

*На правах рукописи*

**Кузнецов Денис Бахтиерович**

**ПРИМЕНЕНИЕ СВЧ-ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ  
ПРОБИОТИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.6 – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Миронов Андрей Юрьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Красильников Игорь Викторович** – доктор биологических наук, Публичное Акционерное Общество «Институт стволовых клеток человека», Директор по инновациям в биотехнологии

**Меденцев Александр Григорьевич** – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, лаборатория адаптации микроорганизмов, заведующий

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Одной из важнейших задач в биотехнологии и биофармацевтической промышленности является оптимизация процессов культивирования микроорганизмов. Поиск методов с применением устройств, работающих на физических принципах, которые позволяют изменять активность клеток, представляется актуальным объектом изучения (Yamamoto T. et al., 2000; Holl R.A., 2001; Вызулин С.А. и др. 2006; Креницкий А.П. и др., 2006; Chari A. et al., 2010; Trevors, J.T. et al., 2012; Ericsson J.D., 2013; Powell, W.J. et al., 2014; Geddes C.D., 2019). Одними из таких физических методов воздействия, являются микроволновое и инфракрасное облучение (Tuner J. et al., 2001; Тамбиев А.Х. и др., 2002; Бецкий О.В., 2004; Morgan, R. et al., 2006; Barraud N. et al., 2006; Postolakyi O.M. et al., 2009; Колесников В.Г., 2010; Chilochi A.A. et al., 2011; Torgomyan H., 2012; Mishra T. et al., 2013; Kubo M.T.K. et al., 2020; Bazana L.C.G. et al., 2022). В последнее время активно разрабатываются и внедряются устройства с источниками электромагнитного излучения этих диапазонов и в будущем это может быть перспективно с учетом снижения их стоимости и появления знаний о механизмах, лежащих в основе биотехнологических эффектов (Колесников В.Г., 2010; Mishra T. et al., 2013; Kubo M.T.K. et al., 2020) при создании эффективных производств с новым классом оборудования, что будет способствовать реализации «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года».

Стоит отметить, что в настоящее время в коммерчески доступных устройствах для культивирования используются широкополосные ИК-излучатели в качестве теплового источника. В таком применении имеются недорогие и распространенные компоненты, а процессы воздействия хорошо описываются классической термодинамикой (Kowacz M. et al., 2009; Shah U. et al., 2016). Однако нетепловые эффекты в биотехнологических процессах как от инфракрасного, так и от микроволнового излучений по-прежнему не поддаются пониманию ученых, а устройства для узкополосного облучения сложны и дороги (Тамбиев, А.Х. et al., 2000; Tsimmerman I.S. et al., 2001; Wang P.X., 2006; Mazinani S.A. et al., 2019; Tayebi-khorami M. et al., 2022). Кроме того, развитие этого направления технологий невозможно без понимания фундаментальных законов, лежащих в основе механизмов воздействия электромагнитным излучением на бактериальные культуры, что в свою очередь является одной из проблем наряду с техническими барьерами. Таким образом, разработка электромагнитной биотехнологии как нового направления и научное обоснование механизмов, лежащих в её основе, является важной задачей в производстве продуктов, получаемых из бактериальных клеток.

### **Степень разработанности темы исследования**

Традиционно для культивирования клеток бактерий применяют аппаратно-программные комплексы на основе биореактора (Иоффе, И.Л. 1998; Тамбиев, А.Х. и др., 2003). Распространение биореакторов для производства лекарственных препаратов началось с открытия антибиотиков в 1940-х годах (Иоффе, И.Л. 1998). Однако по-прежнему из-за ограниченности знаний о влиянии электромагнитного излучения на биопроцессы, управление культивированием происходит за счет контроля температурного режима, рН, состава субстрата и газовых смесей, и скорости перемешивания. Различие в аппаратах для культивирования состоит преимущественно в особенностях термостатирования, подвода питательной среды и газовых смесей или воздуха (Иоффе, И.Л. 1998). С расширением знаний и появлением новых устройств,

появляется возможность изменять параметры живых систем с помощью подвода энергии электромагнитного излучения в процессе культивирования и ферментации (Holl R.A., 2001; Креницкий А.П. и др., 2007; Ericsson J.D., 2013; Takahashi Y. et al., 2018; Geddes C.D., 2019; Zhou X. et al., 2019). Например, за счёт появления дешёвых светодиодных источников излучения технология узкополосного красно-синего оптического облучения при культивировании фотосинтетических микроорганизмов и растений получила широкое распространение, но влияние такого рода лучистой энергии на живые системы изучено ещё недостаточно (Makowski W. et al., 2019; Weraduwage S. M. et al., 2022; Yudina L. et al., 2022).

К настоящему времени известны исследования, демонстрирующие перспективность разработки методов СВЧ-интенсификации в производстве различных микробиологических продуктов (Hadjiloucas S., 2002; Тамбиев А.Х. и др., 2002; Осипова М.В., 2007; Zhou X. et al., 2019; Gostyukhina A. et al., 2020; Tian H. et al., 2022; Tayebi-khorami M. et al., 2022). В этих работах показано, что обработка нетепловой энергией миллиметрового излучения может использоваться для повышения биосинтетической способности культур, повышения качества продукции, сокращения времени технологического цикла, увеличения биомассы в одном производственном цикле, в случае с рекомбинантными микроорганизмами – повышенному накоплению целевого продукта. Такие преимущества электромагнитной биотехнологии могут увеличить производительность существующих ферментационных линий.

Таким образом, крайне актуальным является изучение эффектов облучения на модельных системах и микроорганизмах, в том числе на штаммах *Escherichia coli*, и их использование в производстве биотехнологической продукции. Изучение этих эффектов также представляет собой актуальную научную проблему в связи с повсеместным распространением электромагнитного излучения этих диапазонов в антропосфере наряду с токсичными соединениями (Зарубина, А.П. и др., 2010).

**Цель работы** – разработка технологии интенсификации роста *Escherichia coli* и характеристика эффектов СВЧ-воздействия.

#### **Задачи исследования:**

1. Оценить влияние параметров технологического процесса на ростовые характеристики культуры *E. coli*.
2. Изучить эффекты от СВЧ-облучения в питательной среде и клетках *E. coli*.
3. Определить влияние микроволновой интенсификации роста культуры на продукцию рекомбинантных белков и физиологический статус клеток культуры.
4. Разработать технические и технологические приёмы интенсификации процесса культивирования штаммов *E. coli*.

#### **Научная новизна**

В ходе диссертации впервые разработан метод увеличения выхода биомассы *E. coli* с помощью микроволнового облучения, основанный на обработке культуры с однородной плотностью потока мощности на частоте 36,84÷37,04 ГГц в режиме непрерывной генерации, продолжительностью 25±5 мин, концентрацией, при которой необходимо проводить облучение 1200±240 млн кл/мл, температуре 37±1 °С. Использование этого метода в способах изготовления маточной и реакторной культуры в совокупности является перспективной технологией оптимизации *upstream process*.

Разработан метод восстановления индикаторных свойств цельноклеточного биосенсора на основе *E. coli* с *lux*-опероном после длительного хранения и продемонстрирована его работоспособность в способе определения антагонистической активности пробиотиков. Данный способ был разработан на основе изучения реакции

люминесценции биосенсора при воздействии на него электромагнитным излучением различных параметров.

Изучено влияние микроволновой интенсификации на продукцию рекомбинантных белков и установлено, что оптимальные параметры облучения не приводят к потере плазмиды и снижению их биосинтеза.

С использованием методов математического планирования и оптимизации условий проведения эксперимента определены параметры продолжительности облучения и концентрации клеток, при которых культивирование штамма *E. coli* является наиболее эффективным для увеличения прироста биомассы и продукции целевого белка.

С помощью комплекса физических методов исследования были получены данные, которые подверглись математической обработке и выявлены прогнозирующие переменные, что в будущем позволит предсказывать биотехнологические эффекты с помощью компьютерного моделирования. Впервые представлено теоретическое обоснование механизмов влияния электромагнитного излучения на метаболическую активность, бактериальную люминесценцию и изменение ростовых характеристик бактериальной культуры на основе изученных физико-химических процессов, протекающих при микроволновой обработке питательной среды и штаммов *E. coli*.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Разработана научная концепция об основных звеньях механизма влияния микроволнового облучения на биологические эффекты при СВЧ-облучении на модели *E. coli* с использованием теоретического аппарата физики и химии поверхности, что позволило интерпретировать результаты СВЧ-обработки на молекулярном уровне. Такой подход является новаторским и может быть в будущем консолидирован с вычислительными методами моделирования поверхностных процессов и молекулярно-динамического моделирования взаимодействия биополимерных структур с окружением из полярного растворителя и между собой.

Предложены оригинальные научные гипотезы, в соответствии с которыми процессы изменения подвижности протонов на интерфейсах клеток, индуцированные СВЧ-излучением, приводят к сложным каскадным реакциям, выражающимися в изменении биологических параметров культуры бактерий.

В результате проведенных исследований изучено влияние переменных технологического процесса и обнаружены новые закономерности, на основании чего были разработаны оригинальные методы и доказана их перспективность использования в практике тестирования антагонистической активности и культивирования штаммов *E. coli*.

Изложены новые идеи, которые вносят вклад в расширение представлений о влиянии различных факторов на получение требуемого биотехнологического результата при микроволновой обработке, что в свою очередь, позволило раскрыть связь ряда переменных и обнаружить зависимость прироста биомассы от количества протонов с низкой подвижностью и от суммарной площади интерфейсов клеток при СВЧ-облучении в виде S-образной кривой.

