

Фенотипические проявления особенностей метаболизма клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3) при выращивании на средах, содержащих различные источники углерода

И. Ю. Славченко^{1,2}, Е. В. Борейко²

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

² ПНИК «Биотехнолог»
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Штамм *E. coli* BL21 (DE3) широко применяется для получения рекомбинантных белков с использованием РНК-полимераза фага T7-зависимой системы экспрессии. Недавно было показано, что уровень синтеза целевых продуктов в клетках *E. coli* зависит от источника углерода в культуральной среде и определяется метаболическими свойствами продуцента, в частности, образованием ацетата, ингибирующего рост и выход рекомбинантного белка. В данной работе представлены результаты тестирования фенотипического проявления метаболизма клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3), в частности, таких свойств, как рост, кислото- и газообразование при выращивании на средах, содержащих 13 различных источников углерода. Показано, что клетки BL21 (DE3) не способны утилизировать сахарозу и инозит. Среди метаболизируемых источников углерода наименьший уровень кислотообразования наблюдается при выращивании данной культуры на среде с глицерином.

Введение. Уровень синтеза рекомбинантных белков в клетках *E. coli* во многом определяется природой вещества, используемого в качестве источника углерода, и метаболическими свойствами штамма-продуцента. Это стимулировало исследования по изучению влияния различных источников углерода на экспрессию рекомбинантных белков. В ряде работ продемонстрировано, что содержание в культуральной среде того или иного источника углерода может приводить как к увеличению, так и уменьшению уровня синтеза рекомбинантного белка [1—4]. Одним из факторов, негативно влияющих на конечный выход целевого продукта, является накопление ацетата в течение роста клеток *E. coli* в аэробных условиях, например, на среде с таким легкометаболизируемым источником углерода и энергии, как глюкоза. При этом ингибируется и синтез целевого продукта, и рост клеток штамма-продуцента [5—8].

В настоящее время разрабатываются различные подходы для уменьшения образования ацетата клетками *E. coli*. Так, конструирование штаммов, несущих мутации в генах, продукты которых вовлечены в процесс синтеза ацетата (например, в гене *pta*, кодирующем фосфотрансацетилазу, или в гене *ackA*, несущем информацию для синтеза ацетаткиназы), приводит к понижению уровня накопления ацетата и увеличению выхода целевого продукта [9—12]. Аналогичный эффект достигается с помощью метаболической инженерии путем введения в клетки *E. coli* генов, продукты которых способствуют уменьшению накопления ацетата, например, гена *alsS* *Bacillus subtilis*, кодирующего ацетоллактатсинтазу, катализирующую преобразование пирувата в нейтральные и менее токсические соединения [11—14]. И, наконец, поиск альтернативных источников углерода, содержание которых в среде не приводит к высокому уровню образования ацетата, также может обеспечить увеличение выхода рекомбинантного белка [15, 16]. В литера-

туре описано, что уровень аккумуляции ацетата разными штаммами *E. coli* может существенно различаться [5, 8]. Поэтому желательно располагать информацией о влиянии как можно более широкого круга углеродных субстратов на метаболизм клеток конкретного штамма-реципиента.

Цель настоящей работы состояла в изучении фенотипического проявления особенностей метаболизма культуры *E. coli* BL21 (DE3), в частности, уровня кислото- и газообразования при выращивании клеток на среде с различными источниками углерода.

Материалы и методы. Объектом исследования служил штамм *E. coli* BL21 (DE3) — *E. coli* B, F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(*r_B⁻m_B⁻*), *galλ*(DE3). Штамм получен из музея культур ПНИК «Биотехнолог».

Среды. Культуру поддерживали на чашках Петри с агаризованной средой LB [17] без добавления сахаров. Концентрация агара в среде составляла 1,5 %.

