

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Г.Н. Габричевского»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

На правах рукописи

Кузнецов Денис Бахтиерович

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

1.5.6 – Биотехнология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук, профессор
Миронов Андрей Юрьевич

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования.....	4
Степень разработанности темы исследования.....	5
Цель исследования.....	6
Задачи исследования.....	6
Научная новизна.....	6
Теоретическая и практическая значимость работы.....	7
Методология и методы исследования.....	9
Материалы исследования.....	10
Штаммы бактерий.....	10
Питательные среды.....	10
Биотехнологические методы исследования.....	11
Микроскопические методы исследования.....	11
Биолюминесцентные методы исследования.....	12
Микробиологические методы исследования.....	12
Спектрофотометрические методы исследования.....	13
Рефрактометрические методы исследования.....	13
Методы исследования кислотности среды.....	13
Методы ядерной магнитно-резонансной релаксации.....	13
Статистические методы исследования.....	13
Личное участие автора в получении результатов.....	14
Основные положения, выносимые на защиту.....	15
Степень достоверности и апробация результатов.....	15
ГЛАВА 1. Обзор литературы	17
1.1. Объекты микромира как основа современного биотехнологического и биофармацевтического производства.....	17
1.2. Цельноклеточные биосенсоры.....	18
1.3. Современное состояние развития технологий электромагнитного облучения культур микроорганизмов.....	19
1.4. Электромагнитная обработка культур живых систем, способы и устройства	23
1.5. Эффекты под воздействием ЭМИ	25
1.6. Теоретические принципы в описании процессов	28
1.6.1. Теория многослойной организации поляризованной воды в клетке.....	28
1.6.2. Поглощение излучения	30
1.6.3. Специфичность СВЧ- и ИК-воздействия.....	32
Заключение по главе.....	34

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	35
Глава 2. Изучение влияния обработки электромагнитным излучением на бактериальные культуры и питательные среды	35
2.1. Методы облучения.....	35
2.2. Эффекты обработки ЭМИ питательной среды	40
2.2.1. Спектрофотометрия ГРМ-бульона.....	40
2.2.2. Влияние ЭМИ на ЯМР-параметры питательной среды.....	42
2.2.3. Рефрактометрия питательной среды, подвергшаяся облучению ЭМИ.....	44
2.3. Влияние ЭМИ миллиметрового диапазона на штаммы <i>Lactobacillus</i>	45
2.4. Сканирующая атомно-силовая микроскопия клеток <i>E. coli</i>	46
2.5. Изучение люминесценции биосенсора <i>E. coli</i> K12 TG1 с клонированными генами <i>luxCDABE P. luminescens</i> ZM 1	50
Заключение по главе.....	55
ГЛАВА 3. Разработка технологии интенсификации роста культуры <i>E. coli</i>	56
3.1. Исследование параметров накопления биомассы культуры <i>E. coli</i> K12 TG1 с клонированными генами <i>luxCDABE P. luminescens</i> ZM 1 и продукции ею рекомбинантных белков	58
3.2. Разработка метода интенсификации роста биомассы <i>E. coli</i> LEGM-18, оценка параметров ЯМР-релаксации	63
3.3. Получение биомассы <i>E. coli</i>	74
Заключение по главе.....	79
Заключение	80
Выводы	88
Практические рекомендации	89
Перспективы дальнейшей разработки темы.....	90
Обозначения и сокращения	91
Список литературы	92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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 [35, 37, 66, 83, 88, 101, 156, 179, 181, 191]. Одними из таких физических методов воздействия, являются микроволновое и инфракрасное облучение [5, 23, 44, 55, 70, 135, 136, 155, 176, 185]. 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 [23, 135] 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 [119, 165, 201]. 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 [169, 184, 189]. 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 [21, 45]. Распространение биореакторов для производства лекарственных препаратов началось с открытия антибиотиков в 1940-х годах [21]. Однако по-прежнему из-за ограниченности знаний о влиянии электромагнитного излучения на биопроцессы, управление культивированием происходит за счет контроля температурного режима, pH, 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 [21]. С расширением знаний и появлением новых устройств, появляется возможность изменять параметры живых систем с помощью подвода энергии электромагнитного излучения в процессе культивирования и ферментации [37, 83, 88, 101, 156]. 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 [183, 185, 194].

К настоящему времени известны исследования, демонстрирующие перспективность разработки методов СВЧ-интенсификации в производстве различных микробиологических продуктов [32, 44, 96]. 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 [17].

Цель исследования – 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 $36,84 \div 37,04$ 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 М-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, рН 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).

Материалы исследования

Штаммы бактерий

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⁺ lac I^q lacZΔM15 с *lux*-опероном *Photobacterium 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, грамотрицательные. 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

В экспериментах с *E. coli* использовали мясо-пептонный бульон (МПБ) и бульон гидролизата рыбной муки (ГРМ-бульон). Приготовление питательной среды МПБ производили из Бульона питательного (Сухой мясо-пептонный бульон) (HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). Размешивали 13,0 г порошка (Таблица 1) в 1 л дистиллированной воды, кипятили до полного растворения. Разливали в коблы и автоклавировали при 1,1 атм (121° С) в течение 15 мин.

Таблица 1

Состав МПБ	
Мясной экстракт	10,0 г
Пептон ферментативный	10,0 г
Хлорид натрия	5,0 г

Для приготовления питательной среды ГРМ-бульон использован «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов, сухой ГРМ-бульон» (ГНЦ ПМБ, Россия) (ФС 42-3378-97), стандартизованный по рН ($7,2 \pm 0,2$). 20 г препарата (Таблица 2) суспендировали в 1 л дистиллированной воды, кипятили в течение 1-2 мин при постоянном помешивании. При наличии опалесценции фильтровали через бумажный фильтр. Разливали в колбы и стерилизовали при температуре 121° С в течение 15 мин.

Таблица 2

Состав ГРМ-бульона	
Панкреатический гидролизат рыбной муки	8,0 г
Пептон сухой ферментативный	8,0 г
Хлорид натрия	2,0 г

Среда Эндо (ГНЦ ПМБ, Россия) использовалась для определения выживаемости штаммов *E. coli* (ВФС-42-3110-98). Для лактобактерий использовали МРС-1 (АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», Россия). Данная среда используется в процессе изготовления препарата «ЛАКТОБАКТЕРИН» (ПР № 20858541-56-18).

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 засекали 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: $F_a = k \times \Delta Z$, где k – жёсткость зонда, ΔZ – 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 [43]. Уровень люминесценции биосенсора измеряли на «Биотокс» (ООО НЕРА-С, Россия). При проведении исследований подбора параметров облучения результаты исследования уровня люминесценции рассчитывались по формуле:

$$\text{Уровень люминесценции} = (X_1 - X_2) / X_1,$$

где X_1 и X_2 – средние значения по прибору без и после облучения образцов соответственно [51].

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: $1 \text{ McF} = 3 \times 10^8$ кл./мл

Удельную скорость роста культуры (μ , час^{-1}) 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 засевали 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 «pX-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 релаксометре 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±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% [27].

Личное участие автора в получении результатов

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. Несчислаевым. 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.

Основные 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 ± 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/см², продолжительностью 25 ± 5 мин.

Степень достоверности и апробация результатов

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Объекты микромира как основа современного биотехнологического и биофармацевтического производства

Преимущественно для производства биотехнологической продукции используют микроорганизмы, биохимия, морфология и генетика которых хорошо изучена [164]. В производстве очень часто предпочтение отдают *E. coli*, сенной палочке (*Bacillus subtilis*), пекарским дрожжам (*Saccharomyces cerevisiae*). Наиболее часто объектом в биотехнологии выступает *E. coli*. *E. coli* - первый микроорганизм, использованный в биоинженерии; к настоящему времени создано большое количество её генетически модифицированных штаммов и получаемых на основе биосинтеза терапевтических биомолекул [3, 28, 91, 94, 141, 160, 170].

С успехом рекомбинантную¹ *E. coli* применяют для производства ряда витаминов, таких как витамин В₁₂ [131] и витамин С [68]. Известны методы производства протеиногенных аминокислот с использованием *E. coli*, например, биосинтез метионина [102], L-аргинина [86] или L-треонина [197]. Ещё одной разновидностью продуктов, получаемых с помощью *E. coli* являются ферменты, например, фитазы² [124], которые добавляются в корма для животных с целью увеличения эффективности усвоения пищи.

Ряд штаммов *E. coli* используется в производстве пробиотических лекарственных препаратов при лечении диареи (NCT01469273), хронических запоров (NCT02726295), болезни Крона, синдрома раздражённого кишечника, язвенного колита, для иммуномодуляции при риноконъюнктивите (NCT01013259) и детской диареи (NCT02541695). В настоящее время в University of Oulu (Finland) проводятся клинические исследования по определению эффективности и безопасности цельноклеточных препаратов на основе *E. coli* для профилактики инфекционных заболеваний мочеполового тракта (NCT04608851), в NIZO Food Research (Netherlands) для лечения диареи (NCT03301103), в Национальном

¹Рекомбинантная бактерия – микроорганизм, который носит короткие фрагменты генома другого организма (с помощью технологии рекомбинантной ДНК).

²Фитазы - группа ферментов, относящихся к подклассу фосфатаз, осуществляющих высвобождение хотя бы одного фосфат-иона из молекулы фитиновой кислоты. В результате гидролиза фитиновой кислоты образуются низшие, т. е. содержащие менее шести остатков фосфорной кислоты, инозитолфосфаты, инозитол и неорганический фосфат, высвобождаются связанные с фитатами катионы.

медицинском университете имени А. А. Богомольца (Украина) как средство для лечения 1 и 2 стадии печёночной энцефалопатии (NCT04787276).

Представляют интерес иммуностимуляторы, иммуномодуляторы, вакцины, гормоны и противоопухолевые средства, изготовленные на основе *E. coli*.

➤ «Уро-Ваксом» (лизат 18 штаммов *E. coli*) производства «Астеллас». Используется в качестве иммуномодулятора.

➤ «Постеризан» (клетки *E. coli*), производитель - «Dr. Kade». Регенерирующее, противозудное, противоаллергическое, иммуностимулирующее, противовоспалительное средство. Формирует адаптивный и стимулирует врождённый иммунитет.

➤ «Аспарагиназа» (полученная из *E. coli*) производства «Медак Гмбх». Цитостатическое, противоопухолевое средство, используемое в основном при лечении острого лимфобластного лейкоза.

Одним из новых направлений является разработка пробиотических рекомбинантных штаммов *E. coli*, которые одновременно выполняют функцию адресных систем доставки и продуцентов терапевтических белков, например для лечения фенилкетонурии (NCT04534842), кишечной гипероксалурии (NCT04629170) и иммуноонкологии [93]. Из указанных выше сфер применения можно заключить, что *E. coli* является важнейшим объектом биотехнологии, и выбор её производственных и генетически модифицированных штаммов в качестве объектов исследования является перспективным, оптимизация одного из главных этапов производства продуктов, полученных с использованием *E. coli*, будет являться несомненным преимуществом, поскольку будет отражаться на их себестоимости.

1.2. Цельноклеточные биосенсоры

Использование цельноклеточных биосенсоров для аналитических задач характеризуется более низкой стоимостью и простотой. За последнее время стало известно множество цельноклеточных биосенсоров, которые могут использоваться при оценке различных видов токсичности, воздействия различных факторов среды

и многих других задачах [34, 95, 134, 162]. Такие биосенсоры получают с помощью трансфекции генов, ответственных за синтез индикаторных веществ [92].

Одним из распространенных биосенсоров являются микроорганизмы с *lux*-оперонами. Экспрессированный комплекс белков, выполняющий индикаторную функцию, обычно чувствителен к температуре, но в целом биосенсор адекватно отражает влияние различных факторов на клетки [12]. Известна научная работа и запатентован метод на её основе по определению влияния ЭМИ с помощью биосенсора [13, 36]. Известен подобный способ определения влияния микроволнового излучения при использовании люминесцентного биосенсора [33]. Методы на основе биосенсоров быстры, просты, чувствительны и объективны, они не требуют высококвалифицированного персонала, дорогого оборудования и химических агентов [33, 36].

Перечисленные преимущества сенсорных биолюминесцентных систем привлекают учёных использовать их в своих исследованиях. При длительном хранении тест-штаммов возникает потребность восстановления их индикаторных свойств. Возможно, что одним из методов, способствующих нормализации индикации, может быть обработка электромагнитным излучением.

1.3. Современное состояние развития технологий электромагнитного облучения культур микроорганизмов

Электромагнитные излучения природного и техногенного происхождения как неотъемлемая часть окружающей среды определяют существование живых организмов и всей биосферы. Излучения представляют собой возмущения электромагнитного поля (ЭМП) и взаимодействуют с заряженными частицами, перенося энергию в пространстве [46, 87, 103].

Первые генераторы миллиметрового СВЧ-излучения были разработаны в 1965-1966 годах. В течение последних нескольких лет СВЧ-излучение миллиметрового диапазона использовалось в связи, метеорологии, радиоастрономии, медицине и в вооружении (радары для систем управления огнем и зенитно-артиллерийскими комплексами, системы нелетального оружия «Active

Denial System») [48, 118, 130, 184].

Из-за растущего распространения СВЧ-излучения исследования воздействия низкоинтенсивного микроволнового излучения на живые организмы становятся всё более актуальными в связи с большей доступностью компонентной базы. В XXI веке в биологии и медицине уделяется внимание этому диапазону [1, 5, 7, 19, 24, 29, 73] и инфракрасному диапазону [114, 123, 199]. Такой интерес определяется прежде всего особенностью взаимодействия излучения с молекулами, которые участвуют в жизнедеятельности клеток.

Первые исследования в промышленных условиях проведены в начале 80-х годов прошлого века [45]. Цель исследований – определение возможности масштабирования метода СВЧ-интенсификации процесса пивоварения и повышение качества продукта. В рамках этих исследований было установлено, что СВЧ-облучение увеличивает скорость роста культуры микроорганизмов и изменяет продукцию метаболитов, в частности гликогена и токсичных компонентов, таких как альдегиды и диацетил, что отражается на вкусовых характеристиках и питательности готового продукта. Кроме того, были обнаружены эффекты повышения устойчивости дрожжевой культуры при воздействии негативными факторами и восстановление её угнетенной биосинтетической активности.

Обзор опубликованных данных о влиянии миллиметрового излучения на микроорганизмы показал, что микроволны оказывают влияние на процесс клеточного деления, продукцию белков, морфологию клеток при отсутствии мутагенного эффекта [45, 80]. В настоящее время в данном направлении науки рассматриваются два варианта: воздействие ЭМИ высокой и низкой интенсивностей (ЭМИНИ) на микроорганизмы. При этом оба варианта ещё малоизучены, а развитие технологий, которые совмещают в себе использование ЭМИ и живых систем является перспективным.

Проблема низкоинтенсивного СВЧ-воздействия³ на живые организмы

³ Плотность потока энергии ЭМИ не превышает 10 мВт/см²

является частью общей проблемы воздействия слабых внешних физических факторов. СВЧ-излучение с длиной волны в диапазоне от 4 до 8,5 мм показало перспективность для использования в биотехнологических процессах [44]. К настоящему времени известен ряд работ, описывающих результаты экспериментов о влиянии микроволнового излучения на объекты микромира [5, 44, 45, 46, 47, 70, 108, 137, 178, 183, 194].

Биотехнология – отрасль знаний, которая на основании изучения процессов жизнедеятельности живых организмов, а главным образом клеток микроорганизмов, растений, животных, использует эти биологические процессы, а также сами биологические объекты для промышленного производства продуктов, необходимых для жизни человека или воспроизведения биоэффектов не проявляющихся в естественных условиях [18]. Обнаружено влияние СВЧ-облучения на биологические параметры культур микроорганизмов [23, 135]. Показано, что СВЧ-излучение с частотой 61,2, 53,53, и 42,2 ГГц способно повышать скорость деления клеток, биосинтез и секрецию внеклеточных гидролаз до 47% *Aspergillus niger* [70]. Эффект зависил от частоты излучения и функционального состояния штаммов.

Микроволновое облучение культуры *E. coli* K12 длиной волны 4,1 и 4,24 мм изменяло параметры роста бактерий, рН и электропроводности питательной среды [175]. При облучении и добавлении цефтриаксона или канамицина наблюдалось ингибирование тока ионов H^+ и K^+ более выраженное влияние ингибитора АТФ-азы. При этом излучение с длиной волны 4,1 мм усилило влияние цефтриаксона на транспорт обоих ионов [176]. Облучение культуры *Saccharomyces* с частотой 53,53 ГГц, 10 мВт/см² обеспечивало прирост биомассы в среднем до 30% [187]. В исследовании с *S. cerevisiae* культуру облучали мощностью 100 мВт/см² с длиной волны от 5,49 до 5,57 мм. При облучении с длиной волны 5,57 мм прирост биомассы составил 136% и увеличилась подъёмная сила⁴ до 10,5 мин (контроль 21

⁴ Подъёмная сила – способность дрожжей сбраживать глюкозу, фруктозу, сахарозу.

мин), мальтазная активность⁵ до 6 мл / час (контроль 4 мл / час), зимазная активность⁶ до 60 мин (контроль 45 мин) [10].

В эксперименте с воздействием различных видов ЭМИ на *Streptomyces canosus* вначале получали мутантные штаммы после γ -облучения и после γ +УФ-облучения. Далее облучали микроволнами с частотой 53,53 ГГц. Продукция триглицеридов у не мутантного штамма уменьшилось на 40÷80%, по сравнению с образцами без облучения, но повысилась у мутантных. Измерение показателя прироста биомассы показало, что у нативного штамма прирост достигал до 138,8%, а у мутантных около 116,7% и 125,8% соответственно [155].

При микроволновом облучении культуры *Enterococcus hirae* с длиной волны λ 5,78 и 5,56 мм обнаружено снижение транспорта H^+ и K^+ через мембрану и общей и АТФ-азной активности. Предполагается, что основной механизм возникновения биологических эффектов от микроволнового облучения опосредован его влиянием на АТФ-азу [174].

Имеются данные о корреляции данных по параметру прироста микроводорослей с уровнем насыщения их водой⁷. Клетки имеют оптимальный физиологический статус, когда в них повышается количество адсорбированной воды. Снижение количества адсорбированной воды приводит к их стрессу [148, 167].

Использование ЭМИ для управления процессом адсорбции воды в живых системах с целью получения полезных биотехнологических эффектов более перспективно по сравнению с химическими веществами, в связи с отсутствием процессов образования их метаболитов и не естественных биохимических цепочек.

Получаемые при облучении микроорганизмов эффекты в дальнейшем могут явиться основой новых методов получения вакцин, увеличения продуктивности методов получения антибиотиков и ряда других продуктов [109, 110, 112, 114, 146, 185].

⁵ Мальтазная активность - время (в мин), необходимое для выделения 10мл CO_2 при сбраживании 10-20 мл 5%-ного раствора мальтозы при 30° С дрожжами, взятыми в количестве 2,5% к объёму среды.

⁶ Зимазная активность - время (в мин), необходимое для выделения 10 мл CO_2 при сбраживании 10-20 мл 5%-ного раствора глюкозы при 30° С дрожжами, взятыми в количестве 2,5% к объёму среды.

⁷ Гидратация - присоединение молекул воды к молекулам или ионам.

