

ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *Escherichia coli* ОБОГАЩЕНИЕМ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДОБАВКОЙ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Т. П. Перерва¹

Ю. А. Кобозев²

Л. Н. Мойса²

А. С. Дворник¹

А. Ю. Мирюта¹

Л. П. Можилевская¹

В. А. Кунах¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Киев

²ЧАО НПК «Диапроф-Мед», Киев

E-mail: tpererva@ukr.net

Получено 16.06.2011

Добавление экстракта лекарственного растения *Ungernia victoris* в бактериальную питательную среду существенно повышает выход биомассы клеток и целевого протеина штаммов ITG-1 (продуцент рекомбинантного NH₂-концевого фрагмента β-галактозидазы) и ITG-71Δ (продуцент рекомбинантного химерного полипептида с иммунологическими свойствами ВИЧ-протеина Env-1).

При использовании относительно бедной среды LB низкие концентрации экстракта (0,25, 0,5 и 1%) стимулирующего эффекта не обеспечивают. В то же время присутствие экстракта в более высоких концентрациях (2,0, 5,0 и 10%) способствует повышению уровня биомассы и увеличению объема содержания целевого протеина на единицу объема среды у обоих штаммов.

Результаты опытов, проведенных с использованием среды LB, показывают потенциальную способность экстракта *U. victoris* повышать конечный выход целевого продукта за счет двух механизмов — повышения выхода биомассы и возрастания процентного содержания рекомбинантного полипептида в тотальном клеточном протеине.

В отличие от результатов, полученных на среде LB, на обогащенной среде, обычно используемой для промышленного культивирования штаммов-продуцентов, концентрации экстракта 2,0, 5,0 и 10% не только не стимулируют, но даже демонстрируют устойчивую тенденцию к угнетению конечного выхода биомассы и целевого полипептида. При этом добавление экстракта *U. victoris* к обогащенной среде в более низких концентрациях (0,25–1%) приводит, как правило, к значительному увеличению выхода целевых протеинов обоих штаммов.

Полученные данные соответствуют полученным нами ранее для бесплазмидных штаммов и подтверждают общие закономерности, согласно которым добавление экстракта лекарственного растения в высоких концентрациях к обедненной, а в низких — к обогащенной среде способствует существенному повышению выхода биомассы и целевого рекомбинантного протеина на единицу объема среды культивирования.

Ключевые слова: рекомбинантный протеин, *E. coli*, экстракт *Ungernia victoris*, питательные среды.

Развитие биотехнологии тесно связано с производством рекомбинантных полипептидов, используемых в медицине, фармакологии и сельском хозяйстве. Сочетание технологии рекомбинантных ДНК с интенсивным выращиванием бактериальных культур сделало возможным выход целевого продукта в количествах, существенно превосходящих получение его из природных источников. *E. coli*, как один из наиболее полно охарактеризованных микроорганизмов, оказалась

достаточно широко используемым микроорганизмом-хозяином для производства протеинов, не требующих посттрансляционной модификации. Поскольку успех ферментации в значительной степени определяется составом среды выращивания, одним из способов повышения выхода рекомбинантных протеинов при культивировании штаммов-продуцентов считается оптимизация питательных сред. С этой целью как в обедненные, так и в обогащенные питательные

среды вносят добавки либо неопределенного состава (гидролизаты продуктов животного происхождения) [1], либо индивидуальные вещества (энзимы, микроэлементы, аминокислоты) [2–4]. Перспективным представляется также использование биологически активных веществ и комплексов, источником которых могут быть продукты растительного происхождения. В микробиологической практике достаточно широко применяют соевый гидролизат [5, 6] и картофельно-глицероловую среду [7] — для обнаружения бактериальной контаминации, наработки рекомбинантных штаммов и дифференциальной диагностики инфекционных заболеваний. В связи с тем, что в последнее время большое значение придается проблемам биоэтики, защиты прав животных и охраны окружающей среды, вопрос альтернативного использования растительных продуктов для изготовления бактериальных питательных сред обсуждается все шире [8]. Особенно перспективными добавками к бактериальным питательным средам могут быть экстракты лекарственных растений, у которых обнаружена различная биологическая активность, проявляющаяся как в эукариотических, так и в прокариотических системах [9–11]. В предшествующей работе [12] мы показали стимулирующее влияние экстракта лекарственного растения *Ungernia victoris* на накопление биомассы трех бесплазмидных штаммов *E. coli* и высказали предположение, что подобное влияние возможно и в отношении синтеза целевого полипептида, кодируемого последовательностью, встроенной в рекомбинантную плазмиду. В настоящей работе изучено и сопоставлено влияние экстракта *U. victoris* в качестве добавки к двум различным питательным средам на накопление биомассы клеток и выход целевого продукта в одном и том же эксперименте.

