствор Гея)	20
Позитивный контроль (казеин 5 мг/мл)	140

Примечание. Положительной считали миграцию 60 и более микрометров за 130 мин.

непосредственный контакт или модификацию раковой клетки либо выделение антигена, связанного с раком. Неспецифическая иммуностимуляция имеет в виду участие в реакциях иммунных адьювантов.

С точки зрения микробиологии интерес представляет тот факт, что анаэробные коринебактерии (при введении животным) значительно (>чем в 2 раза) стимулируют фагоцитный индекс «К», а классические пропионовые бактерии сильного действия не оказывают (White, 1975). То же касается энзиматической активности макрофагов: под действием кожных пропионовых возрастает активность кислой фосфатазы, β -D-галактозидазы, фосфолипазы А. В качестве примера приводим данные по активности кислой фосфатазы (табл. 81), а также по хемотактической активности макрофагов (табл. 82). Предполагают (Wilkinson, 1975), что активирующий фактор кожных пропионовых бактерий по крайней мере в своей части, представлен пептидом и имеет сродство к мембране мононуклеарных фагоцитов, у которых активирует такие процессы, как экзоцитоз, эндоцитоз, движение. При коротком времени активации в макрофагах наблюдали (Wilkinson, 1975) усиленный синтез белков. Но молекулярная основа иммуностимулирующего действия анаэробных коринебактерий требует дальнейшей расшифровки.

Многие микобактерии, будь то сапрофитные или патогенные, большая часть нокардий тоже проявляют ряд адьювантных эффектов на морских свинках, подобнокожным пропионовым, но, как

ни странно, аэробные коринебактерии этим свойством не обладают. Кожные пропионовые бактерии имеют отличия от других вышеуказанных бактерий и в отношении механизма активации, осуществляя прямую и специфическую активацию макрофагов. Они не активируют лимфоциты тимуса и в этом, как и в других отношениях, отличаются от действия микобактерий и нокардий (White, 1975). Поэтому считают, что биологические эффекты микобактерий и анаэробных коринебактерий основаны на совершенно различных типах химического действия.

У. С. parvum обнаружено и иное, чем иммуностимулирующее, важное для клиники действие. Фосфолипидные вещества клеток не только стимулировали переваривающую способность макрофагов печени и селезенки, но и их бактерицидное действие в отношении *Salmonella typhimurium* и *Listeria monocytogenes* (Fauve, 1975). Обработка мышей с помощью *С. parvum* увеличивала их устойчивость не только к опухолям, но и к бактериальным инфекциям (Adlam et al., 1972). Противоопухолевое и антибактериальное действие не может быть полностью объяснено стимуляцией РЭС.

In vivo и in vitro наблюдали (Ceruti, 1975), что перетониальные эксудаты мышей, обработанные *С. parvum*, содержат фактор, который ингибирует вирус везикулярного стоматита и энцефаломиокардита. Причем у ингибитора не были обнаружены биохимические свойства, присущие интерферону. Например, интерферон термолабилен, а новый фактор термоустойчив.

Для применения *С. parvum* в качестве антивирусного препарата требуются дополнительные исследования.

Экспериментальные и клинические испытания кожных пропионовых бактерий продолжаются и результаты исследований регулярно докладываются на международных коллоквиумах, один из которых — «Bacteria and Cancer» — состоялся в Болонье (Франция) в 1982 г. В одном из сообщений (Szmigielski et al., 1982) показано, что *P. granulosum* КР-45 проявляет иммуномодулирующую, антинеопластическую и антивирусную активность в клинических исследованиях, что связывают с активацией моноцит-макрофаговой системы, индукцией синтеза интерферона и/или активацией киллерных клеток.

Стимуляция синтеза интерферона происходила также в культуре тканей людей. Авторы считают, что иммуномодуляторное и антинеопластическое действие пропионовых бактерий обусловлено компонентами их клеточных стенок, в особенности пептидогликановым и тейхоевым комплексом. Показано стимулирование также гемопоэтической системы, пролиферации костного мозга. Если *P. granulosum* вводить мышам за несколько дней до облучения смертельной дозой рентгеновских лучей (850 рад), то время жизни животных сильно продлевается. Предлагают сочетать иммунотерапию с интенсивной радио- и химиотерапией при лечении больных. Считают (Roszkowski et al., 1982), что *P. granulosum* КР-45 можно эффективно использовать в рутинной адьювантной форме

з противоопухоловой терапии при относительно низкой токсичности.

S. parvum представляет собой уникальный организм и в другом отношении, тоже связанном с медициной, а именно в отношении способности к синтезу простагландинподобных соединений (ППВ).

Простагландиноподобные соединения. В липидном ядре *P. acnes* обнаружены (Hellgren, Vinceni, 1983) вазоактивные простагландиноподобные вещества, содержащие характерную алифатическую цепь семейства простагландинов. Эти вещества *P. acnes* представляют новый тип бактериальных простагландинов. Биологические активности ППВ сравнивали с таковыми арахидоновой кислоты и простагландинов PGE₂, PGF₂ и PGI₂. Спектр ППВ был сходен со спектром биологического действия PGI₂, но в то же время обладал уникальной особенностью — антиагрегирующим действием на platelets. In vivo ППВ *P. acnes* индуцировали изменения в капиллярах кровеносной системы (на животных) и проявляли потенциальную хемотактическую активность в отношении полиморфонуклеарных лейкоцитов человека (Belsheim et al., 1979), т. е. обладали целым спектром биологических эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пропионовокислые бактерии представляют четкую древнюю эволюционную ветвь, восходящую от актиномицетного предка (рис. 80). Это — мост, связывающий прошлое и настоящее.

На основании высокой степени гомологии нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в род *Propionibacterium* включены 3

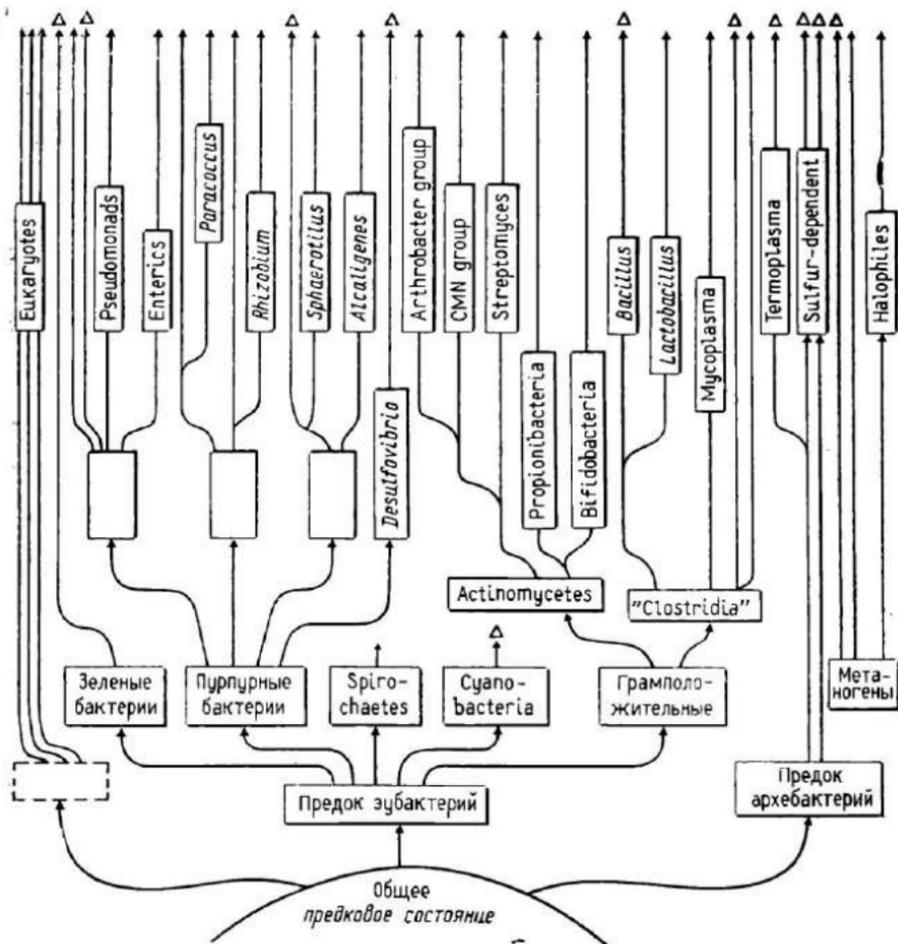


Рис. 80. Филогения живых организмов (Brock, Madison, 1988)

подгруппы пропионовых бактерий: классические, кожные и *Propionibacterium propionicus*. Классические бактерии обитают главным образом в молоке, сырах (отсюда и другое название: молочные пропионовые), кожные — на коже людей, в рубце жвачных; *P. propionicus* — в почве.

Род *Propionibacterium* не представляет собой единую группу. Экология несомненно отражается на свойствах представителей подгрупп. Но даже классические бактерии, изученные лучше других, не представляют собой единую группу и характеризуются разнородностью в отношении многих признаков, включая химический состав клеток, жирных кислот мембранных липидов, условий хранения, отношения к ЕН, кислороду, механизма поглощения сульфата и др. Более того, даже у представителей одного вида установлено «смешение» функций, многие из которых дублируются разными системами; например, получение энергии может осуществляться при субстратном и окислительном фосфорилировании, синтез и метилирование ДНК — V_{12} -зависимым или V_{12} -независимым путем. Микроб включает в работу те ферменты, которые позволяют ему наиболее эффективно реализовать свои жизненные возможности в конкретной ситуации. Говорят, что к умным следует относить субъекты, которые способны принять в нужную минуту и в соответствующих условиях единственно правильное решение. В пропионовых бактериях природа почти не делала ошибок.

«Смешение» функций у пропионовых бактерий определяет их другую особенность — высокую степень адаптации, которой не владеют, например, другие, молочные бактерии — бактерии рода *Lactobacillus*. Этому способствуют и плазмиды, обнаруженные, но еще недостаточно изученные у пропионовых бактерий.

Может быть, сохранение у пропионовых бактерий генов (многие из которых могут молчать в обычных условиях), делающих их метаболизм лабильным, пластичным, задерживало скорость эволюции этой формы жизни, если сравнить ее со скоростью эволюции других потомков актиномицетной линии (рис. 80). Перед нами подлинно живой пласт древности.

Всех представителей рода объединяет сохранение у них единого способа получения энергии в анаэробных условиях — пропионовокислого брожения, которое при участии в нем *AdoCbl* представляет собой наиболее гармоничный и энергетически наиболее выгодный способ генерации АТФ. Это единственное бактериальное брожение, которое позволяет получать ~ 6 М АТФ на 1,5 М сброженной глюкозы. Окислительное фосфорилирование, открытое у пропионовых бактерий, протекает с небольшой эффективностью, но вносит вклад и в анаэробных условиях при осуществлении, наряду с брожением, фумаратного дыхания.

Предпочтение анаэробного образа жизни перед аэробным связано также с тем, что синтез цитохромов, в том числе *b*-типа, работающего при брожении, в присутствии кислорода сильно подавлен.

Синтетические способности бактерий хорошо развиты, хотя и различаются у разных штаммов. Установление у пропионовых бактерий способности фиксировать молекулярный азот, использовать углеводороды, самостоятельно синтезировать витамины (ранее считавшиеся «обязательными») расширяет наши представления о границах жизни пропионовых бактерий.

Все пропионовые бактерии синтезируют витамин В₁₂, принимающий участие в брожении, синтезе белка, ДНК, в регуляции синтеза ДНК и в некоторых других реакциях. «Анаэробные» штаммы синтезируют витамин В₁₂ в больших количествах, чем «аэробные» при росте в одинаковых анаэробных условиях, что говорит о генетической детерминированности «сверхсинтеза» В₁₂ первыми. У анаэробных форм, и это продемонстрировано экспериментально, метаболизм настроен на высокий уровень витамина В₁₂, а сам витамин выступает регулятором такой «настройки», для чего требуется его высокий уровень в клетках.

Образование высоких количеств витамина В₁₂ — лишь одна из особенностей пропионовых бактерий, которая используется в практической деятельности людей. С древних времен бактерии используют в сыроделии и многие пороки лучших сыров вызваны отсутствием или слабым ростом пропионовых бактерий. Поэтому столь важно было создание специальных многоштабмовых заквасок пропионовых бактерий для сыров. Сыры — главные источники выделения классических пропионовых бактерий. Кожные бактерии рассматривают как биологическую защиту человека и полезную естественную микрофлору рубца жвачных. Они усиливают иммуностимулирующие реакции у людей, оказывают благотворное влияние на сельскохозяйственных животных и птиц и потому нашли применение как компоненты лечебных и профилактических препаратов. Для использования пропионовых бактерий в медицине нужны дальнейшие исследования. Обнаружение у них антимутагенных свойств раскрывает широкие перспективы таких исследований и новые области практического применения этой полезной группы бактерий.

Применение методов молекулярной таксономии изменило численность и качественный состав рода и позволило обозначить близких и дальних родственников.

Высокий уровень гомологии ДНК-ДНК представителей некоторых видов заставил сократить число видов классических бактерий с 11 до 5: *P. freudenreichii*, *P. thoenii*, *P. jensenii*, *P. acidipropionici*, *P. coccoides*. Но границы рода были раздвинуты для включения в него 4 видов анаэробных коринебактерий, обитающих на коже людей. С использованием методов традиционной, нумерической и молекулярной таксономии показано, что анаэробные коринебактерии по ряду существенных признаков отличаются от других членов рода *Corynebacterium* и имеют сходства на родовом уровне с пропионовыми бактериями. Их стали называть кожные пропионовые бактерии и именуют как *P. acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum*, *P. limphophilum*. На коже людей обитает еще

один вид пропионовых бактерий, названный *Propionibacterium innocuum*, с фенотипом, характерным для классических пропионовых бактерий, но отличающийся от последних и от кожных бактерий рядом особенностей (Pitcher, Collins, 1991)¹. Так, кожные пропионовые бактерии анаэробны и содержат в клеточной стенке $L=$ ДАП в сочетании с галактозой как главным нейтральным сахаром. У *P. innocuum* в отличие от других кожных пропионовых, в клеточной стенке находится $L=$ ДАП в сочетании с арабинозой как главным углеводом. Кожные пропионовые — анаэробы, а *P. innocuum* обладает первичным дыханием. Бактерии рода *Corynebacterium* содержат в клеточной стенке мезо-ДАП в сочетании с арабинозой как главным сахаром, а также миколовые кислоты, которых у *P. innocuum* нет. Главный продукт метаболизма у *P. innocuum* представлен пропионовой кислотой, а не молочной, как у представителей рода *Corynebacterium*. Гибридизация ДНК *P. innocuum* со штаммами других видов рода *Propionibacterium* дала отрицательные результаты и не выявила близкую геномную гомологию на видовом уровне несмотря на сходство нуклеотидного состава. Изучение последовательности нуклеотидов 16S рНК (около 95% всей молекулы) подтвердило родство с родом *Propionibacterium*. В роде *Propionibacterium P. innocuum* занимает отчетливую линию. Наименьшее эволюционное расстояние ($K_{\text{нuc}}$) отделяет *P. innocuum* от *P. thoenii* и *P. propionicus*.

За счет перемещения *Arachnia propionica* из группы *Actinomyces* род *Propionibacterium* приобрел еще одного члена под названием *P. propionicus*, и на сегодняшний день в состав рода входят 11 видов: 1. *P. freudenreichii*, 2. *P. thoenii*, 3. *P. jensenii*, 4. *P. acidipropionici*, 5. *P. coccoides*, 6. *P. acnes*, 7. *P. avidum*, 8. *P. granulolum*, 9. *P. limphophilum*, 10. *P. propionicus*, 11. *P. innocuum*.

P. innocuum находится на периферии бескорневого дерева, отражающего родственные связи между членами рода.

Таксономии пропионовых бактерий была посвящена специальная сессия на I-ом Международном симпозиуме «Молочные пропионовокислые бактерии», который состоялся во Франции, в г. Рэнне в мае 1995 г.

Другое важное современное направление в изучении пропионовых бактерий связано с генетическими исследованиями. Они проводятся в Англии под руководством Б. Глатц (см. выше), а также в России во ВНИИГенетика промышленных штаммов под руководством С. К. Абилева. В результате проведенных исследований (С. В. Панкова и др.)² создана полноразмерная клонотека генома *P. shermanii* и идентифицирован гес-А ген. Клонированы гены *thr-B* и гес-А *P. shermanii* в клетках различных штаммов *E. coli* в составе различных векторов. Показано, что гес-А подобный ген *P. shermanii* полностью комплементирует гес-А-функции

¹ FEMS Micr. Lett. 1991. Vol. 84, P. 295—300.

² Генетика. 1993. Т. 29, № 3, 539—542, № 5, 777—784; Т. 29. № 6. С. 914—921.

по тесту выживания *E. coli* и способности индуцировать *sos*-систему при действии УФ-лучей, метилметансульфоната и 4НХО. Таким образом было впервые показано, что в геноме *P. shermanii* содержится функционально полноценный ген *гес-А*, способный комплементировать дефектные конститутивные и индуцибельные функции в мутантах *гес-А*-клеток *E. coli*. Молекулярная масса белкового продукта клонированного гена соответствует известным *гес-А* белкам и составляет около 39 кД. Эти новые данные связаны с результатами наших исследований по реактивации *E. coli* и других микроорганизмов, подвергнутых стрессовым воздействиям.

Судьба книги складывалась так, что она не увидела свет вскоре после ее написания, поскольку полученные нами в последние 1—2 года новые факты представляются нам весьма важными, нам хотелось бы обратить на них внимание читателей. Речь идет о реактивирующем действии фактора белковой природы, синтезируемом *P. shermanii*. Фактор, как мы указывали, вызывает реактивацию УФ-инактивированных *E. coli* как дикого типа, так и его изогенных штаммов с дефектами в различных репарационных системах: *pol-A*⁻, *uvr-A*⁻, *гес-А*⁻. Причем в случае *гес-А*-штамма реактивация проявлялась очень слабо, в отличие от других тест-штаммов, и этот факт может свидетельствовать в пользу того, что белковый фактор оказывает какое-то опосредованное действие именно на *гес-А*-функцию, а *гес-А*-ген *P. shermanii* функционально, как мы видели, сходен с *гес-А*-геном *E. coli*. Реактивирующее действие белкового фактора проявляется не только на УФ-облученных бактериях (*E. coli* и *S. typhimurium*), но и на дрожжах: *C. guilliermondii*, *S. cerevisiae*. Таким образом, реактивации подвергаются как прокариоты, так и эукариоты. Причем прослеживался ряд общих закономерностей: реактивация происходит как в случае пост-, так и предынкубации клеток с белковым фактором, действующим в очень незначительных количествах. Эффект действия был обратно пропорционален выживаемости объектов.

