

## РОЗДІЛ VI. МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 577.112.083 + 571.27

### ВЛИЯНИЕ ДОБАВОК РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ К ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА УРОВЕНЬ БИОСИНТЕЗА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА БАКТЕРИЯМИ *ESCHERICHIA COLI*

<sup>1,2</sup>Галкин А.Ю., <sup>3</sup>Горшунов Ю.В., <sup>1</sup>Бесараб А.Б., <sup>2</sup>Луценко Т.Н., <sup>4</sup>Гришина А.С.

<sup>1</sup>Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт»  
03056, Украина, Киев, просп. Победы, 37

<sup>2</sup>ООО «УА «ПРО-ФАРМА»  
03115, Украина, Киев, ул. М. Котельникова, 1

<sup>3</sup>Научно-исследовательский и конструкторско-технологический институт  
городского хозяйства  
03035, Украина, Киев, ул. Урицкого, 35

<sup>4</sup>Университет Маккуори  
2109, Австралия, Сидней, NSW

alexft@mail.ua

Получены данные о возможности оптимизации питательных сред для культивирования рекомбинантных бактерий путем внесения добавок в виде некоторых растительных экстрактов. Доказано стимулирующее действие экстрактов кливии киноварной (корневища, корни и листья) и зефирантеса крупноцветного (луковицы) в качестве добавок в питательную среду при культивировании рекомбинантной бактерии *Escherichia coli* (на примере продуцента рекомбинантного белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* молекулярной массой 60 кДа) в диапазоне 0,5-1,0%. При внесении в питательную среду аналогичных концентраций экстракта фиалки трехцветной (травя) не было зафиксировано заметного воздействия на ростовые и биосинтетические характеристики бактерий. Увеличение концентрации экстрактов до 5,0% приводило к угнетению роста и биосинтетической активности. Биологически активные вещества исследованных экстрактов взаимодействуют с поверхностными структурами бактериальной клетки, а именно с поринами и порин-подобными белками: OmpC и OmpF (экстракт кливии киноварной), OmpA, OmpC и OmpF (экстракт зефирантеса крупноцветного). Такие вещества, как углеводы и минеральные соли, содержащиеся в экстрактах растений, не оказывают существенного влияния на уровень экспрессии различных поринов и порин-подобных белков кишечной палочкой. Механизм данного взаимодействия с большой долей вероятности связан с конкуренцией веществ растительного происхождения за связывание с клеточными рецепторами на поверхности бактериальной клетки.

*Ключевые слова:* рекомбинантный белок, *E. coli*, питательная среда, экстракт, кливия киноварная, зефирантес крупноцветный, фиалка трехцветная

### ВПЛИВ ДОБАВОК РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ ДО ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ НА РІВЕНЬ БИОСИНТЕЗУ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА БАКТЕРІЯМИ *ESCHERICHIA COLI*

<sup>1,2</sup>Галкін О.Ю., <sup>3</sup>Горшунов Ю.В., <sup>1</sup>Бесараб О.Б., <sup>2</sup>Луценко Т.М., <sup>4</sup>Гришина А.С.

<sup>1</sup>Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»  
03056, Україна, Київ, просп. Перемоги, 37

<sup>2</sup>ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА»  
03115, Україна, Київ, вул. М. Котельникова, 1

<sup>3</sup>Науково-дослідний та конструкторсько-технологічний інститут міського господарства  
03035, Україна, Київ, вул. Урицького, 35

<sup>4</sup>Університет Маккуорі  
2109, Австралія, Сідней, NSW

alexft@mail.ua

Отримано дані про можливість оптимізації поживних середовищ для культивування рекомбінантних бактерій шляхом внесення добавок у вигляді деяких рослинних екстрактів.

Доведено стимулюючу дію екстрактів квіви кіноварної (кореневища, коріння і листя) і зефірантесу великоквіткового (цибулини) як добавок у живильне середовище при культивуванні рекомбінантів бактерії *Escherichia coli* (на прикладі продуцента рекомбінантного білка теплового шоку *Chlamydia trachomatis* молекулярною масою 60 кДа) в діапазоні 0,5-1,0%. При внесенні в живильне середовище аналогічних концентрацій екстракту фіалки триколірної (трава) не було зафіксовано помітного впливу на ростові і біосинтетичні характеристики бактерії. Збільшення концентрації екстрактів до 5,0% призводило до пригнічення росту та біосинтетичної активності. Біологічно активні речовини досліджених екстрактів взаємодіють з поверхневими структурами бактеріальної клітини, а саме з поринами та порино-подібними білками: OmpC і OmpF (екстракт квіви кіноварної), OmpA, OmpC і OmpF (екстракт зефірантесу великоквіткового). Такі речовини, як вуглеводи і мінеральні солі, що містяться в екстрактах рослин, що не мають істотний вплив на рівень експресії різних поринів і порино-подібних білків кишковою паличкою. Механізм такої взаємодії з великою часткою ймовірності пов'язаний з конкуренцією речовин рослинного походження за зв'язування з клітинними рецепторами на поверхні бактеріальної клітини.

