Наука та інновації. 2014. Т. 10. № 4. С. 32—39

Л.Р. Фаюра[1], Ю.Р. Борецький[1], Ю.В. Пиняга[1], Н.Б. Мартинюк[2], В.В. Скороход[2], А.А. Сибірний[1]

[1] Інститут біології клітини НАН України, Львів
[2] Приватне акціонерне товариство «Ензим», Ладижин

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ КУЛЬТИВУВАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ШТАМУ-ПРОДУЦЕНТА *ESCHERICHIA COLI* З МЕТОЮ ОТРИМАННЯ АРГІНІНДЕЗІМІНАЗИ *MYCOPLASMA HOMINIS*

Сконструйовано рекомбінантний штам кишкової палички Escherichia coli, що продукує аргініндезіміназу бактерій Mycoplasma hominis. Підібрано умови для стабілізації високопродуктивних клонів штаму-продуцента фермента. Проведено оптимізацію умов культивування штаму-продуцента в біореакторах різного об'єму. Отримано високоочищені препарати аргініндезімінази та підібрано умови їх довготривалого зберігання.

Ключові слова: аргініндезіміназа, штам-продуцент, бактерії Escherichia coli, Mycoplasma hominis.

Нормальні клітини ссавців можуть синтезувати L-аргінін із цитруліну в реакціях, каталізованих аргінінсукцинатсинтазою і аргінінсукцинатліазою. Водночас у клітинах деяких видів пухлин людини і тварин ці ферменти не експресуються [1, 2], тому наявність L-аргініну в крові є необхідною умовою їх росту. Відомо, що голодування пухлинних клітин меланоми, гепатокарциноми, деяких видів саркоми та ін. за аргініном веде до індукції їх загибелі внаслідок апоптозу [1,3,4]. Ферменти, що викликають деградацію аргініну, можуть викликати значне зниження його рівня у кров'яному руслі людини та інгібувати ріст злоякісних клітин [4]. Одним із таких ферментів є аргініндезіміназа (АДІ) (ЕС3.5.3.6), яка каталізує реакцію гідролізу L-аргініну до L-цитруліну та аміаку. Протипухлинна ефективність АДІ доведена в умовах *in vitro* та *in vivo* [5]. Також показано, що АДІ є супресуючим фактором реплікації віруса імунодефіциту людини HIV [6]. Автори [7] повідомляють, що АДІ приблизно в 100 разів більш ефективна при інгібуванні проліферації клітин лімфатичної лейкемії порівняно з використовуваною в клінічній онкології L-аспарагіназою.

Тривалий час перепоною для застосування АДІ була її висока імуногенність. Проте ковалентна модифікація фермента за допомогою активованого поліетиленгліколю дала можливість подолати цю перешкоду [8]. Показано, що АДІ в дозуванні 20—640 од.а./м^2 не викликає в пацієнтів серйозних побічних ефектів, то ж не є токсичною для організму людини в цілому. У провідних онкологічних клініках світу проводяться клінічні випробовування ензимотерапії онкозахворювань за допомогою АДІ, і отримано виражений лікувальний ефект [9, 10]. Проте широкому практичному викорис-

© Л.Р. ФАЮРА, Ю.Р. БОРЕЦЬКИЙ, Ю.В. ПИНЯГА, Н.Б. МАРТИНЮК, В.В. СКОРОХОД, А.А. СИБІРНИЙ, 2014

танню АДІ в онкологічній практиці заважає дуже висока ціна препаратів ферменту.

Способи одержання рекомбінантної АДІ із бактерій *E.coli* описано [11] та запатентовано [12]. Проте в цих способах для культивування бактерій використано багате середовище LB, а індукція експресії фермента проводилася за допомогою досить вартісного реактиву ізопропіл-β-тіогалактозиду (ІПТГ). Тому актуальним завданням було розробити методи культивування продуцента та індукції синтезу АДІ, які б здешевили виробництво фермента в цілому.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для отримання рекомбінантного штаму-продуцента сконструйовану раніше плазміду (похідна вектора pET32, що містить оптимізований ген АДІ *M. hominis*) вводили в клітини штаму *Escherichia coli* BL-21 [11, 13]. Трансформанти відбирали на середовищі LB (1,5 % бактопептон, 0,5 % дріжджовий екстракт, 1 % NaCl; *pH* = 7), що містило ампіцилін (100 мкг/мл) та агар (2 %). Рекомбінантні бактерії вирощували при 28—37 °С у багатому середовищі LB та мінеральному середовищі такого складу (г/л): Na_2HPO_4 — 7,1; KH_2PO_4 — 6,8; NH_4Cl — 2,7; Na_2SO_4 — 0,71; $MgSO_4x7H_2O$ — 0,45; гліцерин — 12,5; глюкоза — 0,5; лактоза (індуктор експресії) — 0,1; пантотенова кислота — 0,002; тіамін — 0,002; піридоксин — 0,002; біотин — 0,002 [14]. Мікроелементи додавали у таких кількостях (г/л): $FeCl_3x6H_2O$ — 12,6; $CaCl_2$ — 2,2; $MnCl_2$ — 2,0; $ZnSO_4xH_2O$ — 2,9; $CoCl_2$ — 0,5; $CuCl_2x2H_2O$ —0,5; $NiCl_2$ — 0,26; Na_2MoO_4 — 2,3; H_3BO_3 — 0,12; Na_2SO_3 — 0,34 [15]. Проводили контроль і дотитровування *pH* середовища до значення 7,2.