С помощью кластерного и регрессионного анализа изучен генезис процесса СВЧ-интенсификации бактериальной культуры и вычислены профили оптимальности концентрации клеток, при которой необходимо проводить облучение и его продолжительность.

На основании результатов исследований предложен новый метод повышения M-концентрации при культивировании *E. coli*, который позволяет увеличить прирост

биомассы *E. coli* K12 TG1 до 64% и *E. coli* LEGM-18 до 81% по сравнению с контролем. Этот метод может быть перспективным в производстве пробиотических препаратов и различных рекомбинантных белков.

Разработанный метод восстановления индикаторных свойств биосенсора с помощью микроволнового облучения в экспериментах с тестированием антагонистической активности дал возможность оценить потенциал его использования, что может иметь ценность не только в оценке качества пробиотических препаратов, но и в методах оценки интегральной токсичности с помощью автоматизированных мобильных лабораторий на базе беспилотных летательных аппаратов, что вероятно позволит снизить частоту валидационных мероприятий и упростит процесс пробоподготовки *in situ*.

Разработаны теоретические основы промышленной технологии и концепции устройств, позволяющие перенести лабораторные исследования в пилотное и серийное производство.

Материалы диссертации внедрены в образовательный процесс в рамках курса биотехнология в ФГБОУ ВПО Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 01.07.2022).

Результаты исследования и разработанный метод восстановления/усиления индикаторных свойств рекомбинантного штамма *E. coli* внедрена в работу АО «НПО Микроген» филиал в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед (акт внедрения от 07.04.2022).

#### **Методология и методы исследования**

Для решения задач, поставленных в рамках диссертационной работы, дизайн исследования включал несколько этапов. На первом этапе изучены факторы, влияющие на процесс облучения исследуемых объектов (глубина проникновения электромагнитного поля, расстояние до границы дальней зоны, диаграмма направленности), затем изучалось влияние ЭМИ на питательную среду и бактериальную культуру (спектрофотометрические характеристики, параметры релаксации ядерного магнитного резонанса (ЯМР), рефрактометрии, определение ростовых характеристик бактериальных культур, их параметров ЯМР-релаксации, pH и биолюминесценции, исследование структуры интерфейса бактериальных клеток с помощью сканирующей атомной микроскопии.

Автор диссертационной работы совместно проводил микробиологические исследования в ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора и АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед». В ФГАОУ ВО «Пермского государственного национального исследовательского университета» проводились работы: облучение образцов ЭМИ, проведение АСМ, ЯМР-релаксометрии (физический факультет); фотоспектроскопии (Естественно-научный институт); рефрактометрии (химический факультет).

#### **Штаммы микроорганизмов**

В эксперименте использован биосенсор «ЭКОЛЮМ-8» на основе штамма *E. coli* K12 TG1 hsd R17 hsdM thi relA1 sup E44 Δ (lac-pro AB) F' (traD36 proAB<sup>+</sup> lac I<sup>q</sup> lacZΔM15 с *lux*-опероном *Photoharbdus luminescens* ZM1 (сокр. *E. coli* K12 TG1 (plum)) и потенциально производственный штамм *E. coli* LEGM-18 (патент RU 2065875), полученный в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт экологии и генетики микроорганизмов» Уральского отделения Российской академии наук и депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИгенетика. Палочки длиной от 1,5 до 2,0 мкм, малоподвижные, грамтрицательные. Оптимальная температура роста 37±1° С. Спор

не образует.

Также использованы производственные штаммы из коллекции АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед»: *Lactobacillus acidophilus* NK1, *L. plantarum* 8P-A3, *L. fermentum* 90T-C4, *L. acidophilus* 100ash.

#### Питательные среды

Для исследования биологических показателей культур *E. coli* использованы питательные среды: бульон гидролизата рыбной муки (ГРМ-бульон) (ТУ 9398-021-78095326-2006), мясо-пептонный бульон (МПБ) (ТУ 10-02-789-176-94), среда Эндо (ВФС-42-3110-98), модифицированная питательная среда МРС-1.

#### **Биотехнологические методы исследования**

Для исследования ростовых характеристик использовали лиофилизаты культур, которые регидротировали раствором натрия хлорида комнатной температуры. Далее выдерживали 5 мин при комнатной температуре и засеивали питательные среды.

Для исследований с биосенсором проводили регидратацию лиофилизатов, далее выдерживали 30 мин при комнатной температуре, разливали в пробирки и облучали. В контрольные пробирки добавляли изотонический раствор. Тестирование проводилось при комнатной температуре.

#### Микроскопические методы исследования

Одним из наиболее информативных *in situ* методов исследования поверхности и адсорбатов является атомно-силовая микроскопия. Исследование интерфейсов клеток и их адгезионных способностей проводилось на сканирующем атомно-силовом микроскопе «Интегра Прима» (NT-MDT, Россия). Прибор позволяет получать информацию о топографии и адгезионных параметрах образца при работе в контактном режиме. Для сканирования использовался зонд с жёсткостью 0,03 N/m из CSGiO. Силу адгезии вычисляли по формуле:  $F_a = kx\Delta Z$ , где  $k$  – жёсткость зонда,  $\Delta Z$  – разность высоты между поверхностью и отрывом зонда.

#### Биолюминесцентные методы исследования

Для исследования влияния излучения на реакцию цельноклеточного биосенсора *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* работы проводили по методике экспресс-тестирования (Несчисляев В.А. и др. 2002). Уровень люминесценции биосенсора измеряли на «Биотокс» (ООО НЕРА-С, Россия). При проведении исследований подбора параметров облучения результаты исследования уровня люминесценции рассчитывались по формуле: Уровень люминесценции =  $(X_1 - X_2)/X_1$ , где  $X_1$  и  $X_2$  – средние значения по прибору без и после облучения образцов соответственно (Несчисляев В.А. и др., 2002).

#### Микробиологические методы исследования

Исследования проводили на Densi-La-Meter II (Эрба Рус, Россия) и КФК-3 (ЗОМЗ, Россия). Перед каждым измерением пробу перемешивали «восьмеркой», не допуская образования пузырьков, а также выдерживали не менее 30 сек. Измерения проводили при температуре  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Пересчёт в концентрацию клеток/мл из единиц мутности проводили согласно инструкции производителя и использовали формулу:  $1 \text{ McF} = 3 \times 10^8 \text{ кл./мл}$

Удельную скорость роста культуры ( $\mu$ , час<sup>-1</sup>) определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln C(t_2) - \ln C(t_1)}{t_2 - t_1},$$

где  $C(t_2)$  и  $C(t_1)$  – концентрация клеток/мл, пересчитанная из единиц Мак-Фарланда (см. выше) во время  $t_2$  и  $t_1$ .

Исследование параметра КОЕ проводили по ФС 42-2207-84. Каждое

исследование проводилось на пяти образцах. Лиофилизат регидратировали изотоническим раствором натрия хлорида. Далее готовили разведения и из шестого и седьмого десятикратного разведения отбирали 0,1 мл и засеивали на чашки Петри со средой Эндо или МРС4 и помещали в термостат. Термостатирование проводили 44 ч при +37 °С.

*Расчёт живых клеток в образце:*

1) Колоний в разведениях

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

2) Расчет КОЕ

$$\text{КОЕ} = \frac{\bar{x} * 10^7 + \bar{x} * 10^6}{2}$$

#### Спектрофотометрические методы исследования

Спектры оптической плотности ГРМ-бульона снимались в 10 мм кюветах в диапазоне от 200 до 1400 нм на спектрофотометре «UV-2600» (SHIMADZU, Япония). Проба сравнения – дистиллированная вода.

#### Рефрактометрические методы исследования

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

#### Методы исследования кислотности среды

Определение интегральной кислотности проводили на иономере «рХ-150» (ООО Антех, Беларусь).

#### Методы ядерной магнитно-резонансной релаксации

Исследование параметров ядерной магнитно-резонансной релаксации (ЯМР-релаксации) выполнено с помощью прибора «mq10 NMR Analyzer» (Bruker, США) в 10 МГц диапазоне. Согласно инструкции по эксплуатации температура измеряемых образцов в релаксметре должна составлять 40° С, поэтому пробы термостатировали 30 мин.

#### Статистические методы исследования

Результаты статистической обработки в таблицах представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ( $M \pm m$ ). При расчете средней ошибки использовали программу MS Office Excel. Для построения диаграмм использовали GraphPad Prism 8 и MS Office Excel. Для кластерного и регрессионного анализа, вычисления функции регрессии, а также для построения профилей для предсказанных значений и желательности и поверхностных контуров желательности использовали пакеты STATISTICA 10. Достоверность различий между сравниваемыми показателями оценивали с использованием t-критерия Стьюдента с помощью MS Office Excel. Критическое значение уровня значимости принимали равным 5%.

#### **Личное участие автора**

Автор провел анализ научной и технической литературы, изучил доступные на рынке аппаратно-программные комплексы на базе биореактора и разработал дизайны исследований. Автор самостоятельно проводил исследования с биосенсором, ЯМР-релаксометрию, рефрактометрию, адсорбционную спектрофотометрию, разработал методы и технологические решения для оптимизации процессов культивирования *E. coli*, которые в совокупности являются перспективной технологией. Проводил пробоподготовку для АСМ. Микробиологические исследования проводил совместно с профессором кафедры промышленной технологии с курсом биотехнологии ФГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, д.м.н. В.А. Несчисляевым. Совместно с доцентом



кафедры радиоэлектроники и защиты информации физического факультета ФГАОУ ВО ПГНИУ, к.ф.-м.н. И.В. Вольхиным выполнил работу по поиску оптимальных условий обработки СВЧ-излучением бактериальных культур, совместно с заведующим кафедрой радиоэлектроники и защиты информации физического факультета ФГАОУ ВО ПГНИУ, к.ф.-м.н. И.В. Лунеговым проводил сканирующую атомно-силовую микроскопию. Автор лично провел статистическую обработку, интерпретировал результаты, определил выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Разработанная технология интенсификации биопроцессов обеспечивает повышение М-концентрации культуры *E. coli* K12 TG1 до 64% и *E. coli* LEGM-18 до 81%.

