

УДК 573.6.579

С.Н. Адамович¹, А.П. Федосеев², Р.В. Киборт², Р.Г. Мирсков¹, А.Н. Мирскова¹**ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СТИМУЛЯТОРЫ ПОВЫШЕНИЯ ВЫХОДА БАКТЕРИЙНОЙ МАССЫ STAPHYLOCOCCUS AUREUS (ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТЕИНА А)**¹ Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

Впервые изучено влияние 2-гидроксиэтиламмониевых солей биологически активных арилсульфанилуксусных кислот на выход бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (штамм № 209), биомассы бактерий Мережковского (*Salmonella typhi* spermophilorum) и кишечной палочки (*E. coli* M-17). Внесение стимуляторов роста в питательную среду в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} вес. % повышает выход бактериальной массы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* на 32–40 %, бактерий Мережковского *Salmonella typhi* spermophilorum – на 47,5–140,4 %, кишечной палочки – на 11,4–59,4 %. Увеличение выхода биомассы микроорганизмов с использованием стимуляторов открывает путь к их практическому использованию в процессах крупномасштабного глубинного культивирования золотистого стафилококка с целью получения ценного протеина А, биопрепаратов, диагностических средств, сывороток, вакцин, для производства лекарственных пробиотических препаратов, для уничтожения грызунов (переносчиков чумы, вредителей урожая зерна, продуктов питания).

Ключевые слова: стимуляторы повышения выхода ценной биомассы микроорганизмов

PROSPECTIVE GROWTH STIMULATORS OF BACTERIAL MASS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS (TO PRODUCE PROTEIN A)S.N. Adamovich¹, A.P. Fedoseyev², R.V. Kibort², R.G. Mirskov¹, A.N. Mirskova¹¹ A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

The influence of 2-hydroxyethylammonium salts of biologically active arylsulfanylacetic acids on the yield of bacterial mass of *Staphylococcus aureus* (strain 209), biomass of Merezkhovskiy's bacteria (*Salmonella typhi* spermophilorum) and *E. coli* (*E. coli* M-17) has been studied for the first time. The introduction of growth stimulators (in concentration of 10^{-3} – 10^{-8} wt. %) into nutrient medium increases the yield of microorganisms bacterial mass: *Staphylococcus aureus* by 32–40 %, Merezkhovskiy's bacteria *Salmonella typhi* spermophilorum by 47,5–140,4 %, *E. coli* by 11,4–59,4 %. The increase of yield of the microorganisms biomass reached by application of the growth stimulators opens the route to their utilization in large-scale processes of *Staphylococcus aureus* cultivation for the production of valuable protein A, biopreparations, diagnostic agents, serum, vaccines, probiotic drugs as well as for the struggle with rodents (plaque carriers, pests).

Key words: growth stimulators of valuable microorganisms mass

Разработка и совершенствование процессов производства биопрепаратов, в частности, бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (для получения протеина А) является актуальной задачей. В настоящее время бактериальная масса стафилококка широко используется как источник белка А-протеина, который является важнейшим компонентом современных бактериальных биопрепаратов, биоспецифических иммуно- и гемосорбентов, диагностических средств, питательных и защитных сред, сывороток, вирусных вакцин. На его основе разработаны новые иммуноплазмасорбенты с зафиксированным на них девитализированным золотистым стафилококком, высокоэффективные при острых отравлениях, заболеваниях печени и почек, хирургических эндогенных интоксикациях, аутоиммунных и психоневрологических заболеваниях.

А-протеин, выделяемый из клеточной стенки золотистого стафилококка, где его содержание составляет 1,7 % сухого веса клетки или 6,7 % веса клеточной стенки, имеет неограниченное значение в качестве детектора иммуноглобулина IgG при иммунодиагностике для определения IgG-фракции человека, для очистки, иммобилизации и детекции

иммуноглобулинов, при иммуноферментном анализе, в биосенсорах.

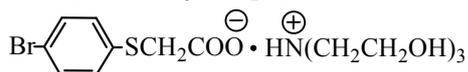
В решении задачи повышения выхода бактериальной массы стафилококка для получения протеина А положительную роль может сыграть использование стимуляторов роста. Благодаря огромному биологическому [2] потенциалу перспективны для этих целей

2-гидроксиэтиламмониевые соли органилокси(сульфанил)(сульфонил)уксусных кислот с общей формулой $R_n(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_{3-n}\text{N}^+\text{H} \cdot \text{O}^-(\text{O})\text{CCH}_2\text{X}(\text{Ind})\text{Ar}$; R = H, Me, X = O, S, SO₂; n = 0–2.