В исследовании с терагерцевым излучением, длины волн которого соответствуют максимумам излучения и поглощения молекул NO и O_2 показано, что излучение с длинами волн поглощения и излучения дикислорода способствует плёнкообразованию культуры *P. aeruginosa*, а излучение, соответствующее NO ингибирует эту способность [39]. При этом, эти данные согласуются с работами, в которых исследуется влияние этих молекул на процесс перехода от биоплёнки к планктонной форме [55, 136]. В ряде работ по изучению терагерцевого излучения на клетки данные сопоставляются с результатами исследований, в которых изучалось влияния монооксида азота на их функционирование [62, 104, 111, 112, 191].

В ряде работ авторы утверждают, что нетепловое СВЧ-воздействие на бактериальные культуры, приводящее к появлению значимых с точки зрения биотехнологии эффектов, проявляется если система имеет определённую упорядоченность. При отсутствии упорядоченности системы наблюдается только тепловой эффект [30, 43]. Вероятно, под упорядоченностью водной среды авторы понимают связанную воду в виде сформированной адсорбированной фазы растворителя на интерфейсах из полярных молекул. Вероятно, именно эти структуры преимущественно поглощают микроволновое излучение. Вышеприведенные данные показывают полезные эффекты воздействия миллиметрового ЭМИ, которые могут использоваться в биотехнологической промышленности [45].

1.4. Электромагнитная обработка⁸ культур живых систем, способы и устройства

Изобретения, относящиеся к аппаратам и методам, предназначенные для повышения ростовых характеристик культур живых систем с помощью ЭМИ неоптического диапазона, представлены немногочисленными патентами США, России, Китая. Интеллектуальная собственность принадлежит различным патентодержателям от частных научно-исследовательских компаний до NASA [35, 37, 83, 88, 101, 156, 189].

⁸ Биостимуляция - комплексное воздействие физическим фактором на живые системы с целью активизировать их основные, резервные и компенсаторные возможности.

Патентный поиск показал, что в упрощённом виде (без рассмотрения мешалок и излучателей ЭМИ) конструкция системы ферментер/биореактор определяется её геометрией и способом размещения антенн. Схема вариантов размещения антенн представлена на рисунке 1. Выделяют следующие возможные варианты размещения источников ЭМИ:

1. Установка излучателей/антенн снаружи ёмкости, ЭМИ проходит через отверстия в биореакторе, которые выполнены из материала, имеющего окно прозрачности в диапазоне излучения (Рисунок 1(1))⁹;
2. Размещение погружных антенн/излучателей внутрь ёмкости (Рисунок 1(2));
3. Размещение антенн/излучателей между ёмкостями, где одна ёмкость находится внутри другой, причём стенки внутренней ёмкости выполнены из материала, имеющего окно прозрачности для данного ЭМИ (Рисунок 1(3)).

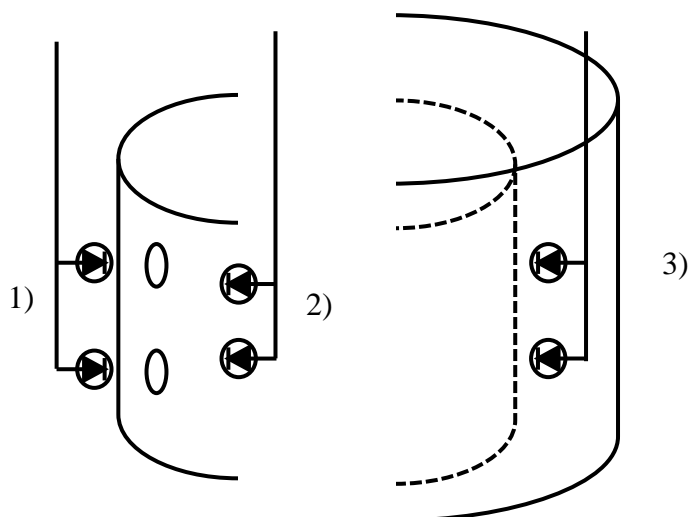


Рисунок 1 – Варианты размещения источников ЭМИ [83, 88, 101, 189, 190]

Примечание: 1) наружное; 2) внутреннее; 3) между емкостями

Основной массив изобретений запатентован в последние двадцать лет, что вероятно, свидетельствует о начальной стадии развития данного направления.

Исходя из приведённой информации, возможно, предлагаемые к разработке методы воздействия ЭМИ на культуру *E. coli* могут быть реализованы существующим уровнем техники. Пока трудно прогнозировать экономический

⁹ Окно прозрачности - диапазон длин волн электромагнитного излучения, в котором имеет место меньшее, по сравнению с другими диапазонами, затухание излучения в среде.

эффект от использования указанных технологий в виду малой освоенности миллиметрового диапазона, и как следствие дорогой компонентной базы. Очевидно, что данные технологии не могут быть коммерциализированы без широкого использования источников излучения и соответственно их кратного удешевления.

1.5. Эффекты под воздействием ЭМИ

В соответствии с требованиями GMP процессы производства биофармацевтических препаратов должны быть разработаны таким образом, чтобы производить продукцию с неизменными характеристиками качества. Производственные процессы должны быть научно обоснованы и каждая часть оборудования, используемого в нём, должна работать для обеспечения продукции в установленных пределах. Необходимо всестороннее понимание эффектов воздействия ЭМИ при разработке технологии микроволновой интенсификации биопроцесса бактериальных культур в производстве биопрепаратов для контроля процесса и выявления рисков. Выявление эффектов и их научное обоснование определяет возможность переноса технологии в производство.

В исследовании протекания биохимических реакций при СВЧ-облучении обнаружено увеличение скорости [22]. Необходимо подчеркнуть, что эффект СВЧ-излучения наблюдался при длинах волн в диапазоне $42,2 \div 73,0$ ГГц. При культивировании в питательной среде с культурой клеток микроорганизмов основным компонентом является вода. Известно, что в ИК- и СВЧ-диапазонах вода имеет выраженный спектр поглощается. Более глубокое излучение процессов, протекающих при облучении водных систем было начато сравнительно недавно [42]. В водных растворах без ограничения на их толщину при микроволновой обработке обнаружена гидродинамическая неустойчивость¹⁰ в виде термогравитационной конвекции¹¹ [8]. Показано, что при облучении тонких слоёв водных растворов (не более 2,0 мм) гидродинамическая неустойчивость имеет иной характер, при котором

¹⁰ Гидродинамическая неустойчивость – физическое явление, заключающееся в разрушении течения со временем под воздействием случайных малых возмущений.

¹¹ Термогравитационная конвекция – вид теплопередачи под действием разности температур в поле гравитации, из-за силы Архимеда.

преимущественно имеет место межфазная конвекция¹² и образование градиента температуры, с повышением концентрации кислорода в жидкой фазе, что не наблюдалось в опытах с большей толщиной растворов [4, 115]. При толщине менее 2 мм значительный вклад в наблюдаемые явления даёт адсорбированная фаза, которая по данным [65, 198, 199, 200] может вырастать до значительных размеров в зависимости от состава и структуры интерфейса. СВЧ-облучение приводило к нестационарным, колебательным течениям в растворах при уровнях плотности падающей мощности 10 мВт/см². Градиент температуры приводил к изменениям поверхностного натяжения и динамики движение жидкости [4].

При исследовании влияния излучения частотой 53,37 ГГц на гигантские везикулы (модель клеток) продемонстрировано их удлинение, обнаружена индуцированная диффузия флуоресцентного красителя и повышение притяжения между везикулами. Эти эффекты являются обратимыми и происходят только во время облучения [158]. При этом облучение вызывает коллективную переориентацию в движении пузырьков. Этот индуцированный излучением миллиметрового диапазона эффект наблюдался в большей степени на гигантских везикулах, полученных с отрицательно заряженными фосфолипидами. Мониторинг изменения температуры образцов и дозиметрии показывает, что наблюдаемые эффекты в движении везикул нельзя отнести к локальному нагреву [52]. Данные о повышении притяжения между везикулами, коллективной переориентации и их движением, полученные в этих исследованиях, свидетельствуют о перераспределении зарядов (Рисунок 2), таким образом, явления, связанные с изменением заряда на интерфейсах при облучении ЭМИ, могут иметь универсальный характер для всех дисперсных систем.

Явление сближения отрицательно заряженных частиц объясняется тем, что помимо отрицательного заряда в воде есть положительные, которые сконцентрированы между отрицательно заряженными частицами [150]. Положительный объёмный заряд между отрицательно заряженными частицами

¹² Термокапиллярный эффект – изменение силы поверхностного натяжения, сопровождающееся деформацией поверхности слоя.

экранирует электрическое поле этих заряженных частиц, и они приближаются друг к другу, за счёт взаимодействия с положительным объёмным зарядом. При

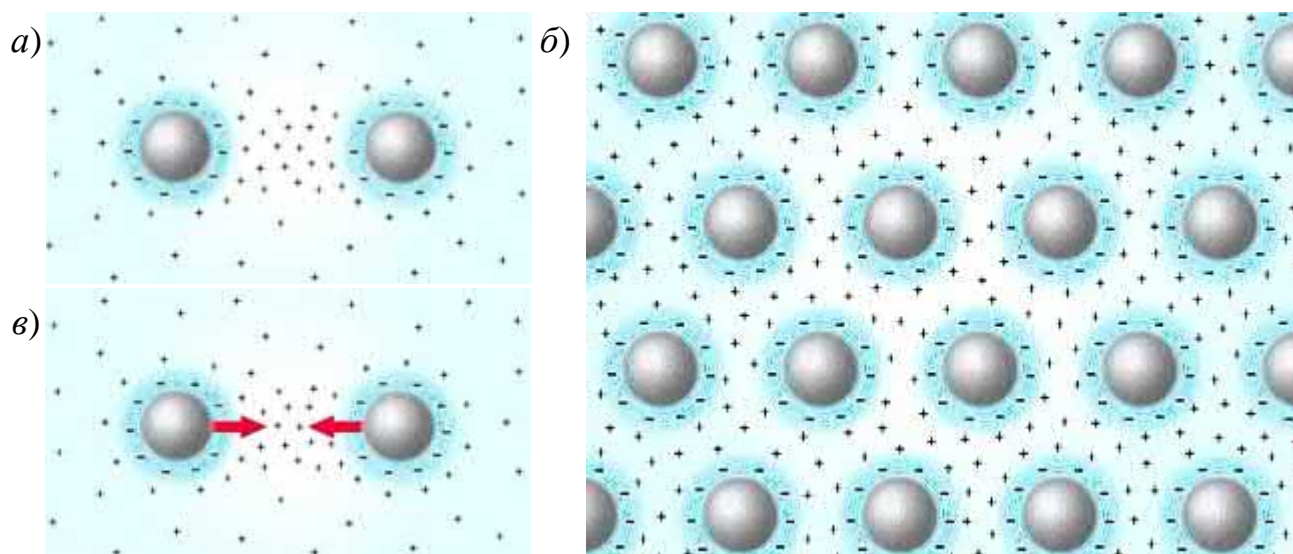


Рисунок 2 – Динамика частиц и структура коллоидной системы [150]

Примечание: *a)* концентрация положительного заряда между отрицательно заряженными частицами; *б)* притяжение отрицательно заряженных частиц; *в)* структура коллоидной системы

приближении на критическое расстояние силы притяжения и отталкивания уравниваются и частицы останавливаются.

Эффекты СВЧ-облучения дисперсионной системы на основе липосом могут проявляться подобным образом в культуре микроорганизмов, где значительная роль отводится гидратным оболочкам фосфолипидов. В исследованиях на этих системах было установлено, что микроволновая обработка перестраивает адсорбированные фазы вокруг центров адсорбции на молекулах фосфолипидов [26]. Такие изменения, очевидно, определяют транспорт заряженных частиц через мембрану, что, несомненно, отражается на функциях различных биосинтетических систем клеток. Установлено, что на длине волны $\lambda=4,85$ мм объём адсорбированной фазы растворителя возрастает, а структура её разупорядочивается. Вероятно, это явление объясняется тем, что чем дальше от интерфейса находятся диполи, тем они имеют меньший дипольный момент, и как следствие более подвижны. Напротив, при облучении с частотой 62,6 ГГц объём адсорбированной фазы снижается, а структурность её повышается. При этом наблюдается изменение структуры

бислойной мембраны в виде повышения подвижности липидных молекул и их разрыхления [26].

С учётом приведённых выше данных далее рассмотрены физико-химические концепции, позволяющие приблизиться к пониманию процессов в клетках микроорганизмов под действием ЭМИ.

1.6. Теоретические принципы в описании процессов

Фазово-сорбционная концепция, базирующаяся на общей химии поверхностей, является наиболее подходящей для теоретического описания механизмов возникновения биологических эффектов при микроволновом облучении [127].

С точки научной обоснованности следующие принципы: усиление ассоциации противоионов (или нейтральных молекул) с центром связывания, если он имеет ограниченную подвижность» [127]; принцип связывания ионов металлов с белковыми интерфейсами и участие АТФ в этом процессе»; принцип образования широких адсорбированных фаз из полярного растворителя на интерфейсах биополимеров» [126].

1.6.1. Теория многослойной организации поляризованной воды в клетке

Биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты, мембраны) в живой клетке представляют собой жидкие кристаллы [38, 186]. Согласно этой теории, молекулы растворителя участвуют в образовании адсорбированной фазы при взаимодействии с центрами адсорбции. Одними из распространенных центров является сеть белковых цепей, где есть доступ воды к пептидным связям, фосфолипиды, нуклеиновые кислоты и полисахариды [127].

В вакууме молекулы воды имеют дипольный момент¹³ 1,85 Дебая ($1 \text{ Д} = 3,33564 \times 10^{-30} \text{ Кл} \times \text{м}$). Значение дипольного момента зависит от межмолекулярных контактов. В естественном жидком состоянии значение составляет 2,9 Дебая. Повышение значения дипольного момента обусловлено окружением других диполей или зарядов,

¹³ Дипольный момент молекулы – асимметрия распределения электрических зарядов в электрически нейтральной системе.

которые изменяют поляризацию¹⁴ [168].

Если пептидная связь в белках доступна для растворителя, она будет играть роль центра адсорбции. При взаимодействии молекул растворителя с центрами адсорбции происходит их поляризация, что проявляется в образовании более жестких водородных связей с окружающими молекулами. Ограничение подвижности диполей и повышение их дипольного момента при определенных условиях на незначительных отдалениях от интерфейса из гидрофильных молекул может запускать процесс самосборки адсорбированной фазы по типу «эпитаксии». При этом «зародышевой» фазой, определяющим структуру адсорбированной фазы служит интерфейс из полярных молекул. Рост такой фазы происходит за счет образования слоев из молекул растворителя, которые имеют ограниченную динамику. С отдалением от центров адсорбции снижается дипольный момент и слои фазы становятся более подвижными, постепенно переходя в фазу свободной воды. Результатом эпитаксиального роста¹⁵ интерфейс будет иметь новую, пограничную фазу с динамичной структурой из поляризованных и упорядоченных молекул [193].

Взаимодействие полярных молекул с другими заряженными частицами усиливает асимметрию зарядов и соответственно их дипольный момент [117]. С возрастанием дипольного момента полярные молекулы растворителя начинают сильнее поляризоваться, образуя более широкие адсорбированные фазы. Свойства такой фазы определяются природой и площадью интерфейсов. Чем она больше, тем выше дипольный момент и тем шире будет адсорбированная фаза [161].

Ещё в середине XX века накопился ряд работ, демонстрирующих наличие в клетках надмолекулярных комплексов и ассоциатов из молекул растворителя, биополимеров и ионов Na^+ и K^+ . С помощью исследования ядерного магнитного резонанса (ЯМР) тканей были подтверждены исследования, полученные другими методами [78]. Впоследствии с усовершенствованием оборудования для ЯМР-спектроскопии было подтверждено, что молекулы полярного растворителя в

¹⁴ Степень поляризации – число диполей, ориентированных вдоль линий напряженности.

¹⁵ Эпитаксиальный рост – ориентированный рост одного кристалла на поверхности другого (подложки), где каждый последующий слой имеет ту же ориентировку, что и предыдущий.

клетках имеют большой дипольный момент [77, 97, 98, 132]. Это открытие позволило разработать технологию магнитно-резонансной томографии (МРТ). Также это было подтверждено в эксперименте с исследованием диэлектрических свойств [74, 75].

Позднее были проведены исследования [65], демонстрирующие, что водосодержащие системы могут поглощать и аккумулировать энергию ЭМИ. В экспериментах на модельных системах с гидрофильными материалами показано, что в процессе поглощения излучения происходит увеличение дипольного момента молекул и рост адсорбированной фазы до 500 мкм на синтетических мембранах и до 200 мкм на мышцах лягушки.

В эксперименте при пропускании тока между электродами в растворе и последующим его отключением измерялся рН. В растворе возле электродов из различного материала было зафиксировано длительное изменение показателя кислотности в виде градиента, что указывает на разделение зарядов в полярной жидкости [145]. Внешние факторы, влияющие на движения зарядов, способны создавать градиент их концентраций как локальный, так и в системе в целом.

В ходе ряда исследований было установлено, что действие энергии ЭМИ на ширину адсорбированной фазы зависит от частоты излучения. При этом выделяют два пути расхода поглощенной энергии, на тепловое движение молекул¹⁶ и разделение зарядов (снижение энтропии в системе). Вода на границе интерфейсов отличается, она поляризована, имеет большой дипольный момент и вязкость, отрицательный заряд, толщина фазы чувствительна к внешним электрическим и электромагнитным полям [65, 117, 126, 198, 199]. Вода имеет выраженное поглощение в широком спектре СВЧ- и ИК-излучения по сравнению с биополимерами, таким образом, она может рассматриваться как основной акцептор энергии электромагнитного излучения, а процессы разделения зарядов, как первичные звенья акта поглощения.

1.6.2. Поглощение излучения

Поглощение и переизлучение квантов определяется энергетическим уровнем

¹⁶Энтропия потерь – мера рассеивания энергии системы в виде теплового движения молекул или излучения.

полярных молекул, т.е. интенсивностью их колебаний и вращений [100]. Высокоинтенсивные колебания связей N=O, C=O, S=O, C-N, C-O, O-H, входящих в состав активных клеточных метаболитов, приводят к поглощению излучения ИК- и СВЧ-излучения. В терагерцевом диапазоне находятся частоты молекулярных спектров излучения и поглощения [25, 54, 81].

Для рассмотрения возможных механизмов влияния ЭМИ на энергетический обмен в клетке необходимо учитывать, что при поступлении энергии клетка на первом этапе сохраняет её в следующие формы: в градиент концентрации протонов $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, градиент концентрации натрия $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ или в фосфоангидридные связи АТФ [60]. Количество молекул воды в клетке *E. coli* составляет 2×10^{10} , АТФ от 5×10^5 до $1,7 \times 10^6$, ионов натрия в среднем 2×10^8 .¹⁷ С учетом ограниченности масштаба и больших площадей интерфейсов из полярных молекул адсорбированная фаза является повсеместной и преобладающей, как внутри, так и снаружи клетки. Отсюда напрашивается вывод, что первой формой, в которой запасается энергия излучения является градиент концентрации протонов $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ [82, 145, 152, 198, 199]. Стоит отметить, что расширение адсорбированной фазы повышает устойчивость таутомеров, конформеров и изомеров. Это может приводить к образованию меньшего количества биохимического «мусора» [126]. Повышение градиента концентрации протонов $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ приводит к тому, что протоны с более высокой свободной энергией, образующиеся в данном процессе, могут транспортироваться с помощью переносчиков в области синтеза АТФ [199]. Подавляющее большинство молекул АТФ образуется протонными АТФ-синтазами (F_0F_1 -АТФ-синтаза) [177]. Почти вся совокупность биологических процессов связана с использованием химической энергии от реакции гидролиза АТФ [41]. АТФ-синтазы в клетках бактерий являются трансмембранными белками [142].