2. Интенсификация процесса суспензионного культивирования не ведёт к потере плазмиды культурой и негативному влиянию на продукцию рекомбинантных белков.

3. Технология получения биомассы включает микроволновое облучение культуры *E. coli* концентрацией  $1200 \pm 240$  млн кл/мл при частоте  $36,84 \div 37,04$  ГГц в режиме непрерывной генерации с потоком мощности излучения  $0,4 \div 10$  мВт/см<sup>2</sup>, продолжительностью  $25 \pm 5$  мин.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность полученных результатов подтверждена не менее 5-кратной повторностью экспериментов и обеспечена комплексным использованием современных физических, физико-химических, микробиологических, биотехнологических и математических методов исследования.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планами научно-исследовательской работы ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора «Разработка нового поколения пробиотиков на основе оценки состояния микробиоты человека и использование новых методов идентификации лакто- и бифидобактерий для профилактики инфекционных и неинфекционных заболеваний, связанных с дисбалансом микробиоты (Рег. № НИОКТР 121021000283-2).

Апробация диссертации проведена на заседании секции «Медицинская биотехнология» Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол №1 от 07.06.2022 г).

Материалы диссертационной работы были доложены на Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО «НПО Микроген» в г. Пермь «Пермской НПО «Биомед» «Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке» в 2018 г., итоговых научных конференциях в Пермской государственной фармацевтической академии в 2011-2012 гг. в г. Пермь, на 18-м Международном медицинском Славяно-Балтийском научном форуме «Санкт-Петербург - Гастро-2016» в г. Санкт-Петербург, на конференции Пермского государственного исследовательском университете «Физика для Пермского края» в 2013 г в г. Пермь.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 10 статей в рецензируемых изданиях, 4 статьи – в остальных изданиях, 4 тезиса – в материалах конференций.

**Объём и структура диссертации.** Материалы диссертации изложены на 117 страницах машинописного текста и иллюстрированы 13 таблицами и 35 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, двух глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка обозначений и сокращений,

цитируемой литературы, включающего 50 – отечественных и 151 – зарубежных источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Изучение влияния обработки электромагнитным излучением на бактериальные культуры и питательные среды

#### Эффекты обработки ЭМИ питательной среды

FDA и ЕМА используют комплексный системный подход к регулированию качества фармпродукции и сходятся в том, что производственный процесс должен быть охарактеризован, определены его критические и ключевые параметры.

Нами определены зависимости продолжительности облучения и изменения физико-химических свойств среды. Обнаружено, что СВЧ-облучение приводит к изменению оптической плотности питательной среды в УФ-части спектра (менее 350 нм) (Рисунок 1.А). Обнаружены две компоненты: первая – пептидная (а), вторая – водная (б). Максимум поглощения пептидной компоненты находится на длине волны 308 нм. В этой области поглощают ароматические аминокислоты. Пик пептидной компоненты (Рисунок 1.А(а)) имеет характерное снижение оптической плотности после облучения. Гипохромизм наблюдается в спектрах  $\alpha$ -спиральных полипептидов. Основной причиной гипохромного сдвига является изменение направления моментов квантовых переходов мономерных остатков биополимеров, сопровождающее переход к другой конформации (Волькенштейн М.В., 1981).

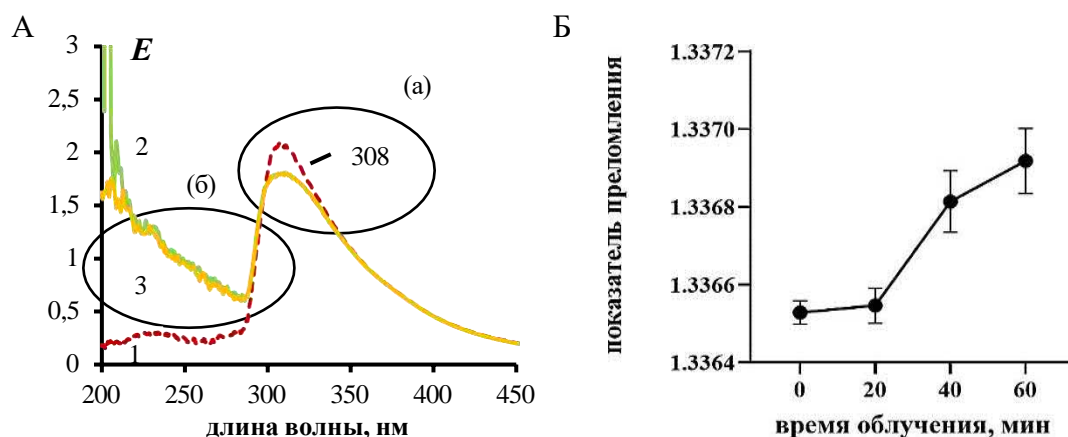


Рисунок 1 – Влияние ЭМИ с  $\nu=37,01$  ГГц на ГРМ-бульон

*Примечание:* (А) – спектры оптической плотности: необлученный (1); облучённой в течение 20 мин (2) и 60 мин (3); (а) белковая компонента, (б) водная компонента; (Б) – изменение показателя преломления

Увеличение оптической плотности водной компоненты в УФ-области связано с возбуждением электронов в молекулах-акцепторах. Увеличение дипольного момента молекул, поглотивших излучение, запускает процессы эпитаксиального роста адсорбированной фазы на интерфейсах.

Результаты рефрактометрии (Рисунок 1.Б) демонстрируют зависимость изменения показателя преломления образцов от продолжительности облучения. Наблюдаемый эффект связан со способностью СВЧ-излучения разворачивать  $\alpha$ -спирали белков за счёт изменения доступности участков для молекул растворителя. Такой эффект СВЧ-излучения показан в ряде публикаций и может иметь прикладное значение в рефолдинге белков.

Для установления правомерности утверждения об изменении толщины адсорбированной фазы растворителя на интерфейсах наиболее приемлемым и информативным является метод ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) релаксометрии. Метод ЯМР-релаксации основан на определении соотношения амплитуд отдельных компонент огибающей сигналов эхо при определении времени релаксации. Более подвижные ядра  $^1\text{H}$  молекул воды и менее подвижные ядра  $^1\text{H}$  молекул биополимеров, входящих в состав клеток и питательной среды, имеют принципиально различные времена релаксации и поэтому дают отдельные компоненты в огибающих сигналов спинового эха, которые пропорциональны населённости (количеству) протонов  $^1\text{H}$  соответствующих фракций. Показатели интенсивности сигналов эха при определении времен  $T_2$ , связанные с подвижностью молекул воды, зависят от характера перераспределения водородных связей. Известно, что разрыв водородных связей ведёт к падению  $T_2$  (вследствие уменьшения времени жизни протона в составе Н-связи), но несущественно влияет на  $T_1$  (Никольская Е.А. и др., 2013).

Установлена незначительная зависимость количества малоподвижных протонов внутри надмолекулярных комплексов питательной среды от продолжительности СВЧ-облучения при исследуемой мощности. Однако обнаружена зависимость между количеством протонов, участвующих в диполь-дипольном взаимодействии и временем облучения в виде S-образной кривой. Полученные данные подтверждают влияние СВЧ-излучения на возбуждение молекул-акцепторов и изменение подвижности протонов в стерильной среде.

#### **Влияние ЭМИ миллиметрового диапазона на штаммы *Lactobacillus***

Предполагается, что повышение прироста биомассы пробиотических организмов может иметь значение при производстве лекарственных препаратов на их основе. Изучалось дозозависимое влияние излучения путем варьирования времени облучения. В эксперименте при разной продолжительности СВЧ-облучения обнаружено увеличение прироста биомассы штаммов *L. acidophilus* 100ash (28%), *L. acidophilus* NK1 (37,5%) и выраженное угнетение роста культуры *L. fermentum* 90Т-С4 (-46%), при этом облучение культуры *L. plantarum* 8Р-А3 не оказало статистически значимого эффекта. Отсутствие единых закономерностей по приросту биомассы при одинаковых условиях СВЧ-облучения привело нас к выводу, что существуют неустановленные факторы, которые могут значимо влиять на достижение необходимого эффекта.

Для наиболее полного изучения процессов, протекающих под воздействием ЭМИ на бактериальную культуру, дальнейшие исследования были направлены на изучение эффектов излучения при обработке рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего люциферазу.

#### **Атомно-силовая микроскопия клеток *E. coli***

Для управления технологическими свойствами процесса культивирования с помощью ЭМИ требуется понимание механизмов, которые приводят к требуемому эффекту. Наше внимание сконцентрировано на околоповерхностных процессах. Одним из методов, позволяющих изучить интерфейсы бактериальных клеток, является атомно-силовая микроскопия (АСМ), позволяющая одновременно изучить топографию поверхности и её адгезионные свойства. При изучении воздействия СВЧ-облучения на биотехнологические аспекты процесса культивирования проведена АСМ клеток *E. coli* (Рисунок 2).

