



Оригинальная статья / Research article

Основы разработки микроволновой интенсификации upstream process на примере *Escherichia coli*

Д. Б. Кузнецов^{1*}, А. Ю. Миронов², В. А. Несчисляев¹, И. Л. Вольхин³, А. М. Королюк⁴,
Е. В. Орлова¹, А. Д. Шилина¹

¹ ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ПГФА), 614990, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

² ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (МНИИЭМ), 125212, Россия, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

³ ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» (ПГНИУ), 614068, Россия, Пермский край, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (СПбГПМУ), 194100, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

* Контактное лицо: Кузнецов Денис Бахтиерович. E-mail: denis.pfa@gmail.com

ORCID: Д. Б. Кузнецов – <https://orcid.org/0000-0003-0884-848X>; А. Ю. Миронов – <http://orcid.org/0000-0002-8544-5230>; В. А. Несчисляев – <https://orcid.org/0000-0002-8163-0674>;

И. Л. Вольхин – <https://orcid.org/0000-0002-8564-0968>; А. М. Королюк – <https://orcid.org/0000-0002-4680-3322>; Е. В. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-5120-7058>;

А. Д. Шилина – <https://orcid.org/0000-0002-2420-445X>.

Статья поступила: 22.03.2021

Статья принята в печать: 22.09.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Штаммы *E. coli* являются основными микроорганизмами, используемыми для получения ряда важных биофармацевтических продуктов. На Земле не существует естественных источников микроволнового излучения, так как оно поглощается верхними слоями атмосферы. Важность исследования биологического действия СВЧ-излучения ни у кого не вызывает сомнений. С каждым годом растет число публикаций, посвященных данной проблеме, и появляются новые идеи использования микроволн в технологии получения лекарств.

Цель. Выявить основные эффекты СВЧ-облучения и разработать технологию микроволновой интенсификации роста культуры *E. coli*.

Материалы и методы. В настоящем исследовании представлены результаты атомно-силовой микроскопии, рефрактометрии, ЯМР-релаксометрии, турбидиметрии и люминометрии, демонстрирующие возможность микроволновой интенсификации процесса культивирования.

Результаты и обсуждение. Обнаружено, что СВЧ-облучение приводит к изменениям подвижности протонов и адсорбции молекул воды на биополимерах и клетках. Это является основными звеньями механизма «нетеплового» микроволнового воздействия. Однократное СВЧ-облучение в зависимости от ряда параметров может снижать или повышать прирост биомассы. Исследования биолюминесценции штамма *E. coli* с *lux*-опероном показали, что оптимальные условия обработки не оказывают негативного влияния на продукцию люциферазы и метаболическую активность клеток.

Заключение. Процедура интенсификации с использованием СВЧ-излучения может считаться перспективным методом и может дать новые идеи для различных приложений в биотехнологии.

Ключевые слова: *E. coli*, биолюминесценция, люцифераза, СВЧ-излучение, рост культуры

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Д. Б. Кузнецов, В. А. Несчисляев, И. Л. Вольхин разработали концепцию, спланировали эксперимент, собрали установки, провели исследования и интерпретировали результаты. Е. В. Орлова принимала участие в написании текста статьи и интерпретации результатов. Д. Б. Кузнецов, А. Ю. Миронов, А. М. Королюк и А. Д. Шилина обработали результаты экспериментов и подготовили текст статьи к публикации.

Для цитирования: Кузнецов Д. Б., Миронов А. Ю., Несчисляев В. А., Вольхин И. Л., Королюк А. М., Орлова Е. В., Шилина А. Д. Основы разработки микроволновой интенсификации upstream process на примере *Escherichia coli*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):72–80. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-72-80>

Basics of the Development of Microwave Intensification of Upstream on the Example of *Escherichia coli*

Denis B. Kuznetsov^{1*}, Andrey Yu. Mironov², Valery A. Neschislyayev¹, Igor L. Volkhin³,
Alexander M. Korolyuk⁴, Ekaterina V. Orlova¹, Anastasiya D. Shilina¹

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Poleyeva str., Perm, Perm Territory, 614990, Russia

² Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology. G. N. Gabrichevsky, 10, Admirala Makarova str., Moscow, 125212, Russia,

³ Perm State University, 15, Bukireva str., Perm, Perm Territory, 614068, Russia

⁴ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2, Litovskaya str., St. Petersburg, 194100, Russia

* Corresponding author: Denis B. Kuznetsov. E-mail: denis.pfa@gmail.com

ORCID: Denis B. Kuznetsov – <https://orcid.org/0000-0003-0884-848X>; Andrey Yu. Mironov – <http://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;

Valery A. Neschislyayev – <https://orcid.org/0000-0002-8163-0674>; Igor L. Volkhin – <https://orcid.org/0000-0002-8564-0968>;

Alexander M. Korolyuk – <https://orcid.org/0000-0002-4680-3322>; Ekaterina V. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-5120-7058>;

Anastasiya D. Shilina – <https://orcid.org/0000-0002-2420-445X>.

Received: 22.03.2021

Revised: 22.09.2021

Published: 25.11.2021

© Кузнецов Д. Б., Миронов А. Ю., Несчисляев В. А., Вольхин И. Л., Королюк А. М., Орлова Е. В., Шилина А. Д., 2021

© Kuznetsov D. B., Mironov A. Yu., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Korolyuk A. M., Orlova E. V., Shilina A. D., 2021

Abstract

Introduction. *E. coli* strains are the main microorganisms used for the production of a number of important biopharmaceutical products. There are no natural sources of microwave radiation on Earth, as it is absorbed by the upper atmosphere. No one doubts the importance of studying the biological effect of microwave radiation. The number of publications devoted to this problem is growing every year, and new ideas for the use of microwaves in drug production technology are emerging.

Aim. Reveal the main effects of microwave irradiation and develop a technology for microwave intensification of *E. coli* culture growth.

Materials and methods. This study presents the results of atomic force microscopy, refractometry, NMR relaxometry, turbidimetry, and lumimetry, demonstrating the possibility of microwave intensification of the cultivation process.