*Ключові слова:* рекомбінантний білок, *E. coli*, живильне середовище, екстракт, квіва кіноварна, зефірантес великоквітковий, фіалка триколірна

### EFFECT OF PLANT SUPPLEMENTS TO NUTRIENT MEDIA ON BIOSYNTHESIS OF RECOMBINANT PROTEIN BY *ESCHERICHIA COLI*

<sup>1,2</sup>Galkin O.Yu., <sup>3</sup>Gorshunov Yu.V., <sup>1</sup>Besarab O.B., <sup>2</sup>Lutsenko T.M., <sup>4</sup>Grishyna A.S.

<sup>1</sup>National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"

03056, Ukraine, Kyiv, Peremohy av., 37

<sup>2</sup>"UA "PRO-PHARMA" LLC

03115, Ukraine, Kyiv, M. Kotelnikov st., 1

<sup>3</sup>Research, Design and Technology Institute of Urban Development

03035, Ukraine, Kyiv, Urytskogo st., 35

<sup>4</sup>Macquarie University

2109, Australia, Sydney, NSW

alexft@mail.ua

Optimization of composition of culture media is an urgent task of modern biotechnology. The response surface method is the most common methodological approaches used to determine the amount and the optimum ratio of the individual components of culture media.

This method is effective for the establishment of optimal amounts of additional components that are most often of animal origin, such as casein and meat hydrolysates; less commonly used herbal supplements. It should be noted that for biotechnology of recombinant proteins optimization of nutrient medium problem is even more relevant as more significantly affect the technical and economic indicators of technology.

Recent scientific reports suggests the possibility of the effective use of plant extracts as a bacterial cell growth promoters, as well as the synthesis of certain products by bacteria, including recombinant proteins. That is why we focused on usage of extracts of several plants in the composition of the culture medium during cultivation of *Escherichia coli* to increase the yield of recombinant proteins, namely: *Clivia miniata*, *Zephyranthes grandiflora*, and *Viola tricolor* extracts. For the preparation of plant extracts we used *Clivia miniata* (rhizomes, roots and leaves), *Zephyranthes grandiflora* (bulbs) and *Viola tricolor* L. (grass).

The plant material was ground in a laboratory mill to a particle size of 3-5 mm. To prepare extract we used the ratio raw: extractant (ethyl alcohol 40%) of 1:5. The extraction was performed at room temperature by two-stage fractional maceration (duration of one cycle of the extraction was 12 hours). The extracts were evaporated using a vacuum rotary evaporator at 40 °C to dryness, dissolved in distilled water to the original volume. We used LB medium (0.5% yeast extract, 1.5% tryptone, 0.5% NaCl); with the addition of antibiotic kanamycin (50 mcg/ml). Biosynthesis of recombinant heat shock protein of *Chlamydia trachomatis* molecular mass of 60 kDa was conducted in *E. coli* bacterial system. *E. coli* cells strain BL21 (DE3) were transformed with a vector rET42a/ChtHSP-60. Recombinant plasmid contains the full length insert HSP-60 gene, which is regulated by transcription promoter lac-operon. The plasmid contains a gene Kan, the sequence encoding the enzyme glutathione-S-transferase and T7 transcriptional terminator.

Culturing was carried out at a constant temperature of 37°C, using biosynthesis inducer isopropyl-β-thiogalactoside in a concentration of 0.3 mM, the duration is 3 hours biosynthesis. Biomass density was determined photometrically at 600 nm. Electrophoretic analysis of biomass and proteins was performed in 15% polyacrylamide gel in the presence of 1% SDS. Scanning stained polyacrylamide gels and calculation of the target protein was determined using the software TotalLab 1.10. We used the following bacteriophages: T7, λ, Oх2, Oх2h12, TuIb and T2. Plating efficiency in the presence of bacteriophages extracts (experiment) compared to control (without crops extract) was determined by counting the negative

colonies on Petri dishes. In an experimental embodiment extracts a volume of 0.1 ml was inoculated into 5.0 ml of molten top layer, 0.1 ml and 0.1 ml of the phage liquid culture *E. coli*, mixed and poured into a cup with the bottom layer of 1.8% agar LB-medium. In the control variant crops made in the same way but instead of the extract were added 0.1 ml of physiological solution of NaCl.

Results crops into account the next day. The data on the possibility of optimizing the culture medium for culturing the recombinant bacteria by introducing supplements in the form of certain plant extracts. It has been proven stimulatory effect of extracts of *Clivia miniata* (rhizomes, roots and leaves) and *Zephyranthes grandiflora* (bulbs) as additives in the culture medium by culturing of recombinant *Escherichia coli* (producer of recombinant 60 kDa heat shock protein of *Chlamydia trachomatis*, as an example) in the range 0.5-1.0%. When entering into the culture medium of similar concentrations of *Viola tricolor* (grass) extract there have been no significant impact on the growth and biosynthetic characteristics of bacteria. Increasing the concentration of the extract to 5.0% leads to inhibition of growth and biosynthetic activity. Biologically active substances of studied extracts interact with the bacterial cell surface structures, namely porines and porine-like proteins: OmpC and OmpF (*Clivia miniata* extract), OmpA, OmpC and OmpF (*Zephyranthes grandiflora* extract). Substances such as carbohydrates and mineral salts contained in extracts of plants, do not have a significant impact on the level of expression of different porines and porine-like proteins of *Escherichia coli*. The mechanism of this interaction will most likely associate with competition phytosubstances for binding to cell receptors on the surface of the bacterial cell.