Проведенные ранее лабораторные и опытно-промышленные испытания ряда соединений из класса 2-гидроксиэтиламмоний органилокси(сульфанил)(сульфонил)ацетатов показали их существенное влияние на выход биомассы дрожжей [3, 5, 7]. Так, например, при добавлении указанных выше соединений в питательные среды в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} вес. % увеличивался выход бактериальной массы дрожжей рода *Candida* на 14–18 %, содержание в ней протеина на 10–12 %, а суммы аминокислот на 7–7,5 %; выход биомассы дрожжей рода *Saccharomyces*

cerevisiac возрастал на 15–18 %, суммарное содержание аминокислот на 20–29 % по сравнению с контролем. Соединения указанной структуры повышали также выход биомассы бактерий рода *Pseudomonas*, *Methylomonas*, *Acetobacter* и др., гриба *Aspergillus niger* – продуцента пищевой лимонной кислоты, ускоряли проращивание ячменя в техно-логии получения пивоваренного солода, рост тутового и дубового шелкопрядов [3], рост микроорганизмов рода *Bacillus mucilaginosus* (Vm), биомасса которых является высоко-эффективной белково-витаминно-ферментной добавкой в корм сельскохозяйственных животных и птиц на 22–44 % [3]. С добавкой стимулятора нарастание биомассы бифидо-бактерий происходит быстрее в 3–4 раза, при этом достигается концентрация бифидо-бактерий 10^{12} – 10^{14} клеток в мл продукта, что на 4–6 порядков выше, чем в контроле за более длительное время [4]. Получены первые результаты по существенному стимулированию роста (в 2–2,5 раза) эмбриональных человеческих клеток, используемых в лечении многих заболеваний методами клеточной терапии [8]. При этом не обнаружено даже признаков дистрофии клеток.

Влияние 2-гидроксиэтиламмоний органилокси(сульфанил)(сульфонил)ацетатов на повышение выхода биомассы *Staphylococcus aureus* практически не изучено. Известен единичный пример: профессор С.-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера д.м.н. Виноградов Е.Я. впервые обнаружил стимулирующее действие на рост стафилококка *Staphylococcus Coowan* синтезированного нами нового соединения – 4-бромфенилсульфанилацетата трис(2-гидроксиэтил)аммония, который в концентрации 4×10^{-4} вес. % в мясопептонном бульоне увеличивал выход сухой бактериальной массы на 25–28,8 % по сравнению с контролем (без стимулятора):



Развивая эти исследования с целью поиска перспективных стимуляторов повышения выхода бактериальной массы *Staphylococcus aureus*, мы из-

учили влияние 2-гидроксиэтил-аммониевых солей биологически активных арилсульфанилуксусных кислот на выход бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (штамм № 209), бактерий Мережковского (*Salmonella typhi spermophilorum*) и кишечной палочки (*E. coli* М-17).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соединения, использованные для испытаний в качестве потенциальных стимуляторов повышения выхода бактериальной массы микроорганизмов, впервые синтезированы в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН. Испытания их стимулирующей активности проведены на кафедре микробиологии Иркутского государственного медицинского университета.

В работе использовали тестовые культуры *St. aureus* (штамм № 209), а также бактерий Мережковского *Salmonella typhi spermophilorum* и кишечную палочку (*E. coli* М-17).

Готовили последовательные серийные разведения стимуляторов от 10^{-3} до 10^{-8} вес. % в 4,5 мл питательной среды – мясопептонный агар (МПА). В качестве контроля – 4,5 мл МПА без стимулятора. В каждую пробирку делали посев суточной бульонной культуры по одной калиброванной бактериологической петле. Термостатировали 24 ч при 37 °С. После этого содержимое пробирок высушивали во взвешенных на аналитических весах чашках Петри в сушильном шкафу при 90 °С до постоянного веса. Стимулирующее действие препаратов учитывали через 24 часа по увеличению биомассы в % по отношению к контролю (вес микробной массы в МПА без стимуляторов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано влияние 8 соединений из ряда 2-гидроксиэтиламмоний органилокси-(сульфанил)(сульфонил)ацетатов на выход биомассы микроорганизмов в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} вес. % в питательной среде. Все соединения данного ряда проявляют различный по величине стимулирующий эффект по отношению к микроорганизмам, величина которого зависит от строения стимуля-

Таблица 1

Структура активных стимуляторов 1–3.