Материалы и методы

Бактерии. В работе использованы плазмидные, ампициллинустойчивые, температуроиндуцибельные штаммы: ITG-1 — продуцент рекомбинантного N-концевого фрагмента β-галактозидазы [13] и ITG-71Δ — продуцент рекомбинантного химерного полипептида с иммунологическими свойствами ВИЧ-протеина Env-1 [14]. Оба штамма являются собственностью НПЖ «Диапроф-Мед».

Питательные среды. Используются среды LB (Лурия–Бертани) и обогащенная среда на солевой основе M9 [15].

Жидкая обогащенная среда содержала (на 1 л): триптона — 10 г; дрожжевого экстракта — 5 г; Na₂HPO₄ — 6 г; KH₂PO₄ — 3 г; NH₄Cl — 1 г; NaCl — 0,5 г; 1 М MgSO₄ — 2 мл; 1 М CaCl₂ — 0,1 мл; 20%-й глюкозы — 10 мл.

Растительный экстракт добавляли в концентрации от 0,25 до 10%. Как и в предыдущей работе [12], диапазон концентраций был подобран так, чтобы в него вошли как низкие концентрации (0,25–1%), обычно считающиеся наиболее приемлемыми для технологического выращивания, так и высокие (2–10%), представляющие интерес с точки зрения максимального влияния экстракта в составе обедненной и обогащенной сред.

Растительный экстракт. Растительный экстракт получали в виде 40%-й этанольной настойки. Конечное соотношение спирт:биомасса составляло 10:1. Экстракт упаривали при помощи вакуумно-ротационного испарителя при температуре 40 °С почти до сухого остатка и растворяли в стерильной дистиллированной воде до исходного объема. В качестве источника экстракта использовали биомассу клеток унгернии Виктора (*Ungernia victoris* Vved ex Artjuschenko) из семейства *Amaryllidaceae* (штамм UV-2, коллекционный №10 ККК ИМБиГ НАН Украины, Киев).

Процедура выращивания культур. Из материала производственных криоконсервированных аликвот обоих штаммов — ITG-1 и ITG-71Δ — получали отдельные колонии на твердой питательной среде с добавлением экстракта *U. victoris*; контрольные варианты выращивали на среде, не содержащей экстракта. С каждой из чашек отбирали по наиболее крупной колонии и переносили в пробирку, которая содержала 4 мл среды с концентрацией экстракта, соответствующей концентрации в чашке, а колонию с чашки без экстракта вносили соответственно в пробирку со средой без экстракта (контроль). Ампициллин добавляли до конечной концентрации 200 мкг/мл. Культуры выращивали на шейкере в течение ночи, в режиме 170 об/мин при 32 °С. На следующий день 80 мкл полученного инокулята вносили в 4 мл свежей среды с добавлением экстракта до соответствующей концентрации. Культуры выращивали в тех же условиях до достижения ими средней фазы логарифмического роста и проводили индукцию биосинтеза целевых полипептидов путем инкубации пробирок с культурами на водяной бане при 42–44 °С в течение 30 мин.

В дальнейшем культуры выращивали при 37 °С в течение 4 ч.

Электрофорез протеинов проводили в 12%-м полиакриламидном геле [16]. Расположение полос, соответствующих целевым полипептидам, показано на рисунке.