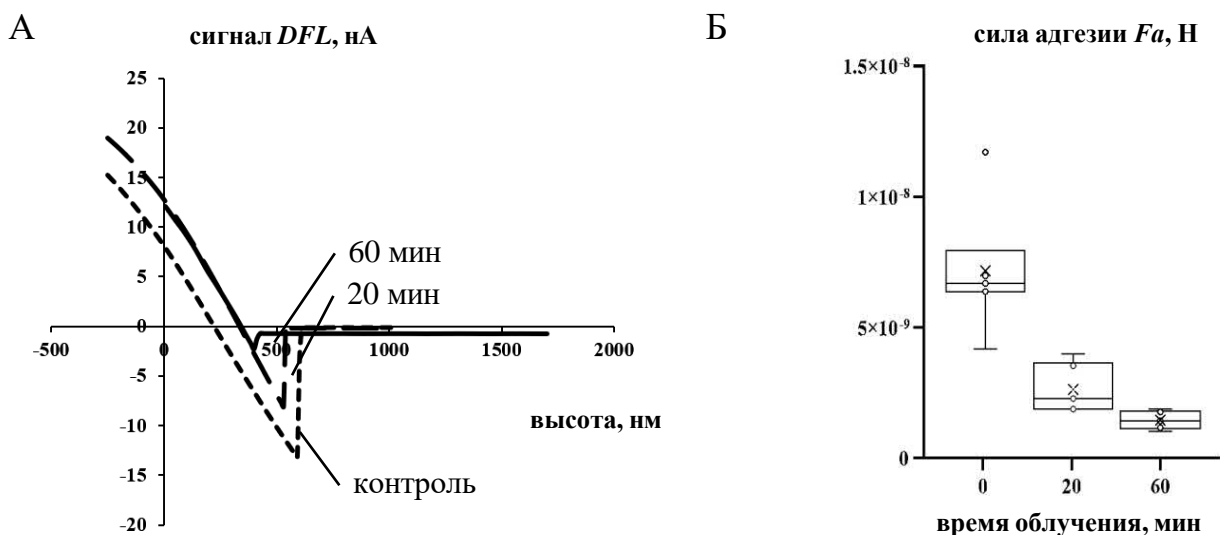


Рисунок 2 – Параметры АСМ клеток штамма *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens*

Примечание: (А) перемещение зонда на поверхности клетки, (Б) сила адгезии,  $\nu=36,84 \div 37,04$  ГГц

С помощью АСМ изучена динамика межфазных процессов на интерфейсах клеток микроорганизмов под воздействием СВЧ-излучения. Анализ данных показал выраженное изменение параметров движения зонда на поверхности (Рисунок 2.А) и снижение показателя силы адгезии  $F_a$  по сравнению с образцами без облучения (Рисунок 2.Б). Показано, что надмолекулярные комплексы из молекул мембраны, которые преимущественно представлены липополисахаридами и адсорбированных молекул растворителя на интерфейсах клеток имеет высокую чувствительность к обработке СВЧ-излучением.

На рисунке 3 представлены сканы интерфейсов клеток. Установлено, что пропорции и рельеф поверхности облучённых клеток отличаются от контрольных образцов. На клетках, подвергшихся облучению, визуализируется складчатая структура, тогда как интерфейс необлучённых клеток (контроль) имеет гладкий и ровный рельеф. Наблюдаются изменения в морфологии и пропорции клеток (уменьшение высоты в отношении длины). На основании сравнительного изучения свойств интерфейсов клеток установлено, что их обработка приводит к снижению толщины адсорбированной фазы воды.

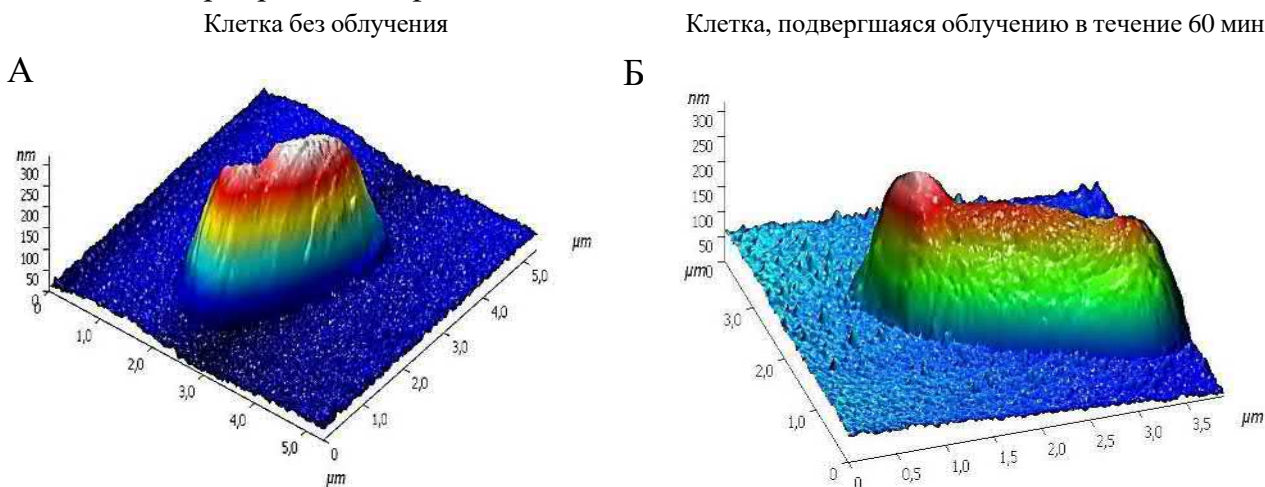


Рисунок 3 – АСМ 3D-изображения бактериальных клеток штамма *E. coli* K12 TG1

Примечание: (А) – без облучения (контроль); (Б) – облучённых в течение 60 мин,  $\nu=37,01$  ГГц

## Изучение биолюминисценции индикаторного штамма *E. coli* K12 TG1 с клонированными генами *luxCDABE* *P. luminescens* ZM 1

Бактериальный сенсор «Эколюм-8» на основе *E. coli* с *lux*-опероном зарекомендовал себя как надёжный инструмент для определения интегрального воздействия широкого спектра соединений различной природы. Изменение показателя биолюминесценции биосенсора под воздействием СВЧ-излучения характеризует влияние на физиологический статус клеток. Определено влияние различных видов излучения на уровень люминесценции биосенсора. Среди изученных режимов облучения биосенсора ИК-излучением не обнаружен режим, обеспечивающий индукцию люминесценции. При изучении влияния СВЧ-излучения установлено, что частота излучения и продолжительность воздействия влияют на интенсивность свечения клеток. Найдены условия облучения, позволяющие повысить уровень люминесценции биосенсора более, чем на 50%.

Повышение физиологического статуса клеток, связанного с их метаболической активностью при СВЧ-обработке, позволяет восстанавливать индикаторные свойства биосенсора. В исследовании с облучённым и необлучённым биосенсором с выходящим сроком годности и свежими контрольными образцами установлено, что после облучения уровни свечения выравниваются до значений биосенсора из свежей серии (Таблица 1).

Таблица 1 – Уровень свечения облучённой и необлучённой культуры *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* при добавлении необлучённой культуры *E. coli* LEGM-18. Облучение 60 мин,  $\nu=36,84\div 37,04$  ГГц

Время экспозиции	Контроль	Без облучения		После облучения	
	Уровень люминесценции, имп/с	Уровень люминесценции, имп/с	Изменение к контролю (%)	Уровень люминесценции, имп/с	Изменение к контролю (%)
30 мин	5309±1275	4498±1679	-15,3 ( $P = 0,027$ )	5597±940	5,4 ( $P = 0,37$ )
60 мин	5223±939	4095±1124	-21,6 ( $P = 0,04$ )	5241±1188	0,4 ( $P = 0,65$ )
90 мин	5001±933	4128±1112	-17,4 ( $P = 0,03$ )	5409±1464	8,2 ( $P = 0,75$ )

Примечание: Знак (-) указывает на уменьшение по сравнению с контрольными значениями

В тесте антагонистической активности с облучённым и необлучённым биосенсором с *E. coli* LEGM-18 обнаружено, что облучение испытуемого штамма не ведёт к искажению индикаторных свойств. Таким образом показано, что СВЧ-облучение может быть использовано в способе восстановления индикаторных свойств биосенсора и не приводит к их искажению.

### Разработка технологии интенсификации роста культуры *E. coli*

Для проверки выдвинутой гипотезы о взаимосвязи между уровнем накопления биомассы *E. coli* и изменением динамики протонов в системе «среда-культура» при обработке ЭМИ миллиметрового диапазона изучены параметры ЯМР-релаксации и показатели роста культур *E. coli* в процессе периодического культивирования.