Індукцію експресії гена АДІ при вирощуванні клонів штаму-продуцента у багатому середовищі LB викликали за загально прийнятим методом за допомогою ІПТГ, а у мінеральному середовищі клітини індукували лактозою [14, 15].

Біомасу клітин визначали турбідиметрично при довжині хвилі 600 нм.

Клітини осаджували при 6000 g протягом 20 хв; клітинну пасту зберігали при —20 °С.

Визначення активності АДІ проводили за кількістю цитруліну, що утворився під час реакції, як описано раніше [11, 16]. За одиницю активності приймали кількість фермента, що перетворює 1 мкмоль L-аргініну до 1 мкмоля L-цитруліну за 1 хв.

Для оцінки вмісту АДІ клітини із 0,1—1 мл культури осаджували протягом 5 хв при 7000 g у поліпропіленових 1,5 мл пробірках. Клітини промивали бідистилятом, осаджували повторно та ресуспендували у 0,4 мл 12,5%-ної трихлороцтової кислоти. Інкубували зразки при t = = –20 °С протягом 0,5—2 год та центрифугували при 12000 g протягом 5—7 хв при t = 4 °С. Осад двічі промивали 0,5 мл холодного 80%-го ацетону. Зливали супернатант, осад підсушували, додавали 10 мкл води і через 10—15 хв — 5 мкл 0,1%-го NaOH. Суміш витримували ще 10—15 хв, періодично струшуючи, додавали 15 мкл 2-х кратного буферу для нанесення (120 мМ Tris-HCl, *pH* = 6,8; 4 % SDS, 20 % гліцерол, 0,02 % г бромфеноловий синій, 2,5 % β-меркаптоетанолу). Зразки кип'ятили на водяній бані протягом 8—10 хв, охолоджували до кімнатної температури, осаджували конденсат центрифугуванням (при 12000 g протягом 1хв) і використовували для електрофорезу або зберігали при t = –70 °С.

Електрофоретичне розділення білків проводили у 10%-ому поліакриламідному гелі за загальноприйнятою методикою. Після обробки барвником (Coomassie Brilliant Blue R250) гелі сканували та денситометрували. На основі отриманих даних обраховували вміст АДІ.

Виділення фермента проводили, як описано нами раніше [16]. Концентрацію білка визначали за метотом Лоурі. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи стандартні методи. Усі досліди повторювали тричі з трьома паралельними повторюваностями у кожному варіанті.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримання штаму-продуцента

Ген, що кодує АДІ *M. hominis*, було ампліфіковано, модифіковано і клоновано, як описано

в [16]. Сконструйовану плазміду pET3d-ADI, що містила оптимізований ген АДІ *M. hominis*, під контролем промотора Т7 вводили у клітини *E. coli* BL-21 за допомогою електропорації. Трансформанти відбирали на середовищі із ампіциліном. Таким чином, було отримано колонії продуцента АДІ, які за умов індукції ІПТГ могли нагромаджувати фермент у нерозчинній формі у вигляді мікротілець.

Необхідно зауважити, що вартість ІПТГ досить висока (10 г коштує приблизно 90 євро, а вартість індукції 1 л культури становитиме близько 1 євро), що значно підвищує собівартість виробництва АДІ. Оскільки вартість використовуваного в цьому випадку багатого середовища також є досить високою, ми вирішили опрацювати можливість використання дешевшого мінерального середовища, у якому індуктором може бути природний, достатньо дешевий цукор — лактоза [14, 15].