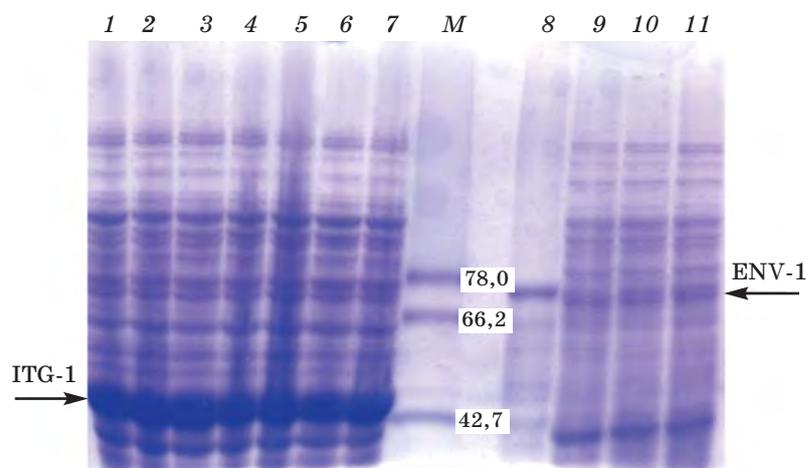
Процентное содержание целевых полипептидов в суммарном клеточном протеине определяли с помощью специализированного программного продукта для молекулярной биологии Scion Image.

Статистическая обработка данных.

Результаты опытов обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента [17].

Результаты и обсуждение

Исходя из того, что на более бедной питательной среде стимулирующий эффект биологической добавки должен проявляться полнее, для первых экспериментов была выбрана среда LB как относительно бедная по составу. Установлено, что на этой среде низкие концентрации экстракта (0,25, 0,5 и 1%) стимулирующего эффекта не обеспечивают. В то же время присутствие экстракта в более высоких концентрациях (2,0, 5,0 и 10%) способствовало повышению биомассы и увеличению общего содержания целевого протеина на единицу объема среды у обоих штаммов (табл. 1).



Электрофореграмма полипептидов индуцированных биомасс штамма *E. coli* ITG-1 — продуцента рекомбинантного протеина β-галактозидазы (треки 1–7) и растворенных в 8 М мочеvine телец включений штамма *E. coli* ITG-71Δ — продуцента рекомбинантного аналога протеина оболочки *env1* ВИЧ-1 (треки 9–11); 8 — хроматографически очищенный протеин *env1* ВИЧ-1; M — протеины-маркеры молекулярных масс (Merck, №4); стрелками обозначены целевые протеины. Электрофорез проводили в 10% -м ПААГ-SDS

Таблица 1. Влияние высоких концентраций экстракта *Ungernia victoris* на выход биомассы и целевого полипептида штаммов — продуцентов ITG-1 и ITG-71Δ на среде LB

Штамм	Концентрация экстракта, %	Количество опытов, n	Конечная ОП ₆₀₀ культуры, % от контроля, M±m	Отношение удельного содержания целевого полипептида опыт/контроль, M±m	Конечное содержание целевого полипептида на ед. объема, % от контроля, M±m
ITG-1	2	4	114,53 ± 1,30*	1,22 ± 0,03	139,32 ± 2,93***
	5	3	128,80 ± 3,85*	1,07 ± 0,01	137,32 ± 4,02**
	10	2	145,94 ± 0,46**	0,86 ± 0,08	125,13 ± 5,08*
ITG-71Δ	2	3	119,85 ± 1,52*	1,22 ± 0,23	146,54 ± 7,40**
	5	4	126,82 ± 3,78**	1,04 ± 0,11	130,50 ± 10,69*
	10	4	142,32 ± 8,70**	1,22 ± 0,15	173,16 ± 6,85**

Примечание: * — P < 0,05; ** — P < 0,01; *** — P < 0,001 — уровни достоверного различия между опытным и контрольным вариантом (в этой и следующих таблицах).

Таким образом, результаты опытов, проведенных с использованием среды LB, показали принципиальную способность экстракта *U. victoris* повышать конечный выход целевого продукта за счет либо повышения выхода биомассы, либо возрастания процентного содержания рекомбинантного полипептида в тотальном клеточном протеине.

