

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ВЫБОРУ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* K-12 И В ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ В ПРОМЫШЛЕННЫХ МАСШТАБАХ**Н.С. Плеханова¹, И.Н. Соловьева¹, А.В. Липкин²**¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия²РХТУ им Д.И. Менделеева, Россия

Штаммы *Escherichia coli* линий K-12 и В являются одними из наиболее часто используемых бактерий-хозяев для получения рекомбинантных белков в промышленных масштабах. Тем не менее, выбор *E. coli* в качестве штамма-хозяина может иметь некоторые недостатки, такие как накопление ацетата. Ацетат накапливается в некоторых условиях культивирования, сопровождается снижением биомассы и продукции целевого рекомбинантного белка, энзиматическая активность которого во многих случаях связана с посттрансляционными модификациями, в частности, с процессом ацетилирования его лизиновых остатков.

Так, например, показатели удельной активности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (ГАФД) – фермента центрального пути метаболизма в двух широко используемых штаммах *E. coli* линий K-12 и В значительно различаются. При полной идентичности аминокислотных последовательностей белков в обоих штаммах, показатель удельной активности белкового препарата ГАФД в штамме MG1655 линии K-12 на 35 % превышает удельную активность того же белка в штамме линии В.

Результаты углубленного изучения литературных данных по анализу транскриптома и протеома исследуемых штаммов показали, что транспорт глюкозы у штаммов линии K-12 более эффективен, чем у штаммов линии В. А также было показано, что уровни экспрессии генов, участвующих в метаболизме ацетата и генов глиоксилатного шунта в штамме BL21 (DE3) выше, чем в штаммах линии K12. Все это безусловно может влиять на показатели активности ферментов.

Таким образом, выбор штамма-хозяина является существенным фактором для эффективного получения рекомбинантных белков, а изучение ферментов центрального метаболизма и их регуляции имеет важное значение для оптимизации производства.

УДК 579.61

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОЗОЛЯ ГИДРОКСИДА ГАДОЛИНИЯ ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ, ОСНОВАННЫМ НА СОДЕРЖАНИИ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА В СРЕДЕ**В.С. Макулова, Л.О. Шадская, И.А. Буторова, И.А. Белова, А.С. Гродский**

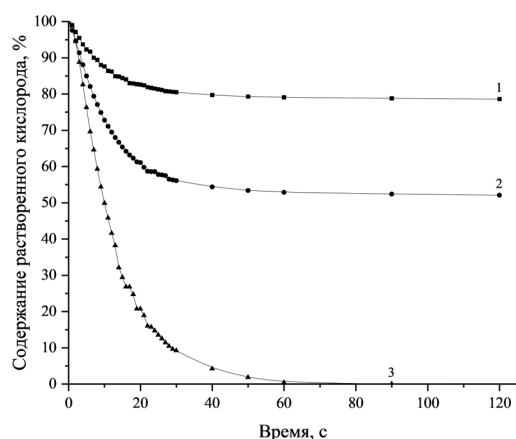
ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия

В последнее время растет устойчивость микроорганизмов к известным антимикробным препаратам, а также расширяется спектр устойчивых видов, поэтому возникает потребность в разработке новых биоцидных веществ, а также методов оценки их антимикробной активности. Большой интерес представляют экспресс-методы, так как они позволяют быстро провести оценку и отбросить неудачные варианты. Известно, что наночастицы многих металлов и их соединений, в том числе редкоземельных элементов, обладают антимикробными свойствами, зачастую отсутствующими в их макроразмерной форме. Одними из наиболее перспективных для применения в медицинских целях среди соединений редкоземельных элементов являются соединения гадолиния. В связи с этим целью данной работы являлась разработка экспресс-метода определения антимикробной активности веществ на основе содержания растворенного кислорода в среде и определение антимикробной активности гидрозоля гидроксида гадолиния данным методом. Синтез и основные коллоидно-химические характеристики гидрозоля гидроксида гадолиния описаны в работе [1].