Results and discussion. It was found that microwave irradiation leads to changes in the mobility of protons and the adsorption of water molecules on biopolymers and cells. These are the main links in the mechanism of "non-thermal" microwave action. A single microwave irradiation, depending on a number of parameters, can decrease or increase the growth of biomass. Studies of the bioluminescence of the *E. coli* strain with the *lux*-operon have shown that the optimal processing conditions do not negatively affect the luciferase production and metabolic activity of cells.

Conclusion. The intensification procedure using microwave radiation can be considered a promising method and can provide new ideas for various applications in biotechnology.

Keywords: *E. coli*, bioluminescence, luciferase, microwave radiation, culture growth

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Denis B. Kuznetsov, Valery A. Neschislyayev, Igor L. Volkhin developed a concept, planned an experiment, assembled installations, conducted research and interpreted the results. Ekaterina V. Orlova took part in writing the text of the article and interpreting the results. Denis B. Kuznetsov, Andrey Yu. Mironov, Alexander M. Korolyuk and Anastasiya D. Shilin processed the results of the experiments and prepared the text of the article for publication.

For citation: Kuznetsov D. B., Mironov A. Yu., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Korolyuk A. M., Orlova E. V., Shilina A. D. Basics of the development of microwave intensification of upstream on the example of *Escherichia coli*. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):72–80. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-72-80>

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время клеточные линии млекопитающих, преимущественно линия клеток CHO (яичник китайского хомячка), являются основными платформами для производства терапевтических молекул из-за возможности получения гликозилированных полипептидов. Однако генно-инженерные штаммы кишечной палочки по-прежнему остаются основными продуцентами ряда важных терапевтических продуктов на основе гетерологичных белков [1–3].

Около 30 % всех одобренных терапевтических белков продуцируются именно в кишечной палочке [4–6].

За последнее десятилетие интерес к использованию микроволнового излучения в различных отраслях сильно повышался. Однако «нетепловое» микроволновое воздействие на бактериальные культуры изучено недостаточно. В ряде работ утверждается, что микроволновое излучение способно «избирательно» нагревать вещества в интересующей системе [7, 8].

Для исключения «теплого» эффекта температура в процессе микроволнового облучения должна контролироваться и быть в пределах ± 1 °C.

В большинстве случаев в работах не указываются такие основные параметры облучения, как поток мощности излучения и глубина проникновения поля (скин-слой), а также условия засева культуры. Все это значительно усложняет как воспроизводимость, так и интерпретацию результатов исследований.

Наши первые исследования с различными производственными штаммами лактобактерий продемонстрировали различие в приросте биомассы при СВЧ-облучении [9]. Ранее нами проведены работы с потенциально производственным штаммом *E. coli* LEGM-18, которые показали возможность управления накоплением биомассой, а также влияние радиационных и биологических факторов на воспроизводимость процесса культивирования и получение полезного биотехнологического эффекта [10]. Настоящее исследование направлено на достижение более глубокого понимания основных звеньев механизма повышения активности культуры кишечной палочки и разработку основ интенсификации процесса культивирования рекомбинантного штамма *E. coli* с использованием крайне высокочастотного излучения.

Штамм *E. coli* K12 является основным производственным штаммом и используется для получения продуцентов различных белков [11, 12].

Цельноклеточные биосенсоры чувствительны к факторам окружающей среды и могут реагировать на многие виды воздействий. Обычно их используют для определения интегральных параметров и состояний, таких как стресс, токсичность и т. д. В этой работе используется штамм *E. coli* K12 TG1 с *lux*-опероном, который зарекомендовал себя как надежный инструмент для определения интегрального влияния широкого спектра соединений различной природы и электромагнитного излучения (ЭМИ) на бактериальную клетку [13, 14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования

В эксперименте использован штамм *E. coli* K12 TG1 hsd R17 hsdM thi relA1 supE44 Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 с lux-опероном *PhotoRHA* *Abdus luminescens* ZM1) [15].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование метаболической активности

Изменение метаболической активности клеток определяли методом биолюминесцентного тестирования. Подготовка образца для исследования биолюминесценции включала регидратацию лиофилизированного штамма бактерий 0,9%-м раствором хлорида натрия, охлажденным до 6 ± 2 °С. После 30-минутной выдержки при температуре (6 ± 2) °С разбавленную суспензию индикаторного штамма достали из холодильника и оставили не менее 30 минут при 22 ± 2 °С. Затем суспензию разливали в полимерные пробирки объемом 1 мл и помещали в экспериментальную установку для СВЧ-облучения. Уровень люминесценции образцов биосенсора определяли при 22 ± 2 °С. Работа на установке «Биотокс-10М» (ООО «НЕРА-С», Россия) проводилась согласно инструкции по эксплуатации установки.

Для изучения влияния излучения на свечение биосенсора эффект воздействия выражали либо в виде значений показателя люминесценции в имп/сек, либо в виде коэффициента свечения (безразмерная величина). Коэффициент свечения:

$$K = \frac{I_1 - I_2}{I_1},$$

где I_1 и I_2 – интенсивности свечения индикаторного штамма без и после облучения соответственно [16].

Увеличение интенсивности свечения прямо пропорционально ингибирующему эффекту, а уменьшение прямо пропорционально стимулирующему эффекту.

Исследование силы адгезии

На атомно-силовом микроскопе NTEGRA Prima – НаноЛаборатория (ООО «НТ-МДТ», Россия) были измерены разности высоты кантилевера в момент контакта с образцом и его отрыва от образца и получены изображения поверхностей клеток. Сила адгезии на поверхности клеток биосенсора вычислена по формуле:

$$F_a = k \times \Delta Z,$$

где k – твердость кантилевера; Z – разность высоты кантилевера в момент контакта с образцом и его отрыва от образца.

Рефрактометрия

Рефрактометрия проводилась с помощью рефрактометра RM50 (Mettler Toledo, США) при температуре 23 ± 1 °С. Погрешность измерения показателя преломления $\pm 0,00002$ nD.