Для определения способности клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3) утилизировать тот или иной источник углерода с образованием газа и кислых продуктов распада использовали полужидкую цветную среду Гисса [18] следующего состава: 100 мл дистиллированной воды; 1 г пептона («Difco», США), 0,5 г NaCl, 0,1 мл 1,6 %-го раствора индикатора бромкрезоловый лиловый. Приготовленную среду нагревали до температуры 80 °С, охлаждали и доводили pH до значения 7,2 с помощью 2 %-го раствора NaOH. Затем среду кипятили в течение 5 мин и до первоначального объема доливали дистиллированную воду. После этого вносили агар-агар до конечной концентрации 0,5 % и среду кипятили до полного растворения агара. Горячую среду по 4 мл разливали в стерильные пробирки и автоклавировали при 0,5 атм. в течение 30 мин. После стерилизации в еще горячую среду (~60 °С) добавляли 0,4 мл 10 %-го стерильного раствора необходимого источника углерода (конечная концентрация 1 %) и при необходимости — 0,02 мл 0,2 М раствора изопропилтиогалактозида (ИПТГ) (конечная концентрация 1 мМ). Исследуемую культуру засеивали в пробирки с агаризованной средой методом укола петлей и выращивали в термостате при 37 °С. Среда с данным индикатором имеет лиловый цвет (pH 7,0—7,2). В результате роста бактерий, сопровождающегося расщеплением углевода с образованием кислых продуктов распада, цвет среды изменяется, и она становится желтой. Образование газа в среде определяли по наличию его пузырьков в толще агаризованной среды. Наблюдение за ростом, кислото- и газообразованием проводили ежедневно в течение 5 дней.

В зависимости от условий эксперимента в среду вносили 10 %-й раствор одного из следующих веществ — L(+)-арабинозы, D(+)-глюкозы, D(+)-кси-

лозы, рамнозы, D(+)-лактозы, D(+)-мальтозы, сахарозы, фруктозы, глицерина, дульцита, *i*-инозита, D(-)-маннита, D(+)-сорбита.

Способность клеток утилизировать сахарозу, глицерин и инозит определяли по наличию или отсутствию роста на агаризованной (1,5 %) минимальной среде M9 [17] с добавлением соответствующего источника углерода.

Результаты и обсуждение. РНК-полимераза фага T7-зависимая система экспрессии — одна из наиболее эффективных и широко используемых прокариотических систем для получения целевых продуктов как про-, так и эукариотического происхождения. Она с одинаковым успехом применяется для биосинтеза рекомбинантных белков как в лабораторных условиях, так и в условиях крупномасштабного производства. В качестве продуцента в таких системах наиболее широко используется штамм *E. coli* BL21 (DE3), специально сконструированный как штамм-продуцент для РНК-полимераза фага T7-зависимой экспрессии [19]. В клетках *E. coli* BL21 (DE3) ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем *lacUV5* промотора локализуется в бактериальной хромосоме, куда он интегрирован в составе фага лямбда D69. РНК-полимераза фага T7, кодируемая одним из ранних фаговых генов, с высокой эффективностью и специфичностью осуществляет процесс транскрипции, инициируемый со специализированных фаговых промоторов. Штамм *E. coli* BL21 (DE3) используют как реципиент для различных плазмидных векторов, в которых целевой ген встроены под контроль одного из промоторов, узнаваемых РНК-полимеразой фага T7. Индукция синтеза фагового фермента и, как следствие, высокоэффективная транскрипция целевого гена в составе рекомбинантной плазмиды наблюдаются после добавления в среду культивирования индуктора ИПТГ.

Несмотря на то, что *E. coli* является наиболее изученным с генетической точки зрения микроорганизмом, механизм влияния используемого в составе питательной среды источника углерода на выход целевого продукта во многом еще далек от полного понимания. Это связано с тем, что большинство штаммов *E. coli*, используемых в биотехнологии, получены путем сложных манипуляций с их геномом, и проследить цепочку всех изменений в генах, продукты которых вовлечены в метаболические процессы клеток конкретного штамма, довольно сложно. Именно поэтому изучение фенотипического проявления метаболизма бактериальной клетки, например, таких свойств, как рост, кислото- и газообразование при выращивании на средах, содержащих различные источники углерода, позволяет более целенаправленно оптимизировать условия культивирования продуцента, в частности, состав питательной среды.