На початковому етапі роботи ферментацію проводили у колбах. Суспензію клітин, вирощених у багатому середовищі LB із ампіциліном до A_{600} = 1,0—2,5, інокулювали у мінеральне середовище, що містило 0,4%-ий гліцерин до оптичної густини A_{600} = 0,3. Інкубували 50 мл культури в 250 мл колбах на качалці (200 об./хв при t = 30 °С) протягом 36—40 год при t = = 30 °С. Лактозу вносили до концентрацій 0,05; 0,1 та 0,5 г/л. Цими експериментами було встановлено, що з урахуванням вартості реактивів концентрація лактози 0,1 г/л є оптимальною для аутоіндукційної продукції АДІ (дані не наведено). Рівень індукції синтезу АДІ у випадку використання мінерального середовища з лактозою (аутоіндукція) був дещо нижчим (10—20 %) проти 20—25 % від загального білка при індукції ІПТГ. Водночас кількість клітин із мінерального середовища була значно більшою, ніж із багатого середовища LB. Очевидно, що запропонована раніше методика аутоіндукції експресії білків може бути використана як основа, але максимальної та стабільної продукції АДІ можна досягнути тільки після підбору умов експресії.

Для досягнення вищого виходу цільового гетерологічного білка необхідно було стабілізувати високопродуктивні клони штаму-продуцента, дослідити вплив концентрації гліцерину у середовищі, аерації, часу та температури вирощування.

Стабілізація штаму-продуцента за ознакою «індукований синтез АДІ»

При зберіганні штаму-продуцента на агаризованому середовищі LB упродовж семи діб при t = 4 °С у більшості клонів, індукованих лактозою, було зафіксовано суттєве зниження продукції АДІ (рис. 1,А). У безклітинних екстрактах продуцента, що зберігався за цих умов, було виявлено активність АДІ, що могло бути спричинено базальною експресією гена. Як наслідок, це могло призвести до зниження концентрації доступного аргініну та зниження життєздатності високопродуктивних клонів.

Ми припустили, що додавання до середовищ вирощування та зберігання клонів аргініну або глюкози, яка знижує базальний рівень експресії клонованого гена, дозволить підняти стабільність високопродуктивних клонів та зберегти високу ефективність аутоіндукції синтезу АДІ. Виявилось, що додаток до середовища аргініну забезпечив краще зберігання високопродуктивних клонів, проте рівень стабілізації був високим тільки у деяких клонів, а у переважній більшості випадків (70—80 % перевірених клонів) цей ефект був виражений недостатньо (рис. 1, *А*), тоді як при додаванні глюкози переважна більшість (80—90 % із перевірених клонів) зберігала здатність до індукованого синтезу АДІ впродовж семи діб зберігання при зазначених умовах (рис. 1, *А*). Проте при подальшому зберіганні клонів впродовж 2—3 тижнів рівень індукції синтезу АДІ знижувався (дані не наведено). При зберіганні високопродуктивних клонів на середовищі із 0,2 % аргініну і 0,2 % глюкози було зафіксовано дещо вищий (порівняно з клонами, які зберігались тільки з глюкозою) рівень синтезу АДІ (рис. 1, *А*).

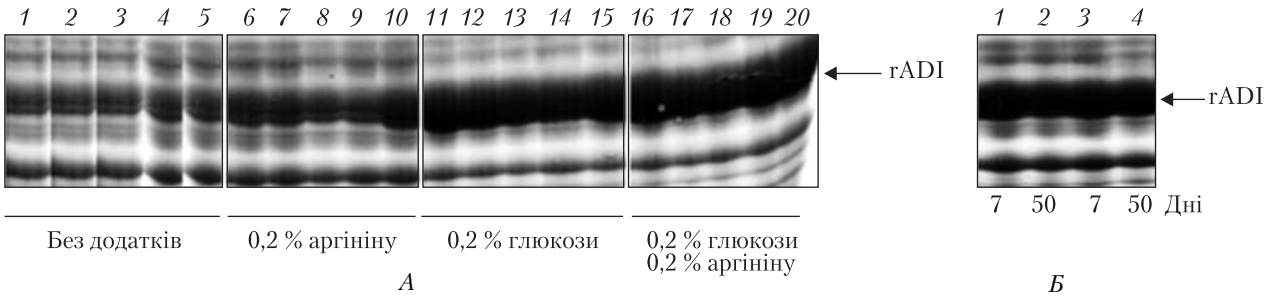

Рис. 1. Вплив аргініну та глюкози у середовищі для селекції та зберігання клонів продуцента на подальшу продукцію АДІ у мінеральному середовищі: *А* — аналіз продукції АДІ клонами, отриманими на середовищах із різними додатками (зразки *1—5* — незалежні клони (трансформанти), отримані та збережені на стандартному LB із ампіциліном; зразки *6—10* — незалежні клони (трансформанти), отримані на стандартному LB із ампіциліном, що містить 0,2 % аргініну; зразки *11—15* — незалежні клони (трансформанти), отримані на стандартному LB із ампіциліном, що містить 0,2 % глюкози; зразки *16—20* — незалежні клони (трансформанти), отримані на стандартному LB із ампіциліном, що містить 0,2 % аргініну та 0,2 % глюкози); *Б* — аналіз продукції АДІ клонами, отриманими на стандартному LB із ампіциліном , що містить 0,2 % аргініну та 0,5 % глюкози (зразки *1* і *3* — незалежні клони (трансформанти), що зберігались протягом 7 днів при t = 5 °С; зразки *2* і *4* — ці ж незалежні клони (трансформанти) , що зберігалися протягом 50 днів при t = 5 °С