ЯМР-релаксометрия

Параметры ЯМР-релаксации определены с помощью прибора mq10 NMR Analyzer (Bruker, США) в 10 МГц диапазоне. В соответствии с требованиями к измерениям температура образцов в релаксометре должна составлять 40 °С, поэтому пробы термостатировали 30 мин.

Определение оптической плотности

Измерения оптической плотности проводили на приборе Densi-La-Meter II (АО «Эрба Рус», Россия) и КФК-3 (ОАО «ЗОМЗ», Россия). Перед каждым измерением суспензию клеток тщательно перемешивали круговыми движениями без образования пузырьков, после чего около ½ мин образец отстаивался для выхода остаточных пузырьков воздуха, которые могли исказить результат.

Экспериментальная установка

На рисунке 1, а представлена схема установки, используемой для исследований в крайне высокочастотном диапазоне. Путь антенно-волнового тракта состоит из Г4-156 генератора, рупорной антенны и линзы. Для контроля потока излучения на противоположной стороне размещалась антенна, которая была подключена к нановольтметру. Подробное описание установки приведено в [17]. Емкость с образцом облучалась потоком микроволнового излучения 0,4 мВт/см². Емкость находилась в сечении СВЧ-пучка половинной мощности. В процессе облучения контролировали температуру и pH. Изменение температуры образцов в процессе эксперимента не превышало 1 °С. После облучения образцы термостатировались на водяной бане при температуре 37 ± 1 °С (рисунок 1, б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение глубины проникновения СВЧ-излучения

При воздействии СВЧ-излучения на бактериальную культуру следует учитывать, что вода является основным компонентом живых организмов, поэтому изменение ее свойств, таких как поляризация молекул, перенос протонов и связанная вода в полимерах может иметь большое значение. При СВЧ-облучении часть энергии сохраняется, а другая часть выделяется в виде теплового движения частиц. В немагнитных жидкостях плотность запасаемой энергии пропорци-

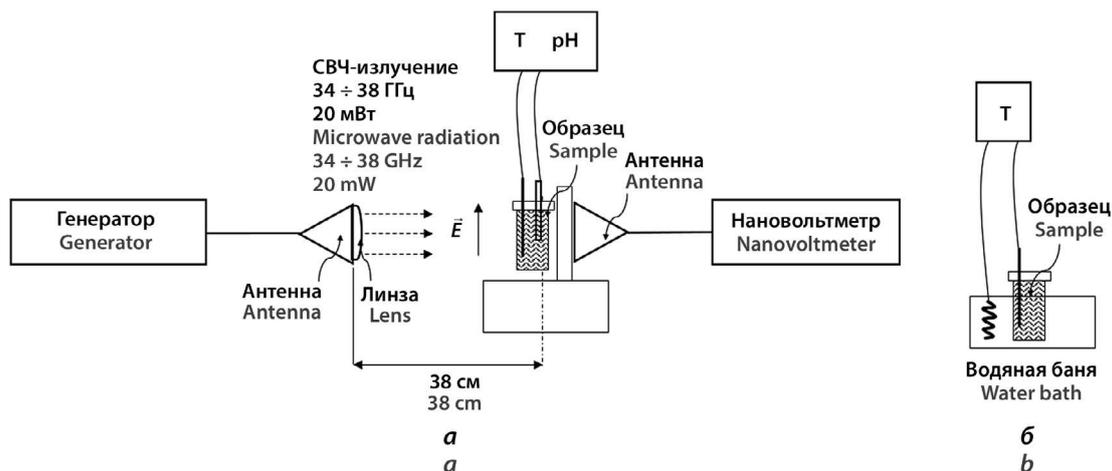


Рисунок 1. Экспериментальная установка:

а – установка на основе генератора Г4-156; **б** – водяная баня

Figure 1. Experimental setup:

a – setup based on the G4-156 generator; **b** – water bath

ональна диэлектрической проницаемости вещества, а выделяемая энергия пропорциональна коэффициенту диэлектрических потерь [18, 19]. При рассмотрении спектра поглощения жидкой воды наблюдается сильное поглощение излучения в диапазоне миллиметрового излучения [20]. Особое внимание следует обратить на показатели диэлектрической проницаемости и диэлектрических потерь в среде в этом диапазоне. Вероятно, для получения биологического эффекта необходимо относительное равенство между диэлектрической проницаемостью среды и диэлектрическими потерями [21].

СВЧ-облучение следует проводить при условии снижения интенсивности не более чем в 2,71 раза. Были проведены исследования для установления условий, при которых все клетки микроорганизмов находятся в поле СВЧ-излучения примерно одинаковой интенсивности. Для этого определялись толщина скин-слоя.

Электрическое сопротивление среды R_{cp} было определено для расчета поглощающей способности среды. Измерения проводились в течение 3,5 минут. Выявлено, что среда ГРМ-бульон (питательный бульон для культивирования микроорганизмов на основе гидролизата рыбной муки) имеет электрическое сопротивление $R_{cp} = 532 \pm 53$ Ом.

Для определения глубины проникновения микроволн в ГРМ-бульон использовались экспериментальные данные по электрическому сопротивлению и параметрам применяемых генераторов электромагнитного излучения. Удельная электропроводность рассчитана по формуле:

$$\sigma_{cp} = (c/ab R_{cp}),$$

где $a = 18$ мм, $b = 29$ мм, $c = 16$ мм – размеры слоя жидкости; R – электрическое сопротивление.

Толщина скин-слоя:

$$\delta = \sqrt{\frac{2}{2\pi f \mu_m \mu_0 \sigma_m}},$$

где f – частота микроволнового излучения, мкМ; μ_m – относительная магнитная проницаемость среды ($\mu_m = 1$); μ_0 – магнитная проницаемость вакуума ($4\pi \times 10^{-7}$ Гн/м). На рисунке 2, а показаны значения скин-слоя для различных частот СВЧ-излучения. Наибольшая глубина проникновения поля показана на частоте 37,04 ГГц.