Способность клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3) утилизировать тот или иной источник углерода с образованием газа и кислых продуктов распада определяли на полужидкой цветной среде Гисса, как описано в разделе «Материалы и методы». В качестве источников углерода использовали следующие вещества — арабинозу, глюкозу, ксилозу, рамнозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, фруктозу, глицерин, дульцит, инозит, маннит, сорбит. Контролем служила среда Гисса без дополнительного внесения углеродсодержащих соединений. Поскольку использование клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3) в биотехнологических процессах на определенном этапе культивирования продуцента предполагает внесение в среду индуктора ИПТГ, исследования проводили как в присутствии, так и в отсутствие данного вещества. Результаты эксперимента представлены в табл. 1. Так, наиболее высокий уровень кислотообразования наблюдается на средах с арабинозой, глюкозой, лактозой, фруктозой, маннитом как в присутствии ИПТГ, так и без него. На среде с ксилозой и дульцитом в присутствии ИПТГ уровень кислотообразования несколько

ниже, чем без ИПТГ. На средах с рамнозой, мальтозой и сорбитом без ИПТГ наблюдается более слабое образование кислоты, чем на вышеуказанных источниках углерода. Снижения уровня кислотообразования на средах с этими соединениями в присутствии ИПТГ по сравнению с вариантами без ИПТГ не наблюдается. При выращивании клеток штамма *E. coli* BL21 (DE3) на средах с сахарозой, глицерином и инозитом, а также в контроле образования кислоты не зарегистрировано. При этом рост исследуемого штамма наблюдается во всех вариантах, включая контроль. Анализ уровня газообразования клетками BL21 (DE3) на средах с различными источниками углерода показал (см. табл. 2), что в некоторых случаях присутствие ИПТГ в питательных средах приводит к более высокой степени газообразования, чем на аналогичных средах без ИПТГ. На средах без ИПТГ наиболее высокий уровень газообразования зарегистрирован на среде с дульцитом, более низкий — с маннитом, сорбитом, фруктозой и ксилозой. Наименьшее газообразование наблюдали на средах с мальтозой, рамнозой и арабинозой. На

Таблица 1

Результаты тестирования уровня кислотообразования клетками *E. coli* BL21 (DE3) на среде с различными источниками углерода без добавления изопропилтиогаляктозида (ИПТГ) и в его присутствии

Источник углерода	Образование кислоты*					
	1-е сут		2-е сут		5-е сут	
	- ИПТГ	+ ИПТГ	- ИПТГ	+ ИПТГ	- ИПТГ	+ ИПТГ
Моносахариды						
Арабиноза	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+
Ксилоза	+	+	+	+	+	+
Рамноза	+	+	+	+	+	+
Дисахариды						
Лактоза	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+
Сахароза	—	—	—	—	—	—
Фруктоза	+	+	+	+	+	+
Спирты						
Глицерин	—	—	—	—	—	—
Дульцит	+	+	+	+	+	+
Инозит	—	—	—	—	—	—
Маннит	+	+	+	+	+	+
Сорбит	+	+	+	+	+	+
Контроль	—	—	—	—	—	—

Примечание. *(-) — среда имеет лиловый цвет, (+) — зеленовато-желтый цвет; (+ +) — лимонно-желтый цвет.

Таблица 2

Результаты тестирования уровня газообразования клетками *E. coli* BL21 (DE3) на среде с различными источниками углерода без добавления изопропилтиогаалактозида (ИПТГ) и в его присутствии

Источник углерода	Образование газа*					
	1-е сут		2-е сут		5-е сут	
	- ИПТГ	+ ИПТГ	- ИПТГ	+ ИПТГ	- ИПТГ	+ ИПТГ
Моносахариды						
Арабиноза	—	+	+	+	+	+
Глюкоза	—	+	—	+	—	+
Ксилоза	+	+	+	+	+	+++
Рамноза	+	+	+	+	+	+
Дисахариды						
Лактоза	+	+++	+	+++	+	+++
Мальтоза	+	+++	+	+++	+	+++
Сахароза	—	—	—	—	—	—
Фруктоза	+	+	+	+	+	+
Спирты						
Глицерин	—	—	—	—	—	—
Дульцит	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Инозит	—	—	—	—	—	—
Маннит	+	+++	+	+++	+++	+++
Сорбит	+	+++	+	+++	+	+
Контроль	—	—	—	—	—	—

Примечание. *(-) — отсутствие пузырьков воздуха; (+) — наличие 1—3 пузырьков воздуха в толще агаризованной среды; (+ +) — 5—6 пузырьков воздуха среднего размера; (+++) — более 6 крупных пузырьков воздуха.

