

УДК 57.083.1:615.322

ОПТИМИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ЭКСТРАКТОМ *Ungernia victoris*

Т. П. Перерва
А. Ю. Мирюта
А. С. Дворник
Л. П. Можилевская
В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Киев

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Оптимизация состава питательных сред считается одним из способов повышения выхода биомассы бактериальных клеток, а также целевого продукта при культивировании штаммов продуцентов всех видов и назначений. В связи с развитием биотехнологической промышленности все большее значение приобретает поиск новых компонентов питательных сред, их оптимального соотношения с базисным составом среды и соответствия свойствам культивируемого объекта.

Добавление экстракта *Ungernia victoris* к бактериальной питательной среде оптимизирует ее состав и позволяет повысить выход биомассы *E. coli*. На LB-среде статистически достоверное превышение выхода биомассы штаммов М17 и НВ101 наблюдается только для более высоких концентраций экстракта (5–10%), в то время как выход биомассы штамма JM109 повышается на всех испытанных концентрациях (0,5–10%). Наиболее высокий выход биомассы всех трех штаммов соответствует концентрации экстракта 10%. Влияние экстракта *U. victoris* на рост бактериальных штаммов на обогащенной среде отличается от его воздействия на эти же штаммы на LB-среде. Прирост биомассы происходит при низких концентрациях экстракта (0,25–1%) и не столь значителен, как на LB-среде. Начиная с концентрации экстракта от 2% и до 10% наблюдается тенденция снижения выхода биомассы для штаммов М17 и НВ101 и более низкого прироста биомассы JM109 по сравнению с концентрациями 0,25–1%. Таким образом, при помощи растительного экстракта можно достичь увеличения выхода биомассы бактерий как на бедной, так и на обогащенной среде. Оптимальное количество прибавляемого экстракта колеблется в зависимости от состава среды и особенностей объекта выращивания.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, растительные экстракты, питательные среды.

В последнее время прослеживается четкий переход от эмпирического подхода к выбору среды культивирования с использованием уже готовых наборов различных биотехнологических фирм, в частности Athena Enzyme Systems, Балтимор (США), до систем расчета, позволяющих четко определить количество и оптимальное соотношение отдельных компонентов питательной среды. В качестве примера можно привести метод Плакетт-Бермана (Plackett-Burman design), разработанный еще в 1946 г. [1] и нашедший успешное применение в наши дни [2]. Широкое распространение получил также так называемый метод поверхностного ответа (response surface method), без которого в настоящее время не обходится почти ни одна серьезная биотехнологическая работа, связанная с выращиванием бактериальных культур [3]. Метод позволяет рассчитать наиболее приемлемое количество дополнительного компонента или смеси, вносимых в питательную среду в качестве добавок. Традиционно такими

добавками выступают продукты животного происхождения — кислотные и энзиматические гидролизаты казеина, энзиматические гидролизаты мяса и препараты типа дрожжевого экстракта [4]. Вещества растительного происхождения используют не столь широко, хотя соевый гидролизат находит применение в микробиологической практике, в том числе в медицинской микробиологии, в частности для обнаружения различных O-серотипов *E. coli* в продуктах животного происхождения [5] или наработки плазмидсодержащих штаммов с целью получения рекомбинантного протеина [6]. В бактериологической диагностике коклюша также давно известна и часто применяется картофельно-глицероловая среда [7].

В то же время продукты растительного происхождения, составляющие базис целых отраслей фармакологической, косметологической и пищевой индустрии, еще недостаточно используются в микробиологической практике, несмотря на то, что в них обнаружен ряд биологически

активных веществ, обладающих антибактериальными, антивирусными, антигрибковыми, антипаразитарными, антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами [8–10].