Проте при подальшому зберіганні, як і в попередніх випадках, рівень індукції синтезу АДІ знижувався (дані не наведено). Цю проблему вдалося вирішити, збільшивши концентрацію глюкози у середовищі для зберігання до 0,5 %. Як виявилось, на багатому середовищі LB із ампіциліном та із додатками 0,2 % аргініну та 0,5 % глюкози клони залишалися здатними до ефективної аутоіндукції синтезу АДІ при зберіганні при t = 4 °С упродовж 50 діб (рис. 1, *Б*).

Оптимізація умов періодичного культивування та індукції синтезу АДІ

За вказаних вище умов культивування продуцента ми досліджували також вплив температури вирощування на рівень експресії цільового білка.

Було встановлено, що відхилення від оптимальної температури (32 °С) на 4—5 °С призводить до зниження продукції цільового білка на 20—25 % (дані не наведено).

Виявилось, що збільшення концентрації основного джерела вуглецю (гліцерину) забезпечує кращий ріст продуцента. У результаті проведених експериментів встановлено, що збільшення концентрації гліцерину від 0,75 до 1,25 % дає можливість отримувати в 1,2—1,3 рази більше клітин без зниження рівня продукції АДІ (рис. 2). Подальше збільшення концентрації гліцерину не давало позитивних результатів.

Слід зазначити, що в цих експериментах максимальний рівень виходу АДІ спостерігався через 30—35 год культивування, а біомаси — через 38—46 год.

При культивуванні високопродуктивних клонів проводили контроль *pH* середовища. Зниження *pH* нижче 6,0 призводило до суттєвого падіння рівня продукції АДІ. Слід зазначити також, що збільшення рівня аерації за рахунок інтенсивності перемішування (до 250 об./хв) приводило до зростання виходу цільового білка, а подальше збільшення частоти перемішування не впливало на вихід АДІ (дані не наведено). З метою наступного масштабування та спрощення технології отримання АДІ ми дослідили продукцію фермента при використанні для інокуляції клітин разом із середовищем (без осадження) та різної густини засіву у мінеральне середовище (A_{600} = 0,01—0,3) (рис. 3).

Отримані результати свідчили, що об'єм інокуляту може бути знижений до 0,3—0,5 % від об'єму ферментації без зниження виходу АДІ, а клітини не потрібно відділяти від попе-

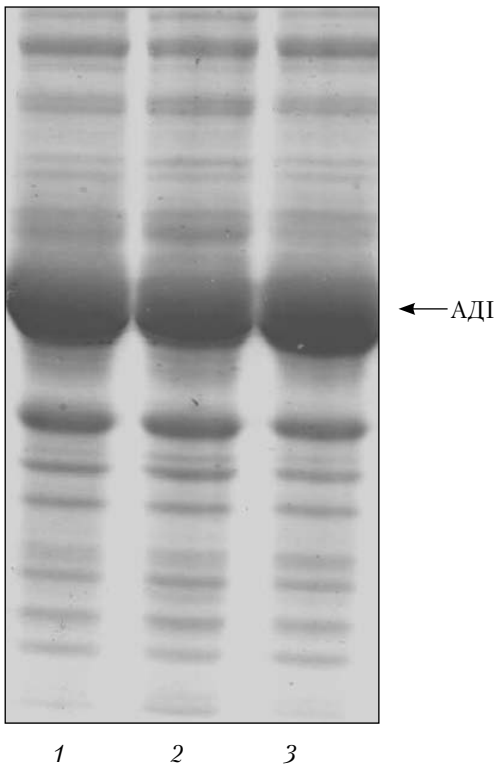

Рис. 2. Аналіз продукції АДІ при різній густині засіву клітин штаму-продуцента у мінеральне середовище: *1* — A_{600} = 0,01; *2* — A_{600} = 0,1; *3* — A_{600} = 0,3

реднього середовища. Це значно покращує стерильність маніпуляцій та полегшує масштабування процесу ферментації.

У результаті проведеної оптимізації середовища та умов культивування штаму-продуцента ми отримали підвищений вихід біомаси клітин (12—14 г/л) та високий рівень експресії АДІ (біля 25 % від кількості загального білка). З урахуванням ціни реактивів можна вважати, що вартість 1 л використовуваного нами мінерального середовища з лактозою в 3 рази є меншою, ніж вартість LB середовища з індуктором ІПТГ.