Определение основных звеньев механизма СВЧ-облучения

При изучении влияния микроволнового излучения на бактериальную культуру *E. coli* исследование было разделено на несколько этапов:

1. Изучение влияния различных режимов СВЧ-облучения на свечение клеток.
2. Определение воздействия СВЧ-облучения на показатель преломления в питательной среде.
3. Исследование влияния СВЧ-облучения на параметры ЯМР-релаксометрии в питательной среде и культуре.
4. Получение данных атомно-силовой микроскопии и силы адгезии на поверхности клеток.

Биolumинесцентное тестирование

На первом этапе изучались влияние СВЧ-облучения на метаболическую активность методом люминесцентного тестирования. Знак минус указывает на повышение метаболической активности. Обнаруже-

но, что облучение миллиметровым СВЧ-излучением в течение одного часа сразу индуцирует люминесценцию биосенсора. Такая обработка обеспечивала стимуляцию свечения на протяжении всего эксперимента (рисунок 2, б, в). Установлена зависимость уровня люминесценции от частоты СВЧ-излучения и продолжительности облучения.

Рефрактометрия

На следующем этапе изучались эффекты воздействия СВЧ-излучения на показатель преломления и параметры ЯМР-релаксометрии. С учетом отсутствия изменения концентрации белков в стерильной питательной среде показатель преломления способен отражать изменения его конформационной структуры. Методом рефрактометрии установлено незначительное изменение показателя преломления (рисунок 2, г). Вероятно, наблюдаемый эффект связан с актом поглощения СВЧ-излучения молекулами-акцепторами, что приводит к смещению электронных плотностей и увеличению их поляризации. Повышение поляризации молекул растворителя в свою очередь изменяет электронные плотности в полипептиде, и прежняя конформация становится энергетически невыгодной, что приводит к разворачиванию спирали белков за счет встраивания молекул растворителя.

ЯМР-релаксометрия

Установлено, что влияние времени облучения питательной среды на количество малоподвижных протонов ^1H внутри надмолекулярных комплексов незначительно (рисунок 2, д). Однако количество протонов ^1H , участвующих в диполь-дипольном взаимодействии, увеличивается при облучении нелинейно и при 20 мин наблюдается насыщение (рисунок 2, е).

При добавлении в питательную среду клеток *E. coli* наблюдается повышение количества протонов ^1H внутри надмолекулярных комплексов, что обусловлено протонами ^1H , входящих в состав клеток, и образованием адсорбированной (связанной) воды. С увеличением продолжительности облучения наблюдается линейное незначительное их повышение, вероятно, обусловленное только за счет повышения количества адсорбированной воды. Также с увеличением продолжительности облучения наблюдается линейная зависимость увеличения протонов ^1H , участвующих в диполь-дипольном взаимодействии (рисунок 2, е).

Атомно-силовая микроскопия

При изучении влияния СВЧ-обработки проведено сканирование поверхностей клеток на атомно-силовом микроскопе. На рисунке 2, ж клетка без облучения, у клеток визуализируются ровные края. На рисунке 2, з клетки после облучения. На поверхностях клеток видна складчатая структура, а также уменьшение размера клетки. Складчатая структура обусловлена поверхностными полисахаридами с узкой

адсорбированной фазой. На рисунке 2, и видно, что сила адгезии значительно снижается с увеличением продолжительности облучения.

Полученные данные ЯМР-релаксометрии, АСМ и рефрактометрии подтверждают влияние СВЧ-излучения на подвижность протонов и обводненность биополимеров. Таким образом, установлено влияние нетеплового СВЧ-облучения на обводненность клеток посредством процесса «набухания» в питательной среде и синерезиса при ее удалении за счет изменения объема адсорбированной фазы молекул растворителя.

Проведенные исследования подтвердили влияние СВЧ-излучения на метаболическую активность и подвижность протонов, и обводненность биополимеров и клеток в среде посредством процесса синерезиса или «набухания» за счет изменения объема адсорбированной фазы молекул растворителя.

Ростовые характеристики культуры при микроволновом облучении

Исследование ростовых свойств культуры проводили на среде ГРМ-бульон. Установлено, что эффект значительно зависит от исходной концентрации, при которой проводится облучение и его продолжительность (рисунок 3). Обнаружено, что при концентрациях 60 млн кл/мл и 300 млн кл/мл микроволновое излучение значительно замедляет рост культуры, однако при облучении культуры с концентрацией 600 млн кл/мл не обнаружено изменение уровня статистически значимых различий. При концентрации 1200 млн кл/мл наблюдается прирост биомассы до 25 % только при 20-минутном облучении.

Зависимость эффекта прироста биомассы от концентрации также была продемонстрирована в работе [10]. Явление обусловлено тем, что концентрация бактериальных клеток определяет суммарные площади гидрофильных поверхностей, на которых происходит перераспределение зарядов и образование градиента концентрации протонов $\Delta\mu\text{H}^+$.

Люминесцентное тестирование *E. coli* после культивирования

В качестве исследования, демонстрирующего влияние микроволнового облучения на продукцию рекомбинантных белков, продуцируемых в клетках хозяина и их метаболическую активность, проведено люминесцентное тестирование после 24-часового культивирования в среде МПБ через 30 и 60 мин после разведения в 50 раз. Обнаружено, что облучение в течение 20 мин культуры с исходной концентрацией 1200 млн кл/мл приводит к выраженному повышению люминесценции (рисунок 4) по сравнению с образцами бактериальных культур, где концентрация была ниже (60, 300, 600 млн кл/мл). Таким образом, подтверждено отсутствие негативного влияния как на клетки хозяина, так и на продукцию рекомбинантных белков после СВЧ-облучения культуры и последующего культивирования.