В проведенных нами ранее исследованиях было показано, что экстракты, полученные из биомассы культивированных *in vitro* клеток некоторых лекарственных растений, также обладают антимуtagenной, антиканцерогенной и противоопухолевой активностью, тестируемой в нескольких фаговых и бактериальных системах [11–17]. Кроме обнаружения этой активности мы установили, что компоненты растительных экстрактов связываются с протеинами-поринами наружной мембраны *E. coli* [18], т. е. в соответствии с данными литературы [19, 20] те из них, размер которых не превышает 600 Да, могут проникать внутрь бактериальной клетки через поровые каналы. Биологический эффект таких веществ в этой системе легче всего отследить по изменениям роста и накоплению биомассы бактерий. В данной работе мы изучали накопление биомассы трех штаммов *E. coli* — M17, HB101 и JM109 в присутствии одного из растительных экстрактов, а именно *U. victoris*, выбранного нами, поскольку его свойства, в том числе и механизм проникновения в бактериальную клетку, были наиболее детально исследованы нами ранее [11, 13, 17, 18]. С одной стороны, повышение выхода биомассы могло бы свидетельствовать о включении в бактериальный метаболизм мелких гидрофильных компонентов растительного экстракта, а с другой — дало бы основание рассматривать растительный экстракт как добавку к питательной среде, оптимизирующую качество последней.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использованы штаммы *E. coli* M17 (колибактерин — аптечный препарат) и два лабораторных штамма JM109 — e14(McrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk⁻ mk⁺) surE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^cZΔM15] и HB101 — supE44 ara14 galK2 lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ(mcrC-mrr) HsdS⁻(r⁻ m⁻), полученных из Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино-на-Оке (Россия).

Питательные среды. Бактерии выращивали на питательной среде LB (Luria-Bertani) [21] или на обогащенной питательной среде M9 [21] следующего состава: на 1 л среды триптона — 10 г; дрожжевого экстракта — 5 г; Na₂HPO₄ — 6 г; KH₂PO₄ — 3 г; NH₄Cl — 1 г; NaCl — 0,5 г; 1M MgSO₄ — 2 мл; 1M CaCl₂ — 0,1 мл; 20% -й глюкозы — 10 мл.

Растительный экстракт прибавляли до концентрации 0,5–10% для среды Luria-Bertani и 0,25–10% для среды на солевой основе M9. Диапазон концентраций был подобран так, чтобы в него вошли как низкие концентрации (0,25–1%), наиболее приемлемые для технологического выращивания, так и высокие (2–10%), важные с точки зрения максимального влияния экстракта в составе бедной и обогащенной сред. Каждую культуру выращивали в течение 18–24 ч при 37 °С, после чего ресуспендировали в соотношении 1:100 в такой же питательной среде, распределяли по пробиркам и вносили растительный экстракт в заданных концентрациях. В качестве контроля использовали эту же бактериальную суспензию, но без экстракта. После этого все культуры выращивали в течение 18–24 ч при температуре 37 °С с аэрацией.

Растительный экстракт получали в виде 40% -й этанольной вытяжки, используя конечное соотношение спирт : биомасса — 3 : 1. Экстракт упаривали при помощи вакуумно-ротационного испарителя при температуре 40 °С почти до сухого остатка и растворяли в стерильной дистиллированной воде до исходного объема. Как источник экстракта использовали биомассу клеток *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko из семейства *Amaryllidaceae* (штамм UV-2, коллекционный № 10, ККК ИМБиГ НАН Украины, Киев) — далее экстракт *U. victoris*.

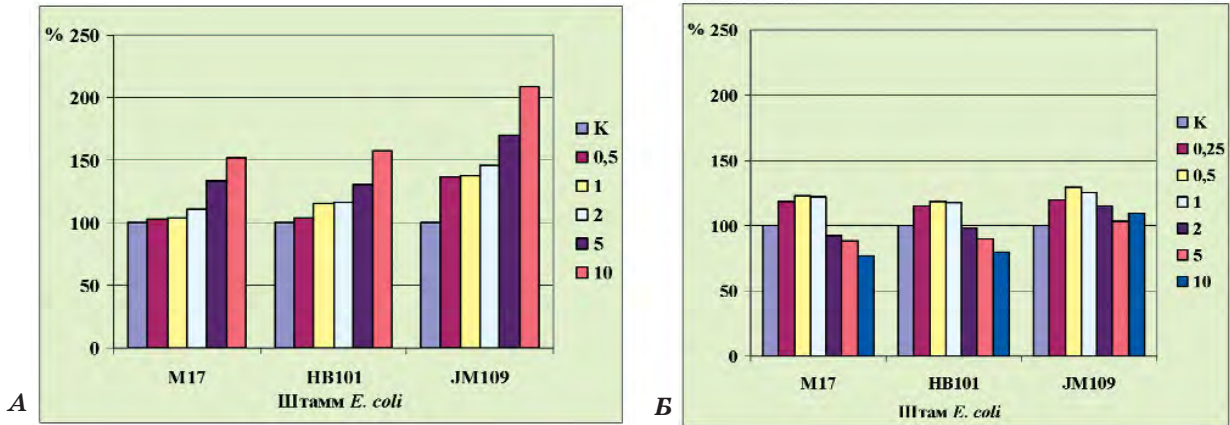
Статистическая обработка данных. Результаты опытов обрабатывали статистически на основании общепринятых методов [22].