Следующую серию опытов выполняли на обогащенной среде, обычно используемой для промышленного культивирования большинства штаммов-продуцентов. Схема исследования была идентична применяемой на среде LB как в отношении подготовки инокулята, так и первоначально используемых концентраций экстракта. В отличие от результатов, полученных на среде LB, экстракт в концентрациях 2,0, 5,0 и 10% не только не повышает, но даже понижает конечное содержание целевого протеина на единицу объема питательной среды (табл. 2). Хотя это понижение не имеет статистически достоверного характера, совокупность полученных результатов отражает

устойчивую тенденцию к угнетению конечного выхода целевого продукта высокими концентрациями растительной добавки на обогащенной среде. Подобный результат был получен также в работе [2], где авторы показали более высокую эффективность добавок в составе бедных сред по сравнению с обогащенными.

Поскольку на обогащенной среде высокие концентрации экстракта *U. victoris* не дали желаемого эффекта, а также в связи с тем, что такие концентрации добавок (2,0–10%) применительно к крупномасштабному культивированию не считаются технологичными, было изучено влияние более низких (0,25–1%) концентраций экстракта на культуру, выращиваемую на обогащенной среде. Результаты этого изучения показаны в табл. 3.

Как следует из представленных данных, добавление экстракта *U. victoris* к обогащенной среде в концентрации 0,25–1% приводит (в большинстве опытов) к значительному и статистически достоверному увеличению

Таблица 2. Влияние высоких концентраций экстракта *Ungernia victoris* на выход биомассы и целевого полипептида штаммов — продуцентов ITG-1 и ITG-71Δ на обогащенной среде

Штамм	Концентрация экстракта, %	Количество опытов, <i>n</i>	Конечная ОП ₆₀₀ культуры, % от контроля, <i>M±m</i>	Отношение удельного содержания целевого полипептида опыт/контроль, <i>M±m</i>	Конечное содержание целевого полипептида на ед. объема, % от контроля, <i>M±m</i>
ITG-1	2	3	97,85 ± 1,93	0,91 ± 0,06	89,64 ± 7,34
	5	3	91,22 ± 5,97	0,91 ± 0,03	83,18 ± 4,46
	10	1	113,41	0,83	94,13
ITG-71Δ	2	2	87,87 ± 5,52	0,84 ± 0,19	74,45 ± 16,25

Таблица 3. Влияние низких концентраций экстракта *Ungernia victoris* на выход биомассы и целевого полипептида штаммов — продуцентов ITG-1 и ITG-71Δ на обогащенной среде

Штамм	Концентрация экстракта, %	Количество опытов, <i>n</i>	Конечная ОП ₆₀₀ культуры, % от контроля, <i>M±m</i>	Отношение удельного содержания целевого полипептида опыт/контроль, <i>M±m</i>	Конечное содержание целевого полипептида на ед. объема, % от контроля, <i>M±m</i>
ITG-1	0,25	3	109,98 ± 6,70	1,42 ± 0,19	157,72 ± 27,39
	0,5	9	118,84 ± 6,95*	1,21 ± 0,14	146,99 ± 18,93*
	1	8	115,14 ± 3,76*	1,26 ± 0,14	148,17 ± 20,19*
ITG-71Δ	0,25	3	112,29 ± 16,90	1,29 ± 0,33	41,26 ± 29,59*
	0,5	3	143 ± 17,75	0,96 ± 0,04	136,18 ± 10,75*
	1	4	138,34 ± 29,49	0,96 ± 0,01	133,09 ± 30,02

выхода целевых протеинов обоих штаммов. В двух случаях (0,25% экстракта, штамм ITG-1, и 1% экстракта, штамм ITG-71Δ) отсутствие достоверности повышения выхода целевого полипептида можно объяснить значительным разбросом результатов в отдельных опытах.