Клетки организмов облучались УФ-С-(254 нм), УФ-В-(303—320 нм), УФ-А-(320—390 нм), а также видимым светом (400—600 нм) и светом полного спектра (290—1000 нм) (Фрайкин и др., 1995)¹. Реактивация организмов имела место в случае УФ-С- и экологического света УФ-В и УФ-А, инактивирующее действие которых связано главным образом с образованием пиримидиновых димеров и 6,4-фотоаддуктов. Реактивацию не наблюдали при облучении клеток видимым светом и светом полного спектра. Эти наблюдения позволяют считать, что реактивирующий фактор запускает какой-то защитный механизм, направленный на репарацию преимущественно указанных типов повреждений и реализация этого механизма происходит с участием гипотетического рецептора, локализованного в цитоплазматической мембране. Под

¹ Микробиология, 1995. Т. 64.

действием видимого света происходят повреждения мембраны (Поспелов и др., 1987)¹ и реактивирующий эффект фактора не проявляется.

Под действием реактивирующего фактора *P. shermanii* увеличивается выживаемость бактерий и дрожжей, подверженных другому стрессу: нагреванию при 45 °С. Наблюдаемую универсальность реактивирующего фактора пропионовых бактерий можно объяснить тем, что, как показано (Van Bogelen et. al., 1987)², у бактерий существует некий общий ответ на различные внешние стрессы. И ответ проявляется координированно при функционировании sos-системы, хит-шоковой системы и систем, ответственных за нейтрализацию окислителей, этанола и др.

Результаты этих исследований докладывались на 1-ом Международном симпозиуме «Dairy propionibacteria» в Рэнне в мае 1995 г. и вызвали большой интерес специалистов.

В настоящее время мы находимся накануне выделения индивидуального белка, называемого нами реактивирующим фактором. После его выделения, мы надеемся, можно будет понять, не связано ли действие реактивирующего фактора с работой чеперонов, чья функция требуется (Mezder-Lallemand, 1995)³ во время и после внешних стрессов, допускает дезагрегацию и облегчает складывание и ассоциацию белков, способствует реактивации некоторых ферментов, подвергнутых химической денатурации (Lee et. al., 1995)⁴ и выполняют ряд других жизненно важных функций.

Обнаружение у пропионовых бактерий реактивирующих и антимуtagenных свойств вносит не только определенный вклад в науку, но открывает возможность создания новых профилактических и лекарственных препаратов, потребность в которых в последние годы сильно увеличивается в связи с разрушением озонового слоя атмосферы, образования озоновых дыр, которые, как было недавно показано⁵, образованы не только над Антарктидой, но и в средних широтах Северного полушария над территорией России. Это сопровождается повышением интенсивности УФ-В, УФ-А-излучений в биосфере и как следствие возникновением мутаций и других пагубных последствий.

Пропионовокислые бактерии относятся к наиболее полезным из анаэробов. Видимо поэтому на Международном симпозиуме в Рэнне большое внимание уделялось вопросам создания пробиотиков с включением в них пропионовых бактерий, созданию и изучению условий, усиливающих биологическую активность пропионовых бактерий в сырах и некоторых сортах хлеба. Бактерии приживаются в кишечнике людей и животных и способны к снижению генно-токсического действия ряда химических соединений и УФ-лучей.

¹ Микробиология. 1987. Т. 56. Вып. 5. С. 882—887.

² J. Bacteriol. 1987. 169. P. 26—32.

³ Abstr. book 7th ECB, Nice. 1995. V. III. P. 23.

⁴ Mol. Biol. of the cell. Suppl. Abstr. 1994. V5. P. 257a.

⁵ Газета «Известия», № 63. 1995, 6 апреля.

Впервые продемонстрированная индукция антимуtagenеза у пропионовых бактерий (Воробьева и др.)¹ служит дополнительным указанием на необходимость создания более тесной связи жизнедеятельности пропионовых бактерий и людей.

Иллюстрацией этому служили многие данные, представленные в сообщениях на международном симпозиуме в Рэнне. В Финляндии, например, (Mantere-Alhonen, 1995)² показано, что положительная роль пропионовых бактерий (ПБ) как пробиотиков обусловлена образованием ими пропионовой кислоты, минорных органических кислот, бактериоцинов и витаминов. ПБ используют также как пробиотики для людей, особенно при нарушении работы кишечного тракта у детей. При изучении микрофлоры так называемой «живой» (сырой) пищи в ней обнаружены *P. jensenii* и *P. thoenii*; поэтому полагают, что различные типы «живой» пищи действуют как пробиотики. Во Франции в закваску для хлеба вносят *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii* (Argoux et. al., 1995) при этом происходит ингибирование роста плесневых грибов за счет образования пропионатов, улучшается аромат, дольше сохраняется свежесть хлеба. Среди метаболитов, имеющих важное промышленное значение и образуемых ПБ — антимикробные белки — бактериоцины (Glatz et. al., 1995). Бактериоцины образуют *P. jensenii* P 126 (енсенины) и *P. thoenii* P 127 (пропионицин PLG I). Пропионицин PLGI — белок с м. м. около 10 кДа, образуется в поздней стационарной фазе. Он имеет широкий спектр антимикробной активности: ингибирует рост грамположительных, некоторых грамотрицательных бактерий, некоторых дрожжей и плесневых грибов. *P. jensenii* образует енсенин G и P. Енсенины активны против пропионовых бактерий, лактобацилл, лактококков. Устойчивость к экстремальным значениям pH, термоустойчивость, широкий ингибиторный спектр позволяет считать енсенины полезными природными консервантами при термальном процессинге пищи (Barefoot et. al., 1995).

ПБ — активные продуценты витамина B₁₂ и порфиринов. В Японии (Murooka et. al., 1995) удалось клонировать гены *P. freudenreichii*, участвующие в синтезе общего предшественника витамина B₁₂ и гемов — 5-аминолевулиновой кислоты, в *E. coli*. Клонирование проводят с целью улучшения экономичности производства витамина. Вектором для переноса генов могут служить бактериофаги, обнаруженные у *P. freudenreichii* (Борисова и др., 1973; Gautier et. al., 1992). Из *P. freudenreichii* к настоящему времени уже выделено и охарактеризовано во Франции 18 бактериофагов (Cassin et al., 1995). В Польше активно проводятся исследования с ПБ в связи с образованием корриноидов. Так показано (Trojanowska et. al., 1995), что выход витамина B₁₂ увеличивается на 100% по сравнению с контролем (монокультурой) при совместном куль-

¹ Микробиология. 1995. Т. 64, № 2. С. 232—237.

² Proc. 1-st Int. Symp. «Dairy propionibacteria». P. 46—47. May 17—19, 1995. Rennes, France.

тивировании ПБ с *Lb. fermentum*, *Lb. arabinosus*, *Lb. helveticus*, *Lb. leichmanii*. Взаимоотношения между ПБ и молочнокислыми бактериями изучают в Ирландии. Некоторые штаммы *S. thermophilus*, *Lb. lactis*, *Lc. lactis* стимулируют рост некоторых ПБ и самая большая стимуляция обнаружена от присутствия в среде *Lb. helveticus* с последующим ростом *P. freudenreichii*. В процессе роста в среде увеличивается уровень аминокислот и пептидов в сыворотке молока, некоторые из которых утилизируют ПБ (Piveteau et. al., 1995). На Западе активно проводятся исследования роли пропионовых бактерий в изготовлении твердых сычужных сыров. Для технологии швейцарского сыра важное значение имеет эстеролитическая, протеолитическая и липолитическая активность ПБ, ферменты которых освобождаются при автолизе (Lemee et. al., 1995).

Подводя итоги многолетних исследований ПБ, следует еще раз подчеркнуть большую гетерогенность классических видов (кроме *P. freudenreichii*), обнаруженную самыми современными методами молекулярной таксономии (Riedel, Britz, 1995), включая риботипирование. Поскольку особенность штамма лежит в основе всех технологий, использующих ПБ, важно знать их истинный статус и потенциальные биохимические возможности. Исследования молекулярной идентификации и таксономии сосредоточено в настоящее время в университетах Южной Африки и Бразилии (Britz, Riedel, 1995, De Carvalho, 1995). Именно в этой сложной области, как впрочем и в ряде других, о которых говорилось в книге, остается пока еще много неясного и неопределенного.

Большой интерес к ПБ, собравший на 1-ый международный симпозиум «Молочные пропионовые бактерии» 170 ученых из разных стран в мае 1995 г., дает основание полагать, что на многие еще нерешенные вопросы удастся ответить и, может быть, открыть новые тайны своеобразной формы жизни, избранной пропионовокислыми бактериями.

ЛИТЕРАТУРА

- Абилев С. К., Порошенко Г. Г. Ускоренные методы прогнозирования мутагенных и бластомогенных свойств химических соединений // Итоги науки и техники. Сер. Токсикология. М., 1986. Т. 14.
- Алексеева М. А. Изучение развития пропионовокислых бактерий в «Советском» сыре и их влияние на его качество. Автореф. канд. дис. М., 1974.
- Алексеева М. А. и др. Совершенствование критериев подбора пропионовокислых бактерий и способа их применения в сыроделии // Научно-технический прогресс — важнейший путь реализации продовольственной программы. Барнаул, 1983. С. 117—129.
- Алексеева М. А. и др. Физиолого-биохимические особенности пропионовокислых кокков // Микробиология. 1973. Т. 42, № 3. С. 464—467.
- Алексеева М. А., Климовский И. И., Анищенко И. П. Видовой состав пропионовокислых бактерий в «Советском» сыре // Молочная промышленность. 1973. № 12. С. 12—13.
- Антошкина Н. В., Воробьева Л. И., Бурьянов Я. И. Зависимое от метилкобаламина метилирование ДНК в бесклеточном экстракте *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1981. № 4. С. 631—635.
- Антошкина Н. В., Воробьева Л. И., Иордан Е. П. Участие метилкобаламина в метилировании ДНК *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1979. Т. 48, № 2. С. 217—220.
- Арешкина Л. Я. и др. О роли витамина В₁₂ в метаболизме метионина. Витамин В₁₂ и его применение в животноводстве. М., 1971.
- Аркадьева З. А., Ольсинская Н. Л., Алексеева М. А. Хранение пропионовокислых бактерий // Прикл. биохим. микробиол. 1988. Т. XXIV, вып. 6. С. 839—845.
- Баранова Н. А., Воробьева Л. И. Влияние пептидов на биосинтез витамина В₁₂ *P. shermanii* // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки. 1971, № 3. С. 97—99.
- Баранова Н. А. и др. Биосинтез витамина В₁₂ в смешанной культуре пропионовокислых бактерий и микобактерий // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки. 1968. № 7. С. 101—104.
- Баранова Н. А., Гоготов И. Н. Фиксация молекулярного азота пропионовокислыми бактериями // Микробиология. 1974. Т. 43, № 5. С. 791—794.
- Баранова Н. А., Климентович Н. Н. Влияние аминокислот на рост *Propionibacterium shermanii* и биосинтез витамина В₁₂ // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки. 1971. № 8. С. 94—97.
- Белозеров Е. В., Юркевич А. М. Производные витамина В₁₂ и иммунodefицит человека // Тез. докл. IX Всес. симп. по целенаправленному изысканию лекарств. веществ. Рига, 1991. С. 11.
- Берри Д. Биология дрожжей. М., 1985.
- Бобык М. А. Обнаружение нового фермента обмена полифосфатов — 1,3-дифосфоглицерат: полифосфат-фосфотрансферазы // Автореф. канд. дис. М., 1971.
- Бонарцева Г. А., Крайнова О. А., Воробьева Л. И. О путях конечного окисления пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1973а. Т. 42, № 4. С. 583—588.
- Бонарцева Г. А. Аэробный метаболизм пропионовокислых бактерий. Автореф. канд. дис. М., 1973.
- Бонарцева Г. А. и др. Об аэробном метаболизме пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1973б. Т. 17, № 5. С. 765—771.

- Борисова Т. Г. и др. Фаг пропионовокислых бактерий // Прикл. биохим. микр. 1973. Т. 9, № 2. С. 246—249.
- Борисова Т. Г., Гоферман Е. Я. Основы технологии антибиотиков и витамина В₁₂. М., 1967.
- Борисова Т. Г. и др. Синтез витамина В₁₂ *P. shermanii* в зависимости от условий культивирования // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки. 1971. № 7. С. 92—96.
- Бровко Л. Ю. и др. Применение иммобилизованной люциферазы светляков для количественного определения АТФ и ферментов, синтезирующих и разлагающих АТФ // Биохимия. 1978. Т. 43, № 5. С. 798—805.
- Брюхачева Н. Л., Воробьева Л. И., Бонарцева Г. А. Об окислительном фосфорилировании у пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1975. Т. 44, № 1. С. 11—14.
- Быховский В. Я. Микробиологический синтез витамина В₁₂. М., 1984.
- Быховский В. Я., Зайцева Н. И. Изучение биосинтеза нового тетрапиррольного соединения (коррифирин) и его роли в биогенезе витамина В₁₂ у *Propionibacterium shermanii* // Прикл. биохим. микр. 1976. Т. 12, № 3. С. 365—371.
- Быховский В. Я., Зайцева Н. А. Биосинтез и некоторые свойства циклического тетрапиррольного предшественника витамина В₁₂ // ДАН СССР. 1975. Т. 224. С. 1431—1434.
- Быховский В. Я., Зайцева Н. И. Микробиологический синтез тетрапиррольных соединений // Итоги науки и техники. Сер. Биологическая химия. 1989. Т. 32.
- Быховский В. Я., Зайцева Н. И. Микробиологический синтез тетрапиррольных соединений // Прикл. биохим. микр. 1983. Т. 19, № 2. С. 163—175.
- Быховский В. Я. и др. Глутаминзависимое амидирование корринового кольца витамина В₁₂ // ДАН СССР. 1982. Т. 267, № 5. С. 1250—1254.
- Быховский В. Я., Зайцева Н. И., Полулях О. В. Биосинтез порфиринов микроорганизмами // Прикл. биохим. микр. 1987. Т. 23, № 6. С. 725—739.
- Быховский В. Я. Микробиологический синтез тетрапиррольных соединений и его регуляция // Мат-лы конф. «Регуляция микроб. метаболизма». Пушкино, 12—14 июня. 1989. С. 143—144.
- Волкова Н. Т. Изучение физиолого-биохимических свойств *P. acnes* с целью получения сухого препарата для животноводства. Автореф. канд. дис. М., 1980.
- Воробьева Л. И. Сбраживание различных источников углерода пропионовокислыми бактериями. Автореф. канд. дис. М., 1958а.
- Воробьева Л. И. Баланс углерода при сбраживании молочной и пировиноградной кислот пропионовокислыми бактериями // Микробиология. 1958б. Т. 27. С. 287—294.
- Воробьева Л. И. Влияние аэрации на пропионовокислое брожение // Микробиология. 1959. Т. 28, № 2. С. 224—230.
- Воробьева Л. И. Пропионовокислое брожение и образование витамина В₁₂ // Успехи микробиол. 1972. Т. 8. С. 182—207.
- Воробьева Л. И. Пропионовокислые бактерии и образование витамина В₁₂. М., 1976.
- Воробьева Л. И. Брожение, вызываемое иммобилизованными клетками пропионовокислых бактерий // Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Пушкино. 1978. С. 127—134.
- Воробьева Л. И. Микробиологический синтез витаминов. М., 1982.
- Воробьева Л. И. Наипольнейшие из анаэробов. Пропионовокислые бактерии для биотехнологии // Химия и жизнь. 1984. № 5. С. 19—22.
- Воробьева Л. И. Промышленная микробиология. М., 1989.
- Воробьева Л. И. Витамины // Промышленная микробиология. М., 1989б.
- Воробьева Л. И. и др. Антимутагенное действие супероксиддисмутазы на индуцированный азидом натрия и нитрозогуанидином мутагенез у *Salmonella typhimurium* // Генетика. 1993. Т. 29, № 5. С. 760—767.

- Воробьева Л. И. и др. Образование летучих кислот иммобилизованными клетками пропионовокислых бактерий // Прикл. биохим. микр. 1977. Т. 13, № 4. С. 531—537.
- Воробьева Л. И., Алтухова Е. А. и др. Десмутагенное действие культуральной жидкости, полученной в результате пропионовокислого брожения на химически индуцированный мутагенез у *Salmonella typhimurium* TA 100. Микробиология. 1993. Т. 62. № 6. С. 1093—1100.
- Воробьева Л. И., Аль-Судани С., Краева Н. И. Пероксидаза пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1986. Т. 55. С. 750—753.
- Воробьева Л. И., Баранова Н. А. Стимулирующее действие *Mycobacterium luteum* на образование витамина В₁₂ пропионовокислыми бактериями // Микробиология. 1966. Т. 35, № 2. С. 250—252.
- Воробьева Л. И., Баранова Н. А. Об изменчивости пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1969. Т. 38, № 1. С. 114—117.
- Воробьева Л. И., Баранова Н. А., Чан Тхи Ткань. Изменчивость пропионовокислых бактерий под действием N-метил-N' нитро-N нитрозогуанидина // Микробиология. 1973. Т. 42. № 2. С. 301—306.
- Воробьева Л. И. Сравнительное физиолого-биохимическое изучение *P. shermanii* и *Mycobacterium luteum* // Микробиология. 1965. Т. 34, № 6. С. 1003—1007.
- Воробьева Л. И. и др. Стабилизация микробных ферментов путем использования экстракта пропионовокислых бактерий // Прикл. биохим. 1992. Т. 28, № 3. С. 416—422.
- Воробьева Л. И., Голозубова Г. А., Сафонов В. Л. Каталаза пропионовокислых бактерий // Научн. докл. Высшей школы. 1968. Т. 4. С. 654—658.
- Воробьева Л. И., Иордан Е. П. Функции кобамидных коферментов в метаболизме пропионовокислых бактерий // Витамины. IX. Киев, 1976. С. 16—20.
- Воробьева Л. И., Иордан Е. П., Гайтан В. И. Способ получения пропионовой кислоты. Авт. свидет. № 2521151 от 2 авг. 1977. Оpubл. 15.03.79. Бюл. № 10.
- Воробьева Л. И., Козырева Л. Ф. Влияние температуры на образование витамина В₁₂ *Propionibacterium shermanii* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биол. 1967а. № 1. С. 52—54.
- Воробьева Л. И., Краева Н. И., Чарахчьян И. А. Новые данные о метаболизме пропионовокислых бактерий // Всес. совещ. по анаэробам. тез. докл. Пушино, 1982. С. 4—5.
- Воробьева Л. И. и др. Окисление n-алканов пропионовокислыми бактериями // Микробиология. 1979. Т. X, № 1. С. 33—38.
- Воробьева Л. И. и др. Ферменты пропионовокислого брожения у мутантной и исходной форм *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1971. Т. 40. № 4. С. 686—690.
- Воробьева Л. И. и др. Реактивация инактивированных ультрафиолетовым светом *Escherichia coli* АВ 1157 клеточными экстрактами // Микробиология. 1993. Т. 62. № 6. С. 1135—1143.
- Воробьева Л. И. и др. Поиск пропионовокислых бактерий в кишечнике человека // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунол. 1987. № 2. С. 7—11.
- Воробьева Л. И., Просветова Н. К., Баранова Н. А. Биосинтез витаминов группы В и витамина К *Myc. luteum* // Микробиология. 1966. Т. 35, № 1. С. 3—7.
- Воробьева Л. И., Стоянова Л. Г., Алексеева М. А. Пути использования пропионовокислых бактерий // Микробные метаболиты. М., 1979. С. 88—101.
- Воробьева Л. И. и др. Пропионовокислые кокки и их систематическое положение // Микробиология. 1983. Т. 52, № 3. С. 465—471.
- Воробьева Л. И., Чарахчьян И. А. Потребление различных источников серы пропионовокислыми бактериями // Микробиология. 1983. Т. 52, № 6. С. 875—879.
- Воробьева Л. И. и др. Антимутагенность пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1991. Т. 60, № 6. С. 83—89.