F_0F_1 -АТФ-синтаза работает в двух режимах: синтез АТФ за счёт трансмембранного градиента протонов $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ и гидролиз АТФ при его больших концентрациях для создания трансмембранного протонного градиента $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ [177].

¹⁷ *Escherichia coli* Statistics https://ecmdb.ca/e_coli_stats

Механизм синтеза АТФ с помощью этого фермента изображен на рисунке 3. Основными звеньями этого механизма является транспорт протонов через мембрану из области с высокой концентрации в область с низкой. Цепь транспорта протонов включает: 1) субъединицы c_{12} , которые содержат $R-COO^-$ группу, являющуюся акцептором H^+ , поступающим из «кислотного резервуара» и транспортируют их в «щелочной резервуар»; 2) два протонных канала в мембранной части АТФ-синтазы. Первый обращён к «кислотному резервуару» и обеспечивает допуск H^+ к депротонированной $R-COO^-$ группе c_{12} -субъединицы. Второй участвует в перемещении H^+ в «щелочной резервуар» [41, 116].

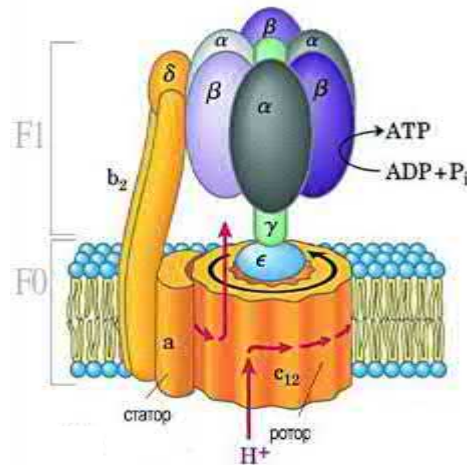


Рисунок 3 – Работа фермента F_0F_1 -АТФ-синтазы [177]

1.6.3. Специфичность СВЧ- и ИК-воздействия

При облучении с одинаковыми параметрами разных микроорганизмов наблюдаются различия в эффектах. Одна из особенностей связей $R-CO-NH-R$ в белках заключается в образовании водородных связей между цепочками белков во вторичных, третичных или четвертичных структурах или с полярным растворителем в свободных участках [49, 152]. При фолдинге происходит десорбция растворителя [128]. Эти исходные процессы могут запускать каскады реакций, в которых поглощенная энергия будет расходоваться, выражаясь в различных биологических эффектах [72, 152, 180, 181].

Расход энергии на специфические межмолекулярные взаимодействия белковых молекул может приводить к образованию временных сигнальных

структур [65]. В процессе образования этих структур изменяется электронная плотность различных участков молекул, что приводит к перестроению структуры, повышению или снижению прочности химических связей [172]. В результате этих взаимодействий образованные структуры могут иметь широкий спектр функциональных характеристик, в частности выступать в качестве лигандов ионов и молекул, образовывать каналы и обладать ферментативной активностью [133].

В более частных примерах обсуждается, что механизмы биосинтеза белка, в которых участвует тРНК для переноса аминокислот к участкам рибосом, где осуществляется рост полипептидной цепи, не может быть описан простыми процессами диффузии [179]. Механизм транспорта таких макромолекул определяется адсорбированной фазой в цитозоле. Встраивание сольватированных молекул в фазу, где растворитель поляризован, энергетически невыгодно, что препятствует их прямому контакту. Однако эта поляризованная фаза имеет выраженный электрический потенциал и может служить донором электронов при транспортировке возбуждения от рецептора к целевой молекуле [79, 90]. Экспериментальные данные, полученные при изучении интерфейсов вода-поверхность, позволили подтвердить эти утверждения [84, 151, 199].

Одним из главных вопросов использования электромагнитного излучения в производстве биотехнологической продукции является его безопасность. Ранее считалось, что нетепловое микроволновое излучение способно оказывать воздействие на экспрессию генов. Крупномасштабных исследований о возможности модификации экспрессии генов при воздействии миллиметровым ЭМИ на живые объекты почти не проводились. Известна работа, где объектом исследования были первичные клетки кожи человека, которые исследовались набором из 41000 зондов для транскрипции при облучении 60,4 ГГц излучением мощностью $1,8 \text{ мВт/см}^2$ продолжительностью 1, 6, 24 ч [122]. В ходе статистического анализа обнаружено, что 130 транскриптов потенциально модулируются после воздействия. Пять из них (CRIP2, PLXND1, PTX3, SERPINF1, TRPV2) подтверждены как дифференциально выраженные после 6 часов

воздействия [122]. Исследования на кератиноцитах кожи показали, что ЭМИ миллиметрового диапазона может влиять на экспрессию мРНК транзиторного рецепторного катионного канала TRPV2 (кальциевые каналы). До сих пор не ясно, являются ли обнаруженные изменения в работе генетического аппарата прямым следствием влияния излучения или это приспособительная реакция на какие-то иные процессы, протекающие в клетках под его воздействием.

Заключение по главе

Имеется достаточное количество исследований, где приводятся данные о различных биологических эффектах при воздействии ЭМИ, что подтверждает интерес учёных к этой области. По-прежнему количество исследований с производственными штаммами и цельноклеточными биосенсорами, а также разработки на их основе методов для получения полезных биотехнологических эффектов при микроволновом облучении, недостаточно.

Существующие методы оценки эффектов СВЧ-облучения на культуры и способы интенсификации технологических процессов имеют ряд недостатков, главным из которых является низкая эффективность. Одной из причин этого является отсутствие механистического понимания механизмов микроволнового воздействия на биологические процессы.

Имеются данные об использовании СВЧ-излучения в биотехнологии, заключающемся в улучшении качества продуктов и повышении биосинтетической способности микроорганизмов. Зарегистрированы изобретения, которые предусматривают использование эффектов воздействия ЭМИ на микроорганизмы.

Данная работа предлагает новые идеи в разработке биотехнологических процессов, например, в производстве цельноклеточных препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОБРАБОТКИ ЭМИ НА КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

2.1. Методы облучения

Для проведения исследований нами была собрана установка, позволяющая проводить обработку с однородной мощностью падающего излучения по всему объему образца. Схема установки для микроволновой обработки (34÷38 ГГц) показана на рисунке 4. Установка основана на генераторе Г4-156 и способна излучать непрерывные плоскополяризованные сигналы. СВЧ-сигнал поступал на антенну (5) через вентиль (2), аттенюатор (3), трансформатор (4). Линза (6) формировала пучок излучения и направляла его на пробу. Поток мощности составлял не менее 0,4 мВт/см².

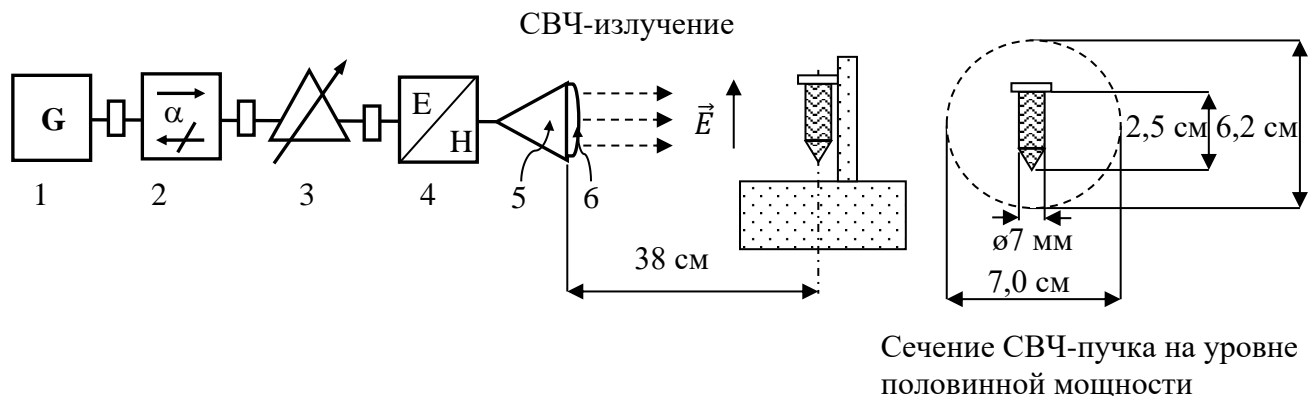


Рисунок 4 – Схема установки для облучения проб на 34÷38 ГГц

Перед каждым облучением, чтобы определить поток микроволновой мощности, проводили исследование. Уровень микроволновой мощности на выходе генератора измерялся измерителем мощности. Потери мощности в микроволновом тракте оценивали методом сравнения с потерями в калиброванном аттенюаторе. Затем ёмкости с бактериальной суспензией помещали в плоскость антенны. Путём перемещения антенны в горизонтальном и вертикальном направлениях и измерения микроволновой мощности получена диаграмма излучения излучающей антенны. Это позволило рассчитать мощность потока микроволнового излучения. Для контроля мощности излучения в поглотителе сделано отверстие, в которое

помещали приёмную антенну с детектором. Сигнал на выходе детектора подтверждал наличие СВЧ-излучения.

Схема установки на основе генераторов производства «НПО КП» (Россия), генерирующая частоты 42,22, 53,53 и 61,18 ГГц представлена на рисунке 5(а). Установка состоит из генератора (1), волновода (2) и штатива (на рисунке не изображено).

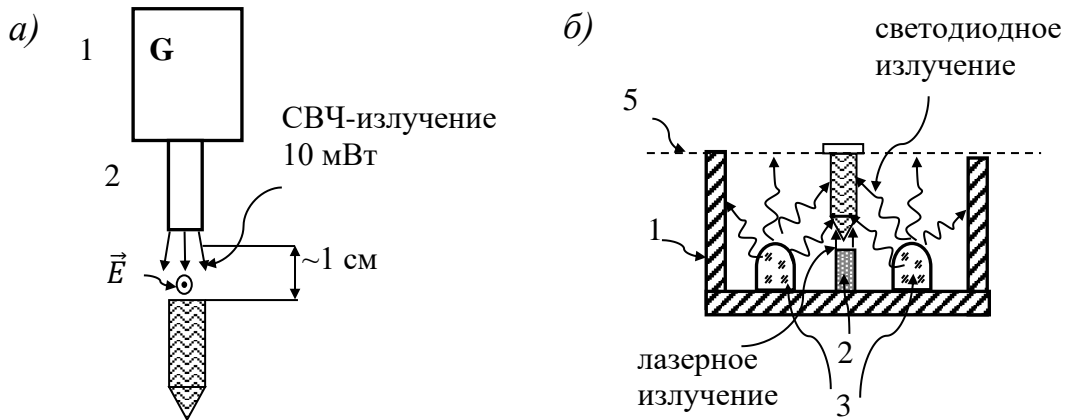


Рисунок 5 – Схема установки для облучения проб

Примечания: а) СВЧ-излучением с $\lambda=7,1, 5,6$ и $4,9$ мм; б) ИК-излучением с $\lambda=850\div 890$ нм

Для ИК-облучения нами собрана установка на основе устройства производства «НПО КП» (Россия). Для этого в устройство, состоящее из лазера (2) и светодиодов (3), размещенных внутри камеры с отражателем (1) дополнительно устанавливали отражатель (5), который одновременно выполнял функцию крепления образца и экранирования излучения (Рисунок 5(б)). Длина волны ИК-излучения лазера и светодиодов $0,85\text{--}0,89$ мкм. Мощность излучения лазера – 15 Вт, светодиодов (4 шт.) – 100 мВт.

При облучении бактериальных культур для подбора параметров облучения стоит учитывать молекулярные спектры поглощения и излучения, количество этих молекул и их влияние на метаболизм. Главным компонентом любого живого организма является вода. При рассмотрении спектра поглощения жидкой воды (Рисунок б(а)) наблюдается сильное поглощение излучения в диапазоне миллиметрового излучения.

Важным показателем также является диэлектрическая проницаемость¹⁸ и диэлектрические потери среды¹⁹. Чем выше диэлектрическая проницаемость вещества, тем больше плотность запасаемой в нём электромагнитной энергии. Сопоставляя данные обзора литературы, в которых демонстрировался эффект прироста биомассы от длины волны ЭМИ, и данные, приведённые на рисунке б(б) можно заключить, что условием повышения технологических свойств процесса культивирования является относительное равенство между диэлектрической проницаемостью среды и диэлектрическими потерями, которые зависят от температуры. Акт поглощения ЭМИ, вероятно, необходимо рассматривать с позиции термодинамики.

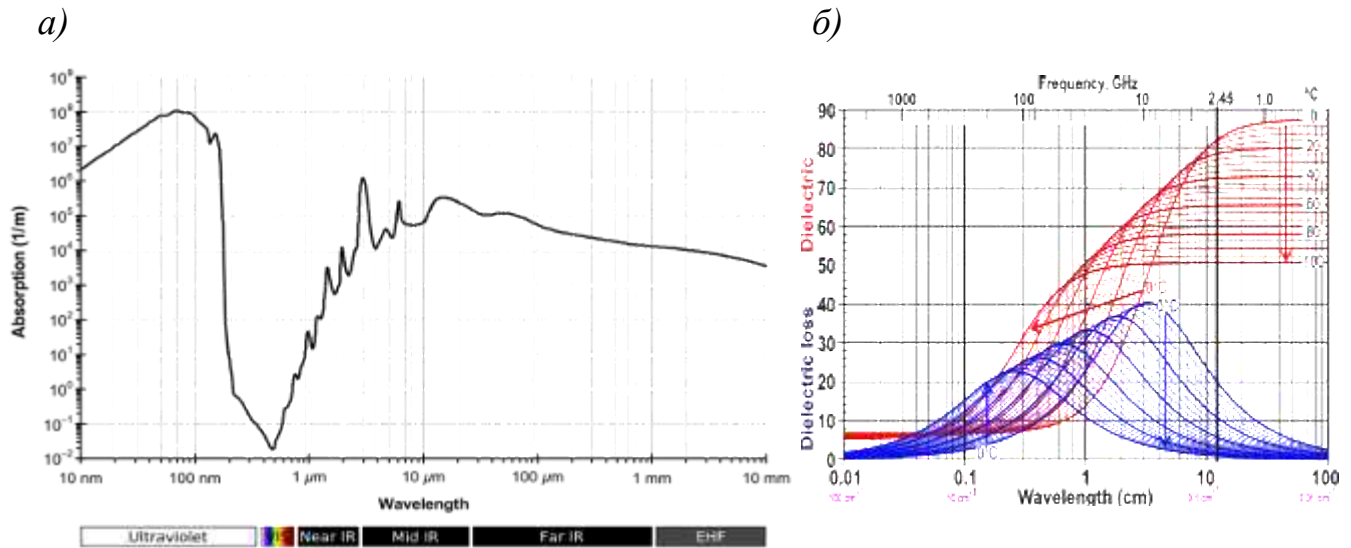


Рисунок 6 – Физические свойства воды

Примечание: а) спектр поглощения жидкой воды [191]; б) диэлектрическая проницаемость и диэлектрические потери воды в диапазоне между 0°C и 100°C , стрелки, показывающие эффект увеличения температуры [64]

Поскольку ЭМИ миллиметрового диапазона сильно поглощается водосодержащими объектами, для облучения с однородной плотностью потока необходимо учитывать толщину скин-слоя в среде (расстояние, на котором интенсивность излучения уменьшается в 2,71 раз), границу дальней зоны,

¹⁸ Диэлектрическая проницаемость среды - величина, показывающая, во сколько раз сила взаимодействия двух электрических зарядов в этой среде меньше, чем в вакууме и обусловлена эффектом поляризации диэлектриков под действием электрического поля и определяется характеризующей этот эффект величиной диэлектрической восприимчивости среды.

¹⁹ Диэлектрические потери - электрическая мощность, затрачиваемая на нагрев диэлектрика, находящегося в электрическом поле.

диаграмму направленности антенны. Для определения этих параметров проведён комплекс предварительных исследований. Для исключения «теплого эффекта» при облучении испытуемых образцов проведено измерение температуры. Отклонений температуры более значения погрешности прибора $\pm 1,0$ °С не обнаружено.

Вначале собрали емкость с электродами, где электроды полностью закрывали боковые стенки емкости, далее вливали ГРМ-бульон и подключали омметр. Электрическое сопротивление составило $R_{\text{ср}}=532,1$ Ом. На следующем шаге провели расчеты удельного электрического сопротивления R по формуле:

$$R=\rho\left(\frac{ab}{c}\right)^{-1},$$

где ρ – удельное электрическое сопротивление, R – сопротивление, ab – площадь электрода, c ширина емкости.

Расчет глубины проникновения поля σ_x вычислили по формуле:

$$\sigma=\sqrt{\frac{2}{2\pi f\mu_{\text{ст}}\mu_0\sigma_{\text{ст}}}},$$

где f – частота СВЧ-излучения (Таблица 3), $\mu_{\text{ст}}$ – относительная магнитная проницаемость среды ($\mu_{\text{ст}}=1$), μ_0 – магнитная постоянная ($4\pi*10^{-7}$ Гн/м), $\sigma_{\text{ст}}$ – активная проводимость среды [131].

Таблица 3

Параметры излучателя

	λ , мм	Частота, ГГц	Диаметр волновода D , мм
Режим 1	$\lambda_1 = 7,1$	42,19	5,0
Режим 2	$\lambda_2 = 5,6$	53,53	4,5
Режим 3	$\lambda_3 = 4,9$	60,12	4,0

На рисунке 7 представлены результаты вычислений скин-слоев для каждого генератора.

Для расчета минимального расстояния расположения пробы от выходного отверстия провели расчет дальней зоны антенны по формуле (ГОСТ Р 51317.4.3-99): $R \geq \frac{2D^2}{\lambda}$, где R - радиус дальней зоны, D - диаметр раскрыва антенны, λ - длина волны (Таблица 3). $R_1 \geq 7,0$ мм; $R_2 \geq 7,2$ мм; $R_3 \geq 6,5$ мм.

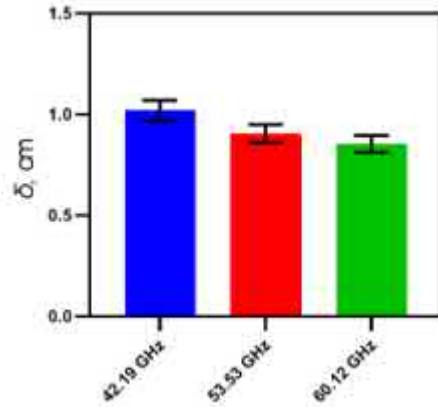


Рисунок 7 – Скин-слой в ГРМ-бульоне

Бала вычислена диаграмма направленности (ДН). ДН – это зависимость амплитуды вектора напряжённости электрической компоненты в пространстве. Узконаправленные антенны имеют основной лепесток, в котором концентрируется основная часть энергии. Расчет значений проводили по формуле:

$$F_e = \frac{P(\theta)}{P_{max}} = \frac{\lambda_0^2}{4\pi^2 D^2} \frac{\sin^2\left(\frac{\pi D}{\lambda_0} \sin \theta\right)}{\sin^2 \theta} (1 + \cos \theta)^2,$$

где F_e – значение ДН в направлении излучения антенны, λ_0 – длина волны, θ – угловое направление, $P(\theta)$ – угловая мощность, P_{max} – максимальная мощность, D – диаметр волновода. Результаты расчёта ДН в нормализованных единицах в декартовой системе координат представлены на рисунке 8.