Результати, отримані на цих етапах роботи, були використані як базові для масштабування нарощування біомаси продуцента.

Оптимізація умов культивування штаму-продуцента АДІ у біореакторах

На наступному етапі роботи ми перевіряли підібрані умови, культивуючи штам-продуцент у лабораторному ферментері об'ємом 1 л. Об'єм середовища у ферментері становив 0,6 л. Початкова концентрація клітин (інокуляція) відповідала A_{600} = 0,01. Температура культивуван-

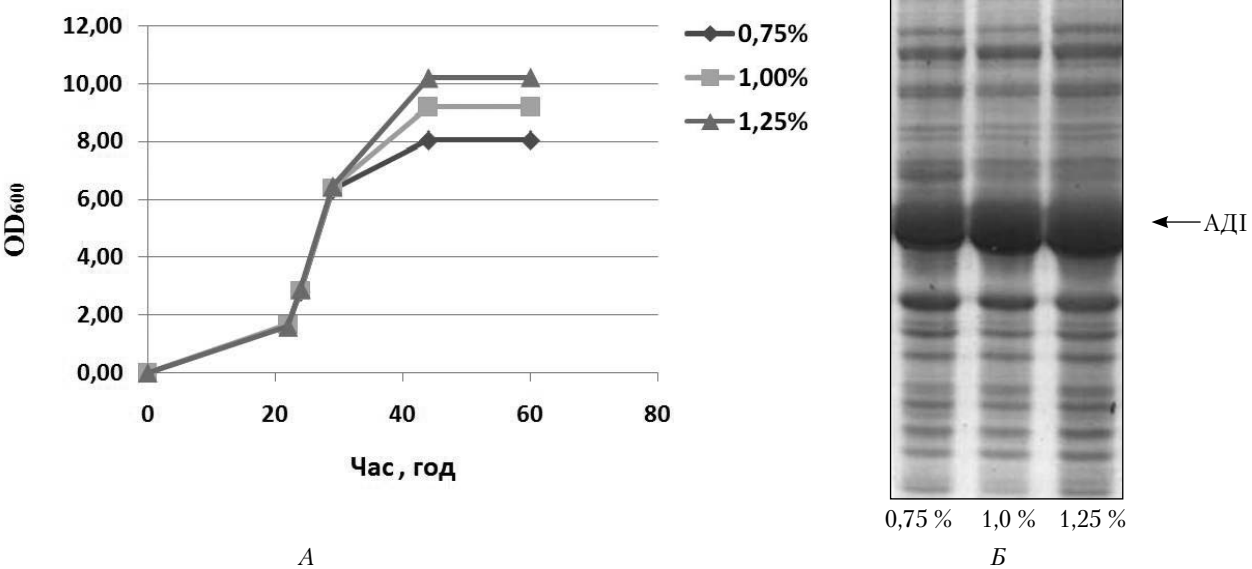

Рис. 3. Вплив концентрації гліцерину на вихід біомаси продуцента (*А*) та рівень індукції синтезу АДІ (*Б*)

ня становила 32 °С, частота перемішування — 600 об./хв., а концентрація гліцерину — 1,25 %. За вказаних вище умов оптимальний рівень аерації становив 0,7 л/хв. Результати одного із типових експериментів наведено на рис. 4. Із рисунка видно, що вже на початку експоненційної фази росту глюкоза була повністю утилізована (рис. 4, Б). Застосування ферментера дозволило досягти більшого (ніж у колбах) виходу біомаси продуцента (рис. 4, А). Швидкість росту також була вищою. Як наслідок, стаціонарна фаза була досягнута уже на 17—19-у годину інкубації. Максимальна продукція АДІ спостерігалась саме у цей період вирощування (рис. 4, Г). Перехід культури у стаціонарну фазу співпав із суттєвим зниженням концентрації доступного амінного азоту у середовищі (рис. 4, В).

Масштабування процесу вирощування продуцента АДІ у промислових умовах

Подальше масштабування процесу проводили на обладнанні акціонерного товариства «Ензим» (м. Ладижин Вінницької обл.). Перевірка здатності до росту і індукованого синтезу АДІ проводилася при вирощуванні в біореакторі об'ємом 100 л. Початковий об'єм середовища становив 70 л.