- Воробьева Л. И., Чердынцева Т. А., Воробьева Н. В. Антимутагенность пропионовокислых бактерий // Тез. докл. Всес. коорд. совещания «Генетические последствия загрязнения окруж. среды мутагенными факторами». Самарканд, 1990.
- Выговская М. В., Дацюк Н. М., Елисеев С. А. О способности некоторых микроорганизмов синтезировать порфирины на водонерастворимых субстратах // Микробиол. журн. 1990. Т. 52, № 3. С. 28—30.
- Гайтан В. И., Воробьева Л. И. Пул АТФ в клетках *Propionibacterium shermanii* в разных условиях культивирования // Микробиология. 1981. Т. 50, № 6. С. 949—954.
- Гайтан В. И., Воробьева Л. И., Коврижных В. А. Содержание полифосфатов и АТФ в клетках *Propionibacterium shermanii* в условиях азотного голодания // Микробиология. 1982. Т. 51, № 5. С. 747—750.
- Ганичева Т. В., Воробьева Л. И. Индуцированный мутагенез пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1991. Т. 60, № 1. С. 101—106.
- Гельман Н. С., Лукоянова М. А., Островский Д. Н. Мембраны бактерий и дыхательная цепь. М., 1972.
- Гершанович В. Н. Исследование регуляции синтеза и активности ферментов углеводного обмена и биологического окисления в различных клеточных системах. Автореф. докт. дис. М., 1965.
- Грузина В. Д., Ерохина Л. И., Пономарева Г. М. Селекция пропионовокислых бактерий и роль морфологических мутантов в отборе активных вариантов // Генетика. 1974. Т. 10, № 12. С. 121—127.
- Грузина В. Д., Ерохина Л. И., Пономарева Г. М. Действие мутагенных факторов на изменчивость *Propionibacterium shermanii*, продуцента витамина В₁₂ // Генетика. 1973. Т. 9, № 4. С. 158—161.
- Домрачева Г. И., Кононов Ю. В., Майданюк А. Э. Влияние пропионовокислых бактерий на качество силоса, рост и развитие молодняка животных // Научн. тр. Сиб. научно-иссл. Ин-та с.-х. животных. Омск, 1970. № 15. С. 173—177.
- Дубинин Н. П. Общая генетика. М., 1976.
- Елисеев С. А. и др. Локализация витамина В₁₂ в клетках *Propionibacterium shermanii* // Микробиол. журн. 1985. Т. 47, № 2. С. 52—56.
- Елисеев А. А., Зайцева Н. И., Быховский В. Я. Амидирование как стадия регуляции в биосинтезе витамина В₁₂ у *Propionibacterium shermanii* // Биохимия. 1988. Т. 53, № 7. С. 1086—1092.
- Елисеев С. А., Познанская А. А. Кобаламин-белковые соединения бактериального происхождения // Прикл. биохим. микробиол. 1984. Т. 20, № 3. С. 307—317.
- Ибрагимова С. И., Неронова Н. М., Работнова И. Л. Влияние ионов водорода на некоторые свойства *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1971. Т. 40, № 5. С. 833—837.
- Ибрагимова С. И., Сахарова З. В. Влияние избытка субстрата на некоторые физиологические свойства *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1972. Т. 41, № 5. С. 834—837.
- Ибрагимова С. И., Сахарова З. В. Ингибирующее действие пропионата натрия на *P. shermanii* // Микробиология. 1974. Т. 43, № 1. С. 18—23.
- Ибрагимова С. И., Шульговская Е. М. Рост культуры *Propionibacterium shermanii* при различных условиях аэрации // Микробиология. 1979. Т. 48, № 4. С. 668—670.
- Иванова И. И., Сахарова З. В. Динамика образования производных витамина В₁₂ *P. shermanii* // Прикл. биохим. микробиол. 1967. Т. 3, № 4. С. 443—445.
- Иконников Н. П. Образование органических кислот, нуклеотидов и их производных иммобилизованными клетками *Propionibacterium shermanii*. Автореф. канд. дис. М., 1985.
- Иконников Н. П., Иордан Е. П., Воробьева Л. И. Выделение нуклеотидов и их производных иммобилизованными клетками *P. shermanii* // Прикл. биохим. микробиол. 1982. Т. 18, № 1. С. 34—40.

- Ильина К. А., Беседина С. Ф. Влияние *Propionibacterium shermanii* на состав органических кислот в силосе // Тр. Ин-та микр. и вирусол. АН Каз. ССР. 1966. Т. 9. С. 29—35.
- Иммобилизованные ферменты. Березин И. В., Мартинек К., Антонов В. К. (ред.). 1976. Т. 1.
- Иордан Е. П. Модуляция в образовании ДНК *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* при лимитировании по корриннодам // Микробиология. 1992. Т. 61, № 3. С. 341—346.
- Иордан Е. П., Воробьева Л. И. О локализации витамин-В₁₂-зависимой рибонуклеотидредуктазы в клетках *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1981. Т. 50, № 4. С. 736—737.
- Иордан Е. П., Воробьева Л. И., Гайтан В. И. О влиянии витамина В₁₂ на уровень сульфгидрильных групп и активность некоторых дегидрогеназ в клетках *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1974. Т. 43, № 4. С. 596—599.
- Иордан Е. П., Воробьева Л. И., Гайтан В. И. Рибонуклеотидредуктаза *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1975. Т. 44, № 4. С. 609—614.
- Иордан Е. П. и др. Образование органических кислот иммобилизованными пропионовокислыми бактериями в проточной системе и возможность стабилизации процесса // Прикл. биохим. микробиол. 1979. Т. 15, № 4. С. 515—521.
- Иордан Е. П., Новожилова Т. Ю., Воробьева Л. И. Влияние уровня образования витамина В₁₂ в клетках на рост и некоторые стороны конструктивного метаболизма *Propionibacterium shermanii* // Прикл. биохим. микробиол. 1984. Т. 20, № 6. С. 765—772.
- Иордан Е. П., Петухова Н. И. Перестройка рибонуклеотидредуктазной системы пропионовокислых бактерий при подавлении образования витамина В₁₂ // Микробиология. 1989. Т. 58, № 4. С. 533—538.
- Иордан Е. П., Петухова Н. И., Воробьева Л. И. Регуляторное воздействие витамина В₁₂ на рибонуклеотидредуктазную систему пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1986. Т. 55, № 4. С. 533—538.
- Калда А. Х. Изучение влияния иммобилизации на аспартазную активность пропионовокислых бактерий и *Escherichia coli* // Автореф. канд. дис. Л., 1984.
- Калда А. Х., Воробьева Л. И. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение I // Тр. Таллиннского политех. ин-та 1980. № 499. С. 63—74.
- Калда А. Х., Воробьева Л. И. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение II // Тр. Таллиннского политех. ин-та. 1981. № 510. С. 37—47.
- Канопкайте С. И., Гибавичус А. С. Влияние некоторых факторов на биосинтез витамина В₁₂, тиамина, рибофлавина и фолиевой кислоты // Тр. АН ЛитССР, 1965. № 1. С. 185—190.
- Карлин Р. Содержание витаминов группы В в кефире и его обогащение при добавлении *P. shermanii* // Прикл. биохим. микробиол. 1966. Т. 2, № 4. С. 386—391.
- Козиковский Ф. В. Искусство сыроделия // В мире науки. № 7. М., 1985. С. 36.
- Коновалова Л. В., Воробьева Л. И. Биосинтез витаминов группы В пропионовокислыми бактериями // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки. 1969. № 1. С. 91—93.
- Коновалова Л. В., Воробьева Л. И. Влияние полимиксина М на накопление липидов и полифосфатов клетками *P. shermanii* // Научн. докл. Высшей школы. Биол. науки. 1972. № 7. С. 101—104.
- Клаус Р., Хейс У. Сборник методик по генетике микроорганизмов. М., 1970.
- Копнов Е. Г., Щербаков Л. А. Применение комплексной закваски пропионовокислых бактерий и дрожжей при силосовании кукурузы // Изв. АН СССР. Сер. Биол. 1970. № 1. С. 142—144.
- Краева Н. И., Воробьева Л. И. Внутриклеточная локализация, выделение и характеристика супероксиддисмутазы из *Propionibacterium globosum* // Прикл. биохим. микробиол. 1981. Т. 17, № 6. С. 837—842.

- Краева Н. И., Воробьева Л. И. Супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза пропионовокислых бактерий // Микробиология. 1981. Т. 50, № 5. С. 813—817.
- Крайнова О. А., Бонарцева Г. А. Ферменты ЦТК и гликолатного шунта у пропионовокислых бактерий // Вестн. Моск. ун-та. 1973. № 4. С. 67—68.
- Кубатиев А. А. Порфирины, витамин В₁₂ и рак. Тула. 1973.
- Кузнецова Р. А. и др. Влияние железа на интенсивность брожения и образования каталазы пропионовокислыми бактериями // Микробиол. журн. 1983. Т. 45, № 1. С. 3—7.
- Кулаев И. С. Биохимия высокомолекулярных полифосфатов. Автореф. докт. дис. М., 1969.
- Кулаев И. С. и др. Ферменты полифосфатного обмена в процессе развития *P. shermanii* в норме и в присутствии полимиксина // Биохимия. 1973. Т. 38, № 4. С. 712—717.
- Купенов Л. Г. Сравнительное изучение изменчивости продуцентов витамина В₁₂ под действием химических мутагенов. Автореф. канд. дис. М., 1974.
- Курилов Н. В., Савастьянова Н. А. Пищеварение у жвачных // Итоги науки и техники. Животноводство и ветеринария. М., 1978. Т. 11. С. 5—78.
- Кучерас Р. В., Гебгардт А. Г. Влияние аминокислот на кобамидсинтетическую активность *Propionibacterium shermanii* // Прикл. биохим. микробиол. 1972. Т. 8, № 3. С. 341—345.
- Лабори А. Регуляция обменных процессов. М., 1970.
- Лагода И. В., Банникова Л. А. Некоторые факторы, влияющие на качество и стойкость сухих заквасок // Молочная промышленность. 1970. № 2. С. 11—15.
- Лавлес А. Генетические эффекты алкилирующих соединений. М., 1970.
- Лайпанов И. З. Биотехнологические свойства микрококков вида *Micrococcus caseolyticus* // Тез. докл. научно-практической конф. «Интенсификация производства и повышение качества сыра». Барнаул, 1989.
- Луста К. А. и др. Ультраструктурные изменения клеток *Bacillus megaterium*, иммобилизованных в полиакриламидном геле // ДАН СССР, 1976. Т. 227, № 2. С. 469—475.
- Машур В. А., Воробьева Л. И., Иордан Е. П. Брожение, вызываемое пропионовокислыми бактериями, не образующими кофермент В₁₂ // Прикл. биохим. микробиол. 1971. Т. 7, № 5. С. 552—555.
- Мельникова Л. В. Фосфолипазная активность пропионовокислых бактерий // Тез. докл. XII съезда Всес. микробиол. о-ва «Достижения микробиологии — практике». Алма-Ата, 1985.
- Мельникова Л. В. Фосфолипазная активность пропионовокислых бактерий и ее влияние на качество «Советского» сыра. Автореф. канд. дис. Углич, 1987.
- Неронова Н. М., Ибрагимова С. И., Иерусалимский Н. Д. Влияние концентрации пропионата на удельную скорость роста *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1967. Т. 36, № 3. С. 404—409.
- Неронова Н. М., Ибрагимова С. И. Образование летучих кислот и витамина В₁₂ *Propionibacterium shermanii* // Микробиология. 1969. Т. 38, № 3. С. 420—424.
- Неронова Н. М., Иерусалимский Н. Д. Непрерывное культивирование пропионовокислых бактерий, образующих витамин В₁₂ // Микробиология. 1959. Т. 28, № 5. С. 647—654.
- Петухова Н. И. Роль витамина В₁₂ в синтезе ДНК и функционировании рибонуклеотидредуктазной системы пропионовокислых бактерий. Автореф. канд. дис. М., 1988.
- Познанская А. А., Елисеев С. А. Кобальт-порфирин-белковые комплексы бактериального происхождения // 4-я Всес. конф. по химии и применению порфиринов. Ереван, 1984.
- Полулях О. В. Биосинтез тетрапиррольных соединений (порфиринов и витамина В₁₂) некоторыми представителями рода *Propionibacterium*. Автореф. канд. дис. М., 1987.

- Полулях О. В., Зайцева Н. И., Румянцева В. Д., Быховский В. Я. Образование порфиринов из 5-аминолевулиновой кислоты суспензиями клеток пропионовокислых бактерий // Прикл. Биохим. Микробиол. 1991. Т. 27, № 1. С. 91—97.
- Порошенко Г. Г., Абилов С. К. Антропогенные мутагены и природные антимутагены // Итоги науки и техники. Сер. Общая генетика. 1988. Т. 12.
- Пронин С. В., Скопинская С. Н., Фенотенова С. А. Выделение, очистка и идентификация протектирующих веществ из культуральной жидкости прорастающих спор *Bacillus cereus*. // Изв. АН СССР. Сер. Биол. 1989, № 1. С. 88—94.
- Работнова И. Л. Роль физико-химических условий (Eh, rH₂) в жизнедеятельности микроорганизмов. М., 1957.
- Работнова И. Л., Иванова И. И. Рост и развитие микробных культур // Успехи микробиол. 1971. № 7. С. 67—107.
- Раминече В. Э., Марауска М. К., Бекер М. Е. Пропионовокислые бактерии и перспективы их использования при сбраживании растительных соков // Изв. АН Латв. ССР. 1982. № 2 (403). С. 96—104.
- Романовская Н. Н. и др. Способ получения кисломолочных напитков. Авт. свид. № 1184506. Опул. Бюл. № 38. 15.10. 1985.
- Рослякова Н. В. Естественная и индуцированная изменчивость *Propionibacterium shermanii*. Автореф. канд. дис. Алма-Ата, 1974.
- Самойлов П. М. и др. Влияние источника углерода на выделение аминокислот и синтез белка *Myc. luteum*. // Микробиология. 1968. Т. 37, № 2. С. 264—268.
- Самойлова Л. А. Действие ультрафиолетовой радиации на клетку. М., 1967.
- Сент-Дьердьи А. Биоэнергетика. М., 1971.
- Сергеева Г. Я. и др. Применение биологического препарата В₁₂ в животноводстве // Ветеринария. 1959. № 5. С. 49—54.
- Сизова А. В., Аркадьева З. А. Пропионовокислые бактерии рубца и способность их к биосинтезу витамина В₁₂ // Микробиол. синтез. 1968. Т. 10. С. 8—13.
- Сизова А. В., Волкова Н. Т. Получение сухого бактериально-витаминного препарата и его биологическая эффективность // Комплексное использование биологически активных веществ в кормлении сельскохозяйственных животных, Горки, 1974. С. 229—232.
- Смит Л. Витамин В₁₂. М., 1962.
- Стойнова Л. Г., Воробьева Л. И., Лобзов К. И. Обессахаривание яичного белка микроорганизмами // Прикл. биохим. микробиол. 1976. Т. 12, № 4. С. 629—635.
- Стойнова Л. Г., Воробьева Л. И., Лобзов К. И. Физиолого-биохимические особенности роста и развития *Propionibacterium shermanii* в яичном белке // Микробиология. 1979. Т. 48, № 6. С. 1011—1015.
- Уманский М. С., Мельникова Л. В. Влияние продуктов гидролиза фосфолипидов молока на качество «Советского» сыра // Информ. листок. Барнаул, 1986. № 195—86.
- Фостер Э. М. и др. Микробиология молока. М., 1961.
- Цукерман Е. С. и др. Обмен витамина В₁₂ и состояние SH-групп при белково-холиновой недостаточности у крыс // Вопросы питания. 1992. № 1. С. 40—45.
- Чан Тхи Тхань. Изучение физиолого-биохимических особенностей представителей различных видов пропионовокислых бактерий и их мутантных форм. Автореф. канд. дис. М., 1973.
- Черный А. М. Патофизиология гипотоксических состояний. Цит. по Кубатиеву А. А. Порфирины и рак. Тула: Приокское книжное изд-во, 1978.
- Чарахчян И. А., Воробьева Л. И. Особенности потребления сульфата пропионовокислыми бактериями // Микробиология. 1984. Т. 53, № 1. С. 38—42.
- Шапошников В. Н., Воробьева Л. И. Развитие пропионовокислых бактерий и синтез витамина В₁₂ на естественных и синтетических средах // Микробиология. 1963. Т. 32, № 2. С. 204—208.