В соответствии с расчетами ДН и скин-слоя образцы размещали не менее, чем 1,0 см от открытого кольца волновода, диаметр емкости не более ширины сечения основного лепестка, что гарантировало равномерное и полное их облучение.

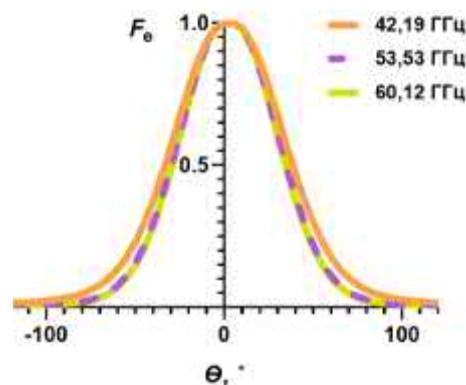


Рисунок 8 – ДН главных лепестков СВЧ-излучения

2.2. Эффекты обработки ЭМИ питательной среды

2.2.1. Спектрофотометрия ГРМ-бульона

Для более глубокого понимания процессов, протекающих при воздействии ЭМП миллиметрового диапазона, нами проведены исследования со стерильной питательной средой ГРМ-бульон, имеющий известные химический состав и процентное содержание аминокислот.

При интерпретации данных с помощью фазово-сорбционной концепции на интерфейсах биополимерах в среде протекают процессы изменения адсорбированной фазы с последующим изменением их конформации, что является следствием переходов молекул на другие энергетические уровни. Разработанная нами схема механизма представлена на рисунке 9.

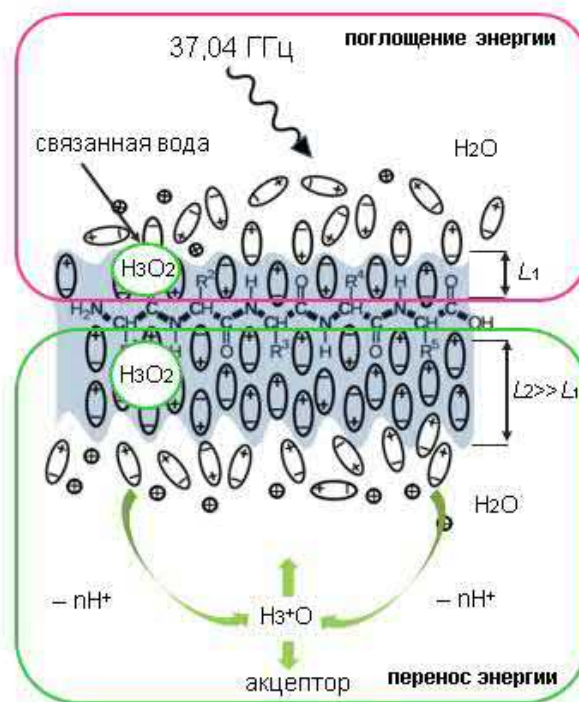


Рисунок 9 – Схема механизма влияния СВЧ-излучения

Примечание: вверху акт поглощения ЭМИ, внизу - процесс изменения гидратных оболочек в биополимерах

В ходе исследований ГРМ-бульона установлено, что миллиметровое излучение не вызывает изменений оптической плотности в диапазоне 350÷1400 нм, однако облучение проб приводит к увеличению оптической плотности в ближней УФ-части спектра (менее 350 нм) (Рисунок 10).

При проведении исследований на спектрах наблюдались две компоненты, первая - пептидная (а) и вторая - водная (б). Максимум поглощения пептидной компоненты составлял 308 нм. В этой области поглощают ароматические аминокислоты, главным образом фенилаланин и тирозин [14, 144]. Аминокислотный состав питательной среды определяется специфичностью ферментативного действия панкреатина [50]. Наблюдается характерное снижение оптической плотности после облучения, проявляющееся в виде уменьшения пика пептидной компоненты (Рисунок 10). *Гипохромный эффект*²⁰ обычно обнаруживается в спектрах α -спиральных пептидов и белков. Одновременное снижение абсорбции излучения при гипохромном сдвиге является следствием изменения конформации биополимеров [9]. Гипохромный эффект также наблюдался в среде МРС-1 после облучения ЭМИ на длинах волн $\lambda=7,1, 5,5, 4,9$ мм.

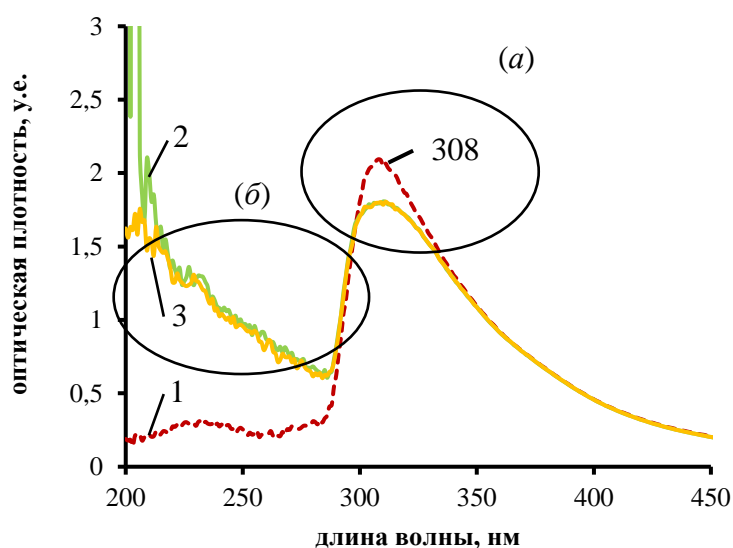


Рисунок 10 – Спектры оптической плотности питательной среды ГРМ-бульона

Примечание: (1) – необлученной (контроль) и облученной с $\nu= 36,84\div 37,04$ ГГц в течение 20 мин (2) и 60 мин (3); а) пептидная компонента, б) водная компонента

Наиболее вероятным объяснением причины увеличения оптической плотности водной компоненты в УФ-области является то, что ЭМИ приводит к

²⁰ *Гипохромный эффект* (гипохромизм) – изменение интенсивности поглощения в результате конформационных перестроек [Bakowska A. et al., 2003].

переходу электронной конфигурации молекул воды в метастабильное²¹ возбуждённое состояние. Увеличение дипольного момента и полярности молекул, поглотивших излучение, может запускать процессы эпитаксиального роста из молекул растворителя на гидрофильных интерфейсах. Можно сделать вывод, что явление межфазных переходов является следствием метастабильности электронных состояний. Полученные нами данные гиперхромизма на длинах волн 200-300 нм согласуются с данными, представленными в работе [199], в которой показано, что адсорбированная фаза воды имеет сильную поглощающую способность в диапазоне 200-300 нм.

Поэтому для подтверждения утверждения об изменении толщины адсорбированной фазы на интерфейсах пептидов, входящих в состав ГРМ-бульона, наиболее приемлемым является метод ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) релаксометрии.

2.2.2. Влияние ЭМИ на ЯМР-параметры питательной среды

Протоны и нейтроны имеют полуцелое спиновое число, которое характеризует вектор их вращения. Ядра атомов с нечётным числом протонов и нейтронов обладают ненулевым спином и пропорциональным ему ненулевым дипольным магнитным моментом. В процессе перехода ядер между состояниями с различными спинами происходит изменение магнитного момента. При наложении внешнего магнитного поля на ядро или нуклон, которые имеют ненулевой магнитный момент, возникает момент силы, которая вызывает прецессию²². Частота прецессии соответствует частоте, на которой ядра будут поглощать электромагнитное излучение. Для возбуждения этой частоты на испытуемый образец подают последовательные импульсы ЭМИ радиочастотного диапазона и регистрируется спиновое эхо²³. Регистрация спинового эха позволяет определять времена спин-решёточной (T_1) и спин-спиновой релаксации (T_2). На основе данного принципа работают ЯМР-релаксометры.

²¹Метастабильное состояние – состояние квазиустойчивого равновесия физической системы, в котором система может находиться длительное время.

²² Прецессия – изменение направления момента импульса частицы под действием момента силы

²³ Спиновое эхо – спонтанное возникновение сигнала ядерного магнитного резонанса после подачи на образец последовательности импульсов электромагнитного излучения радиочастотного диапазона.

Для оценки влияния миллиметрового ЭМИ на ГРМ-бульон нами использована ЯМР-релаксометрия. Время релаксации T_1 характеризует динамику протонов внутри молекул, амплитуда A_1 сигнала эхо пропорциональна населённости P_1 одной из групп протонов в определённый момент времени, время релаксации T_2 – динамику протонов между молекулами. Обнаружено, что спин-решёточная релаксация имеет два характерных времени: короткое $T_{11} \sim 30$ мс и длинное $T_{12} \sim 3000$ мс и соответствующие им амплитуды A_{11} и A_{12} (Таблица 4). Свойства магнитной релаксации протонов в случае совокупности белковых молекул и воды зависят не только от времени релаксации протонов для отдельных молекул, но и от реакции всей системы в целом [77, 105, 147].

Таблица 4

Влияние ЭМИ на ЯМР-параметры питательной среды ГРМ-бульон,
 $\nu=36,84 \div 37,04$ ГГц

ЯМР параметры, время релаксации T (мс)						
Время облучения (мин)	T_{11}	% к контролю	T_{12}	% к контролю	T_2	% к контролю
0 (контроль)	31±4	0	3020±16	0	1550±9	0
20	40±5	29,03 ($p=0,16$)	3190±18	5,63 ($p=0,001$)	1597±7	3,03 ($p=0,01$)
40	40±5	29,03 ($p=0,19$)	3140±16	3,97 ($p=0,07$)	1570±8	1,29 ($p=0,13$)
60	42±5	35,48 ($p=0,09$)	3100±14	2,65 ($p=0,09$)	1571±7	2,65 ($p=0,1$)
ЯМР параметры, амплитуда A (%)						
Время облучения (мин)	A_{11}	% к контролю	A_{12}	% к контролю	A_2	% к контролю
0 (контроль)	-4,6±0,2	0	-154,4±2,8	0	35,5±0,5	0
20	-5,0±0,2	8,7 ($p=0,17$)	-147,9±3,4	-4,2 ($p=0,17$)	41,7±0,9	17,5 ($p=0,002$)
40	-5,2±0,3	13,04 ($p=0,1$)	-161,3±2,5	4,47 ($p=0,1$)	39,5±0,5	11,3 ($p=0,003$)
60	-4,6±0,2	0 ($p=1$)	-167,0±3,1	8,1 ($p=0,02$)	41,8±0,7	17,7 ($p=0,001$)
ЯМР параметры, населённость P (%)						
Время облучения (мин)	P_{11}	% к контролю	P_{12}	% к контролю	P_2	% к контролю
0 (контроль)	2,98±0,07	0	97,02±0,07	0	84,92±0,38	0
20	3,38±0,06	13,5 ($p=0,008$)	96,62±0,06	-0,41 ($p=0,008$)	99,76±0,33	14,87 ($p<0,001$)
40	3,22±0,1	8,2 ($p=0,11$)	96,78±0,1	-0,25 ($p=0,1$)	94,5±2,96	10,13 ($p=0,019$)
60	2,75±0,06	-7,5 ($p=0,06$)	97,25±0,06	0,23 ($p=0,06$)	100	15,07 ($p<0,001$)

Примечание: Знак минус указывает на уменьшение по сравнению с контролем; населённость P (%) нормированное значение амплитуды = $A/A_{\max} \times 100\%$; t -критерий Стьюдента

При облучении миллиметровым излучением обнаружено изменение ЯМР-параметров. Из таблицы 4 видно наличие двух времён релаксации T_1 (T_{11} и T_{12}), что является признаком макроскопически выделенных фаз с относительно фиксированными (устойчивыми) поверхностями в системе. Отсутствие появления

дополнительных компонент в параметрах спин-спиновой релаксации T_2 свидетельствует об одинаковых процессах миграции протонов в объёме образца. Увеличение времён релаксации T_1 и T_2 после облучения свидетельствует об увеличении подвижности системы, однако статистически значимых изменений не обнаружено.

При рассмотрении параметра населенности P_{11} при СВЧ-облучении наблюдается вначале его повышение при 20 и 40 минутах облучения, но уже при 60 минутах происходит резкий спад, что может характеризовать уменьшение количества малоподвижных протонов внутри решетки. При этом рост значений параметра амплитуды A_2 с увеличением времени облучения также имеет не линейную зависимость и повышается уже при облучении в течение 20 минут на 17%. Амплитуда A_2 характеризует количество протонов, участвующих в диполь-дипольном взаимодействии. Наблюдаемое изменение параметра амплитуды A_2 коррелирует с обнаруженным гипехромизмом в УФ-диапазоне при адсорбционной спектроскопии.

Таким образом показано, что метод ЯМР-релаксометрии позволяет определять изменения в структурно-динамическом состоянии молекулярных систем при воздействии ЭМИ.

2.2.3. Рефрактометрия питательной среды, подвергшаяся облучению ЭМИ

Рассмотрение биополимеров, в частности пептидов и протеинов, изменение их конформации невозможно без рассмотрения их водного окружения (гидратной оболочки). Гидратные оболочки состоят из поляризованных молекул воды, склонных, в силу своей природы, к образованию сильных водородных связей и электростатическим взаимодействиям. Специфичность взаимодействия воды с интерфейсами белков обусловлена возможностью последней к упорядочиванию и определяется движением сложной многофазной, поляризованной воды, выраженным поверхностным натяжением²⁴ и избирательностью взаимодействия молекул растворителя с различными полярными участками белка [38, 119].

²⁴ Поверхностное натяжение – большая избыточная энергия поверхностного слоя

Показатель преломления способен отражать не только изменение концентрации белка, но изменение его структуры [20]. Следующим шагом стало изучение показателя преломления питательной среды после помещения её в ЭМП (Рисунок 11).

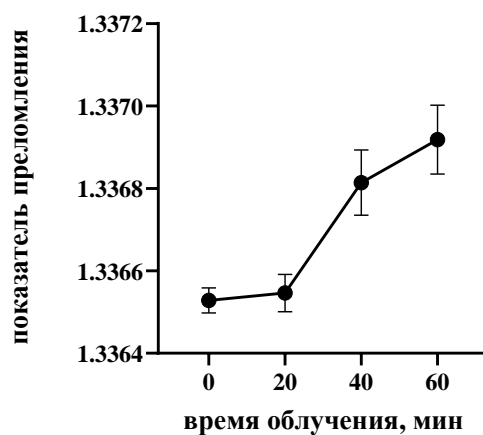


Рисунок 11 – Изменение показателя преломления питательной среды ГРМ-бульон при облучении ЭМИ
Примечание: $\nu=36,84\div 37,04$ ГГц

Из данных, представленных на рисунке 11, видно, что при облучении образцов продолжительностью более 40 мин наблюдается изменение показателя преломления. Облучение менее 40 мин не ведёт к статистически значимому изменению показателя преломления. Одним из возможных механизмов наблюдаемого эффекта является то, что после приготовления среды часть молекул белков и пептидов после стерилизации имеют более скрученную структуру и вследствие этого имеют участки цепи, не доступные растворителю. Миллиметровое излучение способно разворачивать α -спирали и запускать процесс эпитахии на её гидрофильных участках.

Параллельно измерялся интегральный показатель кислотно-основного состояния (рН) ГРМ-бульона и температура. Изменения рН и температуры больше погрешности прибора при любом времени экспозиции в течение 60 мин не обнаружены.

2.3. Влияние ЭМИ миллиметрового диапазона на штаммы *Lactobacillus*

Предполагается, что повышение прироста биомассы пробиотических организмов может иметь значение при производстве лекарственных препаратов на их основе. Для определения эффектов микроволновой обработки лактобактерий эксперимент разбили на два этапа. На первом – исследуемые образцы в жидкой питательной среде после

обработки помещали в термостат с последующим измерением оптической плотности и кислотности среды, на втором – из исследуемых образцов отбирали инокулят и засеивали плотную питательную среду для определения КОЕ.

В результате изучения ростовых характеристик ряда промышленных штаммов лактобактерий установлено, что продолжительность СВЧ-облучения имеет значение для получения необходимого эффекта, но существуют ещё неустановленные факторы, которые значительно влияют на появление тех или иных эффектов. В частности, в эксперименте при определённой продолжительности излучения обнаружено увеличение прироста биомассы штаммов *L. acidophilus* NK1 и *L. acidophilus* 100ash, которое составляло до 28% (Таблица 5). При этом эффект прироста наблюдался при различной продолжительности облучения. Облучение культуры штамма *L. fermentum* 90Т-С4 приводило к выраженному угнетению роста, но не приводило к статистически значимому изменению роста культуры штамма *L. plantarum* 8Р-А3. Отсутствие единой закономерности влияния СВЧ на ростовые характеристики может свидетельствовать о наличии неизвестных переменных в технологическом процессе.

Таблица 5

Влияние облучения ЭМИ различной продолжительности на ростовые характеристики штаммов лактобактерий, $\nu=36,84\div 37,04$ ГГц

Биологические показатели	Время облучения	Штамм			
		<i>L. plantarum</i> 8Р-А3	<i>L. fermentum</i> 90Т-С4	<i>L. acidophilus</i> NK1	<i>L. acidophilus</i> 100ash
рН	Контроль	3,72±0,06	3,69±0,06	3,76±0,08	3,94±0,06
	20 мин	3,85±0,07	3,76±0,06	3,70±0,04	3,80±0,9
	60 мин	3,68±0,04	4,47±0,06	3,68±0,05	4,05±0,07
<i>E</i> (кювета 10 мм), D540 нм	Контроль	1,0±0,1	1,1±0,1	0,8±0,2	0,86±0,1
	20 мин	1,1±0,2	1,2±0,2	1,0±0,2	1,1±0,1*
	60 мин	1,0±0,1	0,48±0,1*	1,1±0,1*	0,8±0,1
КОЕ/мл	Контроль	2,2(±0,3)× 10 ⁹	3,1(±0,5)× 10 ⁸	4,2(±0,7)× 10 ⁷	1,6(±0,2)× 10 ⁸
	20 мин	2,6(±0,5)× 10 ⁹	2,2(±0,4)× 10 ⁸	4,9(±1,1)× 10 ⁷	1,6(±0,5)× 10 ⁸
	60 мин	1,8(±0,2)× 10 ⁹	2,6(±0,2)× 10 ⁸	5,7(±0,8)× 10 ⁷	1,1(±0,2)× 10 ⁸

Примечание: $p < 0,05$ по отношению к образцам без облучения; t -критерий Стьюдента

Обнаружено, что при засеивании исследуемых образцов на плотную питательную среду показатель КОЕ не менялся по сравнению с контрольными образцами. Отсутствие эффектов от облучения вероятно связано с тем, что при переносе облучённых культур на плотную питательную среду эффекты от воздействия СВЧ-излучением нивелируются.

Для наиболее полного изучения процессов, протекающих под воздействием ЭМИ

на бактериальную культуру, дальнейшие исследования направлены на изучение эффектов излучения при обработке рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего люциферазу.

2.4. Сканирующая 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 АСМ, позволяющая одновременно изучить топологию поверхности и силу адгезии. В Nature приведены работы по изучению гидратных оболочек АСМ [173], поэтому АСМ выбрана как новый и надёжный инструмент исследования.