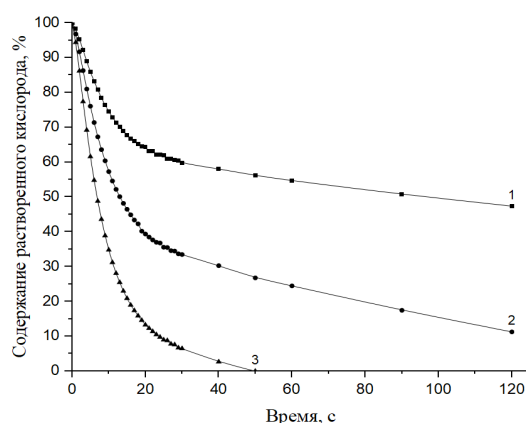
Для разработки экспресс-метода использовался многопараметровый настольный анализатор HI2020 edge (Hanna Instruments) с подключенным датчиком растворенного кислорода П 764080, который представляет собой ультратонкий полярографический электрод с ячейкой Кларка, разработанный для измерения растворенного кислорода в водных растворах.

В качестве тест-микроорганизмов при разработке метода были выбраны следующие штаммы: *Micrococcus luteus* ВКПМ-B-7845, *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ-Y-752, *Pseudomonas fluorescens* ВКПМ-B-6735, *Aspergillus niger* ВКПМ-F-1057, *Ochrobactrum ciceri* ВСБ-947 и *Rhodococcus erythropolis* ВСБ-388. На первом этапе были проведены исследования для определения условий подготовки культуры тест-микроорганизмов. С этой целью варьировали плотность посевного материала, приготовленного по шкале МакФарланда, и время предварительного культивирования. В качестве примера на рисунке 1 представлены кривые кинетики потребления растворенного кислорода в среде при добавлении 1 мл инокулята *M. luteus* и *S. cerevisiae* с плотностью 0,5, 5 и 10 по МакФарланду к 100 мл жидкой питательной среды.

На рисунке 2 представлены кривые при варьировании времени предварительного культивирования от 3 до 24 часов для различных культур при плотности инокулята 5 по стандарту МакФарланда.



(а)



(б)

Рисунок 1. Кинетика потребления кислорода *M. luteus* при времени предварительного культивирования 5 часов (а) и *S. cerevisiae* (б) при времени предварительного культивирования 24 часа, плотность инокулята соответствует: 1 – 0,5 по МакФарланду, 2 – 5 по МакФарланду, 3 – 10 по МакФарланду

Исходя из анализа совокупности полученных данных были определены условия подготовки тест-культур: плотность посевного материала – 5 по МакФарланду, время предварительного культивирования – 3–5 часов для бактерий, 24 часа для грибковых и дрожжевых культур.

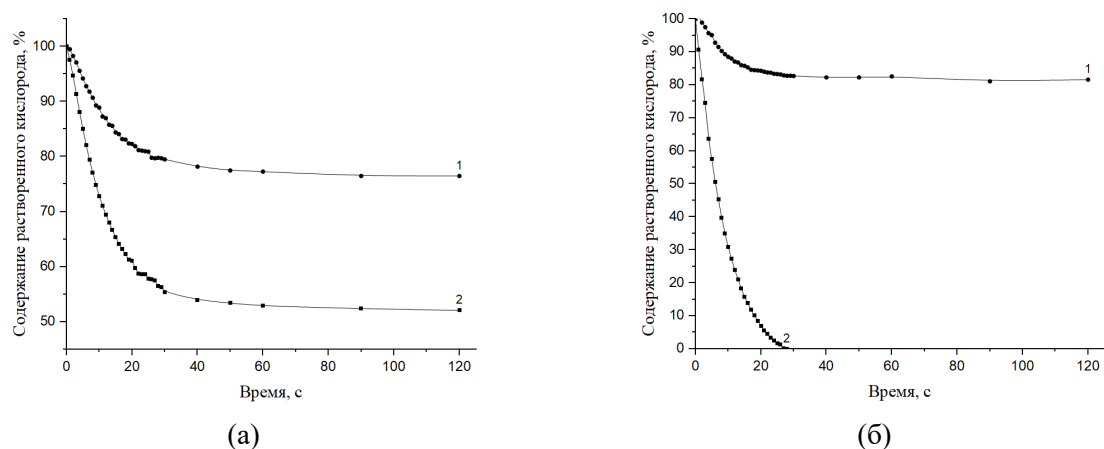


Рисунок 2. Кинетика потребления кислорода *M. luteus* (а) и *A. niger* (б) при плотности посевного материала, соответствующего стандарту 5 по МакФарланду, время предварительного культивирования: 1 – 3 ч, 2 – 5 ч для *M. luteus* и 24 ч для *A. niger*.