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов по влиянию экстракта *U. victoris* на выход биомассы *E. coli* представлены на рисунке.

Как следует из приведенных данных, добавление экстракта *U. victoris* к обеим средам приводит к статистически достоверному повышению выхода биомассы всех трех использованных штаммов. Это свидетельствует о влиянии растительного экстракта на метаболизм бактерий и подтверждает возможность проникновения его компонентов внутрь неповрежденной бактериальной клетки.

Таковыми компонентами могут быть моносахариды, представленные у рода *Ungernia* галактозой, глюкозой, маннозой, арабинозой, рамнозой, а также ряд микроэлементов, в том числе Cu, Zn, Co, Mn, Mo, Al, количество которых зависит от состава почвы или искусственной питательной среды для выращивания культуры клеток *in vitro* [23].



Влияние экстракта *Ungernia victoris* на выход биомассы штаммов M17, HB101 и JM109 на среде LB (A) и на обогащенной среде на солевой основе M9 (B):

по оси ординат даны значения прироста биомассы бактериальных клеток, выраженные в % относительно контрольного варианта (К), выращенного на питательной среде без прибавления растительного экстракта. Столбики разных цветов соответствуют вариантам питательной среды с содержанием экстракта в диапазоне 0,25–10% от объема

Мелкие гидрофильные компоненты растительных экстрактов могут быть представлены также ди- и трисахаридами и аминокислотами. В предшествующей работе [18] мы показали, что экстракт *U. victoris*, полученный нашим методом, содержит протеиновых веществ 4,25 мг/мл, углеводов 15,5 мг/мл и алкалоидов 0,25 мг/мл. Молекулы массой не более 600 Да проникают в бактериальную клетку через каналы протеинов-поринов [19, 20], что влечет за собой эффекты самого различного и даже противоположного характера, например падение рецепторной активности клетки для OmpC- и OmpF-зависимых бактериофагов и повышение ее для ЛПС-зависимых. Последнее свидетельствует о включении компонентов растительного экстракта в углеводный обмен бактериальной клетки, что, очевидно, сказывается и на уровне выхода биомассы выращиваемой культуры.

Установлено, что на среде LB превышение выхода биомассы наблюдается при более высоких концентрациях экстракта для штаммов M17 и HB101 (5–10%), тогда как статистически достоверное превышение биомассы штамма JM109 происходит на всех испытанных концентрациях экстракта (от 0,5 до 10%) с тенденцией постепенного увеличения выхода от низких концентраций экстракта к высоким. Наиболее высокий выход биомассы всех трех штаммов на LB-среде соответствует концентрации экстракта *U. victoris* 10%. Такой эффект можно объяснить, очевидно, составом LB-среды, которая содержит только компоненты, необходимые для поддержания жизнедеятельности бакте-

рий, но в ней отсутствуют источники углерода и буферной системы; обогащение такой среды существенно повышает ее способность обеспечивать прирост бактериальной биомассы. Что касается разницы, наблюдаемой в ответе штамма JM109 по сравнению со штаммами M17 и HB101, то наиболее вероятно, что она обусловлена особенностями генетической структуры и физиологическими свойствами этих штаммов.

Влияние экстракта *U. victoris* на рост бактериальных штаммов на обогащенной среде отличается от его воздействия на эти же штаммы на LB-среде. Прирост биомассы наблюдается при низких концентрациях экстракта (0,25–1%) и не столь значителен, как на LB-среде. Начиная с концентрации экстракта от 2% и до 10% прослеживается тенденция снижения выхода биомассы для штаммов M17 и HB101 и более низкий прирост биомассы JM109 по сравнению с концентрациями 0,25–1%. Этот результат подтверждает многочисленные данные, согласно которым существует некий оптимум насыщения среды питательными компонентами, превышение которого быстро приводит к угнетению роста культуры из-за накопления в среде продуктов ее жизнедеятельности [24]. Интересно, что, как и на LB-среде, штамм JM109 более активно накапливает свою биомассу, что указывает на связь этого показателя с эффектом обогащения питательной среды и генетической организацией выращиваемого объекта.

Несмотря на то, что в данной работе мы отслеживаем только прирост биомассы, а не наработку целевого протеина, есть достаточ-

ные основания считать, что эти два параметра хорошо коррелируют между собой. Так, сравнение выхода биомассы клеток и рекомбинантного протеина вируса Денге на средах LB, TB (триптонный бульон), SB (бульон на соевом гидролизате) и TY (триптон + дрожжевой экстракт) показало, что повышение выхода целевого протеина четко соответствует приросту клеточной биомассы на единицу объема среды [6].