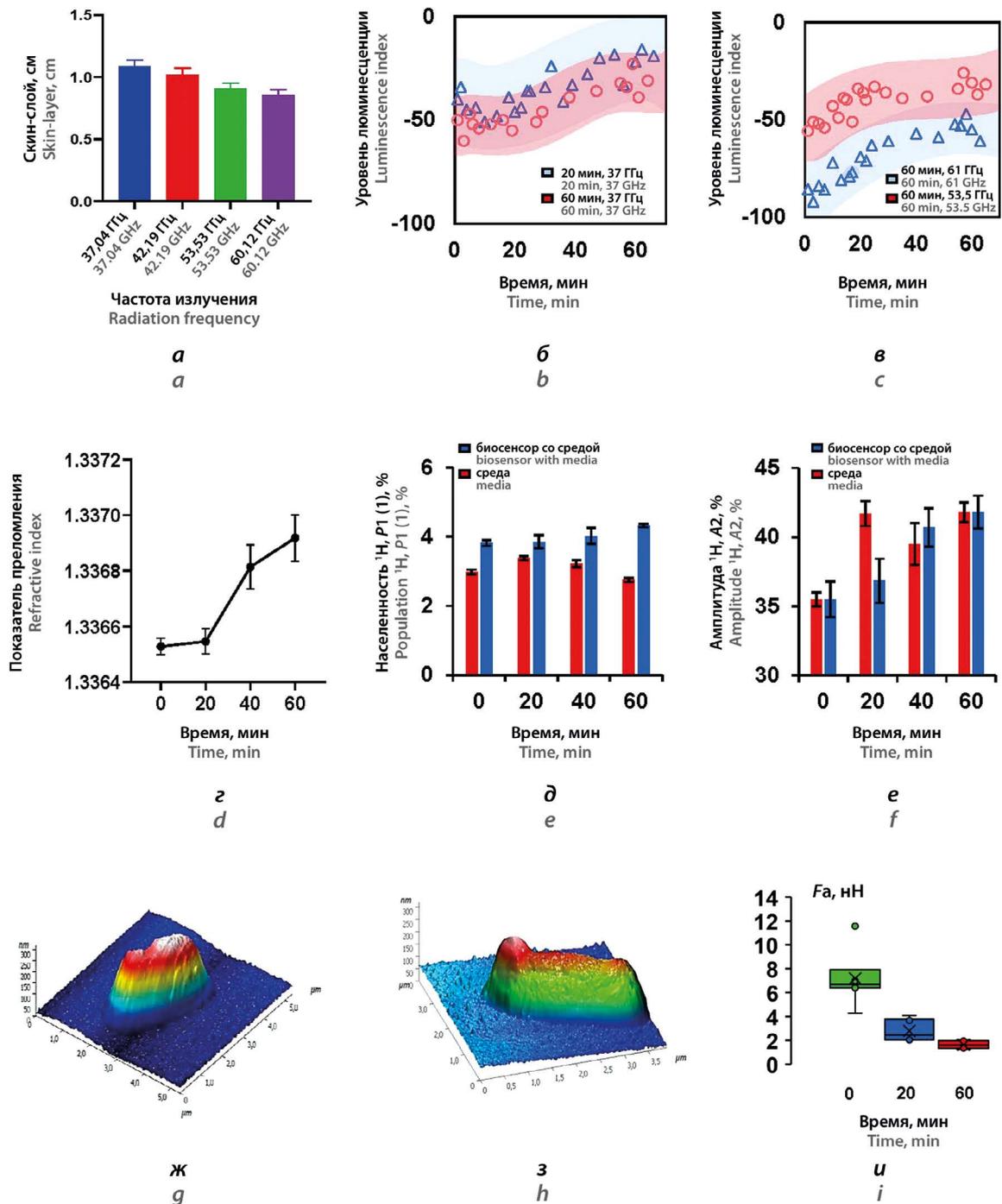


Рисунок 2. Эффекты микроволнового облучения:

а – глубина проникновения поля (скин-слой); **б** и **в** – уровень люминесценции биосенсора; **г** – показатель преломления питательной среды в зависимости от продолжительности облучения; **д** – населенность протонов ^1H , P1(1); **е** – амплитуда ^1H , A2; **ж** – клетка без облучения; **з** – клетка после облучения, 60 мин; **и** – сила адгезии на поверхности клеток в зависимости от продолжительности облучения

Figure 2. Effects of microwave irradiation:

а – the depth of field penetration (skin layer); **б** and **в** – the level of luminescence of the biosensor; **г** – the refractive index of the nutrient medium depending on the duration of irradiation; **д** – the population of protons ^1H , P1(1), (f) amplitude ^1H , A2; **ж** – cell without irradiation; **з** – cell after irradiation, 60 min; **и** – strength of adhesion on the cell surface depending on the duration of irradiation