*Keywords: recombinant protein, E. coli, culture medium, extract, Clivia miniata, Zephyranthes grandiflora, Viola tricolor*

## ВВЕДЕНИЕ

Вопросы оптимизации состава питательных сред остаются актуальной задачей современной биотехнологии. К числу наиболее распространенных методических подходов, используемых для определения количества и оптимального соотношения отдельных компонентов питательных сред, относится метод поверхностного ответа (response surface method) [1]. Данный метод является эффективным для установления оптимальных количеств дополнительных компонентов, которыми чаще всего выступают вещества животного происхождения, например, гидролизаты казеина и мяса; реже используются добавки растительного происхождения. Следует отметить, что для биотехнологических процессов получения рекомбинантных белков задачи оптимизации состава питательных сред представляются еще более актуальными, поскольку более остро влияют на технико-экономические показатели технологии. Как известно, к качеству рекомбинантных белков медицинского назначения предъявляются жесткие требования, обуславливающие более громоздкие схемы очистки, в рамках которых выход очищенного продукта может быть невелик [2-4].

Работы разных авторов свидетельствуют о возможности эффективного применения растительных экстрактов в качестве стимуляторов роста бактериальных клеток, а также синтеза бактериями определенных продуктов, в т.ч. и рекомбинантных белков [5-7]. Анализ упомянутых выше литературных источников привел нас к мысли о целесообразности оценки применения экстрактов следующих растений в составе питательной среды при культивировании *Escherichia coli* для увеличения выхода различного рода рекомбинантных белков, а именно: экстракта кливии киноварной *Clivia miniata*, экстракта зефирантеса крупноцветого *Zephyranthes grandiflora* и фиалки трехцветной *Viola tricolor* L. Первые два растения принадлежат к семейству амариллисовых, а последнее – к семейству фиалковых.

Целью работы было изучение влияние экстрактов трех растений (*Clivia miniata*, *Zephyranthes grandiflora*, *Viola tricolor* L.) на рост различных штаммов *E. coli* и уровень биосинтеза ими рекомбинантных белков, а также изучение возможных механизмов взаимодействия веществ растительного происхождения с бактериальной клеткой.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

*Приготовление и оценка растительных экстрактов.* Для приготовления растительных экстрактов использовали: кливию киноварную *Clivia miniata* (корневища, корни и листья), зефирантес крупноцветный *Zephyranthes grandiflora* (луковицы) и фиалку трехцветную *Viola tricolor* L. (трава). Растительное сырье было измельчено на лабораторной мельнице ЛЗМ-1 до частиц размером 3-5 мм. Для приготовления экстракта использовали соотношение сырье : экстрагент (спирт этиловый 40%) равное 1 : 5. Экстракцию проводили при комнатной температуре методом дробной двухэтапной мацерации (длительность одного цикла экстракции – 12 часов). Экстракты упаривали при помощи вакуумного ротационного испарителя при температуре 40 °С до сухого остатка, растворяли дистиллированной водой до исходного объема. Количество белка в экстрактах определяли фотоколориметрически биуретовым методом [9]. Определение количественного содержания полисахаридов в экстракте проводили гравиметрическим методом [10], содержание флавоноидов (в пересчете на рутин) – спектрофотометрическим методом [11], а содержание алкалоидов (в пересчете на ликорин) – фотометрическим методом [12].

*Питательная среда.* В работе использовали питательную среду LB (0,5% дрожжевого экстракта, 1,5% триптон, 0,5% NaCl); в среду добавляли антибиотик канамицин (50 мкг/мл).

*Экспрессия рекомбинантного белка.* Биосинтез рекомбинантного белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* молекулярной массой 60 кДа (rHSP-60) проводили в бактериальной системе *E. coli*. Клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) были трансформированы вектором pET42a/ChtHSP-60. Рекомбинантная плаزمида pET42a/ChtHSP-60 была сконструирована на основе экспрессирующего вектора pET42a(+) (Novagen, США), содержит полноразмерную вставку гена HSP-60, транскрипция которого регулируется помотором lac-оперона. Плазмида содержит ген Kan, последовательность, кодирующая фермент глутатион-S-трансферазу и T7 терминатор транскрипции [8]. Культивирования проводили при постоянной температуре 37°C, используя индуктор биосинтеза изопропил-β-тиогалактозид в концентрации 0,3 ммоль, продолжительность биосинтеза составляла 3 часа. Плотность биомассы определяли фотометрически при 600 нм.

*Электрофорез и денситометрия.* Электрофоретический анализ биомасс и белков проводили в 15% полиакриламидном геле в присутствии 1% додецилсульфата натрия в трис-трициновий буферной системе [13]. Сканирование окрашенных полиакриламидных гелей и расчет содержания целевого белка определяли с помощью программного обеспечения TotalLab 1.10.