- Шпокаускас А. К., Дачулите Я. Л. Роль микроэлементов в питании растений и повышении эффективности удобрений. М., 1965.
- Штиккель Э. И., Сейдалина Р. Х., Дзюбанова Р. М. Изменение свойств пропионовокислых бактерий в питательных средах с аскорбиновой кислотой // Изв. АН Каз. ССР. Сер. Биол. 1967. № 2. С. 36—39.
- Adams J. F., McEvan F., Wilson A. The vitamin B₁₂ content of meals and items of diet // Brit. J. Nutr. 1973. Vol. 29. P. 65—72.
- Adlam C., Reid D. E., Jorkington P. The nature of the active principle of *Corynebacterium parvum* // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975. P. 35—39.
- Adler H. I., Fisher W. D. et al. // Repair of radiation-induced damage to the cell division mechanism of *Escherichia coli* // J. Bact. 1966. Vol. 91. N 2. P. 737—742.
- Allaker R. P., Greenman J., Osborne R. H. Histamine production by *Propionibacterium acnes* in batch and continuous culture // *Microbios*. 1986. Vol. 48. P. 165—172.
- Atlavinyte O. et al. Effects of entobacterin *Bacillus thuriangiensis* var. *gallerie* on earthworm activity // *Aedobiologia*. 1982. Vol. 23. P. 372—379.
- Allen S. H. G. et al. The isolation, purification and properties of methylmalonyl racemase // J. Biol. Chem. 1963. Vol. 236. P. 1637—1642.
- Allen J. H., Beard M. E. Hydroxy acid oxidase: localization in renal microbodies // *Science*. 1965. Vol. 149, N 3691. P. 1507—1509.
- Allen S. H. G. et al. Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation // J. Bact. 1964. Vol. 87, N 1. P. 171—187.
- Allen S. H. G., Linehan B. A. Presence of transcarboxylase in *Arachnia propionica* // *Int. J. System. Bacteriol.* 1977. Vol. 27. P. 291—292.
- Antila M. Über die Propionsäurebakterien im Emmentaler Käse // *Meijerit. Aikakausk.* 1954. Vol. 16, N 1. P. 1—132.
- Antila M. Die Bildung von Azetoin und Diazetyl bei Propionisäurebakterien // *Meijerit. Aikakausk.* 1956, 1957. Bd 18, 19, S. 7—14.
- Antila M. Der Aminosäureabbau durch Propionisäurebakterien // *Meijerit. Aikakausk.* 1956, 1957. Bd 18, 19, S. 1—6.
- Antila V., Antila M. The content of free amino acids in Finnish cheese // *Milchwissenschaft*. 1968. Vol. 23. P. 597—602.
- Antila M., Hietaranta M. Growth inhibition of propionic acid bacteria by propionate // *Meijerit. Aikakausk.* 1953. Vol. 15. P. 3—10.
- Arima K., Oka T. Cyanid resistance in *Achromobacter* // *J. Bacteriol.*, 1965. Vol. 90, N 3. P. 734—743.
- Ayres G. C., de Mello C., Lara F. J. S. Fumarate hydratase from *Propionibacterium pentosaceum* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1962. Vol. 62. P. 435—437.
- Axelsson L. T. et al. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri* // *Microb. Ecol. Health. a. Disease*. 1989. Vol. 2, N 2. P. 131—136.
- Azuma I., Sigimura K. et al. Chemical and immunological studies on the cell walls of *Propionibacterium acnes* strain C7 and *Corynebacterium parvum* ATCC 11829 // *Japan J. Microbiol.* 1975. Vol. 19. P. 265—275.
- Babior B. M. Cobamides as cofactors. Adenosylcobamide-dependent reactions // *Cobalamin. Biochemistry and Pathophysiology*. N. Y., 1975. P. 141—212.
- Babuchowski A., Glatz B. A., Hammoud E. G. Effect of carbohydrate source on growth yield coefficient of selected strains of propionibacteria // *Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*, 1987. P. 265.
- Babuchowski A., Hammond E. G. Production of propionic acid by *Propionibacterium* spp. grown on various carbohydrate sources // *Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*, 1987. P. 265.
- Baer A. Identification and differentiation of propionibacteria by electrophoresis of their proteins // *Milchwissenschaft*, 1987. Vol. 42, N 7. P. 431—433.
- Bala S., Grover I. S. Antimutagenicity of some citrus fruits in *Salmonella typhimurium* // *Mut. Res.* 1989. Vol. 222. P. 141—148.
- Barker H. A. Biochemical functions of corrinoid compounds // *Biochem. J.* 1967. Vol. 105. P. 1—14.

- Barker H. A., Lipmann F. On lactic acid metabolism in propionic acid bacteria and the problem of oxido-reduction in the system fatty-hydroxyketo acid // Arch. Biochem. 1944. Vol. 4. P. 361—370.
- Barker H. A., Lipmann F. The role of phosphate in the metabolism of *Propionibacterium pentosaceum* // J. Biol. Chem. 1949. Vol. 179. P. 247—257.
- Barksdale L. *Corynebacterium diptheria* and its relatives // Bact. Rev. 1970. Vol. 34, N 4. P. 379—422.
- Barrere G. C. Biochemistry and genetics of vitamin production. // Proc. NATO Adv. Study Inst. Cesme, 4—14 Sept. 1983. N. Y.; London, 1985. P. 141—169.
- Bartosinski B., Zagalak B., Pawelkiewicz J. The route of vitamin B₁₂ biosynthesis in *Propionibacterium* // Biochim. Biophys. Acta. 1967. Vol. 136, N 3. P. 581—584.
- Battersby A. R., Relter L. A. Synthetic studies relevant to biosynthetic research on vitamin B₁₂. Part. 3. An approach to isobacteriochlorins via nitrones // J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1984. Vol. 1. P. 2743—2749.
- Bauchop T., Elsdon S. R. The growth of microorganisms in relation to their energy supply // J. Gen. Microbiol. 1960. Vol. 23, N 3. P. 457—469.
- Baum M., Breese M. Antitumour effect of *Corynebacterium parvum* // Brit. J. Cancer. 1976. Vol. 33. P. 468—473.
- Beck W. S. Vitamin B₁₂. 1982. Vol. 2. P. 1—30.
- Beer A. Identification and differentiation of propionibacteria by electrophoresis of their proteins // Milchwissenschaft. 1987. Vol. 42. P. 431—433.
- Beevers H. Respiratory metabolism in higher plants. Evanston, N. Y., 1961.
- Belsheim J. et al. The effect of acidic polysaccharides and prostaglandin-like substances isolated from *Propionibacterium acnes* on granulocyte chemotaxis // Experientia. 1979. Vol. 35, f-12. P. 1587—1589.
- Bennett Y. W., Bentley R. What's in a name? — Microbiol Secondary Metabolism // Adv. Appl. Microbiol. 1989. Vol. 34. P. 1—28.
- Berger J. M., Johnson M. J., Peterson W. H. The proteolytic enzymes of bacteria. II. The peptidases of some common bacteria // J. Bact. 1938. Vol. 36. P. 521—545.
- Bergey's. Manual of determinative bacteriology. Baltimore, 1957. P. 569.
- Bergey's. Manual of determinative bacteriology. Baltimore, 1986. Vol. 2. P. 1346.
- Bernhauer K. et al. Biosynthesen in der Cobalamin-reihe // Biochem. Z. 1960. Bd. 332. H. 6. S. 562—572.
- Bernhauer K., Wagner F. Synthesen auf dem vitamin B₁₂ Gebiet, XI // Biochem. Z., 1962. Bd. 335, N 5. S. 453—462.
- Bernhauer K. und and, Biogenesewege von der Cobyrynsäure zur Cobyrysaure und zum cobinamid bei *Propionibacterium shermanii* // Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 1968. Bd. 349. S. 1297—1309.
- Bestor T., Laudano A. et al. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminatel domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 203. N. 4. P. 971—983.
- Blanca B. R., Esther L.-B.-P., Horacio S. T. Oncolytic activity of *Clostridium M-55* in tumors induced by SV-40 transformed cells // Rev. Latinoamer. Microbiol. 1989. Vol. 31, N 2. P. 159—165.
- Blaylock B. A. Cobamide-dependent methanol cyanocob(I)alamin methyltransferase of *Methanosarcina barkerii* // Arch. Biochem. Biophys. 1968. Vol. 124. P. 314—324.
- Bodana A. R., Rao D. R. Antimutagenic activity of milk fermented by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* // J. Dairy Sci. 1990. Vol. 73. P. 3379—3384.
- Bodie E. et al. Propionic acid fermentation of ultra-high-temperature sterilized whey using mono and mixed-cultures // Appl. Micr. a. Biotechnol. 1987. Vol. 25, N 5. P. 434—437.
- Bogdanov I., Popkhrstov P., Marinov L. Anticancer effect of antibioticum bulgaricum on sarcoma 180 and on solid form of Ehrlich carcinoma. M., 1962.

- Bomford R., Olivotto M. Inhibition by *Corynebacterium parvum* of lungnodule formation by intravenously injected fibrosarcoma cells // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975. P. 268—275.
- Boretti G. et al. Intermediates in the biosynthesis of vitamin B₁₂ // *Biochem. Biophys. Acta*. 1960. Vol. 34. P. 379—380.
- Borst-Powels G. W. F. H. Ion transport in yeasts // *Bioch. Biophys. Acta*. 1984. Vol. 650. N 1. P. 68—121.
- Boyer P. D. et al. Identification of phosphohistidine in digests from a probable intermediate of oxidation phosphorylation // *J. Biol. Chem.* 1962. Vol. 237, N 10. P. 3306.
- Bray R., Shemin D. The biosynthesis of the porphyrine-like moiety of vitamin B₁₂ // *Biochim. Biophys. Acta*. 1958. Vol. 30, N 3. P. 647—648.
- Brennan P., Balou C. E. Phosphatidylmyoinositol monomannoside in *P. shermanii* // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1968. Vol. 30, N 1. P. 69—75.
- Brock D. W. et al. Actinomycosis caused by *Arachnia propionica* // *Amer. J. Clin. Pathol.* 1973. Vol. 59. P. 66—77.
- Brock J. D., Madison M. J. Biology of microorganisms. 1988. P. 657.
- Bryant M. P., McBride B. C., Wolfe R. S. Hydrogen-oxidizing methane bacteria. I. Cultivation and methanogenesis // *J. Bacteriol.* 1968. Vol. 95. P. 1118—1123.
- Burton M. O., Lochhead A. G. Studies on the production of B₁₂-active substances by microorganisms // *Canad. J. Bot.* 1951. Vol. 29, N 4. P. 352—359.
- Bykhovskii V. Ya. Biogenesis of tetrapyrrole compounds and its regulation in vitamin B₁₂. Berlin, 1979. S. 293—314.
- Bykhovskii V. Ya. et al. Effect of methylation antagonists on biosynthesis of tetrapyrrol compounds from *Propionibacterium shermanii* // *Prikl. Biokhimiya*, 1980. Vol. 16. P. 862—867.
- Cai Miaoying et. al. *Pseudomonas jinanensis* sp. nov // *Acta Microbiol. sin.* 1989. Vol. 29, N 3. P. 155—160.
- Cancho F. G., Navarro L. R. R. de la Borbolla y Alcalá. La formación de ácido propionico durante la conservación de las aceitunas verdes de mesa III. Microorganismos responsables // *Grases Aceites*. 1980. Vol. 31. P. 245—250.
- Cancho F. G., Nosti V. et. al. Especies de *Propionibacterium* relacionadas con la zapatería. Factores que influyen en su desarrollo // *Microbiol. Esp.* 1970. Vol. 23. P. 233—252.
- Carson S. F., Delwiche E. A. Oxidative reactions in propionic acid fermentation // *Fed. Pros.* 1952. Vol. 11. N 1. P. 194—195.
- Castberg H. B., Morris H. A. The pyruvate oxidizing system of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* // *Milchwissenschaft*. 1978. Vol. 33, N 9. P. 541—544.
- Cerdo-Olmedo E., Hanavalt P. C. Macromolecular action of nitrosoguanidine in *E. coli* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1967. Vol. 142, N 2. P. 450—464.
- Cerúti I. Antiviral properties of *Corynebacterium parvum* // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975. P. 84—90.
- Chaix P., Andemand P. Sur les relation entre respiration et fermentation chez *P. pentosaceum*. Lion, 1940.
- Chaix P., Fromageot C. Action du groupe SH sur la fermentation et la respiration des bacteries propioniques en presence de glucose // *Enzymology*. 1939. Vol. VI, N 1. P. 33.
- Chaix P., Fromageot C. Les cytochromes de *P. pentosaceum* // *Trav. de Membrs. Soc. Chim. France*. 1942. T. 24. P. 1125.
- Charfreitag O., Collins M. D., Stackenbrandt E. Reclassification of *Arachnia propionica* as *Propionibacterium propionicus* comb. nov // *Intern. Journ. Syst. Bact.* 1988. Vol. 38. P. 354—357.
- Charfreitag O., Stackenbrandt E. Inter- and intra relationships of the genus *Propionibacterium* as determined by 16S rRNA sequences // *J. Gen. Micro.* 1989. Vol. 135. P. 2065—2070.
- Collins M. D., Dorsch M., Stackenbrandt E. Phylogenetic studies on the genera *Pimelobacter* and *Nocardioides*: transfer of *Pimelobacter tumescens* to a new genus *Terrabacter* // *Intern. J. Syst. Bact.* 1989. Vol. 39. P. 1—6.

- Cooper T. G. et al. The carboxylation of phosphoenolpyruvate and pyruvate // *J. Biol. Chem.* 1968. Vol. 243. P. 3857—3863.
- Corcoran J. W., Shemin D. On the biosynthesis of the porphyrin-like moiety of vitamin B₁₂. The mode of utilization of δ -aminolevulinic acid // *Biochim. Biophys. Acta*, 1957. Vol. 25, N 3. P. 661—662.
- Cox G. B., Newton N. A., Gibson F. The function of ubiquinone in *E. coli* // *Biochem. J.* 1970. Vol. 117, N 3. P. 551—562.
- Cummins C. S. Distribution of 2,3-diaminohexuronic acid in strains of propionibacterium and other bacteria // *Int. System. Bacteriol.* 1985. Vol. 35. P. 411—416.
- Cummins C. S., Hall P. Acetate and pyruvate in cell wall polysaccharides of *Propionibacterium acnes*, *P. avidum* and *P. granulosum* // *Curr. Microbiol.* Vol. 14. P. 61—63.
- Cummins C. S., Johnson J. L. *Corynebacterium parvum*: a synonym for *Propionibacterium acnes* // *J. Gen. Microbiol.* 1974. Vol. 80. P. 433—442.
- Cummins C. S., Johnson J. L. The genus *Propionibacterium* // *The prokaryotes*, 2nd ed. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, application. Vol. 1. Ch. 37. A. Ballows et al. (ed). Springer-Verlag N. Y. Inc. 1992. P. 832—849.
- Cummins C. S., Johnson J. L. The Genus *Propionibacterium* // *The Prokaryotes*. Springer-Verlag. Berlin; Heidelberg; N. Y., 1981. P. 1894—1902.
- Cummins C. S., Johnson J. L. Genus *Propionibacterium*, Orla Jensen, 1909 // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1986. Vol. 2. P. 1346.
- Cummins C. S., Moss C. W. Fatty acid composition of *Propionibacterium (Arachnia propionica)* // *Int. J. Syst. Bact.* 1990. Vol. 40. N 3. P. 307—308.
- Cummins C. S., White R. H. Isolation, identification and synthesis of 2,3-diamino-2,3-dideoxyglucuronic acid: a component of *Propionibacterium acnes* cell wall polysaccharide // *J. Bact.* 1983. Vol. 153. P. 1388—1393.
- Cutting W. et al. Antiviral extracts from *Propionibacteria* // *Antibiot. Chemother.* 1960. Vol. 10, N 10. P. 623.
- Czarnocka-Roczniakowa B. Semi-continuous corrinoid biosynthesis by *P. petersonii* // *Acta microbiol. polon.* 1966. Vol. 15, N 4. P. 349—355.
- Dahl T. A., Midden W. R., Hartman Ph. E. Some prevalent biomolecules as defences against singlet oxygen damage // *Photochemistry and Photobiology*. 1988. Vol. 47, N 3. P. 357—362.
- Davis J. J., Willard J. M., Wood H. G. Phosphoenolpyruvate carboxytransphosphorylase // *Biochemistry*. 1969. Vol. 8. P. 3127—3136.
- Davis J. J., Wood H. G. Inorganic pyrophosphatase // *The formation of phosphoenolpyruvate*. *Fed. Proc.*, 1966. Vol. 25, N 1. P. 278.
- Delwiche E. A. Mechanism of propionic acid formation by *Propionibacterium pentosaceum* // *J. Bact.* 1948. Vol. 56. P. 811—820.
- Delwiche E. A. Vitamin requirements of the genus *propionibacterium* // *J. Bacteriol.* 1949. Vol. 58. N 3. P. 395—398.
- Delwiche E. A. A biotin function in succinic acid decarboxylation by *Propionibacterium pentosaceum* // *J. Bact.* 1950. Vol. 59. P. 439—442.
- Delwiche E. A., Carson S. F. A citric acid cycle in *Propionibacterium pentosaceum* // *J. Bact.* 1956. Vol. 65, N 3. P. 318—321.
- Demain A. L. Production of purine nucleotides by fermentation // *Progress in Industr. Microbiol.* 1968. Vol. 8. P. 36—71.
- Dieterle W. *Doct. Dissert.* Stuttgart univer. 1971. Цит. по Müller G.
- Dills S. S. et al. Carbohydrate transport in bacteria // *Microbiol. Reviews*. 1980. Vol. 44. P. 385—418.
- Dimitrov N. et al. Comparative studies on the effect of *Corynebacterium parvum* on bone-marrow cell colony formation in vitro // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London. 1975. P. 173—180.
- Dimroth P. Bakterielle Energieübertragung über einem Natrium-Cyclus // *Forum mikrobiologie*. 1988. Vol. 5. P. 180—187.
- Doelle H. V. New developments in the elucidation of mechanisms of the pasture and crabtree effects in bacteria // *Adv. Biotechnol. Proc. 6th Int. Ferment. Symp.* London (Canada), 20—25 July, 1980. Vol. 1. Toronto, 1981. P. 249—254.

- Dörner W., Thöenii M. Untersuchungen über Kokkenformige Propionsäurebakterien // Landw. Jahrb. Schwiez. 1939. Bd. 53, N 1.
- Drinan F., Cogan T. M. Detection of propionic acid bacteria in cheese // J. Dairy Res. 1992. Vol. 59, N 1. P. 65—69.
- Döse K. The bioenergetics of anaerobic bacteria: evolutionary concepts // Adv. Space Res. 1989. Vol. 9, N 6. P. 93—100.
- Douglas H. C., Gunter S. E. The taxonomic position of *Corynebacterium acnes* // J. Bact. 1946. Vol. 52, N 1. P. 15—23.
- Drews G. Elektronenmikroskopische Untersuchungen on *Mycobacterium phlei* // Arch. Mikrobiol. 1960. Bd. 35, N 1. S. 53—62.
- Dryden L. P. et al. Production of vitamin B₁₂ analogues by pure cultures of ruminal bacteria // Nature, 1962. Vol. 165. P. 201—202.
- Duda J., Malinska E., Pedziwiłk Z. Relation between the content of vitamin B₁₂ and the number of microorganisms in soil // Acta Micr. Polon. 1957. Vol. 6. P. 355—365.
- Dykstra G. J. et al. Formation of dimethylsulfide by *P. shermanii* ATCC 9617 // J. Dairy Sci. 1971. Vol. 54, N 2. P. 168—172.
- Clausen E. C., Goddy J. L. Fermentation of biomass into acetic and propionic acids with *Propionibacterium acidipropionici* // Adv. Biotechnol. Proc. 6th Int. Ferment. Symp. London (Canada), 20—25 July, 1980. Vol. 2. Toronto, 1981. P. 61—69.
- El-Hagarawy I. S. Factors, affecting the organic acid production by propionibacteria used in the manufacture of Swiss cheese // Diss. Abstr., 1960. Vol. 20. P. 2459.
- El-Hagarawy I. S., Slatter W. L., Harper W. J. Organic acid production by propionibacteria. Effect of strains, pH, carbon source, and intermediate fermentation products // J. Dairy Sci. 1957. Vol. 40. P. 579—587.
- El-Hagarawy I. S. et al. Factors affecting the organic acid production of propionibacteria used in manufacture of Swiss cheese // J. Dairy Sci. 1954. Vol. 37. P. 638.
- Emde R., Schink B. Oxidation of glycerol, lactate, and propionate by *Propionibacterium freudenreichii* in poised-potential amperometric culture system // Arch. Micr. 1990. Vol. 153, N 5. P. 506—512.
- Emde R., Schink B. Enhanced propionate formation by *Propionibacterium* subsp. *freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system // Appl. Environm. Microbiol. 1990. Vol. 56, N 9. P. 2771—2776.
- Escalante-Semerens J. C., Roth J. R. Regulation of cobalamin biosynthetic operons in *Salmonella typhimurium* // J. Bacteriol. 1987. Vol. 169, N 5. P. 2251—2258.
- Evans H. G., Wood H. C. Phosphoenolpyruvate synthesis from pyruvate // Fed. Proc. 1968. Vol. 27, N 2. P. 588.
- Farguharson J., Adams J. F. The forms of vitamin B₁₂ in foods // Brit. J. Nutr. 1976. Vol. 36. P. 127—136.
- Fass S. SOD human efficacy trials for heart attack indication // D.-J.-M.-Enzyme Rep. 1987. Vol. 6, N 10. P. 2.
- Fauve R. M. Stimulating effect of *Corynebacterium parvum* and *C. parvum* extract on the macrophage activities against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975. P. 77—83.
- Ferguson D. A., Cummins C. S. Nutritional requirements of anaerobic coryneforms // J. Bact. 1978. Vol. 135, N 3. P. 858—867.
- Fernandez F., Matthew D. Vitamin K composition of anaerobic gut bacteria // FEMS Micr. Lett. 1987. Vol. 41, N 1. P. 175—180.
- Field M. F., Lichstein H. C. Conditions affecting the growth of propionibacteria in synthetic media // Bacteriol. Proc. 1955. P. 120—121.
- Field M. F., Lichstein H. C. Factors effecting the growth of propionibacteria // J. Bacteriol. 1957. Vol. 73, N 1. P. 96—99.
- Field M. F., Lichstein H. C. Growth stimulating effect of autoclaved glucose media and its relationship to the carbon dioxide requirements of propionibacteria // J. Bact. 1958a. Vol. 76. P. 485—490.