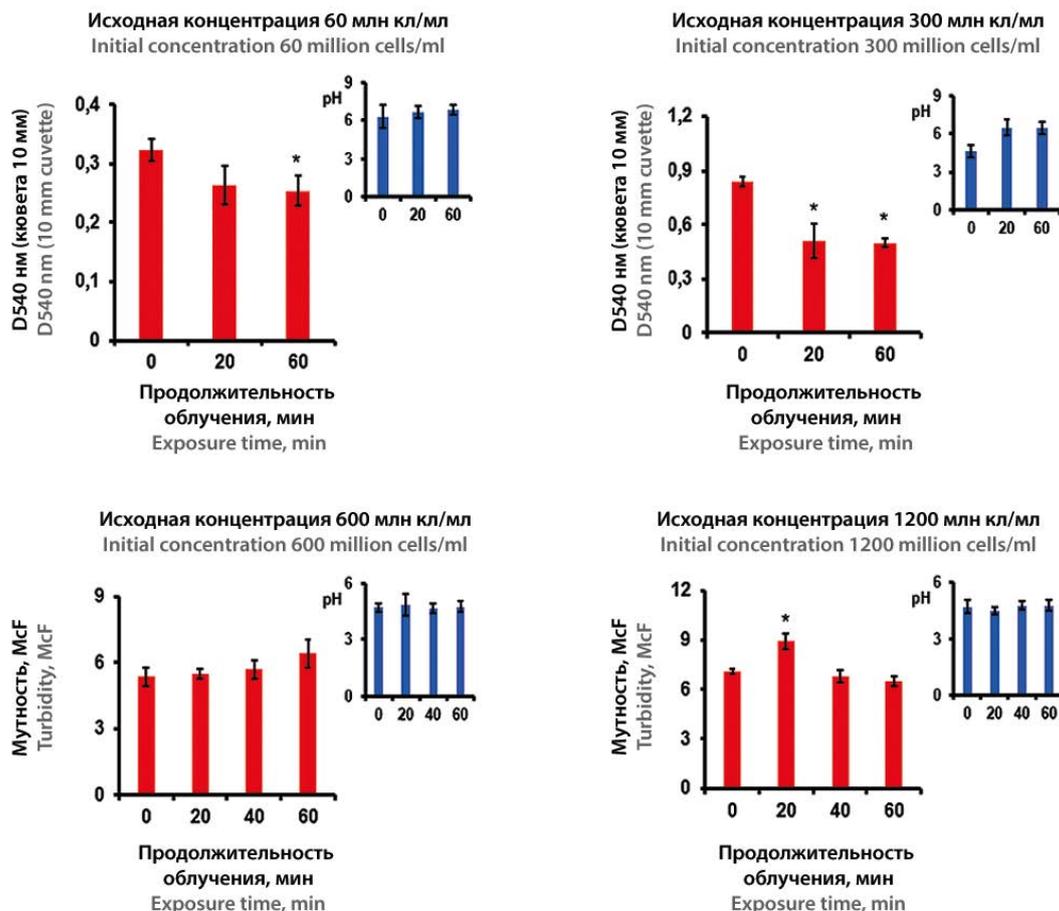


Рисунок 3. Влияние микроволнового облучения на ростовые характеристики культуры *E. coli*. * $p < 0,01$
Figure 3. Influence of microwave irradiation on the growth characteristics of *E. coli* culture. * $p < 0.01$

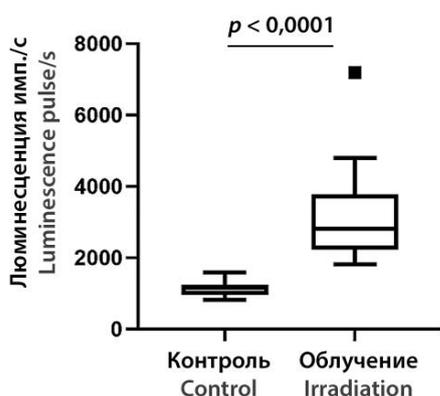


Рисунок 4. Люминесценция *E. coli*
Figure 4. Luminescence of *E. coli*

В связи с тем, что СВЧ-излучение в значительной степени поглощается водой, при определенных условиях оно может влиять на подвижность протонов и приводить к их перераспределению в системе «среда-клетка». Для обсуждения возможного механизма влияния «нетеплового» микроволнового облучения

на метаболическую активность и рост клеток рассмотрены известные механизмы свечения микроорганизмов с *lux*-оперонами. Во всех трех механизмах донорами протонов служат молекулы воды [22–25]. Кроме того, существует вероятность того, что неидентифицированным основанием могут выступать продукты диссоциации молекул воды.

В результате проведенных экспериментов установлено, что найденные параметры СВЧ-обработки приводят к запуску двух взаимосвязанных процессов: повышению концентрации малоподвижных протонов внутри надмолекулярных структур (расширение адсорбированной фазы воды) и увеличению фракции подвижных протонов, участвующих в межмолекулярном взаимодействии. Градиент концентрации протонов $\Delta\mu\text{H}^+$ является основным источником энергии любой клетки. Именно транспорт протонов через АТФ-синтазу обеспечивает синтез молекул АТФ. На основании выше полученных результатов предполагается, что микроволновая индукция процессов транспорта протонов влияет на градиент их концентрации в межмембранных пространствах. Совокупность этих процессов определяет эффект прироста биомассы при СВЧ-обработке.

В свою очередь, это может объяснить как излучение, которое в основном поглощается молекулами воды, может влиять на интенсивность люминесценции, прирост биомассы и продолжительность эффекта. Данные, представленные в данной работе, значительно расширяют представления о микроволновом воздействии на культуры микроорганизмов и позволят в перспективе разработать новые технологии с другими рекомбинатными микроорганизмами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был обнаружен ряд эффектов «нетеплового» микроволнового облучения. Показано, что наблюдаемые эффекты напрямую связаны с поглощением излучения молекулами-акцепторами. Определены параметры СВЧ-облучения, позволяющие повысить уровень люминесценции биосенсора и прирост биомассы. Таким образом, использование СВЧ-облучения для интенсификации роста кишечной палочки можно считать перспективным методом. Установлено, что ключевую роль в получении эффектов от «нетеплового» микроволнового облучения играют изменения подвижности протонов и процессов обводненности биополимеров и клеток посредством процесса синерезиса и «набухания» за счет изменения объема адсорбированной фазы. Это является основными звеньями механизма нетеплового СВЧ-воздействия и может дать новые идеи для его практического применения в технологии получения лекарств.