В целом, результаты настоящей работы соответствуют полученным нами ранее дан-

ными для бесплазмидных штаммов *E. coli* M17, JM109 и HB101, что свидетельствует о наличии общих закономерностей, согласно которым добавление экстракта лекарственного растения в высоких концентрациях к обедненной и в низких концентрациях к обогащенной среде способствует значительному повышению количества биомассы и целевого рекомбинантного протеина на единицу объема среды культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kurbanoglu E. B., Algur O. F.* A new medium from rat horn hydrolysate for enumeration of aerobic bacteria // *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* — 2004. — V. 28. — P. 343–350.
2. *Olsan J. B., Lord C. C., McCarthy P. J.* Improved recoverability of microbial colonies from marine sponge samples // *Microb. Ecol.* — 2000. — V. 40, N 2. — P. 139–147.
3. *Ordax M., Bioska E. G., Lopez M. M., Marco-Noales E.* The addition of copper sulphate to a non-selective medium improves the recovery of plant associated bacteria: *Erwinia amylovora* as a model // *Proceedings of the II International Conference on Environmental, Industrial and Applied microbiology (Biomicroworld 2007, Seville, Spain)*. Antonio Mendes — Vilas Eds. — 2009. — P. 92–95.
4. *Aredes Fernandez P. A., Saguir F. M., Manca de Nadra M. C.* Effect of amino acids and peptides on growth of *Pediococcus pentosaceus* from wine // *Lat. Amer. Appl. Res.* — 2003. — V. 33. — P. 225–229.
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. C., Lakshmana Rao P. V.* Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli* // *Indust. 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. *Mosher R., Crawford K., Lukowiak.* A soy-based alternative to traditional bacterial nutrient media // *Amer. Biol. Teach.* — 2009. — V. 71, N 1. — P. 49–51.
9. *Harbone J. B.* Classes and functions of secondary products from plants // *Brown D. E. and Walton N. J. (eds).* Chemical from plants perspective on plant secondary products. Imperial college Press (Lond.). — 1999. — 436p.
10. *Gambari R.* Predictive analysis of biological effects of natural products. From plant extracts to Biomolecular laboratory and computer modeling // *Evidence-based complementary and alternative medicine.* — V. 2011, article ID 383290, 4 pages, 2011, doi: 10.1093/ecam/nep 096.
11. *Кузьмина Н. С., Слепян Л. И., Марченко А. Л.* Количественное определение гликопептидов в препаратах *Panax ginseng* и *Polyscias filicifolia (Araliaceae)* // *Раст. ресурс.* — 2008. — Т. 44, вып. 4. — С. 140–149.
12. *Перерва Т. П., Мирюта А. Ю., Дворник А. С. и др.* Оптимизация бактериальных питательных сред экстрактом *Ungernia victoris* // *Биотехнология.* — 2011. — Т. 4, № 4. — С. 59–63.
13. *Мойса Л. Н., Чиляков В. А.* Математическое моделирование кривых роста штамма *Escherichia coli* — продуцента рекомбинантного белка β-галактозидазы // *Biopolymers and Cell.* — 2004. — Т. 20, № 6. — С. 524–529.
14. *Мойса Л. Н., Грабченко Н. И.* Применение логистической модели роста для оптимизации условий биосинтеза рекомбинантного белка gp41-N-β-галактозидаза в экспрессирующей системе *E. coli* / *Матер. III съезда Об-ва генет. селекц. им. Н. И. Вавилова.* — М., 2004. — С. 395.
15. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
16. *Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж.* Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
17. *Плохинский Н. А.* Биометрия. — М.: Мир, 1970. — 367 с.

**ПІДВИЩЕННЯ ПРОДУКТИВНОСТІ
РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ
Escherichia coli ЗБАГАЧЕННЯМ
ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА
ДОМШКОЮ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ**

Т. П. Перерва¹, Ю. А. Кобозев², Л. Н. Мойса²,
А. С. Дворник¹, Г. Ю. Мирюта¹,
Л. П. Можилевська¹, В. А. Кунах¹

¹Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України, Київ
²ПрАТ НВК «Діапроф-Мед», Київ

E-mail: tpererva@ukr.net

Збагачення екстрактом лікарської рослини *Ungernia victoris* бактеріального живильного середовища істотно підвищує вихід біомаси клітин та цільового протеїну штамів ITG-1 (продуцент рекомбінантного NH₂-кінцевого фрагмента β-галактозидази) і ITG-71Δ (продуцент рекомбінантного химерного поліпептиду з імунологічними властивостями ВІЛ-протеїну Env-1).