Таким образом, при помощи растительного экстракта можно достичь увеличения

выхода биомассы многих бактериальных штаммов на средах разнообразного состава, хотя очевидно, что оптимальное количество прибавляемого экстракта будет колебаться в зависимости от состава базисной среды и особенностей объекта выращивания.

Исходя из полученных в настоящей работе данных, можно предположить также, что не только экстракт *U. victoris*, но и другие растительные экстракты способны оказывать стимулирующее влияние на рост многих бактериальных культур и могут успешно использоваться в промышленной микробиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Plackett R. L., Burman J. P. The design of optimum multifactorial experiments // *Biometrika*. — 1946. — V. 33, N 4. — P. 305–322.
2. Deshmukh D. V., Puranik P. R. Application of Plackett-Burman design to evaluate media components affecting antibacterial activity of alkaliphilic *Cyanobacteria* isolated from Loran lake // *Turk. J. Biochem.* — 2010. — V. 35, N 2. — P. 114–120.
3. Adinarayana K., Ellaiyah P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp* // *J. Pharmaceut. Sci.* — 2002. — V. 5, N 3. — P. 272–278.
4. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. — М.: Мир, 1967. — 367 с.
5. Catarama T. M. G., O'Hanlon K. A., Duffy G. et al. Optimization of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* 0111 and 026 from minced beef // *J. Appl. Microbiol.* — 2003. — V. 95. — P. 949–957.
6. Tripathi N. K., Shrivastva A., Biswal K. S., Lakshmana Rao P. V. Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli* // *Industr. Biotechnol.* — 2009. — V. 5, N 3. — P. 179–183.
7. Лабинская А. С. Практическое руководство по микробиологическим методам исследования. — М.: Гос. издат. мед. лит., 1963. — 463 с.
8. Hayatsu H., Negishi T., Arimoto S. Dietary inhibitors against mutagenesis and carcinogenesis // *Proc. Third Intern. Conf. Mech. Antimutag. Anticarcin.* — Plenum Press, New York. — 1993. — P. 387–418.
9. Ikken Y., Morales P., Maetinez A. et al. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test // *J. Agr. Food Chem.* — 1999. — V. 47. — P. 3257–3264.
10. Negi P. S., Jayaprakasha G. K., Jena B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts // *Food Chem.* — 2003. — V. 80. — P. 393–397.
11. Дворник А. С., Перерва Т. П., Кунах В. А. Скрининг препаратів, отриманих із культури тканин лікарських рослин, на антимутагенну активність у системі *Escherichia coli* — бактеріофаг λ // *Цитология и генетика*. — 2002. — Т. 36, № 2. — С. 3–10.
12. Мирюта Г. Ю., Дворник А. С., Можилевська Л. П., Перерва Т. П. Вивчення біологічної активності рослинних екстрактів у системі трансформації *Escherichia coli* плазмідною ДНК // *Biopolymers and Cell*. — 2003. — V. 19, N 6. — С. 525–529.
13. Дворник А. С., Перерва Т. П., Можилевська Л. П., Кунах В. А. Вивчення активності рослинних екстрактів у системі нестабільних мутантів *Escherichia coli* // *Цитология и генетика*. — 2004. — Т. 38, № 4. — С. 9–13.
14. Мирюта А. Ю., Перерва Т. П., Можилевська Л. П., Кунах В. А. Влияние экстракта культивируемых клеток *Ungernia victoris* и катионов некоторых металлов на эффективность трансформации клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК // *Там же*. — 2005. — Т. 39, № 6. — С. 34–40.
15. Перерва Т. П., Мирюта А. Ю., Можилевская Л. П. Бактериальная тест-система для первичного скрининга препаратов на антиканцерогенную и антимутагенную активность // *Вісник Укр. т-ва генетиків і селекціонерів*. — 2007. — Т. 5, № 1–2. — С. 55–61.
16. Перерва Т. П., Дворник А. С., Мирюта А. Ю. и др. Бактериальная тест-система для первичного скрининга веществ с потенциальной противоопухолевой активностью // *Цитология и генетика*. — 2007. — Т. 41, № 4. — С. 59–65.
17. Мирюта А. Ю., Перерва Т. П. Биологическая активность экстракта *Ungernia victoris* в системе CaCl_2 — трансформации *Escherichia coli* в присутствии модуляторов кальциевых каналов // *Там же*. — 2008. — Т. 42, № 4. — С. 45–48.
18. Перерва Т. П., Мирюта А. Ю., Мойса Л. Н. и др. Взаимодействие растительных экстрактов *Ungernia victoris*, *Rhodiola rosea* и *Polyscias filicifolia* с бактериальной клеткой // *Там же*. — 2010. — Т. 44, № 4. — С. 34–40.
19. Nicaido H., Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability // *Microbiol. Rev.* — 1985. — P. 1–32.
20. Benz R., Bauer K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-ne-

- gative bacteria. Review on bacterial porins // Eur. J. Biochemistry. — 1988. — V. 176. — P. 1–19.
21. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
22. Плохинский Н. А. Биометрия. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. — 367 с.