Соединение	Формула
1. Трис(2-гидроксиэтил)аммония 4-хлорфенилсульфанилацетат	
2. Диметил-(2-гидроксиэтил)аммония 2,4-динитрофенилсульфанилацетат	
3. L-(+)-трео-1-пара-нитрофенил-2-аммоний-пропандиола-1,3 4-хлорфенилсульфанилацетат	

Таблица 2

Увеличение выхода бактериальной массы микроорганизмов (в % к контролю)

№ соединения	Концентрация соединений, вес. %	<i>St. aureus</i> (штамм № 209)	Бактерии <i>Salmonella typhi spermophilorum</i>	Кишечная палочка
2	10 ⁻³	9,3	63,25	59,64
	10 ⁻⁴	28,5	63,13	
	10 ⁻⁵	16,01	21,3	41,4
	10 ⁻⁶	26,17	65,4	41,08
	10 ⁻⁷	31,96	140,39	12,24
	10 ⁻⁸	17,4	120,81	16,72
3	10 ⁻³	4,31	50,09	
	10 ⁻⁴	9,03	59,0	13,16
	10 ⁻⁵		47,52	
	10 ⁻⁶	40,39	52,92	11,39
	10 ⁻⁷	36,41	53,16	2,56
	10 ⁻⁸		60,83	

торов, их концентрации и от вида бактерий. Так, соединение 1 повышает выход биомассы кишечной палочки в концентрации 10⁻³ – 10⁻⁵ на **19,2–28,5** % и лишь на 1,5 – 2,5 % выход биомассы стафилококка. Большое влияние из испытанных веществ на выход биомассы *Staphylococcus aureus*, бактерий Мережковского и кишечной палочки проявили алканоламмониевые соли серосодержащих 4-хлор и 2,4-динитрофенилсульфанилуксусных кислот (табл. 1). Показатели увеличения выхода биомассы микроорганизмов под влиянием стимуляторов 2, 3 по сравнению с контролем через 24 часа культивирования при 37 °С представлены в таблице 2.

Таким образом, внесение стимуляторов роста (2, 3) в питательную среду в концентрациях 10⁻³ – 10⁻⁸ вес. % повышают выход бактериальной массы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* на 32 – 40 %, бактерий Мережковского *Salmonella typhi spermophilorum* – на 47,5 – 140,4 %, кишечной палочки – на 11,4 – 59,4 %. Стимулирующий эффект соединений 1–3 обусловлен, по-видимому, их активностью как антиагрегантов, стабилизаторов клеточных мембран, антиоксидантов, уменьшающих интенсивность процессов перекисного окисления липидов биологических мембран [1, 6].

Полученные результаты по увеличению выхода ценной биомассы микроорганизмов с использованием стимуляторов открывают путь к их практическому использованию в биотехнологических процессах получения биопрепаратов, диагностических средств, сывороток, вакцин и др. Так, стимуляторы повышения выхода бактериальной массы *Staphylococcus aureus* перспективны для применения в процессах крупномасштабного глубинного культивирования золотистого стафилококка с целью получения ценного препарата – протеина А.

Биомасса бактерий Мережковского (*Salmonella typhi spermophilorum*), безвредных для человека и домашних животных, но вызывающих тиф грызунов со смертельным исходом, находит применение

в биологическом методе дератизации для уничтожения вредных грызунов (переносчиков чумы и др. опасных заболеваний, вредителей урожая зерна, продуктов питания) в местах их массовых скоплений (продовольственные склады, морские порты, города).

Биомасса кишечной палочки *E.coli M-17* используется для производства лекарственных пробиотических препаратов, например, колибактерина, бификола, биофлора, которые применяются в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника. Пробиотики способствуют нормализации микрофлоры, стимулируют местные репаративные процессы в кишечнике; улучшают пищеварение и обмен веществ; стимулируют естественные факторы защиты. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по использованию кишечной палочки для производства биотоплива.