*Бактериофаги.* В работе использовали следующие бактериофаги: T7, λ, Oх2, Oх2h12, Tu1b и T2. Эффективность посева бактериофагов в присутствии экстрактов (опыт) по сравнению с контролем (посевы без экстрактов) определяли подсчетом отрицательных колоний на чашках Петри. В опытном варианте экстракты в объеме 0,1 мл вносили в 5,0 мл расплавленного верхнего слоя, добавляли 0,1 мл фага и 0,1 мл жидкой культуры *E. coli*, перемешивали и выливали на чашку с нижним слоем 1,8%-ной агаризованной LB-среды. В контрольном варианте посевы делали таким же образом, но вместо экстракта вносили 0,1 мл физиологического раствора NaCl. Результаты посевов учитывали на следующий день.

Результаты опытов обрабатывали статистически на основе общепринятых методов с использованием некоторых принципов дисперсионного анализа [14]. Статистическую значимость различий между группами данных оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и F-теста, используя для критерия Фишера выражение

$$F_d = \frac{(M_1 - M_2)^2 (n_1 + n_2 - 2)}{C_1 + C_2} \cdot \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2},$$

где  $F_d$  – критерий достоверности разности по Фишеру;  $M_1$  и  $M_2$  – средние значения для двух выборок;  $n_1$  и  $n_2$  – объемы первой и второй выборок;  $C_1$  и  $C_2$  – случайная (внутригрупповая) дисперсия в однофакторном дисперсионном комплексе, сумма квадратов центральных отклонений дат ( $V$ ) от своей частной средней  $M_1 : C_2 = \sum (V - M_i)^2$ . Рассчитанное значение критерия Фишера  $F_d$  сравнивали со стандартным значением  $F_{st}$ , которое находили с помощью специальных таблиц для двух степеней свободы, первая из которых всегда равна единице ( $V_1 = 1$ ), а вторая – сумме объемов двух выборок минус два ( $V_2 = n_1 + n_2 - 2$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью характеристики полученных растительных экстрактов проводили определение содержания определенных групп биологически активных веществ: белков, углеводов, алкалоидов (для экстрактов кливии киноварной и зефирантеса крупноцветного) и флавоноидов (для экстракта фиалки трехцветной). Выбор упомянутых веществ для характеристики растительных экстрактов был произведен по результатам анализа литературных данных по фармакогностическому изучению соответствующих растений [15-19]. Результаты фитохимической характеристики растительных экстрактов приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Фитохимическая характеристика растительных экстрактов

Биологически активные вещества	Экстракты растений		
	кливии киноварной	зефирантеса крупноцветного	фиалки трехцветной
Белки, %	0,42	0,88	0,74
Углеводы, %	0,51	0,70	0,78
Алкалоиды (в пересчете на ликорин), %	0,05	0,07	—*
Флавоноиды (в пересчете на рутин), %	—*	—*	0,29

Примечание: \* параметр не определяли.

Для оценки влияния растительных экстрактов (диапазон концентраций 0,1-5,0%) на рост клеток *E. coli* штамма BL21 (DE3) и уровень синтеза им гHSP-60 проводили измерения концентрации бактериальных клеток на момент окончания культивирования и содержание растворимой формы целевого продукта (рекомбинантного HSP-60 *Ch. trachomatis*) в культуральной жидкости. Результаты соответствующих исследований приведены в табл. 2.

Следует отметить, что для всех трех исследуемых растительных экстрактов наблюдалась корреляция зависимостей оптической плотности культур и содержания растворимой формы рекомбинантного белка от концентрации экстракта в питательной среде. Наиболее выраженное стимулирующее влияние на накопление биомассы и содержание растворимой формы гHSP-60 было характерно для экстракта зефирантеса крупноцветного в концентрации 0,5-1,0%. Более слабое усиление роста бактериальной культуры и накопления рекомбинантного продукта было зафиксировано при внесении в питательную среду экстракта кливии киноварной в финальной концентрации 0,5%. Внесение экстракта фиалки трехцветной в диапазоне концентраций 0,1-1,0% достоверно не влияло ни на уровень накопления биомассы, ни на уровень биосинтеза целевого белка. В то же время для всех трех исследованных экстрактов было зафиксировано ингибирующее влияние на рост и биосинтетические свойства высокой концентрации экстрактов (5,0%).

Таблица 2 – Влияние различных концентраций растительных экстрактов на выход биомассы и рекомбинантного белка rHSP-60

Концентрация экстракта, %	Концентрация культуры в опыте*, о.е. (ОГ <sub>600</sub> )	Соотношение концентрации культуры в опыте к контролю	Содержание растворимой формы rHSP-60 в опыте*, мг/мл	Соотношение содержания растворимой формы rHSP-60 в опыте к контролю
Экстракт кливии киноварной				
0,1	2,55	1,02**	0,49	1,04**
0,5	3,15	<b>1,25***</b>	0,58	<b>1,23***</b>
1,0	2,90	1,16**	0,48	1,02**
5,0	2,45	0,98**	0,43	0,91**
Экстракт зефирантеса крупноцветного				
0,1	2,49	0,99**	0,49	1,04**
0,5	3,44	<b>1,37***</b>	0,61	<b>1,30***</b>
1,0	3,38	<b>1,35***</b>	0,60	<b>1,28***</b>
5,0	2,22	0,88**	0,39	0,83**
Экстракт фиалки трехцветной				
0,1	2,47	0,98**	0,47	1,00**
0,5	2,58	1,03**	0,46	0,98**
1,0	2,45	0,98**	0,46	0,98**
5,0	2,31	0,92**	0,35	0,74**

Примечания. \* Среднее значение параметра по результатам трех исследований. \*\* Уровень достоверного различия между результатами опыта и контроля составляет  $P < 0,05$ . \*\*\* Уровень достоверного различия между результатами опыта и контроля составляет  $P < 0,01$ .