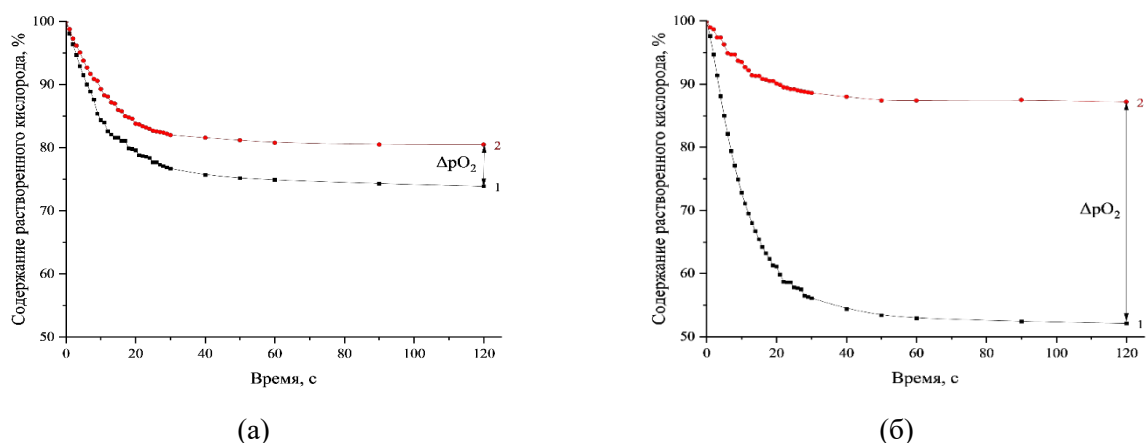


Рисунок 3. Кинетика потребления кислорода *P. fluorescens* (а) и *M. luteus* (б) при времени культивирования 5 ч и плотности инокулята 5 по стандарту МакФарланда: 1 – контрольный образец, 2 – опытный образец с добавлением ПАВ.

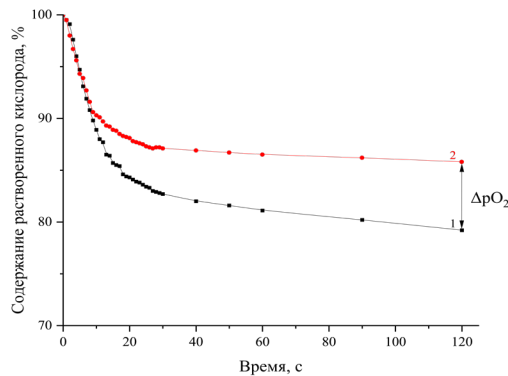
Возможность использования прибора для оценки антимикробной активности проверяли при добавлении в среду ПАВ с установленной активностью против широкого спектра микроорганизмов – тетрабутиламмония бромистого с концентрацией 0,5 масс %. В качестве критерия оценки антимикробной активности в отношении каждой исследуемой культуры определяли величину ΔpO_2 , которая представляет собой разницу между содержанием растворенного в среде кислорода в опытном и контрольном образцах за 2 мин. Чем больше данная величина, тем больше антимикробная активность в отношении взятой культуры. На рисунке 3 в качестве примера представлены кривые кинетики потребления кислорода для *P. fluorescens* и *M. luteus*. Результаты определения ΔpO_2 для всех выбранных тест-штаммов представлены в таблице 1.

Из полученных данных видно, что данный метод можно использовать для оценки антимикробной активности веществ и принять в качестве экспресс-метода для бактериальных культур.