У разі використання відносно бідного середовища LB низькі концентрації екстракту (0,25, 0,5 і 1%) стимульовального ефекту не забезпечують. Водночас присутність екстракту в більш високих концентраціях (2,0, 5,0 та 10%) сприяє підвищенню рівня біомаси та збільшенню загального вмісту цільового протеїну на одиницю об'єму середовища в обох штамів.

Результати дослідів, проведених з використанням середовища LB, показують потенціальну здатність екстракту *U. victoris* підвищувати кінцевий вихід цільового продукту за рахунок двох механізмів — збільшення виходу біомаси та росту відсоткового вмісту рекомбінантного поліпептиду в тотальному клітинному протеїні.

На відміну від результатів, отриманих на середовищі LB, на збагаченому середовищі, яке зазвичай використовують для промислового культивування штамів-продуцентів, концентрації екстракту 2,0, 5,0 та 10% не тільки не стимулюють, але навіть демонструють стійку тенденцію до пригнічення кінцевого виходу біомаси та цільового поліпептиду. При цьому додавання екстракту *U. victoris* до збагаченого середовища в нижчих концентраціях (0,25–1%) як правило, зумовлює значне збільшення виходу цільових протеїнів обох штамів.

Отримані дані відповідають одержаним нами раніше для безплазмідних штамів і підтверджують загальні закономірності, згідно з якими додавання екстракту лікарської рослини в високих концентраціях до збідненого, а в низьких — до збагаченого середовища сприяє істотному підвищенню виходу біомаси та цільового рекомбінантного протеїну на одиницю об'єму середовища культивування.

Ключові слова: рекомбінантний протеїн, *E. coli*, екстракт *Ungernia victoris*, живильне середовище.

**INCREASING OF *Escherichia coli*
RECOMBINANT STRAINS PRODUCTIVITY
BY MEANS OF NUTRIENT MEDIUM
ENRICHMENT WITH ADDITION
OF PLANT ORIGIN**

T. P. Pererva¹, Yu. A. Kobozev², L. N. Moisa²,
A. S. Dvornik¹, A. Yu. Miryuta¹,
L. P. Mozhylevska¹, V. A. Kunakh¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
²RPC JSC «DiaProf-Med», Kyiv

E-mail: tpererva@ukr.net

Addition of medicinal plant *Ungernia victoris* extract to bacterial nutrient medium rises significantly yield of cell biomass and target protein of strains ITG-1 (producer of recombinant NH₂-terminal fragment of β-galactosidase) and ITG-71Δ (producer of recombinant chimerical polypeptide with immunological properties of HIV protein Env-1).

When relatively poor LB medium is used, low concentrations of extract (0.25, 0.5 and 1%) do not ensure effect of stimulation. At the same time the presence of extract in higher concentrations (2.0, 5.0 and 10%) acts to rise further increasing of biomass level and total content of target protein on unit of medium volume for both strains.

So the results of experiments carried with use of LB medium demonstrate principle ability of *U. victoris* extract for raising final yield of target product at the expense of two mechanisms — increase of biomass yield and growth of percentage of recombinant polypeptide in total cell protein.

Unlike the results obtained in LB medium, extract of 2.0, 5.0 and 10% concentrations in enriched medium that is in use usually for industrial cultivation of strains-producers demonstrates even stable tendency to inhibition of final yield of biomass and target polypeptide aside from stimulate. For all that addition of *U. victoris* extract to enriched medium in more low concentrations (0.25–1%) results as a rule in significant yield increasing of target proteins for both strains.

Data obtained correspond to our data received earlier for plasmidless strains and prove general regularities according to that ones addition of medicinal plant extract in high concentrations to poor medium and in low concentrations to enriched one facilitates significant rise of biomass and target protein yields per unit volume of cultivation medium.

Key words: recombinant protein, *E. coli*, *Ungernia victoris* extract, nutrient media.