На первом этапе изучены ростовые характеристики культуры, вычислены концентрации клеток, построены кривые накопления биомассы и удельных скоростей роста. Анализ полученных данных выявил различие в ростовых характеристиках культур *E. coli* LEGM-18 и *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 на среде ГРМ-бульон. Ростовые характеристики культуры *E. coli* LEGM-18 представлены на рисунке 4. На основе этих данных определены основные фазы роста культуры *E. coli* LEGM-18 и их зависимость от исходной концентрации клеток. В анализируемом процессе культура с исходными концентрациями в  $1,2 \times 10^9$  и

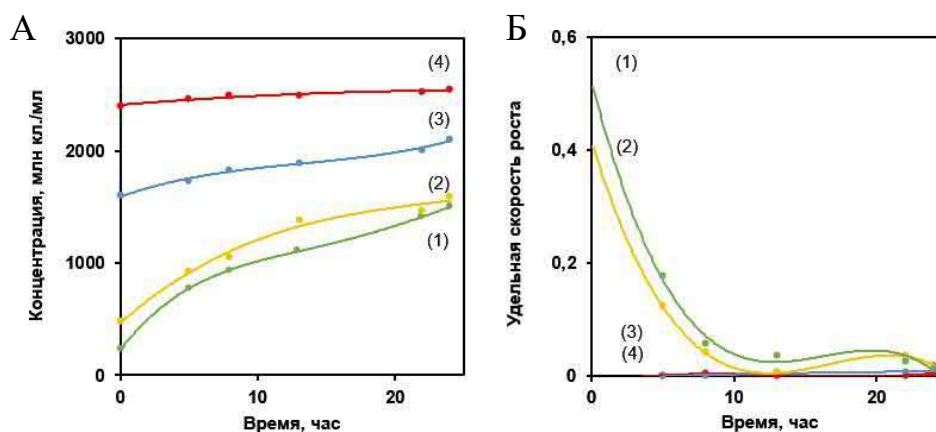


Рисунок 4 – Ростové характеристики культуры *E. coli* LEGM-18

Примечание: А) Кривые накопления биомассы, Б) Изменения удельной скорости роста в зависимости от исходной концентрации клеток: 1)  $2,4 \times 10^8$  кл./мл, 2)  $4,8 \times 10^8$  кл./мл, 3)  $1,2 \times 10^9$  кл./мл, 4)  $2,4 \times 10^9$  кл./мл. Среда - ГРМ-бульон

$2,4 \times 10^9$  млн. кл./мл находилась в фазе замедленного роста, которая к 12 ч сменялась стационарной фазой. При исходной концентрации в  $2,4 \times 10^8$  и  $4,8 \times 10^8$  кл./мл фаза экспоненциального роста фиксируется до 12 ч, после чего начиналась фаза замедленного роста, сменяющаяся стационарной фазой к 22 ч. Полученные данные позволили оценить подобласть значений исходных концентраций и интервал варьирования, в которой будет проводиться эксперимент.

Для изучения условий интенсификации процесса культивирования при СВЧ-облучении проведены исследования по установлению прироста биомассы со штаммами культур *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 и *E. coli* LEGM-18.

Изучено влияние СВЧ-облучения на биологические показатели культуры *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 и *E. coli* LEGM-18. При одинаковых условиях обнаружены сходные зависимости эффектов при облучении штамма *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 с штаммом *E. coli* LEGM-18. При низких концентрациях наблюдалось либо угнетающее действие, либо его отсутствие, либо незначительная стимуляция роста, но с увеличением концентрации, при которой проводили облучение, прирост биомассы увеличивался.

Полученные данные использованы для построения карты уровня прироста биомассы (Рисунок 5). Варьируемые факторы нормировали при помощи линейного преобразования:  $x_j = (z_j - z_j^0) / \Delta z_j$ , где  $x_j$  – нормированное значение фактора,  $z_j$  – нормированное значение фактора,  $z_j^0$  – значения фактора в натуральном масштабе,  $\Delta z_j$  – интервал варьирования по оси  $j$ .  $z_j^0 = (z_j^{min} + z_j^{max}) / 2$ ,  $\Delta z_j = (z_j^{max} - z_j^{min}) / 2$ . Анализ карты уровня прироста биомассы культуры *E. coli* LEGM-18 на среде ГРМ-бульон показал, что существуют два экстремума в координатах  $-0,1; -0,35$  и  $1,2; 1,2$ . Оптимизация процесса при продолжительном облучении и высокой концентрации, при которой необходимо проводить облучение (соответствует координатам  $1,2; 1,2$ ) не является перспективным, поэтому выбран экстремум с координатами  $-0,1; -0,35$ . Для определения границ оптимальных технологических условий проведено планирование на основе полного факторного эксперимента (ПФЭ). Для этого центр плана эксперимента был смещен и получены дополнительные данные в точках 10 и 30 мин продолжительности облучения при концентрациях  $6 \times 10^8$  и  $1,8 \times 10^9$  кл./мл. Данные полного факторного эксперимента позволили вычислить адекватную функцию модели полиномиальной



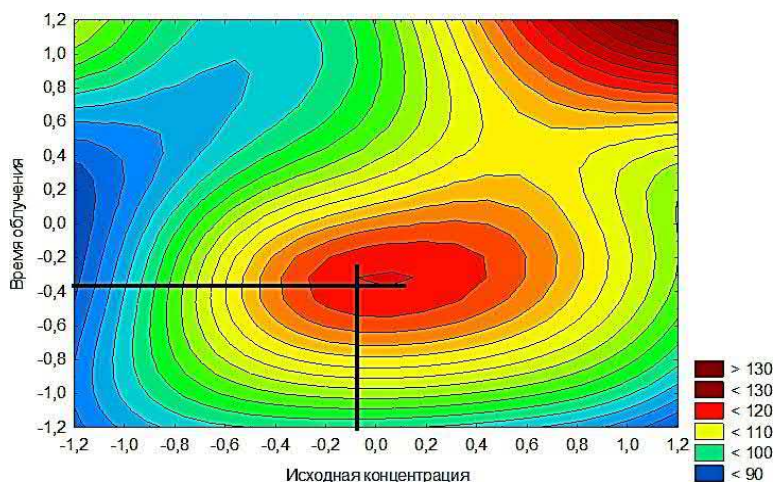


Рисунок 5 – Карта уровня прироста биомассы (%) в зависимости от исходной концентрации и продолжительности облучения

*Примечание:* синий цвет – снижение % прироста биомассы по сравнению с контрольными образцами, зелёный цвет – уровень прироста биомассы исследуемых образцов соответствует значениям контрольных образцов, оттенки красного цвета – повышение % прироста биомассы по сравнению с контрольными образцами

регрессии и границы оптимальных значений параметров СВЧ-облучения:  $y=31,82-11,6x_1^2+10,64x_2-7,16x_2^2-3,19x_2^3$ , где  $y$  – прирост биомассы (%),  $x_1$  – концентрация (млн кл./мл),  $x_2$  – время облучения (мин).

На рисунке 6 представлены модели поверхности отклика (оптимальности) исходной концентрации слева и времени облучения справа. Установлено, что оптимальными параметрами для интенсификации процесса культивирования (увеличение концентрации

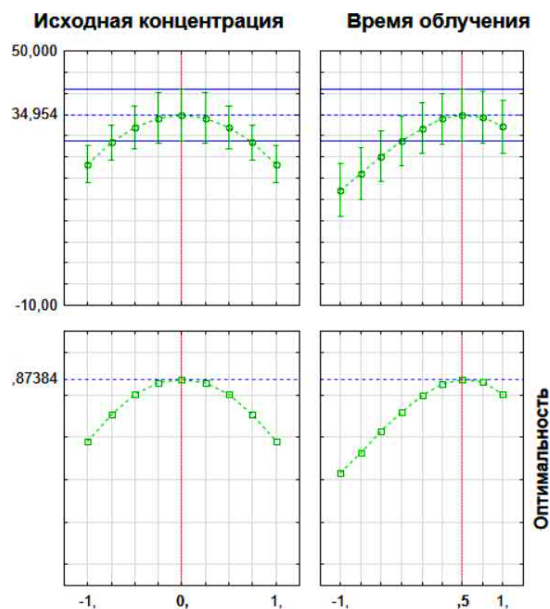


Рисунок 6 – Профили для предсказанных значений исходной концентрации и продолжительности облучения

*Примечание:* слева – профили для предсказанных значений исходной концентрации от 600 до 1800 млн кл./мл (соответствуют -1 и 1 по оси  $x$ ); справа – профили для предсказанных значений продолжительности облучения от 10 до 30 мин (соответствуют -1 и 1 по оси  $x$ ); сверху графики минимальных и максимальных значений, соответствующих квадратичной поверхности отклика; снизу графики поверхностей оптимальности, пересечение с красной линией соответствует оптимумам переменных, где 1 – 100%

клеток) являются  $25 \pm 5$ -минутное СВЧ-облучение при концентрации  $1200 \pm 240 \times 10^6$  кл./мл.

Анализ данных прироста биомассы при оптимальных технологических параметрах на среде МПБ и ГРМ-бульон показал, что питательная среда может значительно оказывать влияние на % прироста биомассы при облучении. На ГРМ-бульоне прирост составил 33% по сравнению с контролем, при использовании МПБ прирост составил 81% (Рисунок 7.А). Вероятно, особенности в ростовых характеристиках культуры на различных средах связаны с различием в составе нутриентов.

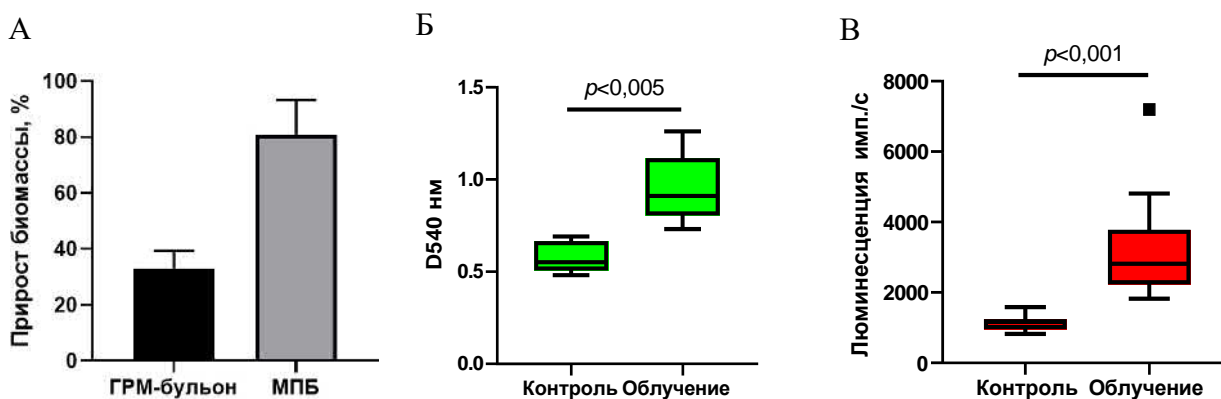


Рисунок 7 – Биотехнологические параметры бактериальной культуры *E. coli*.