среде с глюкозой образование газа имело место только в присутствии ИПТГ. На средах, содержащих сахарозу, глицерин и инозит (и в них же не было отмечено образования кислоты), а также в контроле газообразования не наблюдалось.

Поскольку среда Гисса готовится на основе пептонной воды, что позволяет клеткам *E. coli* расти на ней без добавления каких-либо дополнительных источников углерода, то в случае получения отрицательных результатов по показателям кислото- и газообразования (в данном случае на средах с сахарозой, глицерином и инозитом) необходимо определить, является ли это следствием неспособности клеток *E. coli* BL21 (DE3) утилизировать данные источники углерода, либо процесс их утилизации происходит с очень низким уровнем кислото- и газообразования. Для этого культуру BL21 (DE3) высевали на чашки с агаризованной минимальной средой M9. Экспериментальные чашки содержали сахарозу, глицерин или инозит. Отрицательным контролем служила чашка со средой M9 без добавления какого-либо источника углерода,

а положительного — с добавлением глюкозы. Результаты исследований показали, что клетки *E. coli* BL21 (DE3) не дали роста на минимальной среде M9 с сахарозой и инозитом, что свидетельствует о неспособности данного штамма утилизировать эти источники углерода. В то же время исследуемая культура выросла на среде M9 с глицерином, что демонстрирует способность клеток *E. coli* BL21 (DE3) утилизировать глицерин как источник углерода.

Таким образом, в данной работе показано, что клетки BL21 (DE3) не способны утилизировать сахарозу и инозит в качестве источников углерода. Обнаружено, что внесение в культуральную среду ИПТГ может влиять на фенотипические проявления метаболизма клеток *E. coli* BL21 (DE3), а именно — уменьшать уровень кислотообразования и стимулировать интенсивность газообразования при росте на средах, содержащих некоторые источники углерода. Установлено, что утилизация глицерина клетками *E. coli* BL21 (DE3) не приводит к кислотообразованию и, следовательно, к образова-

нию высокой концентрации ацетата. Поэтому использование глицерина в качестве источника углерода в питательных средах для выращивания продуцентов, созданных на основе штамма *E. coli* BL21 (DE3) и РНК-полимераза фага Т7-зависимой экспрессии рекомбинантных генов, может быть наиболее перспективным.

I. Yu. Slavchenko, E. V. Boreyko

Phenotype display of *Escherichia coli* BL21 (DE3) cell metabolism during growth in the media containing various types of carbon substrates

Summary

The *E. coli* strain BL21 (DE3) is widely applied for the synthesis of recombinant products using the bacteriophage T7 polymerase-base expression systems. The level of target protein production in *E. coli* cells has been recently shown to depend on the type of carbon source in the growth media and the producer metabolic properties, especially by acetate production. The growth of the strains and overproduction of recombinant proteins are inhibited by acetate. The growth, acid-generation and gas-forming during cultivation of *E. coli* BL21 (DE3) cells in the media, containing 13 various types of carbon substrates, have been tested in this work. It was found that BL21 (DE3) cells cannot utilize sucrose and inositol. The least level of acid-generation is observed when glycerol is used as the carbon source.