ЛИТЕРАТУРА

- Agbogbo F. K., Ramsey P., George R., Joy J., Srivastava S., Huang M., McCool J. Upstream development of *Escherichia coli* fermentation process with PhoA promoter using design of experiments (DoE). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2020;47(9–10):789–799. DOI: 10.1007/s10295-020-02302-7.
- Bayer B., Stosch M., Striedner G., Duerkop M. Comparison of Modeling Methods for DoE-Based Holistic Upstream Process Characterization. *Biotechnology Journal*. 2020;15(5):1900551. DOI: 10.1002/biot.201900551.
- Kante R. K., Vemula S., Somavarapu S., Mallu M. R., Boje Gowd B. H., Ronda S. R. Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization. *Biologicals*. 2018;56:45–53. DOI: 10.1016/j.biologicals.2018.10.002.
- Overton T.W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*. 2014;19(5):590–601. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.11.008.
- Sanchez-Garcia L., Martín L., Mangues R., Ferrer-Miralles N., Vázquez E., Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial Cell Factories*. 2016;15(1):33. DOI: 10.1186/s12934-016-0437-3.
- Ehgartner D., Sagmeister P., Langemann T., Meitz A., Lubitz W., Herwig C. A novel method to recover inclusion body protein from recombinant *E. coli* fed-batch processes based on phage ΦX174-derived lysis protein E. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101(14):5603–5614. DOI: 10.1007/s00253-017-8281-x.
- Dudley G. B., Richert R., Stieglman A. E. On the existence of and mechanism for microwave-specific reaction rate enhancement. *Chemical Science*. 2015;6(4):2144–2152. DOI: 10.1039/C4SC03372H.
- Kabb C. P., Carmean R. N., Sumerlin B. S. Probing the surface-localized hyperthermia of gold nanoparticles in a microwave field using polymeric thermometers. *Chemical Science*. 2015;6(10):5662–5669. DOI: 10.1039/C5SC01535A.
- Кузнецов Д. Б., Орлова Е. В., Несчисляев В. А., Вольхин И. Л., Широких А. А., Баландина А. В. Перспективный метод оптимизации производства пробиотических препаратов. *Биофармацевтический журнал*. 2015;7(6):16–19.
- Kuznetsov D., Volkhin I., Orlova E., Neschislyayev V., Balandina A., Shirokikh A. Microwave Radiation Effects on the Process of *Escherichia coli* Cultivation. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2019;47(3):372–380. DOI: 10.4014/mbl.1810.10024.
- Marisch K., Bayer K., Cserjan-Puschmann M., Luchner M., Striedner G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories*. 2013;12(1):58. DOI: 10.1186/1475-2859-12-58.
- Kelpšas V., von Wachenfeldt C. Strain improvement of *Escherichia coli* K-12 for recombinant production of deuterated proteins. *Scientific Reports*. 2019;9(1):17694. DOI: 10.1038/s41598-019-54196-w.
- Khudyakova A. V., Lekontseva T. G., Fedorov A. V. Estimation of the Toxicity of a Metal/Carbon Nanocomposite of Copper by Biotesting. *Biology Bulletin*. 2019;46(10):1359–1363. DOI: 10.1134/S1062359019100145.
- Zarubina A. P., Gapochka M. G., Novoselova L. A., Gapochka L. D. Effect of low intensity electromagnetic radiation on the toxicity of domestic wastewater tested with the "Ecolum" test-system. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2013;68(1):49–52. DOI: 10.3103/S0096392512030108.
- Данилов В. С., Зарубина А. П., Ерошников Г. Е., Соловьева Л. Н., Каташев Ф. В., Завильгельский Г. Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2002;3:20–24.
- Несчисляев В. А., Пшеничных Р. А., Арчакова Е. Г., Чистохина Л. П., Фадеева И. В. Способ определения антагонистической активности пробиотиков. Патент РФ на изобретение RU 2187801. 20.08.2002. Доступно по: https://i.moscow/patents/RU2187801C2_20020820. Ссылка активна на 23.07.2021.
- Kuznetsov D. B., Orlova E. V., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Izmetiev I. V., Lunegov I. V., Balandina A. V., Dianova D. G. Epitaxy of the bound water phase on hydrophilic surfaces of biopolymers as key mechanism of microwave radiation effects on living objects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;154:40–47. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.014.
- Stenishchev I. V., Basharin A. A. Toroidal response in all-dielectric metamaterials based on water. *Scientific Reports*. 2017;7(1):9468. DOI: 10.1038/s41598-017-07399-y.
- Bordonsky G. S., Orlov A. O., Schegrina K. A. Dielectric Losses in Supercooled Pore Water at a Frequency of 34 GHz. *Radiophysics and Quantum Electronics*. 2017;59(10):812–820. DOI: 10.1007/s11141-017-9750-x.
- Carlson S., Brüning F. N., Locher P., Bonthuis D. J., Netz R. R. Exploring the Absorption Spectrum of Simulated Water from MHz to Infrared. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2020;124(27):5599–5605. DOI: 10.1021/acs.jpca.0c04063.
- Andryieuskiy A., Kuznetsova S. M., Zhukovsky S. V., Kivshar Yu. S., Lavrinenko A. V. Water: Promising Opportunities For Tunable All-dielectric Electromagnetic Metamaterials. *Scientific Reports*. 2015;5(1):13535. DOI: 10.1038/srep13535.
- Hartmann S., Hultschig C., Eisenreich W., Fuchs G., Bacher A., Ghisla S. NIH shift in flavin-dependent monooxygenation: Mechanistic studies with 2-aminobenzoyl-CoA monooxygenase/reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(14):7831–7836. DOI: 10.1073/pnas.96.14.7831.
- Romero E., Gómez Castellanos J. R., Gadda G., Fraaije M. W., Mattevi A. Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes. *Chemical Reviews*. 2018;118(4):1742–1769. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00650.
- Tinikul R., Chaiyen P. Structure, Mechanism, and Mutation of Bacterial Luciferase. In: *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology – Volume 3*. New York City: Springer; 2014. P. 47–74. DOI: 10.1007/10_2014_281.

25. Campbell Z. T., Weichsel A., Montfort W. R., Baldwin T. O. Crystal Structure of the Bacterial Luciferase/Flavin Complex Provides Insight into the Function of the β Subunit. *Biochemistry*. 2009;48(26):6085–6094. DOI: 10.1021/bi900003t.