В воздушной атмосфере на полярных интерфейсах имеется адсорбированная фаза воды толщиной в несколько нм. Поверхности клеток *E. coli* преимущественно представлены высокогидрофильными полисахаридными концами LPS, которые могут адсорбировать большое количество молекул растворителя, и эта адсорбированная фаза взаимодействует с зондом, формируя «мостик» между зондом и образцом. Сила, затраченная на разрыв связей с зондом, называется силой адгезии F_a и показывает, насколько сильно прилипает зонд к поверхности. Чем сильнее зонд вязнет в приповерхностных слоях, тем больше межмолекулярное взаимодействие между исследуемым интерфейсом и зондом. Это означает, что сила адгезии F_a прямо пропорциональна количеству молекул и их дипольному моменту, взаимодействующих с зондом, и соответственно, прямо пропорциональна толщине адсорбированной фазы на интерфейсе.

Схема подготовки проб изображена на рисунке 12. Подготовка включала разведение лиофилизата *E. coli* (проба) по методу, описанному в «Биотехнологические методы исследования». После проводили четырехкратное центрифугирование по 10 мин, 2000 об/мин с удалением супернатанта и добавлением раствора натрия хлорида 0,9%. Разбавленный преципитат разливали в пробирки и облучали. После отбирали 10 мкл и наносили на подложку. Далее подложку разгоняли в центрифуге SPIN12000 (Midas) и проводили сканирующую

атомно-силовую микроскопию.

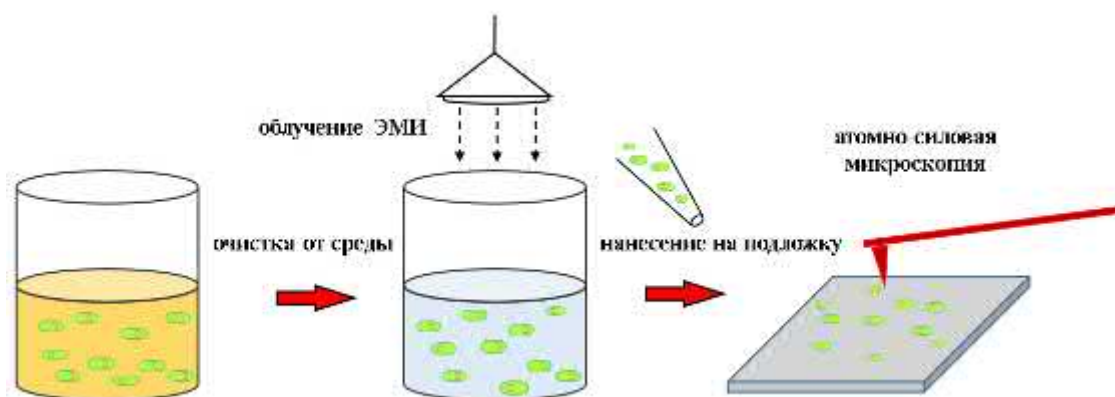
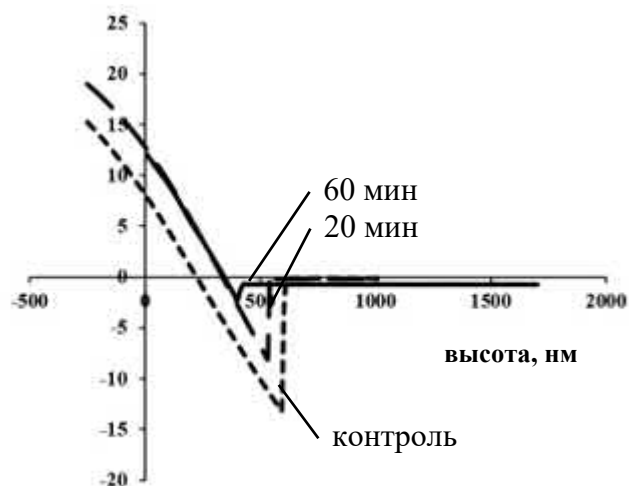


Рисунок 12 – Схема подготовки проб для атомно-силовой микроскопии

С помощью АСМ изучена динамика изменения фаз на интерфейсах клеток микроорганизмов под воздействием СВЧ-излучения. Установлена временная зависимость влияния СВЧ-облучения на движение зонда (Рисунок 13(а)) и силу адгезии F_a (Рисунок 13(б)).

а)

сигнал DFL , нА



б)

сила адгезии F_a , Н

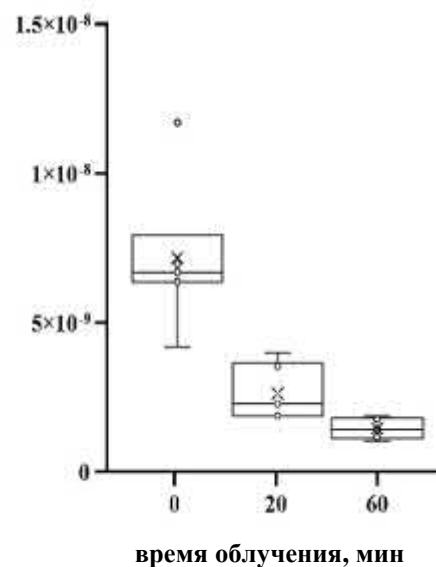


Рисунок 13 – Параметры АСМ клеток штамма *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens*

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

В результате анализа данных АСМ установлено выраженное влияние обработки ЭМИ бактериальных клеток на высоту отрыва зонда от поверхности

(Рисунок 13(а)) и показатель силы адгезии F_a (Рисунок 13(б)) по сравнению с образцами без облучения ($p < 0,001$). Результаты исследования позволили сделать вывод, что воздействие ЭМИ миллиметрового излучения на силу адгезии F_a имеет экспоненциальный характер. С увеличением продолжительности обработки после выраженного спада силы адгезии F_a при облучении в течение 20 мин продолжается её незначительное снижение. Возможным объяснением экспоненциального характера изменения силы адгезии F_a ($7,17 \times 10^{-9}$ Н образцы без облучения, $2,78 \times 10^{-9}$ Н при 20 мин экспозиции, $1,63 \times 10^{-9}$ Н при 60 мин экспозиции) является то, что надмолекулярные комплексы из молекул мембраны и связанных молекул воды на интерфейсах клетки имеют высокую чувствительность к обработке СВЧ-излучением, что также наблюдается на сканах интерфейсов (Рисунок 14).

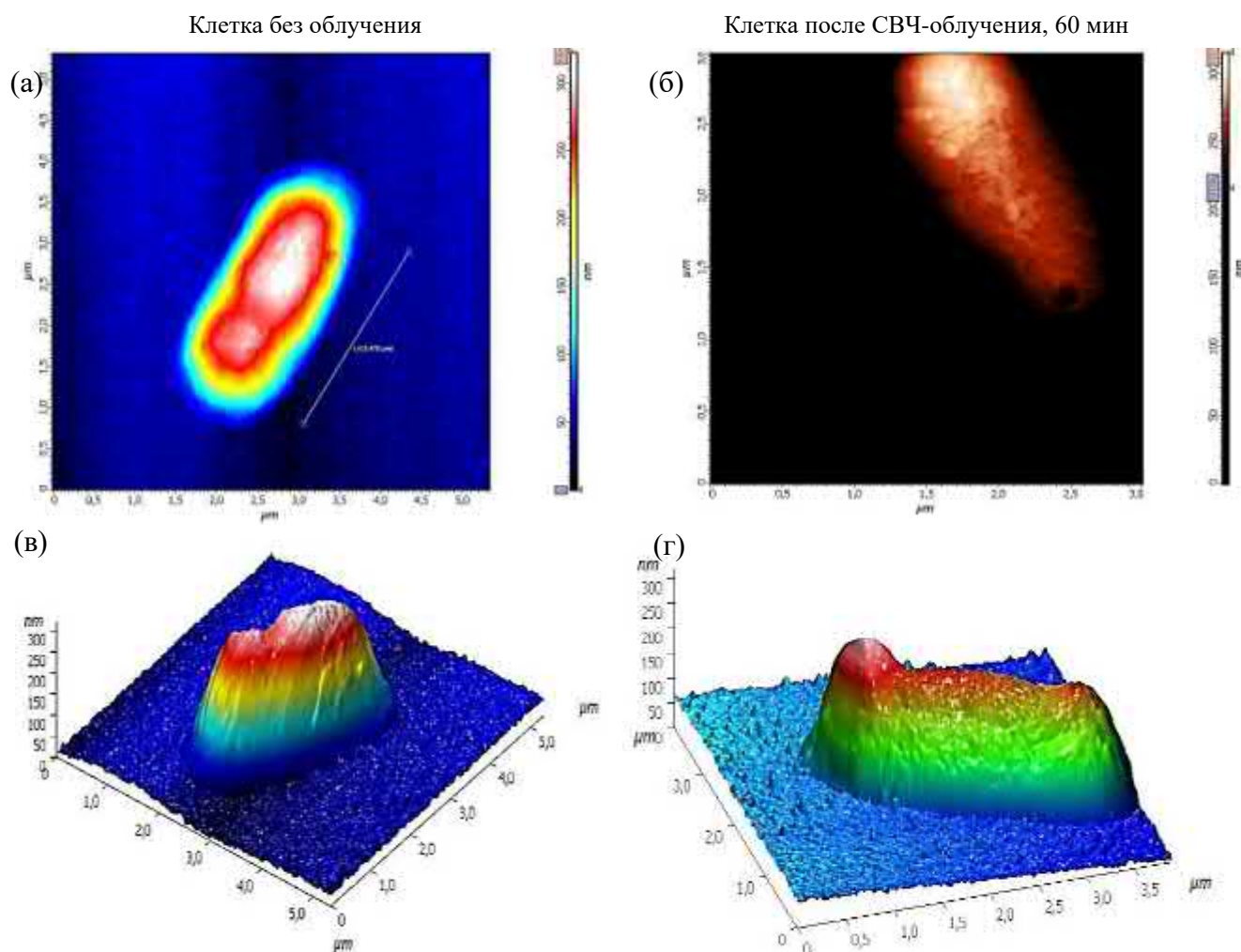


Рисунок 14 – АСМ бактериальных клеток штамма *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens*

Примечание: (а) 2D и (в) 3D-изображения без облучения (контроль), (б) 2D и (г) 3D-изображения клеток после 60 мин СВЧ-облучения

Изображения, полученные с помощью АСМ до (Рисунки 14(а) и 14(в)) и после СВЧ-облучения (Рисунки 14(б) и 14 (г)), показали, что пропорции и рельеф интерфейса клеток различаются между контрольными и облученными образцами. В контрольных образцах картирование интерфейса показало гладкую и ровную топологию (Рисунки 14(а) и 14(в)). На интерфейсах облученных клеток наблюдались выраженные неровности и уменьшение высоты в отношении длины клеток (Рисунки 14(б) и 14 (г)). На основании сравнительного изучения свойств интерфейсов клеток установлено, что их обработка ведёт к снижению толщины адсорбированной фазы воды посредством синерезиса.

2.5. Изучение люминесценции биосенсора *E. coli* K12 TG1 с клонированными генами *luxCDABE P. luminescens* ZM 1

Использование биосенсоров на основе *E. coli* обусловлено рядом существенных факторов, определяющих эффективность применения данных бактериальных препаратов и качество проведения люминесцентного тестирования [12, 13, 36]. Такими факторами, прежде всего, являются стабильность тест-культуры и воспроизводимость результатов при проведении люминесцентного анализа.

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 (углеводороды, тяжёлые металлы, фенолы, пестициды и т.д.) и ЭМИ на бактериальную клетку [16, 17, 195]. Изменение показателя биолюминесценции тест-системы под воздействием ЭМИ характеризует изменения в функционировании электрон-транспортной цепи, работа которой обуславливает дыхание и генерацию квантов света и демонстрирует участие в этих процессах активных форм кислорода [195].

В условиях продолжительного хранения тест-штамма возможно снижение его индикаторных свойств, что в целом может сказаться на результатах испытаний. Поддержание индикаторных свойств сенсорной биолюминесцентной системы является актуальной задачей.

Способ определения «острого» токсического воздействия исследуемых образцов (МР 11-1/133-09) и антагонистической активности пробиотиков на бактерии при совместной инкубации с биосенсором определяется по ингибированию или стимуляции его люминесценции [43]. Использование данного биосенсора в экспериментах позволит оценить, как потенциал ЭМИ для поддержания/восстановления индикаторных свойств бактериального сенсора, так и влияние излучения на физиологический статус и антагонистическую активность бактериальной культуры.

В рамках изучения влияния ЭМИ на повышение стабильности биосенсора и разработки способа восстановления его индикаторных свойств исследование было разделено на три фрагмента:

1. Исследование влияния различных типов обработки ЭМИ на люминесценцию биосенсора «Эколюм-8» (*E. coli* K12 TG1 с клонированными генами *luxCDABE* *P. luminescens* ZM 1) и выбор оптимальных режимов;
2. Сравнительное изучение уровня люминесценции, облучённого и необлучённого биосенсора при добавлении необлучённой культуры *E. coli* LEGM-18;
3. Сравнительные исследования индикаторных свойств «Эколюм-8» при добавлении облучённой и необлучённой культуры *E. coli* LEGM-18.

На первом этапе изучили характеристики люминесценции биосенсора при воздействии ИК- и СВЧ-излучением. В опытах использовались три экспериментальных установки.

Полученные данные об изменении реакции люминесценции тест-системы во времени при воздействии ИК-излучением с различной продолжительностью облучения показало разносторонний характер её развития (Рисунок 15). Увеличение продолжительности облучения с 2 мин до 10 мин ведёт к переходу от стимуляции свечения к его угнетению.

Двух и пятиминутная обработка ИК-излучением не ведёт к значимому изменению показателя уровня люминесценции (Рисунок 15(a)). Обработка ИК-излучением в течение 10 мин ведёт к выраженному снижению интенсивности

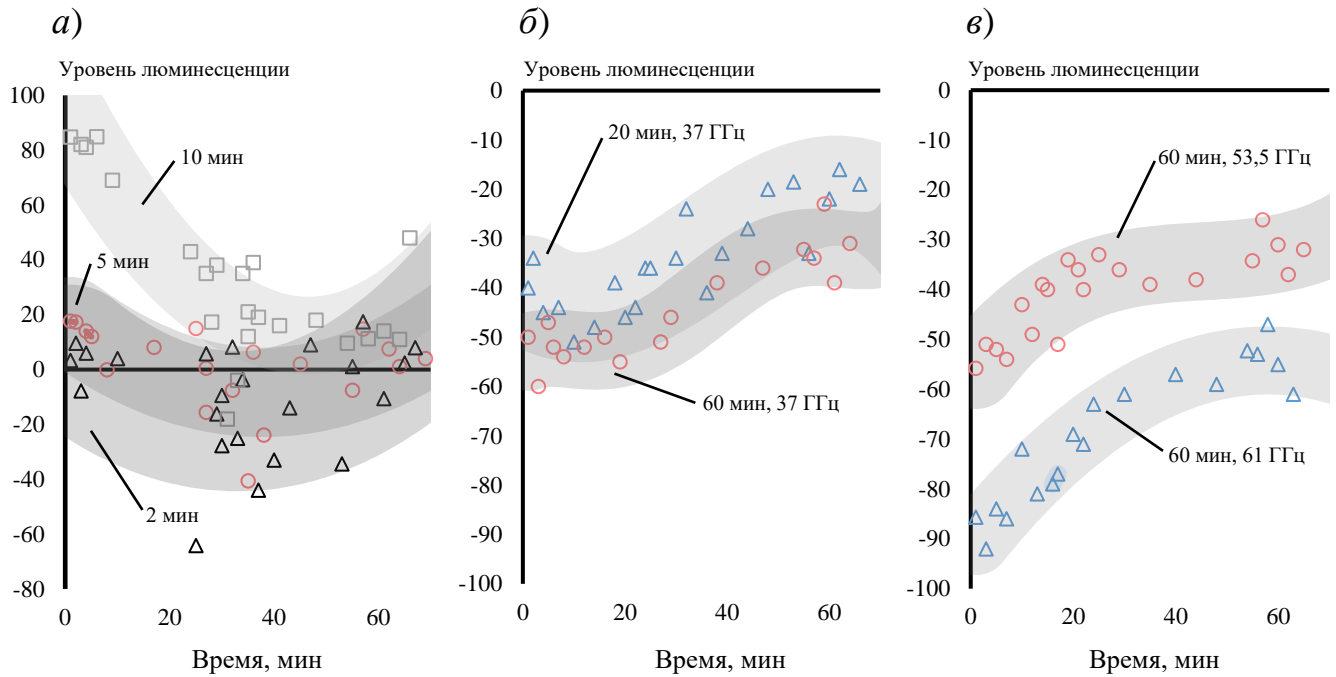


Рисунок 15 – Изменение уровня люминесценции биосенсора «Эколюм-8» после обработки ЭМИ.

Примечание: а) обработка ИК-излучением $\lambda=850\div 890$ нм при варьировании времени облучения; б) и в) обработка СВЧ-излучением при варьировании времени облучения и частоты излучения соответственно. Значение «0» - контроль (проба без облучения); знак минус указывает на увеличение люминесценции по сравнению с контролем

люминесценции, которая восстанавливалась до значений контрольных проб (значение 0) через 1 ч. Среди изученных режимов обработки тест-системы ИК-излучением не обнаружен необходимый режим для решения данной задачи.

Исследование свечения культуры штамма *E. coli*, продуцирующий люциферазу при обработке СВЧ-излучением, показало различие в протекании реакции люминесценции по сравнению с обработкой ИК-излучением. Обнаружено, что облучение миллиметровым СВЧ-излучением в течение одного часа сразу индуцирует люминесценцию тест-штамма. Такая обработка обеспечивала стимуляцию люминесценции на протяжении всего эксперимента (Рисунки 15(б) и 15(в)).

Важным аспектом прикладного использования обработки СВЧ-излучением культуры тест-штамма является отсутствие искажения индикаторных свойств, поэтому на следующем этапе провели сравнительные испытания индикаторных свойств облучённой и необлучённой культуры тест-штамма *E. coli* K12 TG1 с клонированными генами *luxCDABE* *P. luminescens* ZM 1 с выходящим сроком

годности и контрольными образцами, полученными после культивирования (Рисунок 16). Оценку индикаторных свойств тест-штамма проводили путём измерения уровня его свечения через 30, 60 и 90 мин.