- Field M. F., Lichstein H. C. Influence of casein hydrolysates and amino acids on glucose fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* // *J. Bact.* 1958b. Vol. 76. P. 491—494.
- Fisher W. D. et al. Properties of a cell fraction that repairs damage to the cell division mechanism of *Escherichia coli* // *J. Bact.* 1969. Vol. 97, N 3. P. 500—505.
- Fisher B., Wolmark N., Fisher E. R. Results of investigation with *Corynebacterium parvum* in an Experimental Animal system // *Corynebacterium parvum*. N.-Y.; London, 1975. P. 218—243.
- Fitz A. Über Spaltpilzgährungen // *Ber. der Deutschen Chem. Gesellsch.* 1978. Bd. 11. S. 1890—1899.
- Flavin M., Brissilla J. O., Ochoa S. Metabolism of propionic acid in animal tissues // *Nature*. 1955. Vol. 176. P. 826.
- Ford S. H., Friedman H. C. Vitamine B₁₂ biosynthesis: in vitro formation of cobinamide from cobryc acid and L-threonine // *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. Vol. 175, N 1. P. 121—130.
- Forrest W. W. Energetic aspects of microbial growth. *Microbial Growth*. Cambridge, 1969. P. 65.
- Forrest W. W., Walker D. J. Change in entropy during bacterial metabolism // *Nature*, 1964. Vol. 201, N 4914. P. 49—52.
- Foschino R. et al. Propionic bacteria activity in different culture conditions // *Ann. Microbiol.* 1988. Vol. 38. P. 207—222.
- Francalani F. et al. The subunit structure of methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii* // *Biochem. J.* 1986. Vol. 236, N 2. P. 489—494.
- Frazier W. C., Wing H. U. Bacterium acidi propionici and other lactate-fermenting bacteria of swiss cheese // *J. Bact.* 1932. Vol. 23, N 1. P. 60—61.
- Freer J. et al. Ultrastructural changes in bacteria isolated from cases of leprosy // *J. Bact.* 1969. Vol. 100, N 2. P. 1062—1075.
- Freudenreich E., Orla-Jensen. Über die Emmenthaler Käse stattfindeter Propionsäuregärung // *Lands. Jahrb. Schweiz*. 1906. Bd. 20. S. 320.
- Frey B., McCloskey J., Kersten W., Kersten H. New function of vitamin B₁₂ cobamide-dependent reduction of Eoxoquenosine to Quenosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // *J. Bacteriol.* 1988. Vol. 170, N 5. P. 2078—2082.
- Friedrich W. M., Sandeck W. Zur rolle des faktors via in vitamin B₁₂-stoffwechsel des *P. shermanii* // *Z. Naturforsch.* 1964. Bd. 19b. H. 6. S. 538.
- Frings W., Schlegel H. G. Über reaktionen der heterotrophen kohlendioxid-fixierung // *Biol. Rundschau*. 1970. Bd. 8. H. 4. P. 218—232.
- Fromageot C., Chaix P. Respiration et fermentation chez *Propionibacterium pentosaceum* // *Enzymologia*. 1937. Bd. 3. S. 288.
- Fujii K., Fukui S. Relation between vitamin B₁₂ content and ratio of mono-unsaturated fatty acids to the methyl-branched fatty acids in *Corynebacterium simplex* cells grown on hydrocarbons // *FEBS Letters*. 1969. Vol. 5, N 4. P. 343—346.
- Fujimura S., Nakamura T. Purification and properties of bacterium like substance (Acnein) of oral *Propionibacterium acnes* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1978. Vol. 14. P. 893—898.
- Fujita H., Saino Y. Isolation of anaerobic *Corynebacterium* from human bone marrows and its protective activity against sarcoma-180 // *Kokubyo Gakkai Zasshi*. 1971. Vol. 38. P. 294—299.
- Fukui G. M. Studies on growth and respiration mechanisms of the propionic acid bacteria. N. Y., 1952.
- Furusawa E., Ramanathan S., Furusawa S. Antiviral activity of higher plants and propionin on lymphocytic choriomeningitis infection (32057) // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967. Vol. 125, N 1. P. 234—239.
- Galesloot T. E. Involved van nisine op die bacterien welke betrokken zijn of kunnen zijn bij bacteriologische processen in kaas en smelikaas // *Netherlands Milk and Dairy J.* 1957. Vol. 11. P. 58—73.

- Galli A., Ottogalli G., Volonterio G. Metodo per la conta ed identificazione dei batteri propionici nei prodotti lattierocaseari // Estratto dalla Rivista «L'industria del datta». Milano, 1984. Vol. 2. P. 19—32.
- Gerenser M. A., Slack J. M. Isolation and identification of *Actinomyces propionicus* // J. Bact. 1967. Vol. 94. P. 109—115.
- Gerwin B. I., Jacobson B. E., Wood H. G. Transcarboxylase. VIII. Isolation and properties of a biotin-carboxyl carrier protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1962. Vol. 64. P. 1315—1322.
- Gibson K. D., Neuberger A., Scott J. J. The purification and properties of δ -aminolevulinic acid dehydrase // Biochem. J. 1955. Vol. 61, N 4. P. 618—629.
- Gibson K. D., Scott J. J. Enzyme systems in porphyrin biosynthesis // Biochemists Handbook London, 1961.
- Glatz B. A. The classical propionibacteria: their past, present and future as industrial organisms // ASM News. 1992. Vol. 58, N 4. P. 197—201.
- Glatz B. A., Anderson K. I. Isolation and characterization of mutants of *Propionibacterium* strains // J. Dairy Sci. 1988. Vol. 71. P. 1769—1776.
- Greenberg D. M., Rodwell V. W. Metabolic pathways. 1969. Vol. 3. Chapt. 16.
- Greenman J., Holland K. T., Cunliff W. J. Effects of glucose concentration on biomass, maximum specific growth rate and extracellular production by three species of cutaneous propionibacteria grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. 1981. Vol. 127, N 2. P. 371—376.
- Haase C. F., Beegan H., Allen G. S. Propionyl-coenzyme A carboxylase of *Mycobacterium smegmatis* // Eur. J. Biochem. 1984. Vol. 140. P. 147—151.
- Halankar P. P., Blomquist G. J. Comparative aspects of propionate metabolism // Comp. Biochem. Physiol. 1989. Vol. 92B, N 2. P. 227—231.
- Hall B. G. The origin of mutants // Environm. Mutagenes. 1989. Vol. 14. Suppl. P. 80.
- Halpern B. Closing remarks. *Corynebacterium parvum*. Application in experimental and clinical oncology. N. Y.; London, 1975. P. 419—423.
- Halpern B. N., Biozzi G., Stiffel C. // Role du systeme reticuloendothelial et antitumorale. Paris, 1963. P. 221—236.
- Halpern B. N. et al. Inhibition of tumour growth by administration of *C. parvum* // Nature, 1966. Vol. 212. P. 853.
- Halpern B. N. et al. Stimulation of the phagocytic activity of the reticuloendothelial system provoked by *C. parvum* // J. Reticuloendothel. Soc. 1964. Vol. 1. P. 77.
- Hamilton J. A. et al. Electron paramagnetic resonance studies on cobalamin-dependent ribonucleotide reduction // Biochemistry. 1972. Vol. 11. P. 4696—4705.
- Hatanaka H., Wang E., Taniguchi M. et al. Production of vitamin B₁₂ with a hollow-fiber module // Appl. Micro. Biotechnol. 1988. Vol. 27, N 5/6. P. 470—473.
- Hayashi S., Furusaka C. Enrichment of *Propionibacterium* in paddy soils by addition of various organic substances // Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 1980. Vol. 46. P. 313—320.
- Hellgren L., Vincenzi J. New group of prostaglandine-like compounds // P. acnes // Gen. Pharmac. 1983. Vol. 14. P. 207—208.
- Herzog V., Fahini H. D. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor // An. Biochem. 1973. Vol. 55. P. 554—562.
- Hettinga D. H., Reinbold G. W. The Propionic acid bacteria — a Review. I. Growth // J. Milk Food Technol. 1972. Vol. 35, N 5. P. 295—301.
- Hettinga D. H., Vedamuthu E. R., Reinbold G. W. Pouch method for isolation and enumeration of propionibacteria // J. Dairy sci. 1968. Vol. 51. P. 1707—1709.
- Hietaranta M., Antila M. The influence of biological nutrients on the growth of propionic acid bacteria in milk. XIII // Int. Dairy Congr. 1953. Vol. 3. P. 1428—1431.

- Hietaranta M., Antila M. Some aspects of citric acid breakdown in Emmental cheese // *Mejerit. Finl. Svensk.* 1954. Vol. 16. P. 91—94.
- Hitchner E. R. Some physiological characteristics of the propionic acid bacteria // *J. Bact.* 1934. Vol. 28. P. 473—479.
- Hocman G. Prevention of cancer: vegetables and plants // *Comp. Biochem. Physiol.* 1989. Vol. 93B. P. 201—212.
- Hoeffler U. Enzymatic and hemolytic properties of *Propionibacterium acnes* and related bacteria // *J. Clin. Microbiol.* 1977. Vol. 6. P. 555—558.
- Hoeffler U. Production of hyaluronidase (E. C. 3.2.1.36) by propionibacteria from different origins // *Zentr. Bakt. Paras. Infekt. Hyg. I Abt. Orig. A.* 1980. Vol. 245. P. 1—2.
- Hogenkamp H. P. C. Enzymatic reactions involving corrinoids // *Ann. Rev. Biochem.* 1968. Vol. 37. P. 225—245.
- Hogenkamp H. P. C. The chemistry of cobalamin and related compounds // *Cobamin: Biochemistry and Pathophysiology.* N. Y., 1975. P. 21—73.
- Holdeman L. V., Cato E. P., Moore W. E. C. *Anaerobic laboratory manual*, 4th ed Blackburg, Virginia, 1977.
- Holland K. T., Cunliffe W. J., Roberts C. D. The role of bacteria in acne — a new approach // *Clin. and Exper. Dermat.* 1978. Vol. 3. P. 253—257.
- Holland K. T., Greenman J., Cunliffe W. J. Growth of cutaneous propionibacteria on synthetic medium: growth yields and exoenzyme production // *J. Appl. Bact.* 1979. Vol. 47. P. 383—394.
- Holland K. T., Ingham E., Cunliffe W. J. The microbiology of Acne // *J. Appl. Bact.* 1981. Vol. 51. P. 195—215.
- Holliday R. A. A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms // *Nature.* 1956. Vol. 178, N 4540. P. 987.
- Höllriegel V. et al. Different pathways in some aerobic and anaerobic microorganisms // *Arch. Microbiol.* 1982. Vol. 132, N 2. P. 155—158.
- Holmberg K., Forsum V. Identification of *Actinomyces*, *Arachnia*, *Bacterionema*, *Rothia* and *Propionibacterium* species by defined immunofluorescence // *Appl. Microbiol.* 1973. Vol. 25. P. 834—843.
- Hosono A., Sagae S., Tokita F. Desmutagenic effect of cultured milk on chemically induced mutagenesis in *Escherichia coli* B/r WP2 trp-hcr // *Milchwissenschaft.* 1986. Vol. 41, N 3. P. 142—145.
- Ichikawa J. Microbiological studies on propionic acid bacteria. Formation of propionic acid from succinate // *J. Agric. Chem. Soc. Japan.* 1955. Vol. 29. N 5. P. 357—361.
- Ingham E. et al. Purification and partial characterization of hyaluronate lyase (EC 4.2.99.1) from *Propionibacterium acnes* // *J. Gen. Microbiol.* 1979. Vol. 115. P. 411—418.
- Ingham E. et al. Purification and partial characterization of acid phosphatase (EC. 3. 1. 3. 2) produced by *Propionibacterium acnes* // *J. Gen. Microbiol.* 1980. Vol. 118, N 3. P. 59—65.
- Ingham E. et al. Partial purification and characterization of lipase (E. C. 3. 1. 1. 3) from *Propionibacterium acnes* // *J. Gen. Microbiol.* 1981. Vol. 124. P. 393—401.
- Ingham E. et al. Studies of the extracellular proteolytic activity produced by *Propionibacterium acnes* // *J. Appl. Bact.* 1983. Vol. 54. P. 263—271.
- Israel L. Preliminary results of nonspecific immunotherapy for lung cancer // *Cancer Chemother. Rep.* 1973. Vol. 4. P. 283.
- Israel L. Report on 414 cases of human tumors treated with corynebacteria // *Corynebacterium parvum*, N. Y.; London, 1975. P. 389—401.
- Israel L., Edelstein R. Nonspecific immunostimulation with *C. parvum* in human cancer // *Ann. M. D. Anderson Symp. on Fundamental Cancer Res.* 1973.
- Israel L., Halpern B. *Le Cor. parvum* dans les cancers avancees // *Nouv. Presse Med.* 1972. Vol. 1. P. 19.
- Iwasaki H., Fujiyama T., Yamashita E. Studies on the red tide dinoflagellates I. On *Entomosigma* sp. appeared in coastal area of Fukujama // *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.* 1968. Vol. 7. P. 259—267.

- James W. O., Beevers S. H. The respiration of *Arum* spadix. A rapid respiration, resistant to cyanide // *New Phytologist*. 1950. Vol. 49, N 3. P. 353—357.
- Janoschek A. Zur systematik der Propionsäurebakterien // *Zbl. Bakt. II Abt.* 1944. Bd. 106. S. 321—337.
- Javanainen P. M., Linko Y. Y., Linko P. Propionic acid formation by mixed cultures of *Lactobacillus* sp. and *Propionibacterium* sp. on wheat flour based substrate // *Proc. 4th Eur. Congr. Biotechnol. Amsterdam*, June 14—19. 1987. Vol. 3. Amsterdam etc., 1987. P. 313—316.
- Jeter R. et al. Synthesis and use of vitamin B₁₂ in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // *Cell a. Mol. Biol.* 1987. Vol. 1. P. 551—556.
- Johns A. T. Mechanisms of the propionic acid formation by propionibacteria // *J. Gen. Micr.* 1951. Vol. 5. P. 337—345.
- Johnson J. L., Cummins C. S. Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical *Propionibacteria* and strains of *Arachnia propionica* // *J. Bact.* 1972. Vol. 109, N 3. P. 1047—1066.
- Jong E. C., Ko H. L., Pulverer G. Studies on bacteriophages of *Propionibacterium acnes* // *Medical Microbiology and Immunology*. 1975. Vol. 161. P. 262—271.
- Jordan E. P., Antoshkina N. V., Vorobjeva L. I. The participation of coenzyme B₁₂ in the synthesis of DNA by *Propionibacterium shermanii* // *Vitamin B₁₂*. Berlin; N. Y., 1979. P. 1095—1099.
- Joseph A. A., Wixom R. L. Aminoacid metabolism in the genus *Propionibacterium* // *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1972. Vol. 139, N 2. P. 526—534.
- Jwanny E. W., Chenouda M. S., Osman H. G. Utilization of hydrocarbons by microorganisms // *Zeitschr. Allg. Mikrob.* 1974. Vol. 14, N 3. P. 205—212.
- Kabongo M., Nutini M. L., Esters S. A. Intradermal injections of bacteria and their relation to acne pathogenesis // *J. Invest. Dermatol.* 1981. Vol. 76. P. 314.
- Kabongo M., Sower M. C., Nutini L. G. A simplified medium for detecting the effect of lecithin on the growth of *Propionibacterium acnes* // *Microbiologica*. 1982. Vol. 5, N 1. P. 11—23.
- Kada T., Inoue T., Onta T., Shirasu Y. Antimutagens and their mode of action // *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*. N. Y., 1986. P. 181—196.
- Kamikubo T. et al. Biological activities of new corrinoides // *Agric. Biol. Chem.* 1982. Vol. 46, N 6. P. 1673—1674.
- Kameda T. Fatty acids in genus *Bacillus*. I. Iso- and anteiso-fatty acids as characteristic species // *J. Bacteriol.* 1967. Vol. 93, N 3. P. 894—903.
- Kargaonkar K. S., Raut S. L. Reactivation in UV inactivated *Escherichia coli* by cell free extracts // *Curr. Modern Biol.* 1967. Vol. 1, N 1. P. 291—298.
- Kaszubiak H., Malinska E., Pedziwilk Z. Studies on production and structure of corrinoides from *Rhizobium meliloti* // *Acta Microbiol. Polon.* 1957. Vol. 6. P. 239—251.
- Kazirow J., Ochoa S. The metabolism of propionic acid // *Advan. Enzymol.* 1964. Vol. 26. P. 283.
- Keenan T. W., Bills D. D. Volatile compounds produced by *Propionibacterium shermanii* // *J. Dairy Sci.* 1968. Vol. 51, N 5. P. 797—799.
- Kellenmeyer R. W. et al. Methylmalonyl isomerase. IV. Purification and properties of the enzyme from propionibacteria // *J. Biol. Chem.* 1964. Vol. 239. P. 2562—2569.
- Kimball R. J., Setrow I. R., Lin M. The mutagenic and lethal effects of monofunctional methylating agents in strains of *Haemophilus influenzae* defective in repair processes // *Mutat. Res.* 1971. Vol. 12, N 1. P. 21.
- Kenney R. W., Werkman C. H. Transamination in *P. shermanii* // *Iowa State Coll. J. Sci.* 1958. Vol. 32, N 3. P. 455—461.