Поскольку предыдущие исследования показали эффективность экстрактов кливии киноварной и зефирантеса крупноцветного в качестве добавок в питательную среду при культивировании *E. coli* – продуцента рекомбинантного HSP-60 *Ch. trachomatis*, то было целесообразно исследовать механизмы, обуславливающие соответствующую биологическую активность фитоэкстрактов. В работах [6, 7] было установлено, что при взаимодействии с клетками *E. coli* экстракта растения *Ungernia victoris* по крайней мере одна из мишеней находится в плазматической мембране бактериальной клетки. Поэтому отправной точкой для наших дальнейших исследований было предположение о возможности взаимодействия компонентов растительных экстрактов с поверхностными структурами *E. coli*.

Для изучения механизмов такого взаимодействия нами был использован метод, подобный фаготипированию бактерий, и позволяющий оценить структурно-физиологическое состояние клеточной стенки бактерии при ее взаимодействии с веществами различного происхождения [6]. В случае наличия взаимодействия между исследуемыми веществами и определенными поверхностными структурами бактерии (в частности, липополисахаридом и белками наружной мембраны клеточной оболочки) будет наблюдаться снижение уровня адсорбций бактериофагов на поверхности клетки и, соответственно, уменьшение

эффективности посева бактериофагов. Поскольку адсорбция бактериофагов происходит специфическим образом, при взаимодействии с известными поверхностными структурами бактериальной клетки, то данный подход может предоставить ценную информацию о молекулярных механизмах взаимодействия растительных экстрактов с клетками *E. coli*.

При планировании данных экспериментов нами были выбраны шесть бактериофагов, которые имеют различные молекулярные мишени на поверхности *E. coli*, а именно: T7 (абсорбируется на липополисахариде),  $\lambda$  (абсорбируется на белке LamB), Oх2 (абсорбируется на белке OmpA), Oх2h12 (абсорбируется на белках OmpA и OmpC), TuIb (абсорбируется на белке OmpC) и T2 (абсорбируется на белке OmpF) [20-24]. Результаты изучения влияния растительных экстрактов на эффективность посева различных бактериофагов представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Влияние растительных экстрактов на эффективность посева бактериофагов

Происхождение экстракта	Бактериофаги						F-тест
	T7	$\lambda$	Oх2	Oх2h12	TuIb	T2	
Кливия киноварная	98 ± 6	105 ± 6	98 ± 5	86 ± 7	82 ± 5	88 ± 5	$\beta > 0,95$
Зефирантес крупноцветный	102 ± 8	102 ± 4	106 ± 8	69 ± 4	80 ± 4	87 ± 4	$\beta > 0,95$

Примечание: в таблице приведены средние значения и их стандартные отклонения ( $M \pm m$ ), в процентах, относительно контроля; каждый опыт выполнен в 4-х повторностях.

По полученным результатам исследуемые бактериофаги можно условно разделить на две группы: I – бактериофаги T7,  $\lambda$  и Oх2, II – бактериофаги Oх2h12, TuIb и T2. Для бактериофагов I группы среднее значение эффективности посева составляет  $102 \pm 6\%$ , а II группы –  $82 \pm 5\%$ , что свидетельствует о наличии статистически достоверных различий между данными группами бактериофагов (при оценке по t-критерию Стьюдента –  $P < 0,01$ , и F-критерию Фишера –  $\beta > 0,95$ ).

Отметим, что для каждого растительного экстракта также были зафиксированы статистически достоверные различия эффективности посева бактериофагов I и II групп. Значит, можно утверждать, что в присутствии экстрактов кливии киноварной и зефирантеса крупноцветного бактериофаги Oх2h12, TuIb и T2 достоверно снижают эффективность посева по сравнению с контролем. Как известно, рецепторы данных бактериофагов входят в группу поринов внешней мембраны оболочки *E. coli* [20-24]. Скорее всего, снижение эффективности посева для данных бактериофагов происходит из-за взаимодействия веществ, содержащихся в растительных экстрактах, с фаговыми рецепторами бактериальной клетки.