Уровень гашения (стимуляции) свечения имп/с

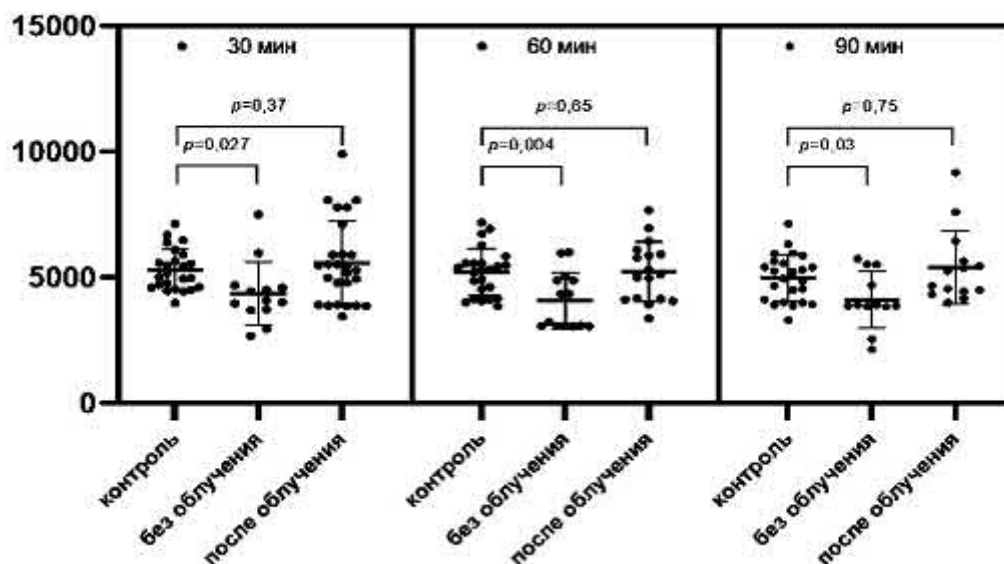


Рисунок 16 – Уровень свечения облучённого и необлучённого биосенсора «Эколюм-8» при добавлении необлучённой культуры *E. coli* LEGM-18

Примечание: облучение 60 мин, $\nu=36,84 \div 37,04$ ГГц; *t*-критерий Стьюдента

Было обнаружено, что образцы с выходящим сроком годности имели интенсивность свечения в среднем на 15,3% ($p = 0,027$) в точке 30 мин ($p = 0,004$), на 21,6% в точке 60 мин и на 17,4% ($p = 0,03$) в точке 90 мин по сравнению с контролем (Рисунок 16). При сравнительном анализе изменений во времени показателя свечения не обнаружено статистически значимого различия ($p > 0,05$) между облучёнными и контрольными образцами биосенсора «Эколюм-8», что свидетельствует о восстановлении индикаторных свойств биосенсора.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что микроволновая обработка культуры для повышения стабильности препарата является перспективным и не приводит к искажению данных при биолюминесцентном тестировании. Разработанный способ восстановления индикаторных свойств тест-культуры после длительного хранения основан на обнаруженном эффекте повышения физиологического статуса клеток. Метод имеет практическое значение

для продления срока годности биосенсора.

Объяснение этого эффекта сложно с уровня существующих знаний о биологических эффектах микроволнового облучения. Цельноклеточные биосенсоры теряют свои индикаторные свойства даже в оптимальных условиях. С одной стороны, в связи с тем, что до процедуры замораживания или лиофилизации культура достигла фазы роста, когда образование мертвых клеток уравнивается с количеством новых клеток (стационарная фаза роста). После воздействия таких стрессовых факторов на культуру как замораживание и лиофилизация равновесие смещается в сторону фазы отмирания. С другой стороны, живые системы имеют в своем составе вещества в метастабильном состоянии [61, 99, 149, 188]. Метастабильность веществ обеспечивает неоднородность распределения энергии в живых системах и создает в них её потоки. Протекание химических реакций в живых системах невозможно при отсутствии воды. Процедуры замораживания и лиофилизации необходимы, чтобы остановить процессы перехода веществ из метастабильного состояния в основное. Однако, в полной мере это невозможно. Криопротекторами являются сильно гидрофильные вещества, например, сахара [163], желатин, глицерин [182] или аминокислоты [51], которые позволяют сохранять большее количество связанной воды. Добавление этих веществ резко снижает температуру замерзания, предотвращая кристаллизацию воды, и это позволяет восстанавливать культуру после замораживания или лиофилизации с большим количеством жизнеспособных клеток. Используемый нами биосенсор содержал защитную среду следующего состава: сахароза – 400 г, желатин – 80 г.

Вероятно, количество связанной воды влияет как на стабильность системы, так и на предотвращение образования кристаллов воды, которые разрушают мембраны и эндомембранную систему клеток.

Микроволновое излучение сильно поглощается водой. В 2021 году были опубликованы результаты исследований компании Merck о разработке технологии микроволновой лиофилизации вакцин [58]. В работе показано, что микроволновая

лиофилизация позволяет более бережно осуществлять сушку, получая более качественный продукт. Также в работах [129, 165, 192] было показано, что микроволны способны оказывать сильное воздействие на процессы синерезиса в различных гелях (деградация гелей с образованием свободной воды и переходом дисперсной системы в более энергетически равновесное состояние).

В этой работе мы показываем, что микроволновое излучение способно оказывать стимулирующее влияние на биосенсор за счет влияния на адсорбированную фазу воды. Этот эффект имеет высокое значения для жизнедеятельности клеток и управляя ростом или деградацией этой фазы можно получать различные биологические эффекты.

Воздействие СВЧ-излучением на биосенсор «Эколюм-8» предположительно позволяет улучшить его потребительские свойства за счёт снижения концентрации клеток в пробе при тестировании и таким образом увеличивая количество тестов или восстановления индикаторных свойств после длительного хранения.

Заключение по главе

СВЧ-облучение с одинаковыми параметрами приводит к разным эффектам прироста биомассы штаммов лактобактерий.

Микроволновое облучение снижает адгезионные свойства интерфейсов *E. coli* посредством процесса синерезиса.

СВЧ-облучение способно изменять физиологический статус бактериальной культуры индикаторного штамма *E. coli*.

Разработанный метод восстановления индикаторных свойств биосенсора позволяет улучшить его потребительские свойства.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИНТЕНСИФИКАЦИИ РОСТА КУЛЬТУРЫ *E. COLI*

Совершенствование производства биопрепаратов, которые изготавливают из *E. coli*, включает в себя прикладные разработки. Неотъемлемой частью в этих работах является поиск способов и технических решений, позволяющих повысить эффективность технологии получения препаратов. В технологии выделяются две стадии *upstream* и *downstream*. Первая стадия включает этапы культивирования бактерий и могут рассматриваться в качестве объектов оптимизационных исследований.

Перспективно совершенствование культивирования микроорганизмов, эффективность которого существенно зависит от условий проведения технологического процесса и активности посевного материала. Оптимизация роста плотности биомассы является одним из главных параметров этого процесса. Указанная задача - многопараметрическая. В соответствии проведенным нами обзором литературы и анализом коммерчески доступных биореакторов для её решения используют набор методов и инструментов, представленных на рисунке 17.

Оптимизация процесса культивирования бактериального штамма состоит в подборе условий и техники для её реализации. Контролируемыми условиями в данном технологическом процессе являются: уровень притока тепловой энергии и различных газов, значение рН (Рисунок 17). Кислотность среды регулируется путём дополнительного введения аммиака, натрия гидроксида или соляной кислоты, также для роста буферной ёмкости среды используют натриевые или калиевые соли лимонной, фосфорной, уксусной кислот.

К настоящему времени существующие производственные технологии культивирования исчерпали свой потенциал и не могут обеспечить дальнейший рост плотности биомассы. Одним из вариантов решения обозначенной проблемы может стать СВЧ-облучение бактериальной культуры малой интенсивности в процессе её роста. Цикл развития культуры начинается с засева среды. После лаг-

фазы происходит интенсивный рост культуры (лог-фаза²⁵), которая переходит в стационарную фазу, где концентрация клеток в питательной среде достигает максимального значения.



Рисунок 17 – Варианты оптимизации культивирования *E. coli*

Основными лимитирующими факторами дальнейшего роста культуры являются: истощение питательной среды, изменение её кислотности и накопление продуктов жизнедеятельности, в том числе продуцирование сигнальных молекул. Вероятно, имеются и другие, пока не изученные, лимитирующие факторы, один из которых возможно был открыт нами при выполнении этой работы.

Нами предложено, что таким лимитирующим фактором является взаимосвязь между максимальной концентрацией клеток и суммарной площадью полярных интерфейсов в единице объёма. Для подтверждения гипотезы о существовании взаимосвязи между накоплением биомассы *E. coli*, площадью интерфейсов и трансформацией объёма воды в адсорбированной фазе в системе

²⁵ Лог-фаза – фаза роста бактериальных культур характеризуется максимальной скоростью деления клеток, увеличение числа которых происходит в геометрической прогрессии.

«среда-культура» при обработке ЭМИ миллиметрового диапазона мы также изучили параметры ЯМР-релаксации и показатели роста штамма *E. coli* LEGM-18 в процессе периодического культивирования.

3.1. Исследование параметров накопления биомассы культуры *E. coli* K12 TG1 с клонированными генами *luxCDABE* *P. luminescens* ZM 1 и продукции ею рекомбинантных белков

Штамм *E. coli* K12 является часто используемым штаммом-продуцентом различных рекомбинантных белков. Его применение в качестве модельного микроорганизма при оценке получения целевого продукта актуально. В исследованиях использован штамм *E. coli* K12 TG1 с клонированными генами *luxCDABE* *P. luminescens* ZM 1, продуцирующий рекомбинантный белок – люциферазу. Исследование ростовых свойств культуры проводили на среде ГРМ-бульон, являющийся базовой средой, состоящей из гидролизата рыбной муки. На основании полученных данных вычислены концентрации клеток и построена кривая накопления биомассы, по которой определялись основные фазы роста культуры *E. coli* (Рисунок 18).

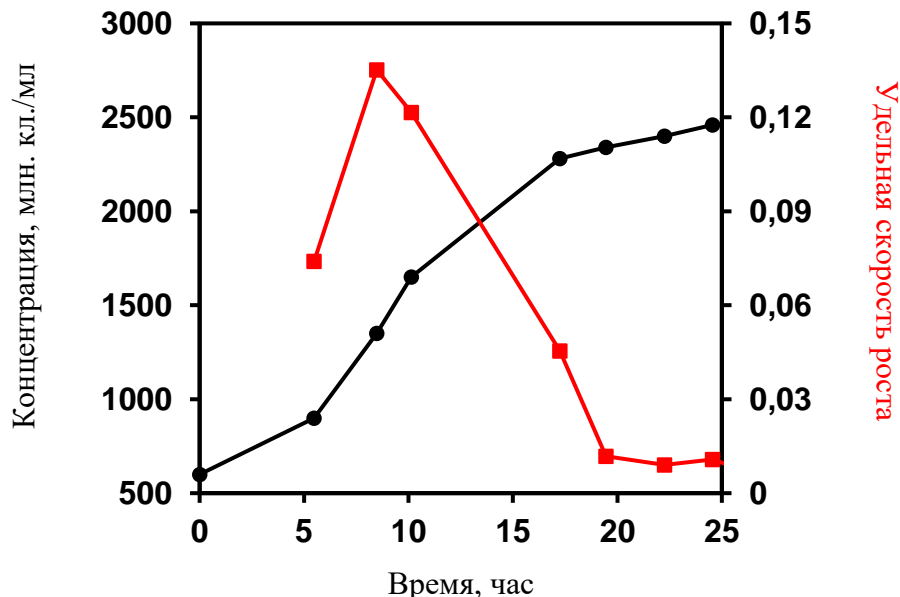


Рисунок 18 – Кривая накопления биомассы и удельной скорости роста *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1
Примечание: среда – ГРМ-бульон

При исследовании ростовых свойств культуры показано, что культура

переходит в лог-фазу через 5 часов. Это довольно длительная адаптация, которая связана с составом среды (Рисунок 18). Установлено, что при достижении концентрации 2380 млн кл./мл удельная скорость роста снижается до около нулевых значений.

Для изучения возможности изменения ростовых свойств бактериальной культуры при обработке СВЧ-излучением проведены исследования с данным штаммом. На следующем этапе проведены исследования биологических показателей культуры *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 при СВЧ-облучении с частотой 36,84÷37,04 ГГц. Установлено, что при исходных концентрациях культуры в диапазоне $6 \times 10^7 \div 3 \times 10^8$ кл./мл излучение оказывает угнетающий эффект (Рисунки 19(а) и (б)).

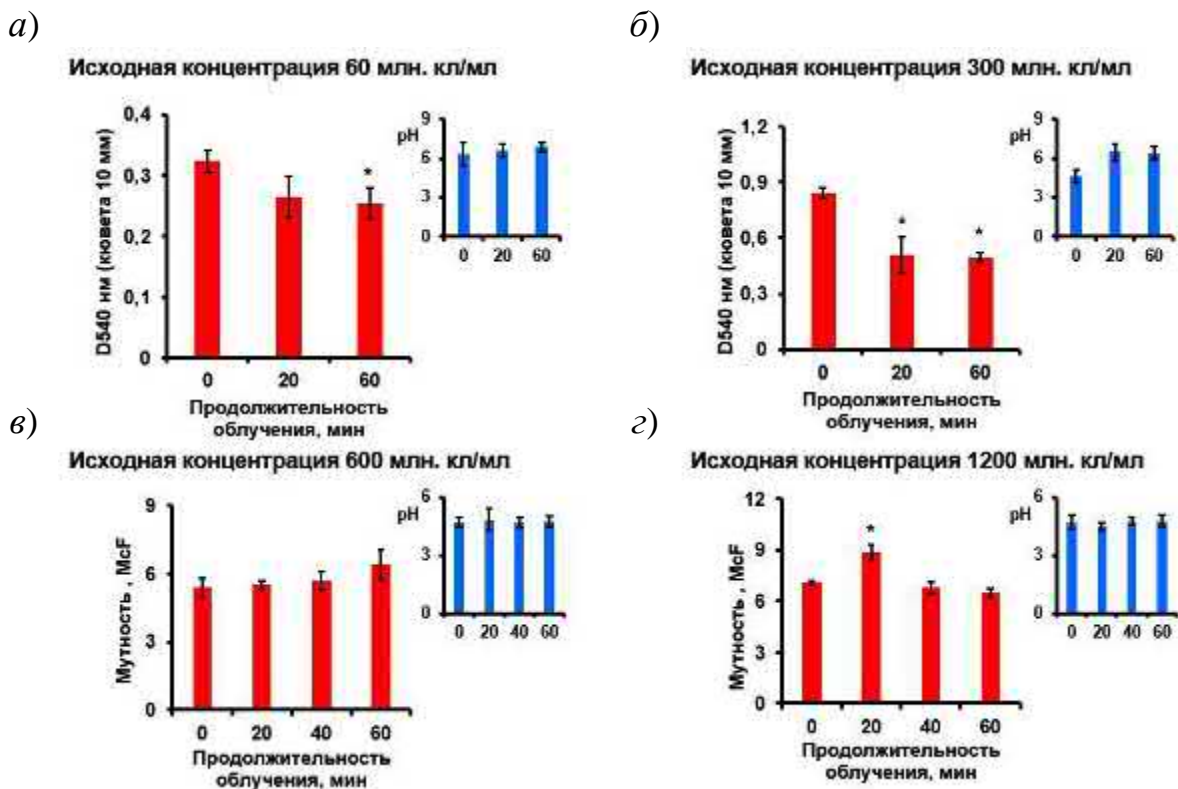


Рисунок 19 – Прирост биомассы и изменение pH при СВЧ-облучении в зависимости от исходной концентрации клеток культуры *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1

Примечание: а) исходная концентрация 60 млн. кл./мл, б) исходная концентрация 300 млн. кл./мл, в) исходная концентрация 600 млн кл./мл, г) исходная концентрация 1200 млн кл./мл., среда – ГРМ-бульон; * $p < 0,05$ по отношению к образцам без облучения; *t*-критерий Стьюдента

При увеличении исходной концентрации бактериальной суспензии штамма

E. coli с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 до $1,2 \times 10^9$ кл./мл при продолжительности обработки 20 мин наблюдается прирост биомассы в среднем на 25% (Рисунки 19 (в) и (г)).

На следующем этапе при найденных оптимальных условиях проведён эксперимент на среде МПБ. Обнаружено увеличение прироста биомассы после облучения на 64% по сравнению с контролем (Рисунок 20(а)). Таким образом, показано, что питательная среда и исходная концентрация клеток являются важными переменными технологического процесса.

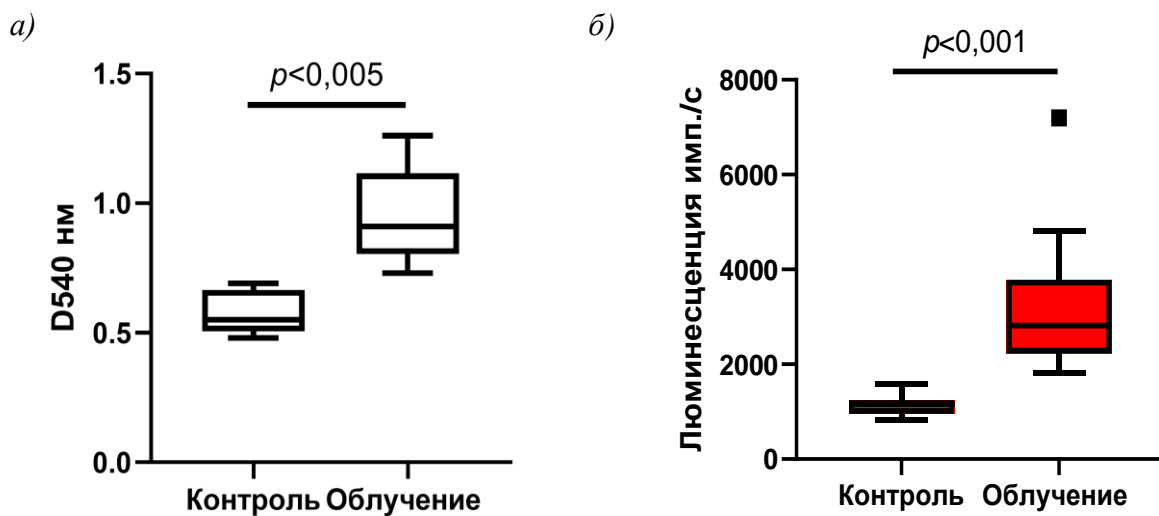


Рисунок 20 – Результаты исследований на среде МПБ

Примечание: Прирост биомассы (а) и изменение люминесценции (б) при СВЧ-облучении культуры *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1; *t*-критерий Стьюдента

Для определения влияния СВЧ-облучения на продукцию рекомбинантного белка проведено люминесцентное тестирование. Анализ свечения, обусловленного работой такого рекомбинантного белка – люциферазы, позволяет установить функциональную связь между СВЧ-облучением, физиологическим статусом клеток и количеством продуцируемого клетками рекомбинантного белка. На рисунке 20(б) представлены 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 физиологический статус клеток.

Для установления гипотезы взаимосвязи между накоплением биомассы *E. coli* и подвижностью протонов, в т. ч. участвующих в гидратных оболочках в системе «среда-

культура» при СВЧ-облучении, изучены параметры ЯМР-релаксации культуры *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1. Подобный подход определения связанной воды рассмотрен в работе [193] на модели суспензии шариков гидрофильного материала. Метод ЯМР широко используется для изучения динамики протонов и связанной воды [59, 86, 121, 171, 196].