- Kishimoto Y. et al. Branched-chain and odd-numbered acids and aldehydes in the nervous system of patient with deranged vitamin B₁₂ metabolism // *J. Lipid Res.* 1973. Vol. 14. N 1. P. 69.
- Krättiler B. Chemistry of methylcorrinoids related to their roles in bacterial C₁ metabolism // *FEMS Microbiol. Rev.* 1990. Vol. 87, N 3—4. Spec. Issue. P. 349—354.
- Krebs H. A., Egglestone L. V. Biological synthesis of oxaloacetic acid from pyruvic acid and CO₂. The mechanism of carbon dioxide fixation in propionic acid bacteria // *Biochem. J.* 1941. Vol. 35, N 7. P. 676—687.
- Kurmann J. Ein vollsynthetischer Nährboden für Propionsäure-bakterien // *Pathol. et Microbiol.* 1960. Vol. 23. P. 700—711.
- Kuroda Y., Inoue T. Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria // *Mut. Res.* 1988. Vol. 202, N 2. P. 387—391.
- Kurtz F. E. et al. Interrelationships between pH, population of *P. shermanii*, levels of free fatty acids and the flavor ratings of Swiss cheese // *J. Dairy Sci.* 1958. Vol. 41. P. 719.
- Kurtz F. E. et al. Interrelationships between pH, population of *P. shermanii*, levels of free fatty acids and the flavor ratings of Swiss cheese // *J. Dairy Sci.* 1959. Vol. 42. P. 1008.
- Kusel J. P., Fa Y. H., Demain A. L. Betaine stimulation of vitamin B₁₂ biosynthesis of *Pseudomonas denitrificans* may be mediated by increase of activity of δ -aminolevulinic acid synthase // *J. Gen. Micro.* 1984. Vol. 130. P. 835—841.
- Lagakas R. The Pasteur effect today // *Biol. Chem-Hoppe Seuler.* 1987. Vol. 368, N 6. P. 540—541.
- Lancelle M. A., Asselineau M. J. Sur les lipids de *P. freudenreichii* // *Comp. Rend. Acad. sci.*, 1968. T. 266, N 18. P. 1901—1903.
- Lara F. J. S. The succinic dehydrogenase of *Propionibacterium pentosaceum* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1959. Vol. 33. P. 565—567.
- Laubinger W., Dimroth W. Characterization of the Na⁺-stimulated ATP-ase of *Propionigenium modestum* as an Enzyme of the F₁, F₀ Type // *Eur. J. Biochem.* 1987. Vol. 168. P. 475—480.
- Leann J., Bachman R., Clatz B. Protoplast formation and regeneration in *Propionibacteria* // *Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.* Washington, 1986. P. 277.
- Leaver F. W., Wood H. G., Stjernholm R. The fermentation of three carbon substrates by *C. propionicum* and *Propionibacterium* // *J. Bact.* 1955. Vol. 70. P. 521—530.
- Lederer E. *Lit. no Shaw N., Dinglinger J. D.*, 1969.
- Lee S. Y., Vedamuthu E. R., Washam C. J., Reinbold G. W. Diacetyl production by propionibacteria // *J. Dairy Sci.* 1969. Vol. 52. P. 893.
- Lee S. Y. et al. Diacetyl production by *Propionibacterium shermanii* in milk cultures // *Can. J. Microbiol.* 1970. Vol. 16. P. 1231—1242.
- Lee W. L., Schalita A. R., Pon-Fitzpatrick M. B. Comparative studies of porphyrin production in *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium granulosum* // *J. Bacteriol.* 1978. Vol. 133, N 2. P. 811—815.
- Leeper F. J. The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls and vitamin B₁₂ // *Natur. Product Reports.* 1989. Vol. 6, N 2. P. 171—203.
- Leps W. T., Ensign J. C. ATP pool level and endogenous metabolism in *Arthrobacter crystallopoietes* during growth and starvation // *Arch. Microbiol.* 1979. Vol. 122, N 1. P. 61—65.
- Lewis V. P., Yang S. T. A novel extractive process for propionic acid production from whey lactose // *Biotechnol. Progr.* 1992. Vol. 8, N 2. P. 104—110.
- Lichstein H. C. The presence of bound biotin in purified preparation of oxaloacetic carboxylase // *J. Biol. Chem.* 1955. V. 212. P. 217—222.
- Lichstein H. C. Bound biotin in oxalacetic carboxylase preparation // *Arch. Biochem. Biophys.* 1957. Vol. 71. P. 276—277.
- Lichstein H. C. On the specificity of biotin in the metabolism of propionibacteria // *Arch. Biochem. Biophys.* 1958. Vol. 77. P. 378—386.

- Jochhead A. G. Soil bacteria and growth-promoting substances // *Bact. Rev.* 1958. Vol. 22. P. 145.
- Jochmüller H., Wood H. G., Davis J. J. Phosphoenolpyruvate carboxytransphosphorilase // *J. Biol. Chem.* 1966. Vol. 241, N 23. P. 5678—5691.
- Joyon W. J., Glatz B. A. // Partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. Vol. 57. P. 701—706.
- Kalich G. W., Reinbold G. W., Vedamuthu E. R. An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium* // *Canad. J. Microbiol.* 1968. Vol. 14, N 11. P. 1185—1191.
- Karston H. R. The requirement of sheep for cobalt or for vitamin B₁₂ // *Br. J. Nutr.* 1970. Vol. 24. P. 615.
- Karth E. H. Cheese // *Industrial microbiology*. Connecticut, 1982. P. 65.
- Karwaha S., Kennedy J. F., Sethi R. P. Vitamin B₁₂ production from whey and simulation of optimal cultural conditions // *Process. Biochem.* 1983. Vol. 18, N 6. P. 24—27.
- Kathe E. et al. Therapeutic trial with reticulostimulin in patients with ear, nose or throat cancer // *Corynebacterium parvum*. 1975. P. 376—382.
- Matthews R. G., Banerjee R. V., Ragsdale S. W. Cobamide-dependent methyl transferases // *Biofactors*. 1990. Vol. 2, N 3. P. 147—152.
- McBride B. C., Wolfe R. S. A new coenzyme of methyl transfer, coenzyme M // *Biochemistry*. 1971. Vol. 10, N 12. P. 2317—2325.
- McGinley, Webster G. F., Leyden J. J. Regional variation of cutaneous propionibacteria // *Appl. Environment. Microbiol.* 1978. Vol. 35, N 1. P. 62—66.
- Meganathan R., Ensign I. C. A stability of enzymes in starving *Arthrobacter crystallopoietes* // *J. Gen. Microbiol.* 1976. Vol. 94, N 1. P. 90—96.
- Mengel K., Kirkby E. A. Principles of plant nutrition // *International Potash Institute*. Worblaufen-Bern, 1980.
- Menon J. A., Shemin D. Concurrent decrease of enzymic activities concerned with the synthesis of coenzyme B₁₂ and of propionic acid in propionibacteria // *Arch. Biochem. Biophys.* 1967. Vol. 121. P. 304—310.
- Meriläinen V., Anttila M. The propionic acid bacteria in Finnish Emmental cheese // *Meijeritieellinen Aikakauskirja*, Helsinki 1976. Vol. 34. P. 107—116.
- Mervin L., Smith E. L. The biochemistry of vitamin B₁₂ fermentation // *Progress in Industrial Microbiol.* 1964. Vol. 5. P. 55.
- Michelson A. M. U. S. Patent. 1977. 4.029.819.
- Milos L., Mujagic H. Protection by *Corynebacterium parvum* against tumor cells injected intravenously // *Eur. J. Clin. Biol. Res.* 1972. Vol. 17. P. 498—500.
- Milner Y., Wood H. G. Isolation of a pyrophosphoryl form of pyruvate phosphate dikinase from *Propionibacteria* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1972. Vol. 69, N 9. P. 2463—2468.
- Moat A. G., Delwiche E. A. Utilization of coenzyme A by *Propionibacterium freudenreichii* // *J. Bact.* 1950. Vol. 60. P. 757—762.
- Molinari R., Lara F. J. S. The lactic dehydrogenase of *Propionibacterium pentosaceum* // *Biochem. J.* 1960. Vol. 75, N 1. P. 57—65.
- Moore W. E., Cato E. P. Validity of *P. acnes* (Gilchrist). Douglas and Gunter Comb. NOV // *J. Bact.* 1963. Vol. 85, N 4. P. 870—874.
- Moss C. W. et al. Cultural characteristics and fatty acid composition of *Propionibacteria*. // *J. Bact.* 1969. Vol. 97, N 2. P. 561—570.
- Moss C. W. et al. Cultural characteristics and fatty acid composition of *Corynebacterium acnes* // *J. Bact.* 1967. Vol. 94. P. 1300—1305.
- Mukherjee P., Bhattacharjee S. B. The survival of X-irradiated bacteria // *J. Gen. Micr.* 1971. Vol. 65, N 3. P. 275—283.
- Müller G., Bezold G. Gewinnung von porphobilinogen aus δ -aminolevulin-säure mit zellsuspensionen von *P. shermanii* // *Z. Naturforsch.*, 1969. Bd. 24. H. 1. S. 47—53.
- Müller G., Dieterle W., Siebke G. Gewinnung von porphyrinen mittels *Propionibacterium shermanii* // *Z. Naturforsch.* 1970. Bd. 25b. S. 307—309.

- Müller G. et al. Structure of Factor S-3, a metabolite of *Propionibacterium shermanii* derived from uroporphyrinogen I // J. Amer. Chem. Soc. 1986. Vol. 108, N 24. P. 7875—7877.
- Mulli K., Schmidt O. Über eine biologische aktive B₁₂-polypeptide // Z. Vitamin-Hormon- und Fermentforschung, 1956. Bd. 8. H. 4. S. 225—230.
- Nakamura Y. et al. Superoxyde dismutase inhibits promotion of neoplastic transformation of TPA in JB₆-cells: role of reactive oxygen in tumor promotion // Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms. N. Y., 1986. P. 573.
- Naud A. I., Legault-Demare J., Ryter A. Induction of a stable morphological change in *Propionibacterium freudenreichii* // J. Gen. Microbiol. 1988. Vol. 134, N 2. P. 283—293.
- Neujahr H. Y., Fries L. On the occurrence of light-sensitive corrinoids in axenic cultures of unicellular algae // Acta Chem. Scand. 1966. Vol. 20. P. 347—360.
- Niederer W., Pape W. et al. Zur antibiotikehandlung der menschlichen aktinomykosen // Deutsch. Med. Wochenschr. 1982. B. 107. P. 1279—1283.
- Niethammer A., Hizler M. Synthetic culture of *Propionibacterium* (Orla-Jensen) van Niel // Zbl. Bakt. 1960. Vol. 11. Bd. 113. P. 478—479.
- Nishioka H., Nunoshiba T. Role of enzymes in antimutagenesis of human saliva and serum // Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms. N. Y.; London, 1986. P. 143—151.
- Northrop D. B., Wood H. G. Transcarboxylase: VII. Exchange reactions and kinetics of oxalate inhibition // J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244. P. 5820—5827.
- Novic A., Scillard L. Antimutagens // Nature. 1952. Vol. 170. P. 926.
- O'Brien W. E., Wood H. G. Ligand-mediated interaction of subunits as a possible control mechanism in *Propionibacteria* // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249, N 15. P. 4917—4925.
- Oh-Hama T., Stolowich N. I., Scott A. I. 5-Aminolevulinic acid formation from glutamate via the C₅ pathway in *Clostridium thermoaceticum* // Febs Lett., 1988. Vol. 228. P. 89—93.
- Okada J., Murata K., Kimura A. Assimilation of elemental sulfur by a mutant of *Escherichia coli* B // Agr. Biol. Chem., 1982. Vol. 46. P. 1015—1019.
- Orla-Jensen O. Die Hauptlinien des natürlichen Bakterien-systems // Zbl. Bact. Paras. Infekt. Hyg. 1909. Bd. 22. S. 305—346.
- Orme-Johnson W. H., Beinert H., Blackley R. L. Cobamides and ribonucleotide reduction, XII. The electron paramagnetic resonance spectrum of active coenzyme B₁₂ // J. Biol. Chem. 1974. Vol. 249. P. 2338—2343.
- Osava T. et al. Chemical studies of antimutagens of microbial origin // Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms. N. Y., 1986. P. 573.
- Osman H. G., Chenouda M. S. Biosynthesis of vitamin B₁₂ by *P. shermanii*. V. Interrelationship between vitamin B₁₂ and porphyrin synthesis // J. Allg. Microbiol. 1971. Vol. 11, N 3. P. 199—204.
- Osterholm A., Ordal S. J., Witter L. D. Purification and properties of a glycerol ester hydrolase (lipase) from *P. shermanii* // Appl. Microbiol. 1970. Vol. 20, N 1. P. 16—22.
- Overath P. Vitamin B₁₂ als Coenzym des Propionsäurestoffwechsels // Vitamin B₁₂ und intrinsischer Faktor. 2. Europäisches Symp. Hamburg, 1961.
- Overath P. E. and a. Zum Mechanismus der Umlagerung von Methylmalonyl-CoA in Succinyl-CoA. III. Reinigung und Eigenschaften der Methylmalonyl-CoA Isomerase // Biochem. Z. 1962. Bd. 336. H. 1. S. 77—98.
- Owais W. M., Kleinholts A. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems // Mut. Res. 1988. Vol. 197, N 2. P. 313—323.
- Pai S. L., Glatz B. A. Production, regeneration and transformation of protoplasts of *Propionibacterium* strains // J. Dairy Sci. 1987. Vol. 70, N 1. P. 80.
- Pamukcu A. M. et al. Carcinogenicity of tannin and tannin-free extracts of bracken fern (*Pteridium equillinum*) in rats // J. Nat. Cancer Inst. 1980. Vol. 65. P. 131—136.

- Panagon D. et al. A monomeric, allosteric enzyme with a single polypeptide chain. Ribonucleotide reductase of *Lactobacillus leichmanii* // *Biochemistry*. 1972. Vol. 1. P. 2378—2388.
- Park H. S. et al. Growth of propionibacteria at low temperature // *J. Dairy Sci.* 1967. Vol. 50. P. 589—591.
- Pawelkiewicz J., Legocki A. B. Propionate (acetate) — kinase of *P. shermanii* // *Bull. Acad. polon. sci. Ser. biol.* 1963. Vol. 11. P. 569—572.
- Pedziwilk F. Biosynthesis of cobalamin by propionic acid bacteria // *The Poznan Society of Friends of Science*. 1962. Vol. 11. P. 141—192.
- Pedziwilk F. «Poznanskie towarzystwo przyjacional nauk Wyddzial nauk rolnicznych i lesnych // *Prace komisji nauk rolnicznych i komisji nauk lesnych*». 1962. Vol. 11. P. 141—191.
- Pedziwilk F. Zmienność genetyczna bakterii kwasu propionowego // *Poczniki wyższej szkoły kolniczej w poznaniu. Prace Habilitacyjne zeszyt*. 1971. P. 34.
- Pedziwilk F., Skupin J., Trojanowska. Biosynthesis of vitamin B₁₂ by the mutants of *Propionibacterium shermanii* induced with ethyl methanesulphonate (EMS) and dimethyl sulphate (DMS) // *Acta aliment. pol.* 1983. Vol. 9. N 1—4. P. 113—119.
- Peltola E. Effect of salt on bacteria of importance in Emmental cheese-making. Meijerit Aikkausk. 1940. Vol. 2, N 1. P. 11—21.
- Peltola E., Antila M. The effect of oxidizing salts on the oxidation-reduction potential and ripening of Emmental cheese // *XIII Int. Dairy Congr.* 1953. Vol. 2. P. 729—731.
- Perez C. A., De Ruiz Holgado A. P., Oliver G. Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of propionibacteria // *Microbiol. alim. nutr.* 1988. Vol. 6, N 1. P. 91—94.
- Perlman D. Microbial synthesis of cobamides // *Adv. in Appl. Microbiol.* 1959. Vol. 1. P. 87—112.
- Perlman D. Primary products of metabolism. London; N. Y.; San Francisco, 1978. P. 303—326.
- Perlman D., Barrett J. M., Jackson P. W. Vitamin und Intrinsic Faktor. Stuttgart, 1962.
- Petkau A. Role of superoxide dismutase in modification of radiation injury // *Brit. J. Cancer*. 1987. Vol. 55, N 8. P. 87—93.
- Pett H., Wynne A. M. Metabolism of propionic acid bacteria. I. Degradation of phosphorus acid esters by *P. jensenii* // *Trans. Roy. Soc. Can.* 1933. Vol. 97. Sect. V. P. 119.
- Pfohl-Leszkowicz A., Keith G., Dirheimer G. Effect of cobalamin derivatives on in vitro enzymatic DNA methylation: methylcobalamin can act as a methyl donor // *Biochemistry*. 1991. Vol. 30. P. 8042—8051.
- Pine I., Georg K. Reclassification of *Actinomyces propionicus* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1969. Vol. 19. P. 267—272.
- Plastorgos S., Vaughn R. H. Species of *Propionibacterium* associated with Zapateria spoilage of olives. *Appl. Microbiol.* 1957. Vol. 5. P. 262—271.
- Pochi P. E., Strauss J. S. Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) // *J. Investigative Dermatology*. 1961. Vol. 36. P. 423—429.
- Postgate J. R. Biological nitrogen fixation: fundamentals // *Phil. Trans. R. Soc.* 1982. Bd. 286. S. 375—385.
- Poston J. M., Stadtman T. C. Cobamids as cofactors. Methylcobamides and synthesis of methionine, methan and acetate // *Cobalamin: biochemistry and pathophysiology*. N. Y., 1975. P. 111—140.
- Prevot A. R. Les corynebactéries anaérobies (*Anaerobic corynebacterioses*) // *Ergeb. Microbiol. Immunitaetsforsch. Exp. Ther.*, 1960. Vol. 33, N 1. P. 1.
- Prevot A. R. Bacteriological aspects of anaerobic corynebacteria in relation to RES stimulation // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975. P. 3—10.
- Prevot A. R. Nouvelle conception de la position taxonomique des *Corynebacteries anaerobies* Note // *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1976. Vol. 282, serie D. P. 1079—1081.