Умови вирощування у біореакторі на 100 л були аналогічними до умов ферментації в біореакторі об'ємом 1 л в лабораторних умовах. Тривалість ферментацій складала 16—20 год (рис. 5). Як видно із рисунка, максимальний рівень продукції АДІ спостерігався близько 16-ї години інкубації. Цей час відповідав початку переходу культури у стаціонарну фазу. Вирощені клітини було осаджено центрифугуванням та заморожено. У подальших експериментах із них було отримано мікротільця включень, що містять АДІ, і проведено їх солюбілізацію-денатурацію та ренатурацію, як описано раніше [16]. Очистку отриманого препарату АДІ проводили за допомогою іонообмінної хроматографії на Q-сефарозі та гідрофоб-

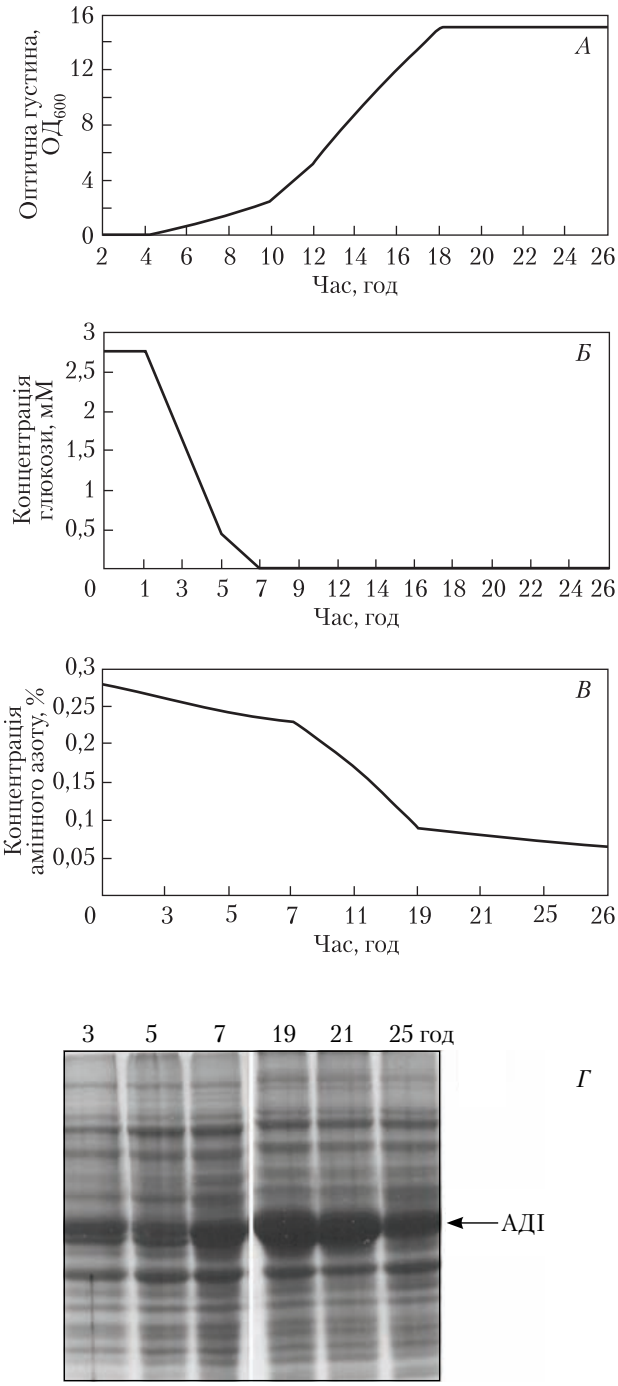

Рис. 4. Характеристика росту штаму-продуцента та продукція АДІ у лабораторному ферментері (1л): *А* — оптична густина культури при 600 нм; *Б* — концентрація глюкози, *В* — концентрація амінного азоту, *Г* — електрофореграма безклітинних екстрактів продуцента (стрілкою показано положення АДІ)

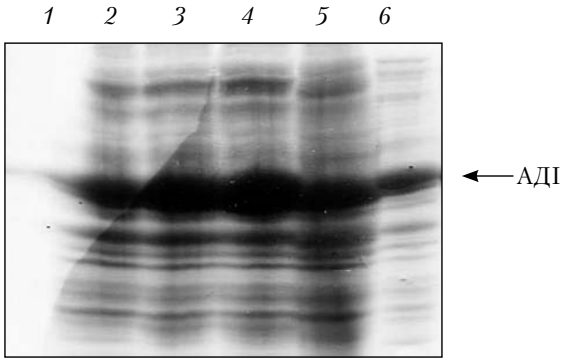

Рис. 5. Електрофореграма безклітинних екстрактів продуцента АДІ, отриманих в умовах ПрАТ «Ензим»: *1*; *6* — інокулят; *2* — 12-а година ферментації; *3* — 14-а година ферментації; *4* — 16-а година ферментації; 5 — ці ж самі клітини зберігались до екстракції при t = 15 °С протягом 5—6 годин (стрілкою показано положення АДІ)