Метод анализа основан на определении соотношения амплитуд отдельных компонент огибающей сигналов эхо при определении времени релаксации. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6

Эффекты ЭМИ на ЯМР параметры культуры *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 в среде ГРМ-бульон ГГц, исходная концентрация 6×10^8 кл./мл

ЯМР параметры, время релаксации T (мс)						
Время облучения (мин)	T_{11}	% к контролю	T_{12}	% к контролю	T_2	% к контролю
0 (контроль)	36±4	0	3392±24	0	1524±14	0
20	60±7,3	66,7 ($p=0,03$)	3430±46	1,1 ($p=0,27$)	1501±11	-1,5 ($p=0,18$)
40	50±10	38,9 ($p=0,1$)	3360±37	-0,9 ($p=0,27$)	1491±9	-2,2 ($p=0,03$)
60	42±8	16,7 ($p=0,36$)	3500±42	3,2 ($p=0,02$)	1448±8	-5 ($p=0,001$)
ЯМР параметры, амплитуда A (%)						
Время облучения (мин)	A_{11}	% к контролю	A_{12}	% к контролю	A_2	% к контролю
0 (контроль)	-5,7±0,3	0	-149,4±2,3	0	35,5±1,3	0
20	-5,7±0,3	0	-147,9±2	-1 ($p=0,58$)	36,84±1,6	3,8 ($p=0,49$)
40	-5,3±0,3	-7 ($p=0,17$)	-131,9±2,6	-11,7 ($p=0,004$)	40,7±1,4	14,6 ($p=0,03$)
60	-5,6±0,2	-1,8 ($p=0,66$)	-129,6±1,5	-13,3 ($p=0,001$)	41,8±1,2	17,7 ($p=0,01$)
ЯМР параметры, населенность P (%)						
Время облучения (мин)	P_{11}	% к контролю	P_{12}	% к контролю	P_2	% к контролю
0 (контроль)	3,82±0,08	0	96,18±0,08	0	84,9±0,8	0
20	3,85±0,19	1 ($P=0,81$)	96,15±0,2	-0,04 ($p=0,81$)	88,1±6,2	3,8 ($p>0,56$)
40	4,02±0,23	5,3 ($P=0,37$)	95,98±0,2	-0,21 ($p=0,37$)	97,7±0,8	15,1 ($p<0,001$)
60	4,32±0,05	13,3 ($P=0,003$)	95,68±0,05	-0,53 ($p=0,003$)	100	17,8 ($p<0,001$)

Примечание: Знак минус указывает на уменьшение по сравнению с контролем; населенность P (%) нормированное значение амплитуды = $A/A_{\max} \times 100\%$; t -критерий Стьюдента

Из таблицы видно, что с увеличением времени облучения ЭМИ незначительно повышается значение населённости P_{11} . Наблюдаемое изменение населённости P_{11} в исследовании ЯМР-релаксации характеризует изменение количества протонов

(концентрации ^1H), внутри решетки и участвующих в образовании гидратных оболочек. Подвижность протонов внутри решетки с увеличением времени принимает параболический вид. Однако при увеличении продолжительности облучения происходит увеличение параметра P_2 , то есть повышается количество протонов участвующих в межмолекулярном взаимодействии при одновременном снижении их подвижности (снижение времени спин-спиновой релаксации T_2).

Незначительное изменение в населённости P_{11} вполне согласуется с современной фазовой теорией, согласно которой протекает процесс перераспределения зарядов, сопровождающийся вытеснением протонов за её пределы. При допущении, что гидратная оболочка имеет упрощённую формулу H_3O_2 [148, 153], справедливо уравнение: $4\text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}_2^- + \text{H}_5\text{O}_2^+$. Время пребывания протонов в такой оболочке крайне мало за счет высокой скорости их переносов. Благодаря такому упрощению динамического процесса изменения количества связанной воды можно заключить, что для установления более точного количества молекул воды, которое образовало новые слои необходимо вести пересчёт с коэффициентом 2. Результаты расчётов представлены в таблице 7.

Таблица 7

Увеличение количества связанной воды относительно контроля в суспензии культуры *E. coli* с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1, в среде ГРМ-бульон, исходная концентрация 6×10^8 кл./мл

Продолжительность облучения, мин	0 (Контроль)	20	40	60
P_{12} %	96,18	96,15	95,98	95,68
P_{11} %	3,82	3,85	4,02	4,32
% к контролю молекул связанной воды	0	2	10	25*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к образцам без облучения; t -критерий Стьюдента; населенность P (%) нормированное значение амплитуды = $A/A_{\text{макс}} \times 100\%$

Полученные данные показывают, что важными параметрами, которые требуется контролировать в процессе СВЧ-облучения бактериальных культур, являются длина волны, продолжительность облучения, концентрация бактериальных клеток, при которой необходимо проводить облучение. При этом стоит учитывать процессы, связанные с изменением подвижности протонов в системе «среда-культура».

3.2. Разработка метода интенсификации роста биомассы *E. coli* LEGM-18, оценка параметров ЯМР-релаксации

Для совершенствования процесса повышения плотности бактериальной культуры проведён эксперимент, в котором варьируемыми факторами являлись исходная концентрация клеток и продолжительность облучения.

На первом этапе изучены ростовые характеристики культуры, вычислены концентрации клеток, построены кривые накопления биомассы (Рисунок 21(а)) и кривые удельных скоростей роста (Рисунок 21(б)), по которым определены основные фазы роста культуры *E. coli* LEGM-18 и их зависимость от исходной концентрации клеток. Полученные данные позволили оценить подбласть значений исходных концентраций и интервал варьирования, в которой будет проводиться эксперимент.

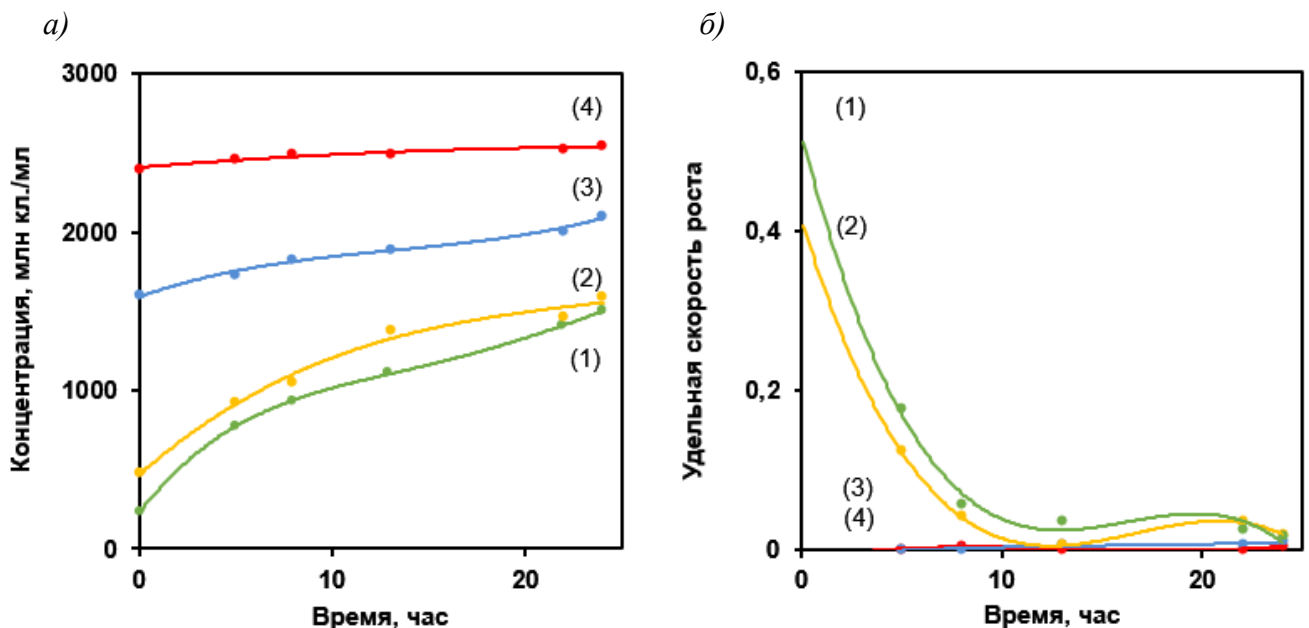


Рисунок 21 – Ростовые характеристики культуры *E. coli* LEGM-18

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

В анализируемом процессе культура с исходными концентрациями в $1,2 \times 10^9$ и $2,4 \times 10^9$ 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.

На основании полученных данных рассчитаны и проанализированы удельные скорости *E. coli* LEGM-18 (Рисунок 21(б)). Обнаружено, что удельная скорость роста в промежутке между 7 и 13 ч культивирования снижается при исходной концентрации в $2,4 \times 10^8$ и $4,8 \times 10^8$ кл./мл. Считается, что основными лимитирующими факторами являются питательные вещества и кислород. Однако в условиях засева питательной среды высокие удельные скорости роста наблюдались только при исходных концентрациях $2,4 \times 10^8$ и $4,8 \times 10^8$ кл./мл. При исходных концентрациях $1,2 \times 10^9$ и $2,4 \times 10^9$ удельные скорости роста были около нуля, что, вероятно, свидетельствует о наличии других, пока не изученных лимитирующих факторов.

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, заключающееся в продолжительности лаг-фазы.

При одинаковых условиях обнаружены сходные зависимости эффектов при облучении штамма *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *P. luminescens* ZM 1 (Рисунок 19) с штаммом *E. coli* LEGM-18 (Таблица 8). Также при низких концентрациях наблюдалось либо угнетающее действие, либо его отсутствие, либо незначительная стимуляция роста (Таблица 8, концентрации $2,4 \times 10^8$ и $4,8 \times 10^8$ кл./мл), но с увеличением концентрации, при которой проводили облучение, прирост биомассы увеличивался (Таблица 8, концентрации $1,2 \times 10^9$ и $2,4 \times 10^9$ кл./мл).

Полученные данные использованы для построения карты уровня прироста биомассы (Рисунок 22). 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, Δz_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. Все

значения исходной концентрации клеток и времени облучения, попадающие в центральные области этих экстремумов, приводят к наивысшим значениям прироста биомассы.

Таблица 8

Прирост биомассы *E. coli* LEGM-18 на среде ГРМ-бульон при СВЧ-облучении (37,04 ГГц)

Время облучения, мин	0 (контроль)	20	40	60
Исходная концентрация $2,4 \times 10^8$ кл./мл				
Мутность, McF	$5 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$
Концентрация, кл./мл	$1,5 \times 10^9$	$1,41 \times 10^9$	$1,35 \times 10^9$	$1,74 \times 10^9$
% к контролю	0	-6	-10	16
Исходная концентрация $4,8 \times 10^8$ кл./мл				
Мутность, McF	$5,3 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$
Концентрация, кл./мл	$1,59 \times 10^9$	$1,47 \times 10^9$	$1,35 \times 10^9$	$1,35 \times 10^9$
% к контролю	0	-8	-15*	-15*
Исходная концентрация $1,2 \times 10^9$ /мл				
Мутность, McF	$7 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,2$
Концентрация, кл./мл	$2,1 \times 10^9$	$2,79 \times 10^9$	$1,92 \times 10^9$	$1,89 \times 10^9$
% к контролю	0	32,9*	-9	-10
Исходная концентрация $2,4 \times 10^9$ кл./мл				
Мутность, McF	$8,5 \pm 0,2$	$9,4 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,2$	$11 \pm 0,4$
Концентрация, кл./мл	$2,55 \times 10^9$	$2,82 \times 10^9$	$2,46 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$
% к контролю	0	10,6	-4,5	29,4*

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к образцам без облучения; t -критерий Стьюдента; знак минус указывает на уменьшение по сравнению с контролем

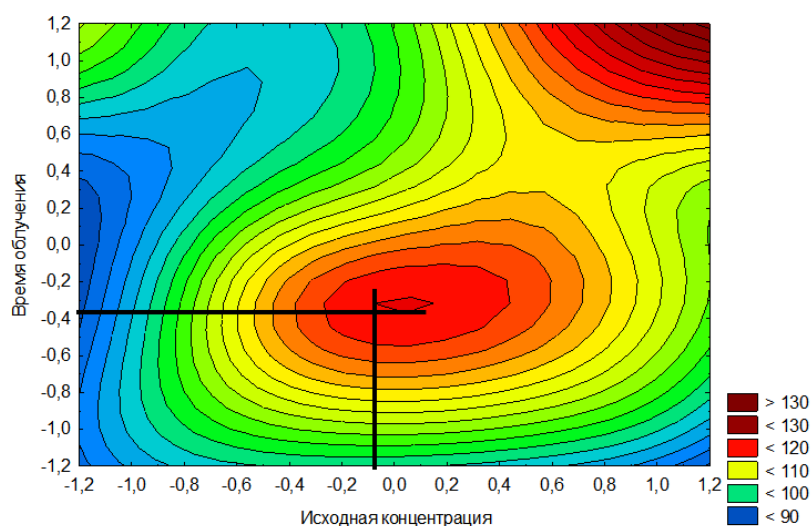


Рисунок 22 – Карта уровня прироста биомассы (%) в зависимости от исходной концентрации и продолжительности облучения

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

С точки зрения радиобиологии, этот «гормезис» в виде двух экстремумов характеризует эти явления как стохастические эффекты, которые не имеют дозовой зависимости, т.е. при повышении дозы увеличивается не эффект воздействия, а вероятность его наступления. При этом эти переменные сцеплены с совокупностью других переменных, которые при их комбинации выражаются в наблюдаемый биологический эффект. 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 построения полного факторного эксперимента (ПФЭ) необходимо сместить центр плана эксперимента и получить дополнительные данные в точках 10 и 30 мин продолжительности облучения при концентрациях 6×10^8 и $1,8 \times 10^9$ кл./мл.

На основе полученных дополнительных данных для ПФЭ (Таблица 9) с помощью математического моделирования вычислена функция модели полиномиальной регрессии и построены профили для предсказанных значений и оптимальности.

Таблица 9

Прирост биомассы *E. coli* LEGM-18 на среде ГРМ-бульон при СВЧ-облучении (37,04 ГГц)

Время облучения, мин	0 (контроль)	10	30
Исходная концентрация 6×10^8 кл./мл			
Мутность, McF	5,56±0,2	5,92±0,3	6,36±0,5
% к контролю	0	6,5	14,4*
Исходная концентрация $1,8 \times 10^9$ кл./мл			
Мутность, McF	7,82±0,1	8,1±0,3	9,8±0,7
% к контролю	0	4,1	25,8*

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к образцам без облучения; t -критерий Стьюдента

Функция регрессии имела следующий вид:

$$y = 31,82 - 11,6x_1^2 + 10,64x_2 - 7,16x_2^2 - 3,19x_2^3,$$

где y – прирост биомассы (%), x_1 – концентрация (млн кл./мл), x_2 – время облучения (мин).

На рисунке 23 представлены модели поверхности отклика (оптимальности) исходной концентрации слева и времени облучения справа. Установлено, что оптимальными параметрами для интенсификации процесса культивирования (увеличение концентрации клеток) являются 25 ± 5 -минутное СВЧ-облучение при концентрации

$1200 \pm 240 \times 10^6$ кл./мл.

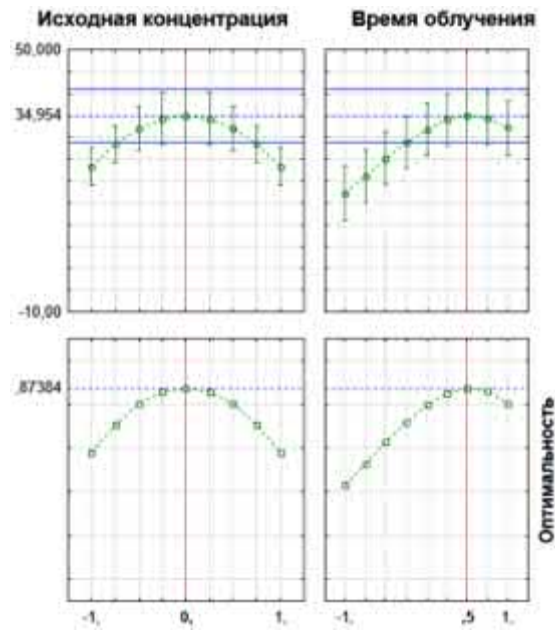


Рисунок 23 – Профили для предсказанных значений исходной концентрации и продолжительности облучения

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%

Для изучения влияния ЭМИ на процесс изменения подвижности протонов, эпитаксиального роста фазы связанной воды и установления корреляции данных с уровнем прироста биомассы использовался метод ЯМР-релаксации.

В таблице 10 показано, что в системе регистрируются отдельные компоненты в огибающих сигналов спинового эхо (время релаксации T_{11} , T_{12} и соответствующие им амплитуды A), которые пропорциональны населённостям (количеству) подвижных и связанных ядер ^1H соответствующих фракций. Показатели интенсивности сигналов эхо времён T_2 связаны с подвижностью протонов и зависят от межмолекулярных водородных связей в образце. Снижение количества межмолекулярных связей в образце проявляется в виде снижения значения T_2 [33].

Эксперименты по изучению параметров ЯМР-релаксации проведены аналогично предыдущим исследованиям. На первом этапе исследовали параметры

ЯМР-релаксации культуры различных концентраций. Результаты представлены в таблице 10. Как и ранее анализ данных ЯМР-релаксации позволяет утверждать, что в системе существует две фазы: первая, соответствующая коротким временам релаксации T_{11} , и вторая - длинным T_{12} .

Таблица 10

ЯМР параметры культуры *E. coli* LEGM-18 в среде ГРМ-бульон

ЯМР параметры, время релаксации T (мс)						
Исход. конц-я (10^6 кл/мл)	T_{11}	% к контролю	T_{12}	% к контролю	T_2	% к контролю
0	34 ± 8	0	3210 ± 32	0	1565 ± 11	0
240	36 ± 8	5,9 ($p=0,75$)	3380 ± 41	5,3 ($p<0,001$)	1594 ± 12	1,9 ($p<0,05$)
480	38 ± 7	11,8 ($p=0,55$)	3760 ± 46	17,1 ($p<0,001$)	1690 ± 14	8,0 ($p<0,001$)
1200	32 ± 5	-5,9 ($p=0,73$)	3700 ± 44	15,3 ($p<0,001$)	1648 ± 11	5,3 ($p<0,001$)
2400	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 (%)						
Исход. конц-я (10^6 кл/мл)	A_{11}	% к контролю	A_{12}	% к контролю	A_2	% к контролю
0	$-5,1 \pm 0,4$	0	$-161,6 \pm 5,7$	0	$41,5 \pm 1,4$	0
240	$-4,7 \pm 0,3$	-7,8 ($p=0,24$)	$-123 \pm 3,1$	-24 ($p<0,001$)	$39,59 \pm 1,1$	-4,6 ($p=0,14$)
480	$-4,7 \pm 0,4$	-7,8 ($p=0,29$)	$-134,3 \pm 4,4$	-17 ($p=0,003$)	$35,88 \pm 0,5$	-13 ($p<0,005$)
1200	$-5,3 \pm 0,4$	3,9 ($p=0,57$)	$-130,4 \pm 4,8$	19,3 ($p=0,002$)	$39,3 \pm 0,9$	-5,3 ($p=0,09$)
2400	$-5,6 \pm 0,4$	9,8 ($p=0,2$)	$-147,4 \pm 5,1$	-8,8 ($p=0,03$)	$41,58 \pm 1,3$	0,2 ($p=0,95$)
ЯМР параметры, населенность P (%)						
Исход. конц-я (10^6 кл/мл)	P_{11}	% к контролю	P_{12}	% к контролю	P_2	% к контролю
0	$3,16 \pm 0,09$	0	$96,84 \pm 0,09$	0	$99,8 \pm 0,2$	0
240	$3,82 \pm 0,1$	21 ($p=0,005$)	$96,18 \pm 0,1$	-0,7 ($p=0,005$)	$95,2 \pm 0,2$	-4,6 ($p<0,001$)
480	$3,5 \pm 0,12$	11 ($p=0,06$)	$96,5 \pm 0,12$	-0,4 ($p=0,06$)	$86,29 \pm 3,8$	-14,2 ($p=0,01$)
1200	$4,06 \pm 0,11$	29 ($p=0,002$)	$95,94 \pm 0,11$	-0,9 ($p=0,002$)	$94,52 \pm 0,5$	-6,1 ($p<0,001$)
2400	$3,8 \pm 0,05$	20 ($p=0,005$)	$96,2 \pm 0,05$	-0,7 ($p=0,005$)	100	0,2 ($p=0,23$)

Примечание: Знак минус указывает на уменьшение по сравнению с контролем; населенность P (%) нормированное значение амплитуды = $A/A_{\max} \times 100\%$, $P_{11} + P_{12} = 100\%$; t -критерий Стьюдента

Соотношение P_{11} к P_{12} позволяет проанализировать переход протонов из состояния свободной воды в адсорбированную фазу. Вторая фаза включает в себя протоны «свободной» воды. Первая фаза имеет незначительный процент населённости P_{11} и соответствует протонам биополимеров и связанной воды. Концентрация протонов в этой фазе колеблется около 4%, что подтверждается наличием в системе 1,8% панкреатического гидролизата рыбной муки, а оставшееся количество приходится на клетки культуры, остатки питательной среды от предыдущего культивирования и

связанную воду. Очевидно, что рост концентрации малоподвижных протонов фазы T_{11} может быть возможным только за счёт увеличения количества адсорбированных молекул воды.