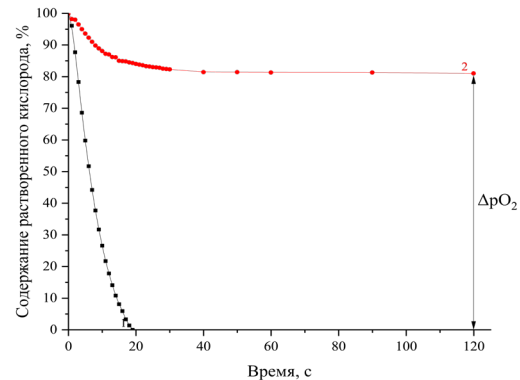
Для определения антимикробной активности гидрозоля гидроксида гадолиния разработанным экспресс-методом были выбраны следующие микроорганизмы: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Candida albicans* ВКПМ Y-3108 и *Bacillus subtilis* ВКПМ B-13183. В качестве ингибитора жизнедеятельности микроорганизмов в опытные образцы было добавлено 5 мл гидрозоля с концентрацией 52 г./л. Кривые кинетики потребления кислорода представлены на рисунке 4, рассчитанные величины ΔpO_2 – в таблице 2.

Таблица 1 – Величины ΔpO_2 , полученные при использовании в качестве ингибитора тетрабутиламмония бромистого

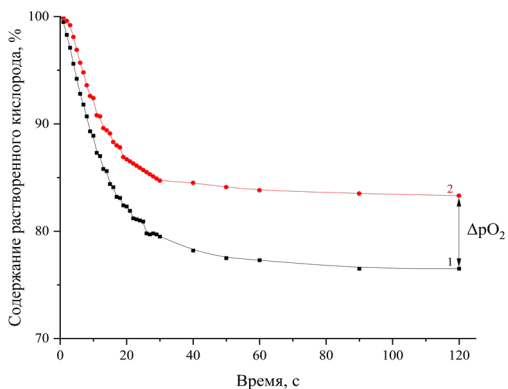
Тест-микроорганизм	fluorescens	luteus	cerevisiae	niger	ciceri	erythropolis
ΔpO_2 , %	6,6	35,1	27,2	3,8	7,6	3,1



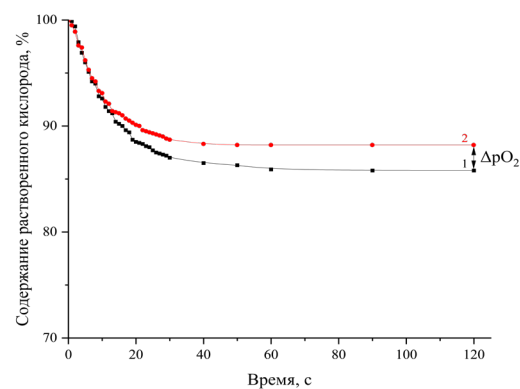
(а)



(б)



(в)



(г)

Рисунок 4. Кинетика потребления кислорода *E. coli* (а), *S. aureus* (б), *B. subtilis* (в), *C. albicans* (г) при времени культивирования 3 часа и плотности инокулята 5 по стандарту МакФарланда: 1 – контрольный образец, 2 – опытный образец с добавлением гидрозоля гидроксида гадолиния

Таблица 2 – Величины ΔpO_2 , полученные при использовании в качестве ингибитора гидрозоля гидроксида гадолиния

Тест-микроорганизм	coli	aureus	subtilis	albicans
ΔpO_2 , %	6,6	81	64,2	3,5

Как видно из представленных данных, антимикробная активность гидрозоля гидроксида гадолиния, определенная данным экспресс-методом, была обнаружена в отношении всех исследуемых тест-культур и согласуется с ранее полученным результатами определения антимикробной активности золя классическим методом серийных разведений [2].

Литература

1. Макулова В.С., Гродский А.С., Белова И.А. Электролитная коагуляция гидрозолей гидроксида гадолиния и ее механизмы // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2022. № 3. С. 20–27.
2. Макулова В.С. и др. Антимикробная активность гидрозоля гидроксида гадолиния // Актуальная биотехнология: Материалы X международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». 2022. № 1. С. 102–103. (Алушта, 12–16 сентября 2022 г.)