- Prevot A. R., Courdurier J., Aladame N. Recherches sur quatre espèces anaérobies de *Corynebacterium*: *C. liquefaciens*, *C. diphtheroides*, *C. avidum*, *C. parvum* // *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1949. Vol. 76. P. 232.
- Prévot A. R., Fredette V. Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria. Philadelphia, Lea. a. Febiger. 1966. P. 345—355.
- Prevot A. R. et al. Stimulation du système reticulo-endothélial (S. R. E.) par les microbiens tués de *Corynebacterium parvum* // *C. R. Acad. Sci.* 1963. Vol. 257, N 1. P. 13—17.
- Prevot A. R. et al. Caractères histopathologiques de la reticulose expérimentale mortelle du lapin provoquée par les *Corynebactéries anaérobies* // *Ann. Inst. Pasteur, Paris*. 1955. Vol. 88. P. 537.
- Prevot A. R. et al. Caractères histopathologiques de la reticulose expérimentale mortelle du lapin provoquée par les *Corynebactéries anaérobies* (in rabbits) // *Ann. Inst. Pasteur, Paris*. 1958. Vol. 94. P. 405.
- Prevot A. R., Tam Nguyen-Dang, Thouvenot H. Influence des parois cellulaires de *C. parvum* 936B sur le SRE de la souris // *C. R. Acad. Sci.* 1968. Vol. 267. P. 1061.
- Prevot A. R., Thouvenot H. Essai de lysotypia des *Corynebacterium anaérobies* // *Ann. de l'Institut Pasteur*. 1964. Vol. 101. P. 966—970.
- Pritchard G. G., Asmundson R. V. Aerobic electron transport in *Propionibacterium shermanii*. Effects of cyanide // *Adv. Microbiol.* 1980. Vol. 126. P. 167—173.
- Pritchard G. G. et al. Effects of oxygen on *Propionibacterium shermanii* grown in continuous culture // *J. Gen. Micr.* 1977. Vol. 102, N 1. P. 223—233.
- Pryor W. A. Cancer and free radicals // *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*. N. Y., London, 1986. P. 45—59.
- Puhvel S. M., Reisner R. M. The production of hyaluronidase (hyaluronate lyase) by *Corynebacterium acnes* // *J. of Investigative Dermatology*. 1972. Vol. 58, N 1. P. 66—70.
- Pulverer G., Ko H. L. Fermentative and serological studies on *Propionibacterium acnes* // *Appl. Micr.* 1973. Vol. 25. P. 222—229.
- Pulverer G., Songo W., Ko H. L. Bakteriophagen von *P. acnes* // *Zbl. Bakt. Hyg.* 1973. Abt. I. Orig. A. Bd. 225. H. 2—3. S. 353—363.
- Puvion F., Fray A., Halpern B. A comparative scanning electron microscope study of the interaction between stimulated or unstimulated mouse peritoneal macrophages and tumour cells // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975. P. 137—144.
- Quastel J. H., Webley D. M. Vitamin B₁ and bacterial oxidations. II. The effects of magnesium, potassium and hexosediphosphate ions // *Biochem. J.* 1942. Vol. 36, N 1. P. 8—33.
- Ramanathan S., Furusawa E., Cutting W. C. An anti-ICM agent from propionibacteria // *Chemotherapy*, 1968b. Vol. 13. P. 271—275.
- Ramanathan S., Wolyneec C., Cutting W. C. Antiviral principles of propionibacteria. Isolation and activity of propionins B and C // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968a. Vol. 129, N 1. P. 73—77.
- Rapp P. Wachstum, corrinoidbildung und biogenese des cobamids aus cobyrinsäure bei *Propionibacterium shermanii*. Freudenstadt, 1968.
- Rapp P. Amidierung von corrinoidcarbonsäuren in rohextrakten aus *Propionibacterium shermanii* // *Hoppe-Seuler's Z. Physiol. Chem.* 1973. Bd. 354. S. 136—140.
- Rapp P., Wagner F. 5th Intern. Ferm. Symp. Abstr. Berlin, 1976. S. 133.
- Reddy M. S., Reinbold G. W., Williams F. D. Inhibition of propionibacteria by antibiotic and antimicrobial agents // *J. of Milk and Food Technology*. 1973. Vol. 36. P. 564—569.
- Reddy G. V., Shahani K. M., Banerjee M. R. Inhibitory effect of yogurt on Ehrlich ascites tumor-cell proliferation // *J. Natl. Cancer Inst.* 1973. Vol. 50. P. 815—817.
- Reed R. C. et al. *Corynebacterium parvum*: preliminary report of a Phase I. Clinical and Immunological study in cancer patients // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975. P. 349—366.

- Reeves R. B., Menzies R. A., Hsu D. S. The pyruvate phosphate dikinase reaction // *J. Biol. Chem.* 1968. Vol. 243, N 20. P. 5486—5491.
- Rehnberger T. G., Glatz B. A. Restriction endonuclease analyses of propionibacterium plasmids // *Abst. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol. Washington*, 1986. P. 277.
- Rehnberger T. G., Glatz B. A. Characterization of plasmid DNA in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *globosum*: evidence for plasmid-linked lactose utilization // *J. Dairy Sci.* 1987. Vol. 70. P. 80.
- Rehnberger T. G., Glatz B. A. Southern hybridization analysis of *Propionibacterium* plasmids // *Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.* 1987. Washington, 1987. P. 147.
- Rehnberger T. G., Glatz B. A. Characterization of *Propionibacterium* plasmids // *Appl. Environm. Microbiol.* 1990. Vol. 56, N 4. P. 864—871.
- Reichard P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides // *J. Biol. Chem.*, 1962. Vol. 237. P. 3513—3519.
- Renz P. Reaktionsfolge der enzymatischen synthese von vitamin B₁₂ aus Cobinamide bei *P. shermanii* // *Hoppe-Seuler's Z. Physiol. Chem.* 1968a. Bd. 349. H. 8. S. 979—981.
- Renz P. Enzyme synthesis of cobinamide phosphate from cobinamid by extracts of *Propionibacterium shermanii* // *Biophys. Res. Comm.* 1968. Vol. 30, N 4. P. 373—378.
- Renz P., Hörig J., Wurm K. Vitamin B₁₂. Berlin; N. Y., 1979. P. 317—322.
- Retey J. The role of vitamin B₁₂ in enzymatic rearrangements // *FEBS, Abstracts 20th Meet. of the Feder. Eur. Bio. Soc. Budapest*, 1990. 19—24 august.
- Rickard T. R., Bigger G. W., Elliot J. M. Effect of 4,6-dimethylbenzimidazole, adenin and riboflavin on ruminal vitamin B₁₂ synthesis // *J. Anim. Sci.* 1975. Vol. 40. P. 1199—1204.
- Ritter P., Schwab H., Holzer H. Testing the stimulatory or inhibitory effect of micrococci on propionic bacteria // *Schweiz. Milchztg.* 1967. Vol. 93 (34), N 113. P. 929—930.
- Rollman N., Sjöström G. The behavior of some propionic acid bacteria strains against NaCl, NaNO₃ and heating // *Svenska Mejeritidningen (Engl. Transl.)*. 1946. Vol. 38 (19). P. 199—201, 209—212.
- Ronzio R. A., Barker H. A. Enzymatic synthesis of guanosine diphosphate cobinamide by extracts of propionic acid bacteria // *Biochemistry.* 1967. Vol. 6, N 8. P. 2344—2354.
- Rosenberg L. E. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism // *The metabolic basis of inherited disease*. 5th edn. N.-Y., 1983. P. 474—497.
- Roszkowski K. et al. Clinical experience in treatment of cancer // in: *Bacteria and Cancer* N. Y., 1982. P. 331—357.
- Roy A. B., Trudinger P. A. The biochemistry of inorganic compounds of sulfur. Cambridge, 1970.
- Saino Y., Nagoya T. et al. Anaerobic coryneforms isolated from human bone marrow and skin // *Japan J. Microbiol.* 1976. Vol. 20, N 1. P. 17—25.
- Sakaguchi K., Swasaki M., Yamada S. Studies on the propionic acid fermentation // *J. Agr. Chem. Soc. Japan*. 1941. Vol. 17. P. 134—138.
- Salton M. R. Bacterial cell walls // *Bacterial Anatomy, Sixth Symp. of the Soc. Gen. Micr. Cambridge*, 1956.
- Salton M. R. Structure and function of bacterial cell membranes // *Ann. Rev. Microbiol.* 1967. Vol. 3. P. 417—442.
- Salyers A. A., Kuritza A. P., McCarthy R. E. Influence of dietary fiber on the intestinal environment // *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 1985. Vol. 180. P. 1—7.
- Samaïn E. et al. Characterization of a new propionic bacterium that ferments ethanol and displays a growth factor-dependent association with gram-negative homoacetogen // *FEMS Lett.* 1982. Vol. 15, N 1. P. 69—74.
- Sasaki T. et al. Antitumor activity of aqueous extracts of marine animals // *J. Pharmacobio-dyn.* 1985. Vol. 8. P. 969—974.
- Schaal K. P. Genus *Actinomyces* // *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, 1986. Vol. 2. P. 1383—1418.

- Schaal K. P. The genus *Arachnia* // *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Vol. 2. Baltimore, 1986. P. 1332—1342.
- Schaal K. P., Pape W. Special methodological problems in antibiotic testing of fermentative actinomycetes // *Infection*. 1980. Vol. 8. Suppl. 2. 176—182.
- Schofield G. M., Schaal K. P. A numerical taxonomic study of members of Actinomycetaceae and related taxa // *J. Gen. Microbiol.* 1981. Vol. 127. P. 237—259.
- Scott A. I. Mechanistic and evolutionary aspects of vitamin B₁₂ biosynthesis // *Accounts Chem. Res.* 1990. Vol. 23, N 9. P. 301—317.
- Shaw N., Dinglinger T. D. The structure of an acylated mannoside in the lipids of propionic acid bacteria // *Biochem. J.* 1969. Vol. 112. P. 769.
- Schiff J. A., Fankhauser H. Assimilatory sulfate reduction // *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*. 1981. P. 153—168.
- Shinohara K. et al. Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits // *Agr. Biol. Chem.* 1988. Vol. 52 (6). P. 1369—1375.
- Schleifer K. H., Plapp R., Kandler O. Glycine as crosslinking bridge in LL-diaminopimelic acid containing murein of *Propionibacterium petersonii* // *FEBS Lett.* 1968. Vol. 1, N 1. P. 287—290.
- Schleifer K. H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implication // *Bact. Revs.* 1972. Vol. 36. P. 407—477.
- Schneider Z. Comprehensive B₁₂: Chemistry, Biochemistry, Nutrition, Ecology, Medicine. Berlin; N. Y., 1987. P. 93—110.
- Schneider Z., Friedman H. C. Studies on the enzymatic dephosphorylation of vitamin B₁₂-5'-phosphate // *Arch. Biochem. Biophys.* 1972. Vol. 152. P. 488—495.
- Schofield G. M., Schaal K. P. A numeric study of members of the Actinomycetaceae and related taxa // *J. Gen. Microbiol.* 1981. Vol. 127. P. 237—259.
- Scholl K. Zur immobilisierung von *Propionibacterium shermanii*. Stuttgart, 1976.
- Schulz A. Biotechnology. Fundamentals a. Food Production with microorganisms // *Verlag Chemie*. 1983. Vol. 5. P. 15.
- Schrauzer G. N. Organocobalt chemistry in vitamin B₁₂ model compounds (cobaloximes) // *Accounts of Chemical Research*. 1968. Vol. 1, N 4. P. 97.
- Schwartz A. C. Anaerobiosis and oxygen consumption on some strains of *Propionibacterium* and a modified method of comparing the oxygen sensitivity of various anaerobes // *Zeitschrift für All. Microbiol.* 1973. Vol. 13. P. 681—691.
- Schwartz A. C. et al. Inhibition of acetate and propionate formation upon aeration of resting cells of the anaerobic *Propionibacterium shermanii*: evidence of the Pasteur reaction // *Zeitschrift für allgemeine Microbiologie*. 1976. Vol. 16, N 1. P. 123—131.
- Schwartz A. C., Sporkenbach J. The electron transport system of the anaerobic *Propionibacterium shermanii*. Cytochrome and inhibitor studies // *Arch. Microbiol.* 1975. Vol. 102. P. 261—273.
- Schwarzenberg L., Mathe G. Results obtained with active immunotherapy using *Corynebacteria* // *Corynebacterium parvum*. N. Y., London, 1975. P. 372—375.
- Seiler J. P. The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. II. Incorporation of benzimidazole into the nucleic acids of *E. coli* // *Mut. Res.* 1973. Vol. 17, N 1.
- Serzedello A., Molinari R., Lara F. J. S. Further studies on the lactic dehydrogenase from *P. pentosaceum* // *Anais. Acad. Brazil. Cienc.* 1969. Vol. 41, N 1. P. 137—140.
- Shaw N., Baddiley J. Structure and distribution of glycosyl diglycerides in bacteria // *Nature*. 1968. Vol. 217, N 5124. P. 142—144.
- Shaw N., Dinglinger J. D. The structure of an acylated mannoside in the lipids of propionic acid bacteria // *Biochem. J.* 1969. Vol. 112, N 6. P. 769—776.
- Shemin D., Bray R. C. The biosynthesis of the corrin structure of vitamin B₁₂ // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1964. Vol. 112, N 1. P. 615.

- Shemin D., Russell C. S., Abramsky T. J. The succinate-glycine cycle. I. The mechanism of pyrrole synthesis // *J. Biol. Chem.* 1955. Vol. 215, N 2. P. 613—626.
- Sherman J. M. The cause of eyes and characteristic flavour in Emmentaler or Swiss cheese // *J. Bact.* 1921. Vol. 6, N 4. P. 379—392.
- Shinohara K. et al. Antimutagenicity of dialyzates of vegetables and fruits // *Agric. Biol. Chem.* 1988. Vol. 52. P. 1369—1375.
- Shuster S. Biological purpose of acne // *Lancet.* 1976. Vol. 1. P. 1328—1329.
- Sibley J. A., Leninger A. L. Determination of aldolase in animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1949. Vol. 177, N 2. P. 859—872.
- Siewert R. Zum auftreten von blinden emmentalerkäsen. Teil 2 // *Milchforsch-Milchprax.* 1989. Bd. 1.31, N 5. S. 118—119.
- Silverman M., Werkman C. H. Vitamin B₁ in bacterial metabolism // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1938. Vol. 38. P. 823—827.
- Silverman M., Werkman C. H. Adaptation of the propionic acid bacteria to vitamin B₁ synthesis including method of assay // *J. Bact.* 1939. Vol. 38. P. 25—32.
- Simon A. Einfluss einiger faktoren auf die produktion von vitamin B₁₂ und die katalase-aktivität von kulturen des *P. shermanii* // *Zbl. Bakt. Paras. Inf. u. Hyg., Abt. II.* 1968. Bd. 122, N 2. S. 143—155.
- Siu P. M. L., Wood H. G., Stjernholm R. L. Fixation of CO₂ by phosphoenolpyruvic carboxytransferase, a carbon-dioxide fixation enzyme from propionic acid bacteria // *J. Biol. Chem.* 1962. Vol. 237. P. 3044—3051.
- Skerman V. D. D. A guide to the identification of the genera of bacteria. Baltimore, 1967.
- Skogen L. O. 1970. M. S. Thesis, Iowa State University, Ames, Iowa.
- Skogen L. O., Keenbold G. W., Vedamuthu E. R. Capsulation of Propionibacterium // *J. Milk Food Technol.* 1974. Vol. 37. P. 314—321.
- Skupin J. Interaction between methylcobalamin and some aminoacids in single cell proteins // *Abstr. III europ. Symp. on vitamin B₁₂ and intrinsic factor.* Zürich, 1979. P. 90.
- Skupin J., Pedziwilk F., Jaszowski B. Identification of CH₃B₁₂ in light sensitive corrinoid-polypeptide complex from propionic acid bacteria // *Bull. Acad. Polon. ser. sci. Biol.* 1970. Vol. 18, N 19. P. 511—515.
- Slack J. M., Gerenser M. A. Actinomyces, filamentous bacteria. Biology and pathogenicity. Minneapolis, 1975.
- Slack C. R., Hatch M. D. Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses // *Biochem. J.* 1967. Vol. 103, N 3. P. 660—665.
- Smith L. Vitamin B₁₂. Methuen. London, 1965.
- Smith R. M., Marston H. R. Production adsorption, distribution and excretion of vitamin B₁₂ in sheep // *Br. J. Nutr.* 1970. Vol. 24. P. 857—867.
- Smith R. T. Role of extracellular RNK-ase in growth of *Corynebacterium acnes* // *J. Gen. Micr.* 1969. Vol. 55. P. 433—443.
- Sobczak E., Komorowska Z. Propionic fermentation of some wastes of food industry // *Ann. Warsaw Agr. Univ. SGGW-AR. Food Technol. and Nutr.* 1984. N 16. P. 45—51.
- Sone N. The redox reactions in propionic acid fermentation // *J. Biochem.* 1972. Vol. 71, N 6. P. 931—940.
- Speedie J. D., Hull G. W. U. S. Patent, No 2,951,017, assigned to Distiller's Company Limited, 1960.
- Stackenbrandt E., Woese C. R. The evolution of prokariotes // *Molecular and cellular aspects of microbial evolution.* Cambridge, 1981. P. 1—31.
- Stadtman C. Vitamin B₁₂. Biochemical studies elucidate the role of this complex in diverse processes // *Science*, 1971. Vol. 171. N 3979. P. 859—867.
- Stasinska B. Estimation of the nutritive value of Propionic bacterial biomass proteins on application of chemical indicators // *Bull. Acad. Press. Sci.* 1977. Vol. 25, N 11. P. 711—717.