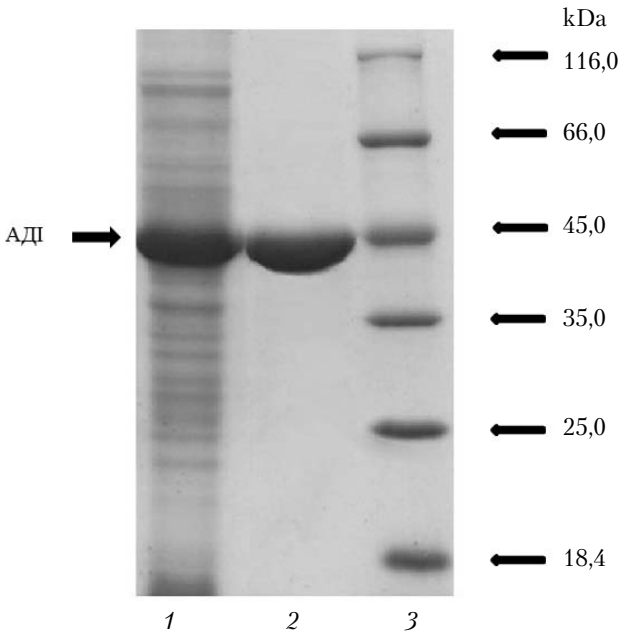

Рис. 6. Електрофореграма препаратів АДІ до і після очистки: *1* — загальний білок індукованих клітин продуцента; *2* — препарат АДІ після очистки; *3* — маркери молекулярної маси

ної хроматографії на фенілсефарозі, як описано в [16]. Препарат фермента концентрували за допомогою ультрафільтрації на мембрані VIVASPIN TURBO-15-10000 (Sartorius) та зберігали при t = 4 °С.

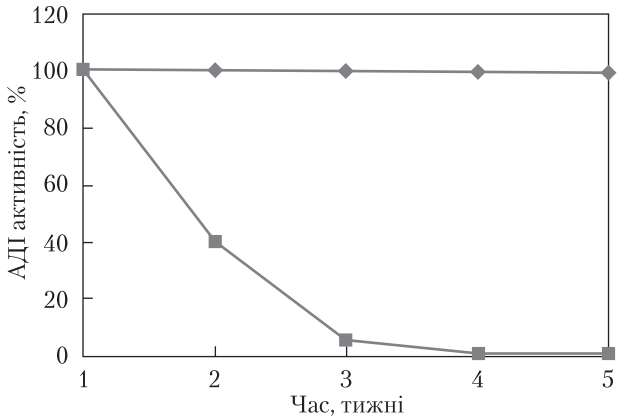

Рис. 7. Зміни активності препарату АДІ під час зберігання при t = 4 °С: ■ — в присутності 1 М NaCl. ◆ — без NaCl

Таким чином, було отримано препарати АДІ високого ступеня очистки із специфічною активністю 30—34 U/мг (рис. 6), що відповідає кращим зразкам, описаним у літературі [8, 10, 11, 12]. Вихід фермента не перевищував 35—40 % від сумарної активності, отриманої на стадії ренатурації. Отримані препарати АДІ зберігали при t = 4 °С у 20 мМ калій-натрій-фосфатному буфері з 1М NaCl.

Як було описано нами раніше, фермент є стабільним за цих умов, а видалення NaCl із буферу зберігання призводить до швидкої втрати ферментативної активності (рис. 7).

ВИСНОВКИ

Отримано високопродуктивні клони рекомбінантного штаму *E. coli*, що продукує АДІ. Показано, що сконструйований продуцент не втрачає здатності до надекспресії АДІ при зберіганні протягом 50 діб при t = 4 °С на середовищі LB з додатками 0,2 % аргініну та 0,5 % глюкози. Оптимізовано мінеральне середовище та умови індукції експресії фермента за допомогою дешевого індуктора — лактози. Отримано підвищений вихід біомаси штаму-продуцента (12—14 г/л) та високий рівень експресії АДІ (біля 20—25 % від загального білка). Проведено оптимізацію умов культивування штаму-продуцента в біореакторах різного об'єму. Отримано високоочищені препарати АДІ