23. Хамидходжаев С. А. Лекарственные растения рода унгернии в Средней Азии // «ФАН» Узб. ССР. — 1982. — 148 с.
24. Lee S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* // Trends Biotechnol. — 1996. — V. 14, N 1. — P. 98–105.

ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ЕКСТРАКТОМ *Ungernia victoris*

Т. П. Перерва, Г. Ю. Мирюта,
А. С. Дворник, Л. П. Можилевська,
В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України, Київ

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Оптимізація складу живильних середовищ вважається одним із засобів підвищення виходу біомаси бактеріальних клітин, а також цільового продукту при культивуванні штамів продуцентів усіх видів і призначень. У зв'язку з розвитком біотехнологічної промисловості дедалі більшого значення набуває пошук нових компонентів живильних середовищ, їх оптимального співвідношення з базисним складом середовища і відповідності властивостям культивованого об'єкту.

Додавання екстракту *Ungernia victoris* до бактеріального живильного середовища оптимізує його склад і дає змогу підвищити вихід біомаси *E. coli*. На LB-середовищі статистично достовірне перевищення виходу біомаси штамів M17 та HB101 спостерігається тільки для вищих концентрацій екстракту (5–10%), тоді як вихід біомаси штаму JM109 підвищується на всіх випробуваних концентраціях (0,5–10%). Найвищий вихід біомаси всіх трьох штамів відповідає концентрації екстракту 10%. Вплив екстракту *U. victoris* на ріст бактеріальних штамів на збагаченому середовищі відрізняється від його впливу на ці самі штами на LB-середовищі. Приріст біомаси відбувається за низьких концентрацій екстракту (0,25–1%) і не такий значний, як на LB-середовищі. Починаючи з концентрації екстракту від 2% і до 10% спостерігається тенденція зниження виходу біомаси для штамів M17 та HB101 і нижчого приросту біомаси JM109 порівняно з концентраціями 0,25–1%. Таким чином, за допомогою рослинного екстракту можна досягти підвищення виходу біомаси бактерій як на бідному, так і на збагаченому середовищі. Оптимальна кількість доданого екстракту коливається залежно від складу середовища та особливостей об'єкта вирощування.

Ключові слова: *Escherichia coli*, рослинні екстракти, живильні середовища.

OPTIMIZATION OF BACTERIAL NUTRIENT MEDIA BY *Ungernia victoris* EXTRACT

T. P. Pererva, A. Yu. Miryuta,
A. S. Dvornik, L. P. Mozhylevskaya,
V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Optimization of culture media is considered to be one of the ways to increase biomass output of bacterial cells as well as a base product at cultivation of all types and purposes.

In connection with the development of the biotechnology industry, search of the new components of nutrient solution and their optimum ratio with the base composition of the medium and corresponding properties of the cultivated object is becoming increasingly important.

Addition of *Ungernia victoris* extract to bacterial nutrient medium optimizes its composition and enables to increase production of *E. coli* biomass. Statistical reliable exceeding of biomass production of M17 and HB101 strains in LB medium occurs only at higher concentrations of extract (5–10%) while biomass production of JM109 strain increases at all tested concentrations (0,5–10%). The highest biomass yield of all three strains corresponds to extract concentration of 10%. The influence of *U. victoris* extract on growth of bacterial strains in enriched medium differs from its influence on the same strains in LB medium. Biomass increase happens at low concentrations of extract (0.25–1%) and it is not such significant as its increase in LB medium. Starting with extract concentration from 2% and to 10%, the tendency towards biomass decrease for M17 and HB101 strains and lower biomass increase for JM109 strain as compared with 0.25–1% concentrations takes place. Thus, it is possible to get improvement of bacterial biomass production by means of plant extract using both poor and enriched medium. Optimal quantity of the added extract fluctuates depending on medium composition and peculiarities of object of growth.

Key words: *Escherichia coli*, plant extracts, nutrient media.