Интересные результаты были получены при исследовании влияния экстракта зефирантеса крупноцветного на взаимодействие бактерии с бактериофагом Oх2h12 по сравнению с аналогичными результатами для бактериофага TuIb. Как известно, первый из них (Oх2h12) имеет два клеточных рецептора – белки OmpA и OmpC, в то время как бактериофаг TuIb взаимодействует только с белком OmpC. Поскольку снижение эффективности посева для бактериофага Oх2h12 ( $69 \pm 4\%$ ) было более выраженным по сравнению с аналогичным результатом для бактериофага TuIb ( $80 \pm 4\%$ ), то можно предположить, что вещества экстракта зефирантеса крупноцветного взаимодействуют с обоими белками-рецепторами *E. coli* – OmpA и OmpC, в отличие от экстракта кливии киноварной, для которого эффективность посева бактериофага Oх2h12 была статистически более высокой, а результаты для бактериофага TuIb при исследовании обоих экстрактов были сопоставимыми.

Следует отметить, что наиболее вероятным представляется именно механизм конкуренции веществ растительного происхождения за связывание с клеточными рецепторами. К такому выводу можно прийти, анализируя результаты исследования других авторов [25-27] относительно механизмов экспрессии белков OmpA, OmpC и OmpF клеткой *E. coli*. Изменение в соотношении экспрессии данных белков может наблюдаться при наличии в питательной среде избыточных (больших) количеств хлоридов натрия и калия (300 ммоль), а также углеводов, в частности сахарозы (600 ммоль). Учитывая результаты собственных фитохимических исследований (табл. 1) и данные литературы [15-18], невозможно прийти к выводу о наличии в исследуемых растительных экстрактах критических количеств данных биологически активных веществ для изменения соотношения экспрессии белков OmpA, OmpC и OmpF кишечной палочкой. Отметим, что не следует полностью исключать вероятность того, что другие вещества растительных экстрактов влияют на соотношение экспрессии белков-рецепторов бактериофагов.

Дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение влияния растительных экстрактов на биосинтез других рекомбинантных белков, а также отработку условий культивирования рекомбинантных бактерий на оптимизированной питательной среде в промышленных масштабах.

### ВЫВОДЫ

Было доказано стимулирующее действие экстрактов кливии киноварной и зефирантеса крупноцветного в качестве добавок в питательную среду при культивировании рекомбинантной бактерии *E. coli* (на примере продуцента рекомбинантного белка теплового шока *Chlamydia trachomatis* молекулярной массой 60 кДа) в диапазоне 0,5-1,0%. Аналогичные концентрации экстракта фиалки трехцветной не оказывали заметного воздействия на ростовые и биосинтетические характеристики бактерии. Увеличение концентрации экстрактов до 5,0% приводило к угнетению роста и биосинтетической активности.

Биологически активные вещества исследованных экстрактов взаимодействуют с поверхностными структурами бактериальной клетки, а именно поринами и порин-подобными белками: OmpC и OmpF (экстракт кливии киноварной), OmpA, OmpC и OmpF (экстракт зефирантеса крупноцветного). Такие вещества, как углеводы и минеральные соли, содержащиеся в экстрактах растений, не оказывают существенное влияние на уровень экспрессии различных поринов и порин-подобных белков кишечной палочкой. Механизм данного взаимодействия с большой долей вероятности связан с конкуренцией веществ растительного происхождения за связывание с клеточными рецепторами на поверхности бактериальной клетки.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Adinarayana K. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. / K. Adinarayana, P. Ellaiyah // *J. Pharmaceutical Sci.* – 2002. – Vol. 5(3). – P. 272-278.
2. Методы получения рекомбинантных белков-цитокинов. II. Эффективный метод выделения, очистки и ренатурации рекомбинантного  $\gamma$ -интерферона человека / [Вульфсон А.Н., Тихонов Р.В., Печенов С.Е. и др.] // *Биоорганическая химия.* – 1997. – Т. 23, № 9. – С. 721-726.
3. Methods of preparation of recombinant cytokine proteins. III. Free-flow electrophoresis in the production of mutant human recombinant Tumor Necrosis Factor-alpha / [Klushmchenko V.E., Tikhonov R.V., Pechenov S.E. et all.] // *Protein Expression and Purification.* – 1998. – Vol. 14. – P. 261-266.