REFERENCES

1. Agbogbo F. K., Ramsey P., George R., Joy J., Srivastava S., Huang M., McCool J. Upstream development of *Escherichia coli* fermentation process with PhoA promoter using design of experiments (DoE). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2020;47(9–10):789–799. DOI: 10.1007/s10295-020-02302-7.
2. Bayer B., Stosch M., Striedner G., Duerkop M. Comparison of Modeling Methods for DoE-Based Holistic Upstream Process Characterization. *Biotechnology Journal*. 2020;15(5):1900551. DOI: 10.1002/biot.201900551.
3. Kante R. K., Vemula S., Somavarapu S., Mallu M. R., Boje Gowd B. H., Ronda S. R. Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization. *Biologicals*. 2018;56:45–53. DOI: 10.1016/j.biologicals.2018.10.002.
4. Overton T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*. 2014;19(5):590–601. DOI: 10.1016/j.drudis.2013.11.008.
5. Sanchez-Garcia L., Martín L., Mangues R., Ferrer-Miralles N., Vázquez E., Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial Cell Factories*. 2016;15(1):33. DOI: 10.1186/s12934-016-0437-3.
6. Ehgartner D., Sagmeister P., Langemann T., Meitz A., Lubitz W., Herwig C. A novel method to recover inclusion body protein from recombinant *E. coli* fed-batch processes based on phage Φ X174-derived lysis protein E. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017;101(14):5603–5614. DOI: 10.1007/s00253-017-8281-x.
7. Dudley G. B., Richert R., Stieglman A. E. On the existence of and mechanism for microwave-specific reaction rate enhancement. *Chemical Science*. 2015;6(4):2144–2152. DOI: 10.1039/C4SC03372H.
8. Kabb C. P., Carmean R. N., Sumerlin B. S. Probing the surface-localized hyperthermia of gold nanoparticles in a microwave field using polymeric thermometers. *Chemical Science*. 2015;6(10):5662–5669. DOI: 10.1039/C5SC01535A.
9. Kuznetsov D. B., Orlova E. V., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Shirokih A. A., Balandina A. V. Promising method of production optimization probiotic preparations. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(6):16–19. (In Russ.)
10. Kuznetsov D., Volkhin I., Orlova E., Neschislyayev V., Balandina A., Shirokih A. Microwave Radiation Effects on the Process of *Escherichia coli* Cultivation. *Microbiology and Biotechnology Letters*. 2019;47(3):372–380. DOI: 10.4014/mbl.1810.10024.
11. Marisch K., Bayer K., Cserjan-Puschmann M., Luchner M., Striedner G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial Cell Factories*. 2013;12(1):58. DOI: 10.1186/1475-2859-12-58.
12. Kelpšas V., von Wachenfeldt C. Strain improvement of *Escherichia coli* K-12 for recombinant production of deuterated proteins. *Scientific Reports*. 2019;9(1):17694. DOI: 10.1038/s41598-019-54196-w.
13. Khudyakova A. V., Lekontseva T. G., Fedorov A. V. Estimation of the Toxicity of a Metal/Carbon Nanocomposite of Copper by Biotesting. *Biology Bulletin*. 2019;46(10):1359–1363. DOI: 10.1134/S1062359019100145.
14. Zarubina A. P., Gapochka M. G., Novoselova L. A., Gapochka L. D. Effect of low intensity electromagnetic radiation on the toxicity of domestic wastewater tested with the "Ecolum" test-system. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2013;68(1):49–52. DOI: 10.3103/S0096392512030108.
15. Danilov V. S., Zarubina A. P., Eroshnikov G. E., Solov'eva L. N., Katshev F. V., Zavi'gel'skiy G. B. *Sensornye bioluminescentnyye sistemy na osnove lux-operonov raznykh vidov ljuminescentnykh bakterij* [Sensory bioluminescent systems based on lux-operons of different types of luminescent bacteria]. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya = Moscow University Bulletin. Series 16. Biology*. 2002;3:20–24. (In Russ.)
16. Neschislyayev V. A., Pshenichnov R. A., Archakova E. G., Chistokhina L. P., Fadeeva I. V. *Sposob opredeleniya antagonisticheskoy aktivnosti probiotikov* [Method for determining the antagonistic activity of probiotics]. Patent RUS RU 2187801. 20.08.2002. Available at: https://i.moscow/patents/RU2187801C2_20020820. Accessed: 23.07.2021. (In Russ.)
17. Kuznetsov D. B., Orlova E. V., Neschislyayev V. A., Volkhin I. L., Izmetiev I. V., Lunegov I. V., Balandina A. V., Dianova D. G. Epitaxy of the bound water phase on hydrophilic surfaces of biopolymers as key mechanism of microwave radiation effects on living objects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;154:40–47. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.014.
18. Stenishchev I. V., Basharin A. A. Toroidal response in all-dielectric metamaterials based on water. *Scientific Reports*. 2017;7(1):9468. DOI: 10.1038/s41598-017-07399-y.
19. Bordonsky G. S., Orlov A. O., Schegrina K. A. Dielectric Losses in Supercooled Pore Water at a Frequency of 34 GHz. *Radiophysics and Quantum Electronics*. 2017;59(10):812–820. DOI: 10.1007/s11141-017-9750-x.
20. Carlson S., Brüning F. N., Locher P., Bonthuis D. J., Netz R. R. Exploring the Absorption Spectrum of Simulated Water from MHz to Infrared. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2020;124(27):5599–5605. DOI: 10.1021/acs.jpca.0c04063.
21. Andryeuskii A., Kuznetsova S. M., Zhukovsky S. V., Kivshar Yu. S., Lavrinenko A. V. Water: Promising Opportunities For Tunable All-dielectric Electromagnetic Metamaterials. *Scientific Reports*. 2015;5(1):13535. DOI: 10.1038/srep13535.
22. Hartmann S., Hultschig C., Eisenreich W., Fuchs G., Bacher A., Ghisla S. NIH shift in flavin-dependent monooxygenation: Mechanistic studies with 2-aminobenzoyl-CoA monooxygenase/reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(14):7831–7836. DOI: 10.1073/pnas.96.14.7831.
23. Romero E., Gómez Castellanos J. R., Gadda G., Fraaije M. W., Mattevi A. Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes. *Chemical Reviews*. 2018;118(4):1742–1769. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00650.
24. Tinikul R., Chaiyen P. Structure, Mechanism, and Mutation of Bacterial Luciferase. In: *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology – Volume 3*. New York City: Springer; 2014. P. 47–74. DOI: 10.1007/10_2014_281.
25. Campbell Z. T., Weichsel A., Montfort W. R., Baldwin T. O. Crystal Structure of the Bacterial Luciferase/Flavin Complex Provides Insight into the Function of the β Subunit. *Biochemistry*. 2009;48(26):6085–6094. DOI: 10.1021/bi900003t.