Примечание: А) % прироста биомассы *E. coli* LEGM-18 при микроволновой интенсификации к контролю (контроль – «0»); Б) Прирост биомассы и В) изменение люминесценции при СВЧ- облучении культуры *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1

При найденных оптимальных параметрах прирост биомассы *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 на среде МПБ увеличился до 64% по сравнению с контролем (Рисунок 7.Б).

Одной из важных проблем при культивировании рекомбинантных штаммов является потеря плазмиды хозяином и прекращение продукции целевого белка. Поэтому на следующем этапе определили влияние СВЧ-облучения на продукцию рекомбинантного белка с помощью люминесцентного тестирования. Анализ свечения, обусловленного работой такого рекомбинантного белка-люциферазы, позволяет установить функциональную связь между СВЧ-облучением, метаболической активностью клеток и количеством продуцируемого клетками целевого продукта. На рисунке 7.В представлены консолидированные данные измерений люминесценции через 30 и 60 мин после 24-часового культивирования. Исследования продемонстрировали, что оптимальные условия обработки обеспечивают прирост биомассы и не оказывают негативного влияния на продукцию люциферазы и метаболическую активность клеток.

Также в производстве пробиотических препаратов важна антагонистическая активность. Антагонистическая активность бактерий опосредована образованием ими специфических метаболитов. База данных ЕСMDB (Университет Альберты) содержит информацию метаболома *E. coli*, состоящую из 3755 низкомолекулярных метаболитов. В качестве метода определения уровня продукции экзометаболитов в получаемой биомассе проведён тест антагонистической активности с помощью биосенсора. Результаты тестирования антагонистической активности представлены на рисунке 8. Перед исследованием все образцы разводились до одинаковых значений мутности. Установлено, что СВЧ-обработка не приводит к статистически значимым изменениям антагонистической активности и не оказывает выраженных изменений в продукции



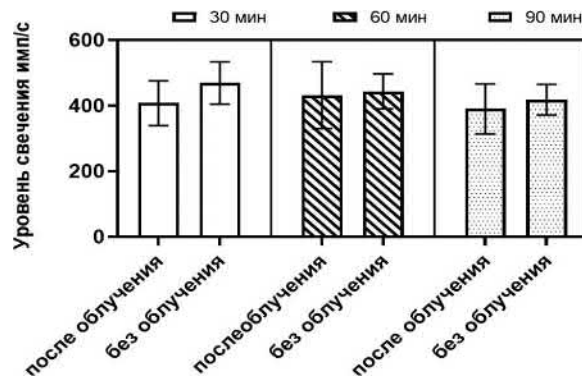


Рисунок 8 – Антагонистическая активность субстанции

Примечание: свечение биосенсора при добавлении облучённого и необлучённого штамма *E. coli* LEGM-18

экзометаболитов *E. coli* LEGM-18, обладающих биологической активностью по отношению к биосенсору.

Таким образом, найдены оптимальные параметры технологического процесса для получения максимального прироста биомассы на различных средах. Обнаружено, что кроме частоты и потока мощности излучения существуют другие критические параметры, влияющие на воспроизводимость и получение полезного биотехнологического эффекта: концентрация клеток, при которой проводится СВЧ-облучение, продолжительность облучения и состав питательной среды.

Разработана технологическая схема получения биомассы *E. coli* (Рисунок 9), которая начинается от получения серии культуры штаммов *E. coli* и заканчивается

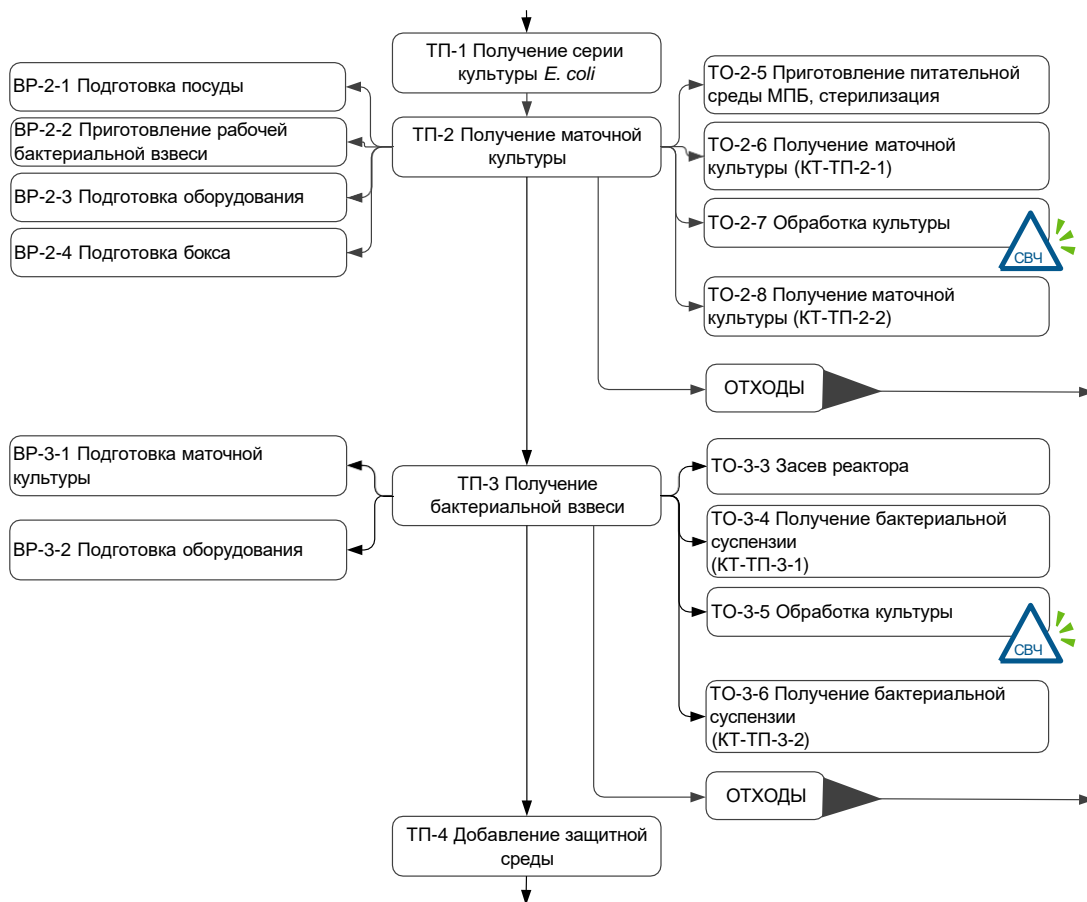


Рисунок 9 – Технологическая схема получения биомассы *E. coli*

реакторным культивированием. Технология микроволновой интенсификации имеет ряд ограничений и на каждом этапе этого процесса используются разнообразные технические и технологические приёмы. Последующие части диссертационной работы посвящены концепциям методов и устройств, которые позволят преодолеть ограничения и осуществить все этапы этого процесса.

На этапе получения серии культуры штаммов технология включает два этапа. На первом этапе в ампулу лиофилизированного штамма вносят пипеткой МПБ и выдерживают 5 мин и после переносят в плоскопараллельный культуральный флакон с МПБ с учётом достижения  $(1,2 \pm 0,24) \times 10^9$  кл./мл. Флакон облучают в течение 20 мин, поток мощности излучения  $0,4 \div 10$  мВт/см<sup>2</sup>. Инкубируют  $16 \pm 2$  ч при температуре  $37 \pm 1$ °С. Полученную культуру переносят в плоскопараллельные флаконы с МПБ. Исходная концентрация должна составлять  $(1,2 \pm 0,24) \times 10^9$  кл./мл. Повторяют процедуру обработки и инкубации в условиях, описанных выше. Инкубацию второй генерации проводят в течение  $13 \pm 1$  ч. Следующие этапы зависят от конечного продукта.

В виду необходимости соблюдения условия толщины скин-слоя при СВЧ-облучении для реализации технологии получения маточной культуры предложен вариант с использованием СВЧ-камеры. Облучение проводится с помощью рупорных антенн. Исходя из наших экспериментальных данных скин-слой составляет около 1 см, а для достижения эффекта прироста биомассы требуется поток мощности излучения  $0,4 \div 10$  мВт/см<sup>2</sup>. Для удовлетворения таких условий необходимо увеличение глубины проникновения излучения и повышения его однородности, поэтому камера для СВЧ-обработки размещается в рефлекторе, который отражает не поглотившееся излучение обратно в культуру. Для обеспечения равномерного распределения клеток в культуре используется перемешивающее устройство типа «качалка». Вариант с проточной перегрузкой позволяет получать до 93 л маточной культуры при использовании СВЧ-камеры диаметром 1,62 м и 12 антеннами. Облучение проводят при следующих параметрах: облучение 20 мин при концентрации  $(1,2 \pm 0,24) \times 10^9$  кл./мл.