4. Получение очищенного рекомбинантного  $\alpha 2b$ -интерферона человека / А.И. Мельник, И.В. Орловская, Н.М. Жолобак, Н.Я. Спивак // Мікробіологічний журнал. – 2012. – Т. 74, № 3. – С. 72-78.
5. Баронец Н.Г. Получение стимуляторов роста микроорганизмов из лекарственных растений: дисс. на соискание науч. степени канд. биол. наук: 03.00.07 / Н.Г. Баронец. – М. : НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, 2005. – 130 с.
6. Взаимодействие растительных экстрактов *Ungernia victoris*, *Rhodiola rosea* и *Polyscias filicifolia* с бактериальной клеткой / [Перерва Т.П., Мирюта А.Ю., Мойса Л.Н. и др.] // Цитологія та генетика. – 2010. – № 4. – С. 34-40.
7. Повышение продуктивности рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* обогащением питательной среды добавкой растительного происхождения / [Перерва Т.П., Кобозев Ю.А., Мойса Л.Н. и др.] // Біотехнологія. – 2012. – Т. 5, №1. – С. 42-47.
8. Biotechnology for obtaining the recombinant heat shock protein (HSP-60) of *Chlamydia trachomatis* and evaluation of the perspectives of its use in serological diagnostics / [Galkin O.Yu., Besarab O.B., Gryshyna A.S. et all.] // Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). – 2014. – Т. 6, Вип. 2. – С. 132-140.
9. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М. : Мир, 1991. – 544 с.
10. Galkin O.Yu. Study of biologically active substances content in herbal preparation for the treatment and prevention of alopecia / O.Yu. Galkin, A.G. Kotov // Украинский журнал клинической и лабораторной медицины. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 60-63.
11. Методика количественного определения суммарного содержания флавоноидов в надземной части ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) / С.С. Ломбоева, Л.М. Танхаева, Д.Н. Олейников // Химия растительного сырья. – 2008. – № 2. – С. 65-68.
12. Шукирбекова А.Б. Изучение ликорина гидрохлорида в химико-токсикологическом отношении: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. фарм. наук: 15.00.02 / А.Б. Шукирбекова. – М. : ВНИИ фармации Минздрава СССР, 1991. – 20 с.
13. Schagger H. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDalton / H. Schagger, G. von Jagow // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 166. – P. 368-379.
14. Плохинский Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – М. : Изд-во Моск. гос. ун-та, 1970. – 367 с.
15. Spaepen S. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling / S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – Vol. 31(4). – P. 425-448.
16. Nair J.J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae / J.J. Nair, J. van Staden // Food Chem. Toxicol. – 2013. – Vol. 62. – P. 262-275.
17. Preliminary isolated organ studies using an aqueous extract of *Clivia miniata* leaves / [Veale D.J.H., Oliver D.W., Arangies N.S. et all.] // J. Ethnopharmacol. – 1989. – Vol. 27 (3). – P. 341-346.
18. Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS / [Katoch D., Kumar S., Kumar N. et all.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2012. – Vol. 71. – P. 187-192.

19. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study / [Piana M., Silva M.A., Trevisan G. et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2013. – Vol. 150(2). – P. 458-465.
20. Lindberg A.A. Bacteriophage receptors / A.A. Lindberg // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1973. – Vol. 28. – P. 207-241.
21. Randall-Hazelbauer L. Isolation of bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli* / L. Randall-Hazelbauer, M. Schwartz // *J. Bacteriol.* – 1973. – Vol. 116. – P. 1436-1446.
22. Datta D.B. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors / D.B. Datta, B. Arden, U. Henning // *J. Bacteriol.* – 1977. – Vol. 131. – P. 821-829.
23. Morona R. Host range mutants of bacteriophage O<sub>x2</sub> can use two different outer membrane proteins of *Escherichia coli* K12 as receptors / R. Morona, U. Henning // *J. Bacteriol.* – 1984. – Vol. 159(2). – P. 579-582.
24. Лихачева А.А. Фаговые рецепторы *Escherichia coli*. Основные компоненты наружной мембраны *E. coli* как фаговые рецепторы / А.А. Лихачева, С.П. Синецкий // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.* – 1989. – № 10. – С. 3-15.
25. Van Alphen W. Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli* / W. Van Alphen, B. Lugtenberg // *J. Bacteriol.* – 1977. – Vol. 131(2). – P. 623-630.
26. Kawaji H. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O<sub>8</sub> and O<sub>9</sub> of *Escherichia coli* K12 / H. Kawaji, T. Mizuno, S. Mizushima // *J. Bacteriol.* – 1979. – Vol. 140(3). – P. 843-884.
27. Russo F.D. Mutations that affect separate functions of OmpR the phosphorylated regulator of porin transcription in *Escherichia coli* / F.D. Russo, J.M. Schlauch, T.J. Silhavy // *J. Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 231(2). – P. 261-273.

#### REFERENCES

1. Adinarayana K. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. / K. Adinarayana, P. Ellaiah // *J. Pharmaceutical Sci.* – 2002. – Vol. 5(3). – P. 272-278.
2. Metody poluchenija rekombinantnyh belkov-citokinov. II. Jeffektivnyj metod vydelenija, ochistki i renaturacii rekombinantnogo  $\gamma$ -interferona cheloveka / [Vul'fson A.N., Tihonov R.V., Pechenov S.E. i dr.] // *Bioorganicheskaja himija.* – 1997. – T. 23, № 9. – S. 721-726.
3. Methods of preparation of recombinant cytokine proteins. III. Free-flow electrophoresis in the production of mutant human recombinant Tumor Necrosis Factor-alpha / [Klushmchenko V.E., Tikhonov R.V., Pechenov S.E. et al.] // *Protein Expression and Purification.* – 1998. – Vol. 14. – P. 261-266.
4. Poluchenie ochishhennogo rekombinantnogo  $\alpha 2b$ -interferona cheloveka / A.I. Mel'nik, I.V. Orlovskaja, N.M. Zholobak, N.Ja. Spivak // *Mikrobiologichnij zhurnal.* – 2012. – T. 74, № 3. – S. 72-78.
5. Baronec N.G. Poluchenie stimuljatorov rosta mikroorganizmov iz lekarstvennyh rastenij: diss. na soiskanie nauch. stepeni kand. biol. nauk: 03.00.07 / N.G. Baronec. – M. : NII vakcin i syvorotok im. I.I. Mechnikova RAMN, 2005. – 130 s.
6. Vzaimodejstvie rastitel'nyh jekstraktov *Ungernia victoris*, *Rhodiola rosea* i *Polyscias filicifolia* s bakterial'noj kletkoj / [Pererva T.P., Mirjuta A.Ju., Mojsa L.N. i dr.] // *Citologija ta genetika.* – 2010. – № 4. – S. 34-40.
7. Povyshenie produktivnosti rekombinantnyh shtammov *Escherichia coli* obogashheniem pitatel'noj sredy dobavkoj rastitel'nogo proishozhdenija / [Pererva T.P., Kobozev Ju.A., Mojsa L.N. i dr.] // *Biotehnologija.* – 2012. – T. 5, № 1. – S. 42-47.
8. Biotechnology for obtaining the recombinant heat shock protein (HSP-60) of *Chlamydia trachomatis* and evaluation of the perspectives of its use in serological diagnostics / [Galkin O.Yu., Besarab O.B.,