I. Ю. Славченко, О. В. Бореико

Фенотипові прояви особливостей метаболізму клітин *Escherichia coli* BL21 (DE3) при вирощуванні на середовищах, що містять різноманітні джерела вуглецю

Резюме

Штам *E. coli* BL21 (DE3) широко застосовується для одержання рекомбінантних білків з використанням РНК-полімераза фага Т7-залежної системи експресії. Нещодавно показано, що рівень синтезу цільових продуктів у клітинах *E. coli* залежить від джерел вуглецю в культуральному середовищі і визначається метаболічними властивостями продуцента, зокрема, утворенням ацетату, що пригнічує ріст і вихід рекомбінантного білка. В даній роботі наведено результати тестування фенотипового прояву метаболізму клітин штаму *E. coli* BL21 (DE3), зокрема, таких властивостей, як ріст, кислото- і газоутворення при вирощуванні на середовищах, що містять 13 різноманітних джерел вуглецю. Показано, що клітини BL21 (DE3) не спроможні утилізувати цукрозу і інозит. Серед метаболізуючих джерел вуглецю найменший рівень кислотоутворення спостерігається при вирощуванні даної культури на середовищі з глицерином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schemidt R. A., Qu J., Williams J. R., Brusilow W. S. Effects of carbon source on expression of F_0 genes and on the stoichiometry of the c subunit in the F_1F_0 ATPase of *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1998.—180, N 12.—P. 3205—3208.
2. Park S. J., Gunsalus R. P. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products // J. Bacteriol.—1995.—177, N 21.—P. 6255—6262.
3. Park S. J., Cotter P. A., Gunsalus R. P. Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in

response to oxygen, carbon, and heme availability // J. Bacteriol.—1995.—177, N 22.—P. 6652—6656.

4. Славченко И. Ю. Изучение особенностей синтеза альфа-2b интерферона человека в клетках *Escherichia coli* при различных условиях культивирования // Биополимери і клітина.—2002.—18, № 2.—С. 164—170.
5. Van de Walle M., Shiloach J. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation // Biotechnol. and Bioeng.—1998.—57, N 1.—P. 71—78.
6. Farmer W. R., Liao J. C. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol.—1997.—63, N 8.—P. 3205—3210.
7. Gschaedler A., Thi L. N., Boudrant J. Glucose and acetate influences on the behavior of the recombinant strain *Escherichia coli* HB 101 (GAPDH) // J. Ind. Microbiol.—1994.—13, N 4.—P. 225—232.
8. Luli G. W., Strohl W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations // Appl. Environ. Microbiol.—1990.—56, N 4.—P. 1004—1011.
9. Chang D. E., Shin S., Rhee J. S., Pan J. G. Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival // J. Bacteriol.—1999.—181, N 21.—P. 6656—6663.
10. Bauer K. A., Ben-Bassat A., Dawson M., de la Puente V. T., Neway J. O. Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant // Appl. Environ. Microbiol.—1990.—56, N 5.—P. 1296—1302.
11. Yang Y. T., Aristidou A. A., San K. Y., Bennett G. N. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* deficient in the acetate production pathway and expressing the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase // Metab. Eng.—1999.—1, N 1.—P. 26—34.
12. San K. Y., Bennett G. N., Aristidou A. A., Chou C. H. Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli* // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1994.—721.—P. 257—267.
13. Aristidou A. A., San K. Y., Bennett G. N. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction // Biotechnol. Progr.—1995.—11, N 4.—P. 475—478.
14. Aristidou A. A., San K. Y., Bennett G. N. Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* expressing the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase in batch and continuous cultures // Biotechnol. and Bioeng.—1999.—63, N 6.—P. 737—749.
15. Aristidou A. A., San K. Y., Bennett G. N. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source // Biotechnol. Progr.—1999.—15, N 1.—P. 140—145.
16. Chou C. H., Bennett G. N., San K. Y. Effect of modulated glucose uptake on high-level recombinant protein production in a dense *Escherichia coli* culture // Biotechnol. Progr.—1994.—10, N 6.—P. 644—647.
17. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—436 с.
18. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования // Под ред. М. О. Биргера.—М.: Медицина, 1973.—455 с.
19. Studier F. W., Moffatt B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // J. Mol. Biol.—1986.—189D, N 1.—P. 113—130.

УДК 577.124 + 579.69

Надійшла до редакції 07.08.01