- Stevenson I. L. The fine structure of *Arthrobacter pascens* and the development of mesosomes during the growth cycle // *Can. J. Microbiol.* 1968. Vol. 14, N 9. P. 1029—1034.
- Stjernholm R. Formation of trehalose during dissimilation of glucose by *Propionibacterium* // *Acta Chem. Scand.* 1958. Vol. 12, N 4. P. 646—649.
- Stjernholm R. L., Flanders F. Metabolism of d-ribose-1-C¹⁴ and C¹⁴-labeled d-gluconate in an enzyme system of the genus *Propionibacterium* // *J. Bact.* 1962. Vol. 84, N 3. P. 563—568.
- Stjernholm R., Wood H. C. The symmetrical C₃ in the propionic acid fermentation and the effect of avidin on propionate fermentation // *Iowa State Coll. J. Sci.* 1963. Vol. 38, N 1. P. 123—140.
- Stolp H. Ernährungsphysiologische untersuchungen an anaeroben bakterien. I. Zur ernährungsphysiologie der Clostridien // *Arch. Mikrobiol.* 1955. Bd. 21. S. 273—293.
- Stolz D. R. et al. Mutagenicity screening of food. II. Results with fruits and vegetables // *Environ. Mutagen.* 1987. Vol. 6. P. 343—354.
- Stone R. W., Wood H. G., Werkman C. H. Phosphorylation and first stages in glucose breakdown by propionic acid bacteria // *J. Bact.* 1937. Vol. 33, N 1. P. 101.
- Strehler B. J., McElroy W. D. Assay of adenosine triphosphate // *Methods Enzymology.* 1957. Vol. 3. P. 871.
- Stroinski A. Cobamide dependent enzymes // *Comprehensive B₁₂*. Berlin; N. Y., 1987. P. 225—266.
- Stroinski A. Medical aspects of vitamin B₁₂ // *Comprehensive B₁₂: Chemistry, biochemistry, nutrition, ecology, medicine.* Berlin; N. Y., 1987. P. 335.
- Stupperich E., Eisinger H. J. Characterization bacterium *Sporomusa ovata* // *Forum Microbiol.* 1990. Vol. 13, N 12. P. 65.
- Swick R. W., Wood H. G. The role of transcarboxylation in propionic acid fermentation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1960. Vol. 46, N 1. P. 28—41.
- Szmigielski S. et al. Experimental immunostimulation by *Propionibacteria* // in: *Bacteria and Cancer* N. Y. 1982. P. 129—147.
- Tatum E. L. et al. Essential growth factors for propionic acid bacteria. II. Nature of the Neuberger precipitate fraction of potato. Replacement by ammonium sulfate // *J. Bact.* 1936. Vol. 32. P. 157—174.
- Taylor M. J., Richardson T. Application of microbial enzymes in food and biotechnology // *Adv. Appl. Microbiol.* 1984. Vol. 25. P. 7—35.
- Terawaki A., Greenberg J. Effect of some radiomimetic agents on deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* and transformations in *Bacillus subtilis* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1965. Vol. 95, N 1. P. 170—172.
- Thelander L., Graslund A., Thelander M. Continual presence of oxygen and iron required for mammalian ribonucleotide reduction: possible regulation mechanism // *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. Vol. 110, N 3. P. 859—865.
- Thöenii J., Allemann O. Über das vorkommen von gefärbten makroskopischen bakterienkolonien in Emmentalerkäsen // *Zbl. Bakt. Paras. Infektionkr.* 1910. Bd. 25. S. 8—30.
- Thompson R. C. The B-vitamin requirements of the propionibacteria // *J. Bact.* 1943. Vol. 46. P. 99—104.
- Titsler R. P. The influence of hydrogen ion concentration upon the growth of *Propionibacterium* // *J. Bact.* 1940. Vol. 39. P. 95—96.
- Tochey J. I., Perlman D., Barker H. A. Purification and properties of cobamide coenzymes obtained from *Propionibacterium arabinosum* // *J. Biol. Chem.* 1961. Vol. 236. P. 2119—2127.
- Tomka G. Acetoin and diacetyl production of the rod shaped propionic acid bacteria // 12 Intern. Dairy Congr. Proc. 1949. Vol. 2. P. 619—622.
- Torrev J. C. Bacteria associated with certain types of abnormal lymph glands // *J. Med. Res.* 1916. Vol. 34. P. 65—80.
- Toujas L., Dazard L., Guelfi J. Kinetics of proliferation of bonemarrow cell lines after injections of immunostimulant bacteria // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975. P. 117—125.
- Troili-Peterson G. Studien über die mikroorganismen des schwedischen gütterkäses // *Zbl. Bakt. Paras. Inf. Hyg.* 1903. Bd. II. S. 120—143.

- Troili-Peterson G. Studien über in käse gefundene glyzerinvergärende und laktat vergärende bakterien // Zbl. Bakt. Paras. Inf. Hyg. 1909. Bd. 24. S. 333.
- Tyree R. W., Clausen E., Gaddy J. L. The production of propionic acid from sugars by fermentation through lactic acid as an intermediate // J. Chem. Technol. and Biotechnol. 1991. Vol. 50, N 2. P. 157—166.
- Underwood E. J. // Trace elements in human and animal nutrition. N. Y., 1971.
- Van Demark P. J., Fukui G. M. An enzymatic study of the utilization of gluconic acid by *P. pentosaceum* // J. Bacteriol. 1956. Vol. 72, N 5. P. 610—614.
- Van de Wijngaard C., van der Drift, Vogels G. D. Involvement of a corrinoid enzyme in methanogenesis from acetate in *Methanosarcina barkeri* // Fems Micr. Lett. 1988. Vol. 52, N 3. P. 165—172.
- Van Gent-Ruijters M. L. W., de Vries W., Stouthamer A. H. Influence of nitrate on fermentation pattern, molar growth yield and synthesis of cytochrome b in *Propionibacterium pentosaceum* // J. Gen. Microbiol. 1975. Vol. 88, N 1. P. 36—48.
- Van Gent-Ruijters et al. Lactate metabolism in *Propionibacterium pentosaceum* growing with nitrate or oxygen as hydrogen acceptor // Ant. van Leenwenhoek. 1976. Vol. 42, N 3. P. 217—228.
- Van Niel C. B. The genus *Propionibacterium*. in: R. S. Breed, E. G. D. Murray, N. R. Smith (ed) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th. ed. Williams & Wilkins. Baltimore, 1974.
- Van Niel C. B. *The Propionic Acid Bacteria* // Haarlem, 1928.
- Vedamuthu E. R., Reinbold G. W. The use of candle oats jar incubation for the enumeration, characterization and taxonomic study of *Propionibacteria* // Milchwissenschaft. 1967. Bd. 22. H 7. S. 428—431.
- Veleminskij J. T., Gichner T., Pokorny V. The action of alkyl-1-nitrosoureas and 1-alkyl-3-nitroso-1-nitrosoguanidines on the M_2 generation of barley and tabidopsis thalina // Scient. Bohemose. 1967. Vol. 9, N 4. P. 249—262.
- Virtanen A. J., Karström H. Über die Propionsäuregärung // Soc. Sci. Fennica, Comment. Physic-Math. 1923. Vol. 1. P. 1—23; Vol. 2. P. 1—13.
- Vogt P., Jaakkola A. The effect of mineral elements added to finnish soils on the mineral content of cereal, potato and hay crops. Aluminium, boron, molybdenum, strontium, chromium, cobalt, lead, nickel; Acta Agric // Scand. Suppl. 1978. Vol. 20. P. 69—79.
- Volk W. A. The effect of fluoride on the permeability and phosphatase activity of *Propionibacterium pentosaceum* // J. Biol. Chem. 1954. Vol. 208. P. 777—784.
- Volk W. A. Formation of L-arabinose phosphate by extracts from *Propionibacterium pentosaceum* // Fed. Proc. 1956. Vol. 15, N 1. P. 376.
- Von Nicolai H., Hooftler U., Zilliken F. Isolation, purification and properties of neuraminidase from *Propionibacterium acnes* // Zbl. Bakt. Paras. Inf. Hyg. 1980. Bd. 247. S. 84—89.
- Vorobjeva L. I., Alekseeva M. A., Vorobjeva N. V. Characteristics of newly isolated strains of propionic acid bacteria // Proc. 4th Conf. of the E. A. C. Udine. Italy. 1990. P. 20.
- Vorobjeva L. I. et al. Antimutagenicity of propionic acid bacteria // Mutat. Res. 1991. Vol. 251, N 6. P. 233—239.
- Vorobjeva L. I. et al. Production of physiologically active compounds by propionic acid bacteria // Proc. of Third Eur. Congress on Biotechn. München. 1984. Vol. 3. P. 690—695.
- Vorobjeva L. I., Jordan E. P., Petuchova N. I. Regulation of DNA-synthesis of B_{12} -dependent ribonucleotide reductase in propionic acid bacteria // Six Int. Symp. on Actinomycetes Biology, 1985, 26—30 august. Budapest, 1985. P. 429.
- Vorobjeva L. I., Kraeva N. I. Superoxide Radicals and Antiradical defence of Propionic acid bacteria // Arch. Microbiol. 1982. Vol. 133, N 1, P. 110—113.

- De Vries W., Wijck-Karteijn W., Stouthamer A. H. Influence of oxygen on growth, cytochrome synthesis and fermentation in propionic acid bacteria // *J. Gen. Microbiol.* 1972. Vol. 71, N 3. P. 515—524.
- De Vries W., van Wijck-Karteijn W. M. C., Stouthamer A. H. Generation of ATP during cytochrome-linked anaerobic electron transport in propionic acidbacteria // *J. Gen. Micro.* 1973. Vol. 76, N 1. P. 31—41.
- De Vries W. et al. The functioning of cytochrome b in the electron transport to fumarate in *Propionibacterium freudenreichii* and *P. pentosaceum* // *Arch. Microbiol.* 1977. Vol. 112. P. 271—276.
- Vuorinen A., Mantere-Alhonen S. On trace elements in *Propionibacterium freudenreichii*-mass // *Meijeritieteell.* 1982. Vol. 40, N 2. P. 53—59.
- Wagner W., Bernhauer K. New aspects of the structure of corrinoid coenzymes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1964. Vol. 112, N 2. P. 580.
- Wagner F., Pfeiffer H., Rapp P. Statische und kontinuierliche kultur von Propionibakterien // *Zbl. Bakt. Parasiten Infekt. Hyg.*, 1968. Abt. I. Suppl. 2. S. 85—89.
- Wakayama E. J. et al. Vitamin B₁₂ levels in selected insects // *Insect Biochem.* 1984. Vol. 14. P. 175—179.
- Walerich W., Pezacka E. Ribosomal proteins share in vitamin B₁₂ biosynthesis // *Vitamin B₁₂*. Berlin, 1979. S. 345—358.
- Walker D. J., Forrest W. W. The generation and utilization of energy during growth // *Advances in Microbial Physiology*. N. Y.; London, 1971. Vol. 5. P. 213.
- Warnecke D., Schwartz A. S., Höfer M. Properties of the transport system for glucose in *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* // *Zbl. Bakteriologie*. 1982. Abt. C. Vol. 3, N 4. P. 547—548.
- Wawskiewicz E. J. Erythritol metabolism by *P. pentosaceum*. The role of L-erythrulose-1-phosphate // *Biochemistry*, 1968. Vol. 7, N 20. P. 683—687.
- Wawskiewicz E. J., Barker H. A. Erythritol metabolism by *P. pentosaceum*. The overall reactions sequence // *J. Biol. Chem.* 1968. Vol. 243, N 8. P. 1948—1956.
- Webster G. F., Cummins C. S. Use of bacteriophage typing to distinguish *Propionibacterium acnes* types I and II // *J. Clin. Micro.* 1978. Vol. 7. P. 84—90.
- Wegner W. S. et al. Alternative pathways of metabolism of short chain fatty acids // *Bact. Rev.* 1968. Vol. 32. P. 1—26.
- Weiss R. New light on bacterial DNA protection // *Sci. News*. 1991. Vol. 139. N 2. P. 21.
- Werkman C. H., Brown R. W. The propionic acid bacteria. II. Classification // *J. Bact.* 1933. Vol. 26, N 2. P. 393—417.
- Werkman C. H., Kendall H. The propionic acid bacteria. I. Classification and nomenclature // *Iowa State Coll. J. Sci.* 1931. Vol. 6, N 1. P. 17—32.
- Werkman C. H., Wood H. G. Heterotrophic assimilation of carbon dioxide // *Adv. Enzymol.* 1942. Vol. 2. P. 135—182.
- Werner H. Untersuchungen über die lipase und lecithinase-aktivität von aeroben und anaeroben *Corynebacterium* und von *Propionibacterium* arten // *Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskr. Hyg.* 1967. Vol. 204. P. 127—138.
- White R. G. The Macrophage-stimulating properties of a variety of anaerobic *Coryneforms* // *Corynebacterium parvum*. Application in Experimental and Clinical Oncology. N. Y.; London, 1975. P. 148—163.
- Wiggert W. P., Werkman C. H. Fluoride sensitivity of *Propionibacterium pentosaceum* as a function of growth conditions // *Biochem. J.* 1939. Vol. 33. P. 1061—1069.
- Wilkinson P. C. Macrophage-stimulating effects of anaerobic coryneform bacteria in vitro // *Corynebacterium parvum*. N. Y.; London, 1975.
- Wixom R. L., Joseph A. A., Hwang S. W. Studies on valin biosynthesis. VIII. Dihydroxyacid dehydratase activity in microorganisms, with diverse fermentation patterns // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1971. Vol. 137, N 1. P. 292—298.
- Winder F. G., Brennan P. J., McDonnell I. Effects of isoniazid on the composition of *Mycobacteria*, with particular reference to soluble carbohydrates and related substances // *Biochem. J.* 1967. Vol. 104, N 2. P. 385—393.

- Winkler S., Fröhlich M. Prüfung des einflusses von nisin auf die wichtigen reifungserreger beim Emmmentalerkäse // *Milchwissenschaftliche Berichte*, 1957. Vol. 7. P. 125—137.
- Wolberg G. et al. Antibody to *Corynebacterium parvum* in normal human and animal sera // *Infect. Immun.* 1977. Vol. 15. P. 1004—1007.
- Wood W. A. Fermentation of carbohydrate and related compounds // *The Bacteria*, N. Y., 1961. Vol. 2.
- Wood H. G. et al. Transcarboxylase. III. Purification and properties of methylmalonyl oxaloacetic transcarboxylase containing tritiated biotin // *J. Biol. Chem.* 1963. Vol. 238, N 2. P. 547—556.
- Wood H. G., Anderson A. A., Werkman C. H. Nutrition of the propionic acid bacteria // *J. Bact.* 1938. Vol. 36. P. 201—214.
- Wood H. G., Davis J., Willard. Phosphoenolpyruvate carboxytransphosphorylase. V. Mechanism of the reaction and the role of metal ions // *Biochemistry*, 1969. Vol. 8. P. 3145—3155.
- Wood H. G. et al. Metabolism of methylmalonyl-CoA and the role of biotin and B₁₂ coenzymes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1964. Vol. 112, N 1. P. 661.
- Wood J. M., Kennedy F. S., Rosen C. G. Synthesis of methyl-mercury compounds by extracts of methanogenic bacterium // *Nature*. 1968. Vol. 220, N 5163. P. 173.
- Wood H. G., Kulka R. G., Edson N. L. The metabolism of glucose-1-C¹⁴ in an enzyme system from *Propionibacterium* // *Biochem. J.* 1956. Vol. 63, N 2. P. 177—182.
- Wood H. G., Leaver F. W. CO₂ turnover in the fermentation of 3, 4, 5 and 6 carbon compounds by the propionic acid bacteria // *Biochim. Biophys. Acta.* 1953. Vol. 12. P. 207—222.
- Wood H. G., Stjernholm R. Transcarboxylase. II. Purification and properties of methylmalonyl-oxaloacetic transcarboxylase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1961. Vol. 47, N 3. P. 289—303.
- Wood H. G., Stone R. W., Werkman C. H. The intermediate metabolism of the propionic acid bacteria // *Biochem. J.* 1937. Vol. 31. P. 349—359.
- Wood H. G. et al. Polyphosphate kinase and polyphosphate glucokinase of *Propionibacterium shermanii* // *Phosphate Metabolism and Cell Regulation Metabolism*. 1987. P. 225—232.
- Wood H. G. et al. Phosphorylation enzymes of the propionic acid bacteria and the roles of ATP, inorganic pyrophosphate and polyphosphates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. Vol. 82, N 2. P. 312—315.
- Wood H. G., Werkman C. H. Pyruvic acid in the dissimilation of glucose by the propionic acid bacteria // *Biochem. J.* 1934. Vol. 28. P. 745—747.
- Wood H. G., Werkman C. H. The propionic acid bacteria: on the mechanism of glucose dissimilation // *J. Biol. Chem.* 1934. Vol. 105. P. 63—72.
- Wood H. G., Werkman C. H. The utilization of CO₂ in the dissimilation of glycerol by the propionic acid bacteria // *Biochem. J.* 1936. Vol. 30. P. 48—53.
- Wood H. G., Werkman C. H. Mechanism of glucose dissimilation by the propionic acid bacteria // *Biochem. J.* 1936. Vol. 30. P. 618—623.
- Wood H. G., Werkman C. H. The utilization of CO₂ by the propionic acid bacteria // *Biochem. J.* 1938. Vol. 32. P. 1262—1271.
- Wood H. G., Werkman C. H. The relationship of bacterial utilization of CO₂ to succinic acid formation // *Biochem. J.* 1940. Vol. 139. P. 365—376.
- Wood J. M., Wolfe R. S. Component required for the formation of CH₄ from methylcobalamin by extracts of *Methanobacillus omelianskii* // *J. Bacteriol.* 1966. Vol. 92. P. 696—700.
- Woolford M. K. In vitro techniques in microbiological studies of the ensiling process. Ph. D. Thesis. Edinburg, 1973.
- Woolford M. K. The significance of *Propionibacterium* species and *Micrococcus lactiliticus* to the ensiling process // *J. Appl. Bact.* 1975. Vol. 35, N 3. P. 301—306.
- Woodruff M. F. A., Boak J. L. Inhibitory effect of injection of *Cor. parvum* on the growth of tumour transplants in isogenic hosts // *Brit. J. Cancer.* 1966. Vol. 20, N 2. P. 345—355.

- Yamamoto I. et al. The effect of dietary or intraperitoneally injected seaweed preparations on the growth of sarcoma-180 cells subcutaneously implanted into mice // *Cancer Lett.* 1986. Vol. 30. P. 125—131.
- Yamamoto I. et al. Antitumour activity of crude extracts from edible marine algae against L-1210 leukemia // *Bot. Mar.* 1982. Vol. 25. P. 455—457.
- Yeliseev A. A., Bikhovskii V. Ya. Influence of light illumination on the tetrapyrrole biosynthesis by propionic acid bacteria // *Forum Mikrobiol.* 1990. Vol. 13, N 1—2. P. 58.
- Yongsmith B., Cole J. A. Cloning and expression of Propionibacterial genes in *E. coli* // *Abstracts XIV Int. Congr. Microbiol. Manchester, 1986.* P. 244.
- Yongsmith B. et al. Production of vitamin B₁₂ by immobilized cells of Propionic acid bacteria // *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1982. Vol. 16, N 1. P. 70—74.
- Yoshida Y., Yuki S. Action of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Bacillus subtilis* // *Japan J. Genetics.* 1968. Vol. 43, N 3. P. 173—179.
- Zodrow K., Stefaniak O. Effect of temperature on the growth and the production of corrinoids by Propionibacterium shermanii // *Acta Microbiol. Pol.* 1963. Vol. 12, N 4. P. 271—280.
- Zodrow K. et al. The effect of different casein hydrolysates on the growth and biosynthesis of corrinoids by Propionibacteria // *Acta microbiol. polon.* 1963. Vol. 12, N 4. P. 263—266.
- Zodrow K., Stephaniak O., Kaczmarek W. Influence of incubation temperature on the content of different corrinoids in the cells of *P. shermanii* // *Acta microbiol. polon.* 1967. Vol. 16, N 3. P. 223—226.
-

Научное издание

ВОРОБЬЕВА Лена Ивановна

ПРОПИОНОВОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ

Зав. редакцией И. И. Щехура

Художественный редактор Л. В. Мухина

Переплет художника В. А. Чернецова

Технический редактор Н. И. Матюшина

Корректоры Е. Н. Павлова, Т. С. Милякова