- Gryshyna A.S. et al.] // *Naukovij visnik Chernivec'kogo universitetu. Biologija (Biologichni sistemi)*. – 2014. – T. 6, Vip. 2. – S. 132-140.
9. *Spravochnik biohimika* / R. Doson, D. Jelliot, U. Jelliot, K. Dzhons. – M. : Mir, 1991. – 544 s.
  10. Galkin O.Yu. Study of biologically active substances content in herbal preparation for the treatment and prevention of alopecia / O.Yu. Galkin, A.G. Kotov // *Ukrainskij zhurnal klinicheskoy i laboratornoj mediciny*. – 2011. – T. 6, № 1. – S. 60-63.
  11. Metodika kolichestvennogo opredelenija summarnogo sodержaniya flavonoidov v nadzemnoj chasti ortilii odnobokoj (*Orthilia secunda* (L.) House) / S.S. Lomboeva, L.M. Tanhaeva, D.N. Olejnikov // *Himija rastitel'nogo syr'ja*. – 2008. – № 2. – S. 65-68.
  12. Shukirbekova A.B. Izuchenie likorina gidrohlorida v himiko-toksikologicheskom otnoshenii: avtoref. dis. na soiskanie nauch. stepeni kand. farm. nauk: 15.00.02 / A.B. Shukirbekova. – M. : VNII farmacii Minzdrava SSSR, 1991. – 20 s.
  13. Schagger H. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDalton / H. Schagger, G. von Jagow // *Anal. Biochem.* – 1987. – Vol. 166. – R. 368-379.
  14. Plohinskij N.A. *Biometrija* / N.A. Plohinskij. – M. : Izd-vo Mosk. gos. un-ta, 1970. – 367 s.
  15. Spaepen S. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling / S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2007. – Vol. 31(4). – P. 425-448.
  16. Nair J.J. Pharmacological and toxicological insights to the South African Amaryllidaceae / J.J. Nair, J. van Staden // *Food Chem. Toxicol.* – 2013. – Vol. 62. – P. 262-275.
  17. Preliminary isolated organ studies using an aqueous extract of *Clivia miniata* leaves / [Veale D.J.H., Oliver D.W., Arangies N.S. et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 1989. – Vol. 27 (3). – P. 341-346.
  18. Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS / [Katoch D., Kumar S., Kumar N. et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – Vol. 71. – P. 187-192.
  19. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study / [Piana M., Silva M.A., Trevisan G. et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2013. – Vol. 150(2). – P. 458-465.
  20. Lindberg A.A. Bacteriophage receptors / A.A. Lindberg // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1973. – Vol. 28. – P. 207-241.
  21. Randall-Hazelbauer L. Isolation of bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli* / L. Randall-Hazelbauer, M. Schwartz // *J. Bacteriol.* – 1973. – Vol. 116. – P. 1436-1446.
  22. Datta D.B. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors / D.B. Datta, B. Arden, U. Henning // *J. Bacteriol.* – 1977. – Vol. 131. – P. 821-829.
  23. Morona R. Host range mutants of bacteriophage Ox2 can use two different outer membrane proteins of *Escherichia coli* K12 as receptors / R. Morona, U. Henning // *J. Bacteriol.* – 1984. – Vol. 159(2). – R. 579-582.
  24. Lihacheva A.A. Fagovye receptory *Escherichia coli*. Osnovnye komponenty naruzhnoj membrany *E. coli* kak fagovye receptory / A.A. Lihacheva, S.P. Sineokij // *Molekuljar. genetika, mikrobiologija i virusologija*. – 1989. – № 10. – S. 3-15.
  25. Van Alphen W. Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli* / W. Van Alphen, B. Lugtenberg // *J. Bacteriol.* – 1977. – Vol. 131(2). – R. 623-630.
  26. Kawaji H. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins O8 and O9 of *Escherichia coli* K12 / H. Kawaji, T. Mizuno, S. Mizushima // *J. Bacteriol.* – 1979. – Vol. 140(3). – R. 843-884.
  27. Russo F.D. Mutations that affect separate functions of OmpR the phosphorylated regulator of porin transcription in *Escherichia coli* / F.D. Russo, J.M. Schlauch, T.J. Silhavy // *J. Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 231(2). – R. 261-273.