Полученную маточную культуру переносят в реактор-ферментёр, снабжённый специальной погружной антенной решёткой (Рисунок 10). Маточную культуру культивируют до концентрации  $(1,2 \pm 0,24) \times 10^9$  кл./мл, после облучают в течение 20 мин и после продолжают культивировать до конца лог-фазы. Для реализации технологии реакторного культивирования разработана концепция перспективной

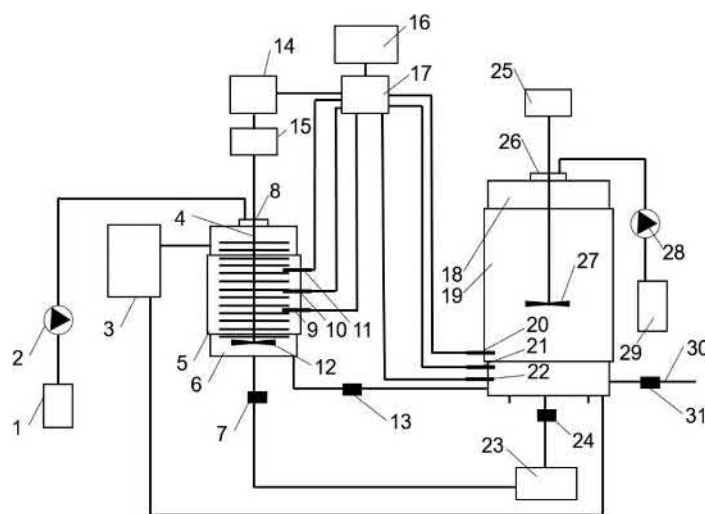


Рисунок 10 – Блок-схема биореактора

биотехнологической установки на базе биореактора, оснащённого обвязкой для СВЧ-облучения. Технический результат достигается тем, что используется антенная решетка погружного типа с шагом в 3 см и генератор не менее 6 кВт. Антенная решётка подключена к электродвигателю (15) и одновременно выполняет функции перемешивания и интенсификации биопроцесса.

Технологическая оснащённость биореактора включает необходимую «обвязку»: датчики температуры, рН, оптической плотности (9,10,11,20,21,22), перемешивающие устройства (12,27), запорную арматуру (7,13,24,31), перекачивающие устройства (2,28), в т.ч. для циркуляции бактериальной суспензии между реакторами и барбатирования (23), дополнительные ёмкости для корректирующих растворов (1,29) и др.

В соответствии с требованиями GMP производственные процессы должны быть основаны на механистическом понимании влияния факторов на характеристики продукта. Невозможно внедрить технологию без глубокого понимания механизма, лежащего в её основе.

Основным компонентом бактериальной культуры является вода, известно, что вода имеет максимальные значения поглощения в СВЧ-диапазоне, следовательно, основным акцептором микроволновой энергии являются молекулы воды, а акт поглощения этой энергии можно рассматривать как первичное звено этого воздействия. Поэтому на следующем этапе для изучения влияния микроволнового излучения на процесс изменения подвижности протонов, фазы связанной воды и установления корреляции данных с уровнем прироста биомассы использовался метод ЯМР-релаксации. Рост концентрации протонов фазы  $T_{11}$  возможен только за счёт увеличения количества малоподвижных протонов в двойном электрическом слое в процессе поляризации.

Вначале были изучены параметры ЯМР-релаксации культуры при различной исходной концентрации (Таблица 2). При содержании  $1,2 \times 10^9$  кл./мл значение

Таблица 2 – Параметры ЯМР-релаксометрии *E. coli* LEGM-18 в ГРМ-бульон

ЯМР параметры, время релаксации $T$ (мс)						
Исходная концентрация	$T_{11}$	% к контролю	$T_{12}$	% к контролю	$T_2$	% к контролю
0	34 ± 8	0	3210 ± 32	0	1565 ± 11	0
$2,4 \times 10^8$	36 ± 8	5,9 ( $P=0,75$ )	3380 ± 41	5,3 ( $P<0,001$ )	1594 ± 12	1,9 ( $P<0,05$ )
$4,8 \times 10^8$	38 ± 7	11,8 ( $P=0,55$ )	3760 ± 46	17,1 ( $P<0,001$ )	1690 ± 14	8,0 ( $P<0,001$ )
$1,2 \times 10^9$	32 ± 5	-5,9 ( $P=0,73$ )	3700 ± 44	15,3 ( $P<0,001$ )	1648 ± 11	5,3 ( $P<0,001$ )
$2,4 \times 10^9$	28 ± 4	-17,6 ( $P=0,3$ )	3610 ± 42	12,5 ( $P<0,001$ )	1621 ± 12	3,6 ( $P<0,001$ )
ЯМР параметры, амплитуда $A$ (%)						
Исходная концентрация	$A_{11}$	% к контролю	$A_{12}$	% к контролю	$A_2$	% к контролю
0	-5,1 ± 0,4	0	-161,6 ± 5,7	0	41,5 ± 1,4	0
$2,4 \times 10^8$	-4,7 ± 0,3	-7,8 ( $P=0,24$ )	-123 ± 3,1	-24 ( $P<0,001$ )	39,59 ± 1,1	-4,6 ( $P=0,14$ )
$4,8 \times 10^8$	-4,7 ± 0,4	-7,8 ( $P=0,29$ )	-134,3 ± 4,4	-17 ( $P=0,003$ )	35,88 ± 0,5	-13 ( $P<0,005$ )
$1,2 \times 10^9$	-5,3 ± 0,4	3,9 ( $P=0,57$ )	-130,4 ± 4,8	19,3 ( $P=0,002$ )	39,3 ± 0,9	-5,3 ( $P=0,09$ )
$2,4 \times 10^9$	-5,6 ± 0,4	9,8 ( $P=0,2$ )	-147,4 ± 5,1	-8,8 ( $P=0,03$ )	41,58 ± 1,3	0,2 ( $P=0,95$ )
ЯМР параметры, населенность $P$ (%)						
Исходная концентрация	$P_{11}$	% к контролю	$P_{12}$	% к контролю	$P_2$	% к контролю
0	3,16 ± 0,09	0	96,84 ± 0,09	0	99,8 ± 0,2	0
$2,4 \times 10^8$	3,82 ± 0,1	21 ( $P=0,005$ )	96,18 ± 0,1	-0,7 ( $P=0,005$ )	95,2 ± 0,2	-4,6 ( $P<0,001$ )
$4,8 \times 10^8$	3,5 ± 0,12	11 ( $P=0,06$ )	96,5 ± 0,12	-0,4 ( $P=0,06$ )	86,29 ± 3,8	-14,2 ( $P=0,01$ )
$1,2 \times 10^9$	4,06 ± 0,11	29 ( $P=0,002$ )	95,94 ± 0,11	-0,9 ( $P=0,002$ )	94,52 ± 0,5	-6,1 ( $P<0,001$ )
$2,4 \times 10^9$	3,8 ± 0,05	20 ( $P=0,005$ )	96,2 ± 0,05	-0,7 ( $P=0,005$ )	100	0,2 ( $P=0,23$ )

Примечание: Знак минус указывает на снижение по сравнению с контролем

Населенность  $P$  (%) =  $A/A_{max} \times 100\%$ ,  $P_{11} + P_{12} = 100\%$

Исходная концентрация «0» – стерильная питательная среда

населённости  $P_{11}$  статистически достоверно больше по сравнению с другими концентрациями, это свидетельствует о наличии большего количества протонов  $^1\text{H}$  в менее подвижной фракции.

После исследованы параметры ЯМР-релаксации при различной продолжительности СВЧ-облучения. Анализ данных прироста биомассы и параметров ЯМР-релаксации позволил сделать заключение о том, что существует прямая зависимость между ростом культуры и концентрацией малоподвижных протонов в системе (Рисунок 11). При этом наблюдается уменьшение времени спин-спиновой релаксации  $T_2$ , что свидетельствует о разрывах водородных связей и снижении подвижности системы за счёт образования более жёстких Н-связей между молекулами растворителя. Обнаружено, что максимальный эффект прироста биомассы при СВЧ-облучении наблюдается, когда в системе наивысшие значения количества малоподвижных протонов. Это хорошо согласуется с законами термодинамики, т.к. система с максимальным количеством малоподвижных протонов является сильно неравновесной и имеет наименьшую энтропию (наибольшее значение доступной внутренней энергии). При сообщении дополнительной энергии система снижает свою энтропию за счёт разделения зарядов и повышения подвижности протонов, выводя их за границы интерфейса. В свою очередь такие протоны начинают участвовать в увеличении градиента концентрации протонов  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  в системе.

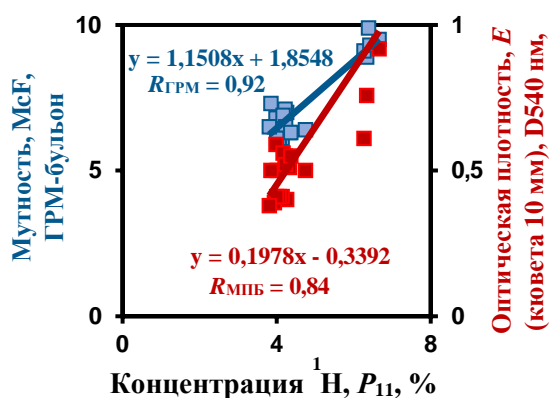


Рисунок 11 – Регрессионный анализ. Концентрация протонов  $P_{11}$ / прирост биомассы при СВЧ-облучении

Градиент концентрации протонов  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  является основным источником энергии любой клетки. Именно транспорт протонов через АТФ-синтазу обеспечивает синтез молекул АТФ. В результате снижения энтропии системой мы наблюдаем прирост биомассы как побочный продукт этого процесса. Такая интерпретация нерезонансного СВЧ-облучения на прирост биомассы позволяет прояснить механизм различных феноменов, например, множественность и пролонгированность эффектов.

Таким образом, была разработана технология интенсификации роста *E. coli* и осуществлена характеристика эффектов СВЧ-воздействия. Экспериментально установлены основные звенья механизма повышения ростовых характеристик бактериальной культуры.

## ВЫВОДЫ

1. Оптимальными параметрами микроволновой интенсификации роста культуры *E. coli* являются: частота 36,84÷37,04 гГц в режиме непрерывной генерации, поток

мощности излучения  $0,4 \div 10$  мВт/см<sup>2</sup>, продолжительность  $25 \pm 5$  мин, концентрация  $1200 \pm 240$  млн кл./мл, температура  $37 \pm 1$  °С.