Используемые для культивирования микроорганизмов природные стимуляторы дефицитны и дороги. Преимуществом химических стимуляторов является их доступность благодаря разработанным нами способам получения и технологии производства из промышленного сырья, безвредность, постоянный состав, высокая активность при добавлении в питательные среды в низких концентрациях. Введение стимуляторов в питательные среды позволяет сократить добавление дорогостоящих витаминов, аминокислот – цистеина, триптофана, ферментативных гидролизатов казеина, сои, мяса, нативной сыворотки крови и др. Разработаны лабораторные технологические регламенты производства, технические условия на ряд препаратов. Технология опытного производства стимуляторов опробована на Усолье-Сибирском химфармкомбинате. Применение данных стимуляторов не требует капитальных вложений на дополнительное оборудование и изменение технологической схемы производства.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлен стимулирующий эффект 2-гидроксиэтиламмониевых солей 4-хлорфенилсульфанилуксусной кислоты на выход бактериальной массы *Staphylococcus aureus* (штамм № 209), биомассы бактерий Мережковского (*Salmonella typhi spermophilorum*) и кишечной палочки (*E. coli* М-17).

2. Внесение стимуляторов в питательную среду в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} вес. % увеличивает выход бактериальной массы *Staphylococcus aureus* на 32–40 %, бактерий Мережковского *Salmonella typhi spermophilorum* – на 47,5–140,4 %, кишечной палочки – на 11,4–59,4 %, что открывает путь к повышению эффективности процессов крупномасштабного культивирования золотистого стафилококка (с целью получения ценного протеина А, биопрепаратов, диагностических средств, сывороток, вакцин), кишечной палочки (для производства лекарственных пробиотических препаратов), препаратов для уничтожения грызунов (переносчиков чумы, вредителей урожая зерна, продуктов питания).

ЛИТЕРАТУРА

1. 2-Гидроксиалкил-аммониевые соли арилтиоуксусных кислот и их влияние на функциональную активность тромбоцитов / Г.Г. Левковская [и др.] // Хим.-фарм. журнал. – 1986. – № 3. – С. 295–300.

2. 2-Гидроксиэтиламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот – но-

вых фармакологически активных соединений / А.Н. Мирскова [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2011. – Т. 19, № 5. – С. 467–478.

3. Алканоламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот – новые стимуляторы биологических процессов / А.Н. Мирскова [и др.] // Ж. оп. Х. – 2008. – Т. 44. – Вып. 10. – С. 1501–1508.

4. Влияние трис-(2-гидроксиэтил)аммоний арокси-, арилтио- и арилсульфонилацетатов на жизнедеятельность бифидобактерий / А.Н. Мирскова [и др.] // Докл. АН. – 2003. – Т. 390, № 2. – С. 280–282.

5. Воронков М.Г., Горбалинский В.А., Дьяков В.М. Крезацин – новый биостимулятор микробиологического синтеза // Докл. АН. – 2003. – Т. 369, № 6. – С. 831–832.

6. Синтез и биологическая активность трис-(2-оксиэтил)аммониевых солей органилтиоуксусных кислот / Г.Г. Левковская [и др.] // Хим.-фарм. ж. – 1983. – № 6. – С. 679–683.

7. Способ получения хлебопекарных дрожжей / А.Н. Мирскова [и др.]. – А.с. СССР 1350172 (1987). – Бюлл. изобр. 1987. – № 41.

8. Экспериментальное изучение влияния некоторых биологически активных веществ на рост фибробластов / В.Ю. Кассин [и др.] // Российская оториноларингология. – 2004. – Т. 5, № 12. – С. 85–88.

Сведения об авторах

Адамович Сергей Николаевич – к.х.н., старший научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ; тел. 42-65-45; e-mail: mir@irioch.irk.ru)

Киборт Рудольф Вадимович – д.м.н., заслуженный профессор кафедры микробиологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет»

Мирсков Рудольф Григорьевич – д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ)

Мирскова Анна Николаевна – д.х.н., профессор, главный научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИрИХ; тел. 42-47-11; e-mail: mirskova@irioch.irk.ru)