та показано можливість їх тривалого зберігання без втрати ферментативної активності.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Philip R., Campbell F., Wheatley D.N.* Arginine deprivation, growth inhibition and tumour cell death. Part 2. Enzymatic degradation of arginine in normal and malignant cell cultures // Br. J.Cancer. — 2003. — V. 88, N 4. — P. 213—283.
2. *Takaku H., Matsumoto M., Misawa S., Miyazaki K.* Antitumor activity of arginine deiminase from *Mycoplasma arginini* and its growth — inhibitory mechanism // Jpn. J. Cancer Res. — 1995. — V. 86, N 9. — P. 840—846.
3. *Sugimura K., Ohno T., Kusuyama T., Azuma L.* High sensitivity of human melanoma cell lines to the growth inhibitory activity of mycoplasmal arginine deiminase *in vitro* // Melanoma Res. — 1992. — V. 2, N 3. — P. 191—196.
4. *Takaku H., Takase M., Abe S. et al.* In vivo anti-tumor activity of arginine deiminase purified from *Mycoplasma arginine* // Int. J. Cancer. —1992. — V. 51, N 2. — P. 244—249.
5. *Kuo M.T., Savaraj, N., Feun, L.G.*, Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes // Oncotarget. — 2010. — V. 1, N 4. — P. 246—51.
6. *Kubo M., Nishitsuji H., Kurihara K. et al.* Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by arginine deiminase of *Mycoplasma arginine* // J. Gen. Virol. — 2006. — V. 87, N 6. — P. 1589—1593.
7. *Gong H., Zolzer F., von Recklinghhausen G. et al.* Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis // Leukemia. — 2000. — V. 14, N 5. — P. 826—829.
8. *Ascierto, P.A., Scala, S., Castello, G. et al.* Pegylated arginine deiminase treatment of patients with metastatic melanoma: results from phase I and II studies // J. Clin. Oncol. — 2005. — V. 23, N 30. — P. 7660—7668.
9. *Ensor, C.M., Holtsberg, F.W., Bomalaski, J.S., Clark, M.A.* Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEGv20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas *in vitro* and *in vivo* // Cancer Research. — 2002. — V. 62. — P. 5443—5450.
10. *Izzo, F., Marra, P., Beneduce, G. et al.* Pegylated arginine deiminase treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: results from phase I/II studies // J. Clin. Oncol. — 2004. — V. 22, N 10. — P. 1815—1822.
11. *Misawa S., Aoshima M., Takaku H. et al.* High-level expression of *Mycoplasma* arginine deiminase in *Escherichia coli* and its efficient renaturation as an anti-tumor enzyme // Biotechnol. — 1994. — V. 36, N 2. — P. 145—155.
12. *Патент США.* — Pub. No.: US 2005/0129706 AI, заявка від 15.01.2004, МПК A61K 39/02, C12N 9/10 // Modified arginine deiminase. — Опубліковано 16.06.2005.
13. *Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: A laboratory Manual // Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. — New York. — 1989.
14. *Sivashanmugam A., Murray V., Cui C. et al.* Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli* // Protein Sci. — 2009. — V. 18, N 5. — P. 936—948.
15. *Studier F.W.* Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif. — 2005. — V. 41, N 1. — P. 207—234.
16. *Fayura L.R., Boretsky Y.R., Pynyaha Y.V. et al.* Improved method for expression and isolation of the Mycoplasma hominis arginine deiminase from the recombinant strain of *Escherichia coli* // J Biotechnol. — 2013. — 167(4): 420-6.

Л.Р. Фаюра, Ю.Р. Борецкий, Ю.В. Пиняга, Н.Б. Мартынюк, В.В. Скороход, А.А. Сибирный

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА *ESCHERICHIA COLI* С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ АРГИНИНДЕЗИМИНАЗЫ *MYCOPLASMA HOMINIS*

Сконструирован рекомбинантный штамм кишечной палочки *Escherichia coli*, продуцирующий аргининдезиминазу бактерий *Mycoplasma hominis*. Подобраны условия для стабилизации высокопродуктивных клонов штамма-продуцента фермента. Проведено оптимизацию условий культивирования штамма-продуцента в биореакторах различного объема. Получены высокоочищенные препараты аргининдезиминазы и подобраны условия их длительного хранения.

Ключевые слова: аргининдезиминаза, штамм-продуцент, бактерии *Escherichia coli*, *Mycoplasma hominis*.

L.R. Fayura, Yu.R. Boretsky, Yu.V. Pynyaha, N.B. Martynyuk, V.V. Skorohod, A.A. Sybyrny

DEVELOPMENT OF CULTIVATION TECHNOLOGY FOR THE *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANT STRAIN PRODUCING ARGININE DEIMINASE OF *MYCOPLASMA HOMINIS*

The recombinant *Escherichia coli* strain producing arginine deiminase of *Mycoplasma hominis* has been constructed. Storage conditions that provide stabilization of most productive clones of the producer were found. Terms for cultivation of the arginine deiminase producer using bioreactors of different volume were optimized. Highly purified samples of arginine deiminase were obtained and their long-term storage conditions were selected.

Key words: arginine deiminase, producer, bacteria *Escherichia coli*, *Mycoplasma hominis*.

Стаття надійшла до редакції 13.02.14