2. При оптимальных параметрах в стерильной питательной среде после СВЧ-облучения обнаружено наличие возбужденных молекул-акцепторов, увеличение количества протонов, участвующих в диполь-дипольном взаимодействии на 17%, в системе «среда-клетки» - увеличение количества малоподвижных протонов на 58% и увеличение ширины адсорбированной фазы растворителя. Структурно-динамическое состояние протонов в системе «среда-клетки» может быть сильным предиктором при микроволновой интенсификации роста штаммов *E. coli*.
3. Разработанная технология микроволновой интенсификации биопроцессов, включающая методы культивирования и СВЧ-облучения, не оказывает негативного влияния на продукцию рекомбинантного белка люциферазы.
4. Разработанная технология позволяет увеличить выход биомассы до 81% по сравнению с контролем.
5. Разработана технологическая схема получения биомассы *E. coli* с использованием камеры для СВЧ-облучения и теоретически разработана перспективная установка для крупнотонажного производства.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

При культивировании штаммов *E. coli* для повышения выхода биомассы рекомендуется проводить облучение с однородной плотностью потока мощности, что достигается за счет расчета толщины скин-слоя (расстояние, на котором интенсивность излучения уменьшается в 2,71 раз) для конкретной среды и частоты излучения и диаграммы направленности.

При конструировании устройств для пилотного и промышленного производства рекомендуется использовать антенные погружные решетки, которые обеспечат соблюдение условий толщины скин-слоя при глубинном культивировании.

Для увеличения плотности бактериальной культуры рекомендуется использовать разработанную технологическую схему и параметры облучения: частота  $36,84 \div 37,04$  ГГц в режиме непрерывной генерации, поток мощности излучения  $0,4 \div 10$  мВт/см<sup>2</sup>, продолжительность  $25 \pm 5$  мин, концентрация, при которой необходимо проводить облучение  $1200 \pm 240$  млн кл./мл, температура  $37 \pm 1$  °С.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

1. Необходимо продолжить изучение биологических эффектов и их механизмов при воздействии микроволновым излучением в т.ч. на других видах микроорганизмов и клеток млекопитающих. Подобные исследования дадут необходимую информацию о фундаментальных основах взаимодействия неионизирующего излучения с живой материей, что может иметь широкое значение во многих отраслях.

2. Кроме этого дальнейшие работы необходимо сосредоточить на разработку аппаратно-программных комплексов, обеспечивающих возможность осуществления микроволновой обработки бактериальной культуры большого объема. Это вызовет получить разносторонние данные при пилотных испытаниях технологии и следовательно, оптимизировать существующие производственные процессы.

### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Кузнецов, Д.Б. Перспективы применения электромагнитных излучений крайне высокой частоты малой мощности в фармации / Д.Б. Кузнецов // **Фундаментальные исследования.** – 2012. – № 10 (часть 2). – С. 400–404.

2. Кузнецов, Д.Б. Каталитические технологии в биоиндустрии на основе физических механизмов воздействия / Д.Б. Кузнецов, Т.Ф. Одегова // **Вестник**

Пермской государственной фармацевтической академии. – 2012. – №9. – С. 236-239.

3. Кузнецов, Д.Б. Физико-химические механизмы воздействия крайне-высокочастотного излучения на микроорганизмы / Д.Б. Кузнецов // *Современные проблемы науки и образования*. – 2013. – № 1; URL: <http://www.science-education.ru/107-8226> (дата обращения: 28.01.2013).

4. Кузнецов, Д.Б. Методика исследования влияния ИК- и СВЧ-излучения на микроорганизмы / Д.Б. Кузнецов, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин, Т.Ф. Одегова // *Вестник Пермского Университета*. (Серия: Физика) – 2013. – Вып.3 (25). – С. 83-87.

5. Кузнецов, Д.Б. Влияние СВЧ-излучения низкой интенсивности на рост штамма *Bifidobacterium bifidum* при глубинном культивировании / Д.Б. Кузнецов, И.Л. Вольхин, И.В. Лунегов // *Материалы краевой научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Физика для Пермского края»*, 22 – 30 апреля 2013 г., г. Пермь. – Пермь, 2013. – С. 137–141.

6. Кузнецов, Д.Б. Исследование влияния СВЧ-излучения миллиметрового диапазона на бактериальную суспензию тест-штамма / Д.Б. Кузнецов, И.Л. Вольхин, И.В. Лунегов // *Материалы краевой научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Физика для Пермского края»*, 22 – 30 апреля 2013 г., г. Пермь. – Пермь, 2013. – С.133–136.

7. Кузнецов, Д.Б. Исследование изменений на поверхности клеток *E. coli lum+* под влиянием СВЧ-излучения миллиметрового диапазона / Д.Б. Кузнецов, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин, В.Л. Гейн, В.А. Несчисляев, А.А. Широких // *Бутлеровские сообщения*. – 2013. – Т.36, №12. – С.53-58.

8. Кузнецов Д.Б. Исследование реакции бактериальной люминесценции под воздействием электромагнитного излучения миллиметрового и инфракрасного диапазонов / Д.Б. Кузнецов, Т.Ф. Одегова, В.А. Несчисляев, В.Л. Гейн, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин // *Бутлеровские сообщения*. – 2013. – Т. 36, №. 12. – С. 8-14.

9. Кузнецов, Д.Б. Эффекты воздействия СВЧ-излучения на *Escherichia coli lum+* / Д.Б. Кузнецов, И.В. Лунегов, И.Л. Вольхин, И.В. Лунегов, Т.Ф. Одегова, В.А. Несчисляев // *Вестник Пермского Университета*. (Серия: Физика) – 2013. – Вып. 2 (24). – С. 71–75.

10. Кузнецов, Д.Б. Молекулярные механизмы воздействия инфракрасного излучения на микроорганизмы / Д.Б. Кузнецов // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 4 (часть 2) – С. 414–418.

11. Кузнецов, Д.Б. Использование микроволнового излучения низкой интенсивности в процессах культивирования микроорганизмов / Д.Б. Кузнецов, Е.В. Орлова, В.А. Несчисляев, И.Л. Вольхин, А.А. Широких, А.В. Баландина // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2015. – №4 (13). – С. 92-95.

12. Кузнецов, Д.Б. Перспективный метод оптимизации производства пробиотических препаратов / Д.Б. Кузнецов, Е.В. Орлова, В.А. Несчисляев, И.Л. Вольхин, А.А. Широких, А.В. Баландина // *Биофармацевтический журнал*. – 2015. – Т.7, №6. – С. 19-22.

13. Кузнецов, Д.Б. Изучение воздействия электромагнитного излучения на процесс культивирования пробиотических клеток / Д.Б. Кузнецов, Е.В. Орлова, В.А. Несчисляев // *Материалы 18-го международного славяно-балтийского научного форума «Санкт-Петербург – Гастро-2016»*, Гастроэнтерология Санкт-Петербурга, 16 – 18 мая 2016 г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2016. – №1-2. – С. М17-М18.

14. Kuznetsov, D.B. Epitaxy of the bound water phase on hydrophilic surfaces of biopolymers as key mechanism of microwave radiation effects on living objects / D.B.

**Kuznetsov, E.V. Orlova, V.A. Neschislyayev, I.L. Volkhin, I.V. Izmestiev, I.V. Lunegov, A.V. Balandina, D.G. Dianova // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2017. – V. 154. – P. 40-47.**

15. Кузнецов, Д.Б. Концепт-вариант биотехнологической установки на базе ферментера с электромагнитным излучателем / Д.Б. Кузнецов, Е.В. Орлова, В.А. Несчисляев, И.Л. Вольхин // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию филиала АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское Научно-производственное объединение «Биомед», Перспективы развития производства и применения иммунобиологических препаратов в XXI веке, 14-15 июня 2018 г. г. Пермь, – Пермь, 2018. – С.218-220.

16. **Kuznetsov, D. Microwave Radiation Effects on the Process of *Escherichia coli* Cultivation / D.B. Kuznetsov, I.L. Volkhin, E.V. Orlova, V.A. Neschislyayev, A.V. Balandina, A.A. Shirokich // Microbiology and Biotechnology Letters. – 2019. – V. 47, № 3. – P. 372-380.**

17. Кузнецов, Д.Б. Основы разработки микроволновой интенсификации *upstream process* на примере *Escherichia coli* / Д.Б. Кузнецов, А.Ю. Миронов, В.А. Несчисляев, И.Л. Вольхин, А.М. Королюк, Е.В. Орлова, А.Д. Шилина // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т.10 , № 4. – С. 39-47.

18. **Kuznetsov, D. Restoration of the Indicator Properties of Whole-cell Luminescent Biosensors / D.B. Kuznetsov, A.Yu. Mironov, V.A. Neschislyayev, I.L. Volkhin, E.V. Orlova, A.D. Shilina // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2022. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03977-7>**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ	–	атомно-силовая микроскопия
АТФ	–	аденозинтрифосфорная кислота
ГРМ	–	гидролизат рыбной муки
ИК	–	инфракрасное
КОЕ	–	колониеобразующие единицы
МПБ	–	мясопептонный бульон
СВЧ	–	сверхвысокочастотное
ЭМИ	–	электромагнитное излучение
ЯМР	–	ядерный магнитный резонанс
GMP	–	good manufacturing practice
ЕМА	–	European Medicines Agency
ЕСМДВ	–	Escherichia coli Metabolome Database
FDA	–	Food and Drug Administration
$\Delta\mu_{\text{H}^+}$	–	градиент концентрации протонов