Из таблицы 10 видно, что при концентрации $1,2 \times 10^9$ кл./мл значение населённости P_{11} статистически достоверно больше, чем при других концентрациях, что свидетельствует о большей концентрации протонов ^1H в менее подвижной фракции. Это указывает на то, что в системе «среда-клетки» сформированы надмолекулярные образования из «связанной» воды более выражено.

Нами предполагается, что исходные значения населённости P_{11} могут иметь влияние на прирост биомассы. Анализ этой переменной дал возможность вычислить функцию регрессии, которая имеет следующий вид:

$$y = -4\text{E-}07x^2 + 0,0011x + 3,2785 ,$$

где y – населённость ^1H , P_{11} , %, x – концентрация клеток, млн/мл. Построение функции регрессии позволило обнаружить, что экстремум переменной P_{11} находится в диапазоне концентрации клеток $1,2\text{-}1,8 \times 10^9$ кл./мл. Математическое моделирование параметров ЯМР-релаксации дало новые данные о количестве малоподвижных протонов в решетке при варьировании концентрации клеток. При этом установлено, что линейной зависимости этих переменных нет.

На следующем этапе опыты по изучению параметров ЯМР-релаксации проведены с облученными образцами культуры аналогично предыдущим исследованиям при различной продолжительности обработки ЭМИ. Результаты представлены на рисунке 24. Полученные данные свидетельствуют о нелинейности процессов перехода протонов ^1H из одной фракции в другую с увеличением продолжительности облучения ЭМИ. Это явление может быть объяснено тем, что обработка ЭМИ бактериальной культуры с позиции квантовой электроники является «накачкой»²⁶.

²⁶Накачка - процесс перекачки энергии внешнего источника в рабочую среду.

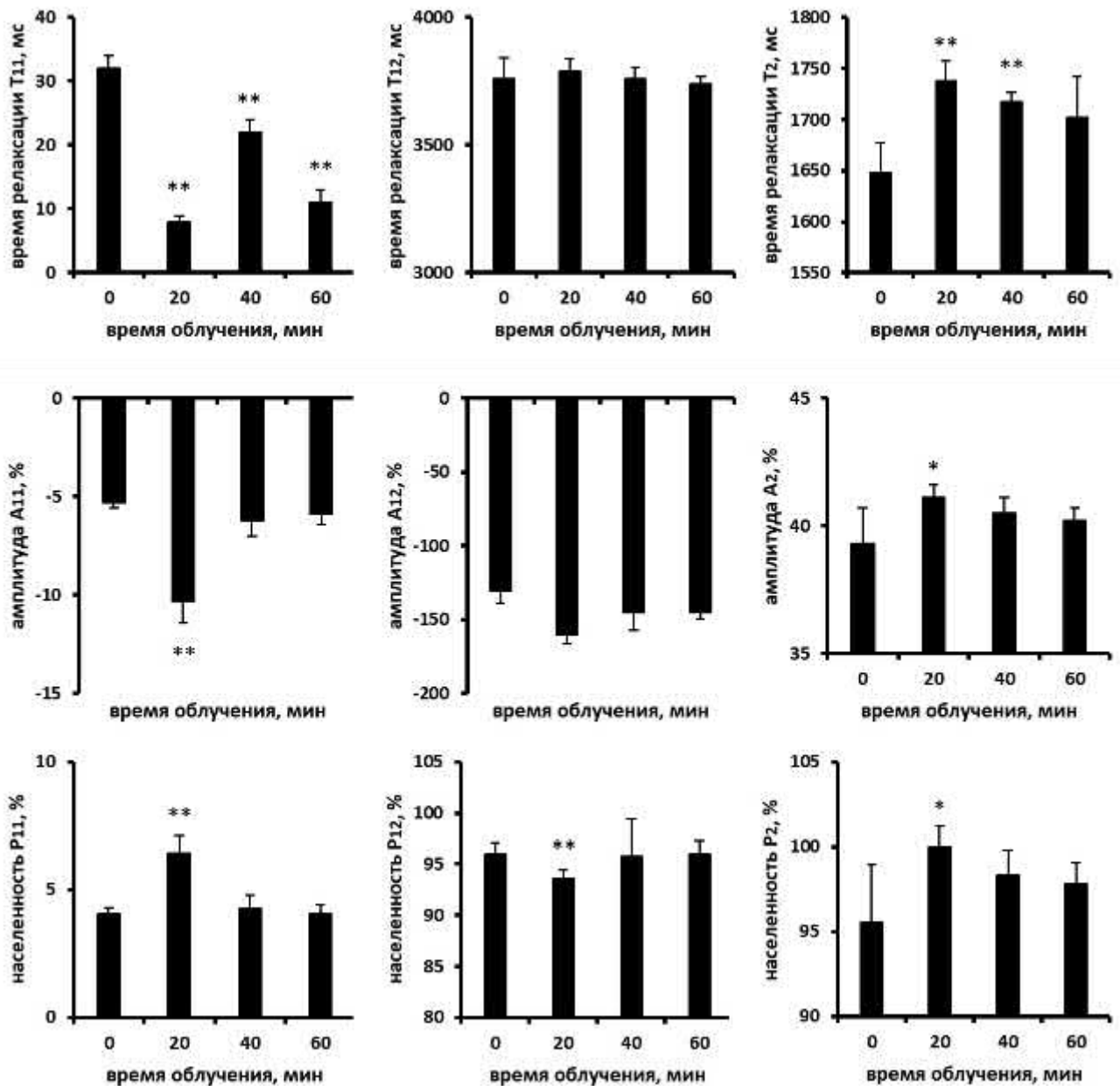


Рисунок 24 – Параметры ЯМР-релаксации *E. coli* LEGM-18 в зависимости от времени облучения

Примечание: частота облучения 37,04 ГГц. Среда - ГРМ-бульон. Исходная концентрация $1,2 \times 10^9$ кл./мл. T_{11} - время спин-решеточной релаксации фазы малоподвижных протонов, T_{12} - время спин-решеточной релаксации фазы подвижных протонов, T_2 - время спин-спиновой релаксации; A_{11} - амплитуда времени спин-решеточной релаксации фазы малоподвижных протонов, A_{12} - амплитуда времени спин-решеточной релаксации фазы подвижных протонов A_2 - амплитуда времени спин-спиновой релаксации, P_{11} - населённость времени спин-решеточной релаксации фазы малоподвижных протонов, P_{12} - населённость времени спин-решеточной релаксации фазы подвижных протонов P_2 - населённость времени спин-спиновой релаксации; * - $p < 0,05$ и ** - $p < 0,01$ по отношению к образцам без облучения; t -критерий Стьюдента

Поглощённая энергия переводит молекулы рабочей среды (воды) в возбуждённое состояние, что приводит к смещению электронных плотностей в

адсорбированной фазе. В этом состоянии начинает действовать механизм запуска эпитаксиального роста связанной воды и вынужденного переноса ^1H за её пределы. Частицы в данном состоянии находятся на квазистабильных энергетических уровнях. Сообщение порции энергии больше, чем система может поглотить, запускает процесс индуцированных квантовых переходов частиц с метастабильного до основного состояния. Наряду с индуцированными квантовыми переходами имеются и спонтанные. Вероятно, именно это придает свойства стохастичности процессу.

Анализ данных прироста биомассы и параметров ЯМР-релаксации позволяет сделать заключение о том, что существует прямая зависимость между эффектом интенсификации роста культуры и количеством протонов участвующих в образовании «связанной» воды в системе (Таблица 11), при этом, что интересно, если учитывать данные таблицы 10, то для достижения эффекта прироста биомассы в системе уже должна быть относительно высокая их концентрация.

Таблица 11

Увеличение количества связанной воды относительно контроля в суспензии культуры *E. coli* LEGM-18 в среде ГРМ-бульон на частоте 37,04 ГГц, исходная концентрация $1,2 \times 10^9$ кл./мл

Продолжительность облучения, мин	0 (Контроль)	20	40	60
P_{12} %	95,94	93,57*	95,74	95,93
P_{11} %	4,06	6,43*	4,26	4,07
% к контролю молекул связанной воды	0	116	9	1

Примечание: * – $p < 0,01$ по отношению к образцам без облучения; t -критерий Стьюдента; населенность P (%) нормированное значение амплитуды = $A/A_{\text{макс}} \times 100\%$

Также при облучении наблюдается уменьшение времени спин-спиновой релаксации T_2 , что свидетельствует о снижении подвижности протонов, участвующих в межмолекулярном взаимодействии за счёт образования более жёстких Н-связей между молекулами воды. Рассмотрение результатов вычислений, приведенных в таблице 11, указывает на то, что микроволновое облучение в течение 20 мин бактериальной культуры с концентрацией $1,2 \times 10^9$ кл./мл приводит к выраженному повышению количества молекул воды, малоподвижные протоны которых участвуют в спин-решеточных взаимодействиях и именно при этих значениях переменных в соответствии с данными математического моделирования наблюдается максимальный прирост биомассы (Рисунок 23).

На следующем этапе изучена возможность интенсификации процесса культивирования с использованием среды МПБ (Таблица 12). Проведённые исследования показали, что использование питательной среды МПБ при культивировании штамма *E. coli* LEGM-18 обеспечивает прирост биомассы до 81%. Это значение вдвое больше по сравнению со средой ГРМ-бульон. Особенности в ростовых характеристиках культуры на различных средах может быть объяснено различием в процентном соотношении питательных ингредиентов и в аминокислотном составе.

Антагонистическая активность бактерий опосредована образованием ими специфических метаболитов. База данных ЕСМДВ (Университет Альберты)

Таблица 12

Прирост биомассы при обработке ЭМИНИ на частоте 37,04 ГГц в зависимости от исходной концентрации клеток культуры *E. coli* LEGM-18 на среде МПБ

Время облучения, мин	0 (контроль)	20	40	60
Исходная концентрация $2,4 \times 10^8$ кл./мл				
<i>E</i> (кювета 10 мм), D540 нм	0,84±0,2	0,85±0,3	0,89±0,2	0,9±0,2
% к контролю	0	1,8	3,9	0,9
Исходная концентрация $1,2 \times 10^9$ кл./мл				
<i>E</i> (кювета 1 мм), D540 нм	0,51±0,1	0,93±0,3	0,47±0,1	0,45±0,1
% к контролю	0	81*	-6	-9

Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к образцам без облучения; t -критерий Стьюдента; знак минус указывает на уменьшение по сравнению с контролем

содержит информацию метаболома *E. coli*, состоящую из 3755 низкомолекулярных метаболитов. Для определения антагонистической активности полученной биомассы проведено тестирование с биосенсором «Эколюм-8». Для этого в точках 30, 60 и 90 мин определяли уровень свечения биосенсора.

Результаты исследования в тесте антагонистической активности при совместном культивировании облучённой и необлучённой культуры штамма *E. coli* LEGM-18 демонстрируют отсутствие статистически достоверного различия показателя свечения во времени ($p > 0,05$) (Рисунок 25). Таким образом, показано, что СВЧ-облучение не оказывает выраженных изменений в продукции экзометаболитов *E. coli* LEGM-18, обладающих биологической активностью по

отношению к биосенсору.

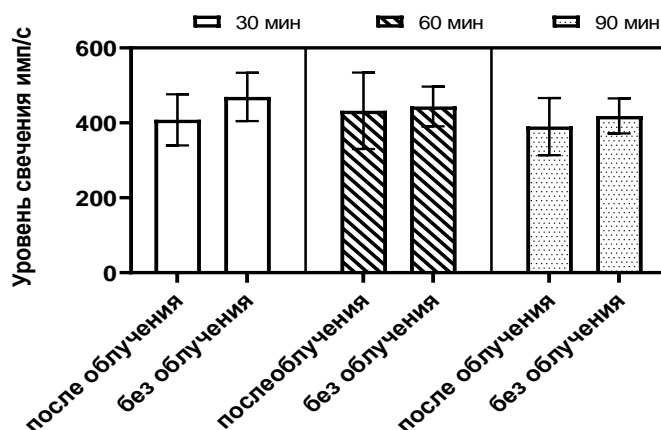


Рисунок 25 – Уровень свечения «Эколюм-8» при добавлении облучённой в течение 60 мин, частотой 36,84÷37,04 ГГц ГГц (зелёный) и необлучённой (жёлтый) культуры *E. coli* LEGM-18.

Примечание: *t*-критерий Стьюдента

Обнаружено, что кроме частоты и потока мощности излучения существует ряд других критически важных параметров процесса, влияющих на воспроизводимость и получение полезного биотехнологического эффекта:

- стадия роста (концентрация клеток) культуры, при которой проводится обработка ЭМИ;
- продолжительность обработки ЭМИ;
- питательная среда (% содержание питательных веществ, аминокислотный профиль).

Изучение влияния микроволнового излучения низкой интенсивности на процессы культивирования штаммов бактерий, в том числе *E. coli* требует большого количества материала для понимания механизмов и эффектов воздействия и необходимо дальнейшее изучение этого вопроса. Одним из важных аспектов внедрения метода в промышленность является его масштабирование. Следующие части данной главы посвящены концепциям методов и устройств, которые, в совокупности составляют перспективную технологию, и как нами предполагается, позволят осуществить трансферт метода в промышленные условия.

3.3. Получение биомассы *E. coli*

Технология получения биомассы включает совокупность методов пассирования штамма, получение маточной культуры и технологию получения реакторной культуры, в которые интегрируется метод СВЧ-облучения. Первый этап включает два этапа пассирования штамма (Рисунок 26). Условия пассирования штамма:

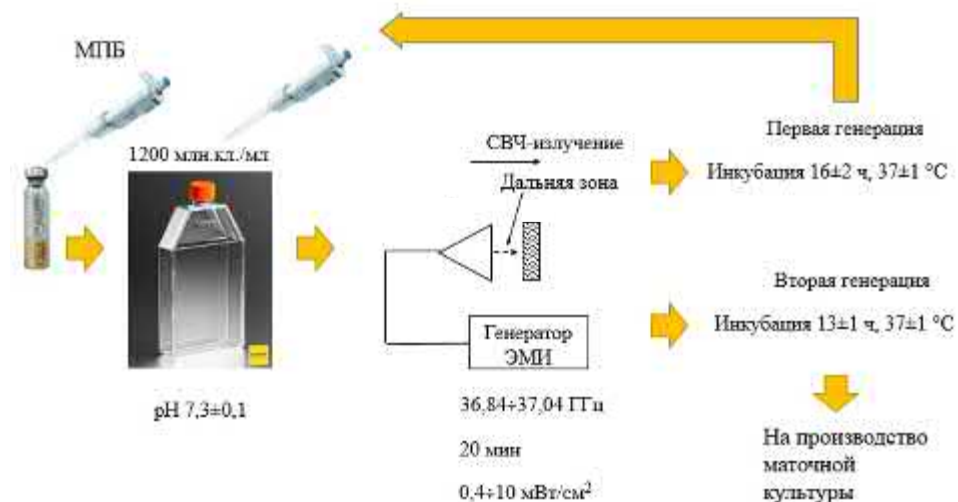


Рисунок 26 – Алгоритм получения культуры штаммов *E. coli*

1. В ампулу лиофилизированного штамма вносят пипеткой МПБ и выдерживают 5 мин. Выдержанный штамм переносят в плоскопараллельный культуральный флакон толщиной 10 мм с МПБ. Концентрация суспензии должна составлять $(1,2 \pm 0,24) \times 10^9$ кл./мл.
2. Засеянную среду помещают на подставку для обработки ЭМИ. Подставка и флакон выполнены из материала, прозрачного для СВЧ-излучения. Обработанную культуру инкубируют 16 ± 2 ч при температуре 37 ± 1 С.

Условия обработки:

- рабочая частота $36,84 \div 37,04$ ГГц в режиме непрерывной генерации;
- время облучения 20 мин;
- ёмкость помещают за пределы границы дальней зоны (ГОСТ Р 51317.4.3-99);
- ёмкость располагается в поле главного лепестка излучения;
- поток мощности излучения до 10 мВт/см².

3. Полученную культуру переносят в плоскопараллельные флаконы с МПБ, повторяют процедуру обработки и инкубации в условиях, описанных выше. Инкубацию второй генерации проводят в течение 13 ± 1 ч. Нарботанную культуру смешивают с защитной средой, разливают во флаконы и проводят лиофилизацию.

Метод получения маточной культуры включает несколько пассажей, необходимых для накопления биомассы. Для СВЧ-обработки бактериальной взвеси объёмом 15-31 л необходимо соблюдение следующих условий:

- Установка снабжена генератором с рупорными антеннами;
- Камера обработки состоит из плоскопараллельной ёмкости с патрубками входа и выхода, где стенки имеют окно прозрачности для ЭМИ;
- Глубина залива камеры \leq размера скин-слоя;
- Высота и ширина камеры должны соответствовать размерам сечения СВЧ-пучка на уровне половинной мощности.

Условия пассирования штамма.

1. Обработку проводят при следующих условиях:

- рабочая частота $36,84 \div 37,04$ ГГц в режиме непрерывной генерации;
- поток мощности излучения $0,4 \div 10$ мВт/см²;
- продолжительность обработки 20 мин.

2. Инкубацию каждого пассажа культуры проводят при температуре $37 \pm 1^\circ$ С в течение 16 ± 2 ч.

3. Нарботанную культуру используют для засева реактора (маточная культура).

Получение реакторной культуры должно выполняться в специальных биореакторах, оснащённых антеннами погружного типа. Аналогичное технологическое решение показало свою эффективность при промышленных испытаниях [45].

На рисунке 27 изображена перспективная блок-схема биореактора, позволяющего проводить обработку бактериальной взвеси с помощью ЭМИ без ограничения объёма, где:

1. ёмкость для культивирования микроорганизмов;
2. перистальтический насос;
3. СIP-мойка;
4. погружная антенная решетка;
5. термостатическая рубашка;
6. биореактор 1;
7. клапан патрубка подвода газов;
8. крышка биореактора;
9. датчик температуры;
10. датчик кислотности;
11. датчик мутности;
12. мешалка;
13. клапан патрубка перекачки бактериальной взвеси;
14. генератор высокочастотный;
15. электродвигатель;
16. блок управления;
17. контроллер;
18. биореактор 2;
19. термостатическая рубашка;
20. датчик температуры;
21. датчик кислотности;
22. датчик мутности;
23. компрессор;
24. клапан патрубка подвода газов;
25. электродвигатель;
26. крышка биореактора;
27. мешалка;
28. перистальтический насос;
29. ёмкость для наращивания культуры микроорганизмов;

30. патрубок слива;

31. клапан патрубка слива.

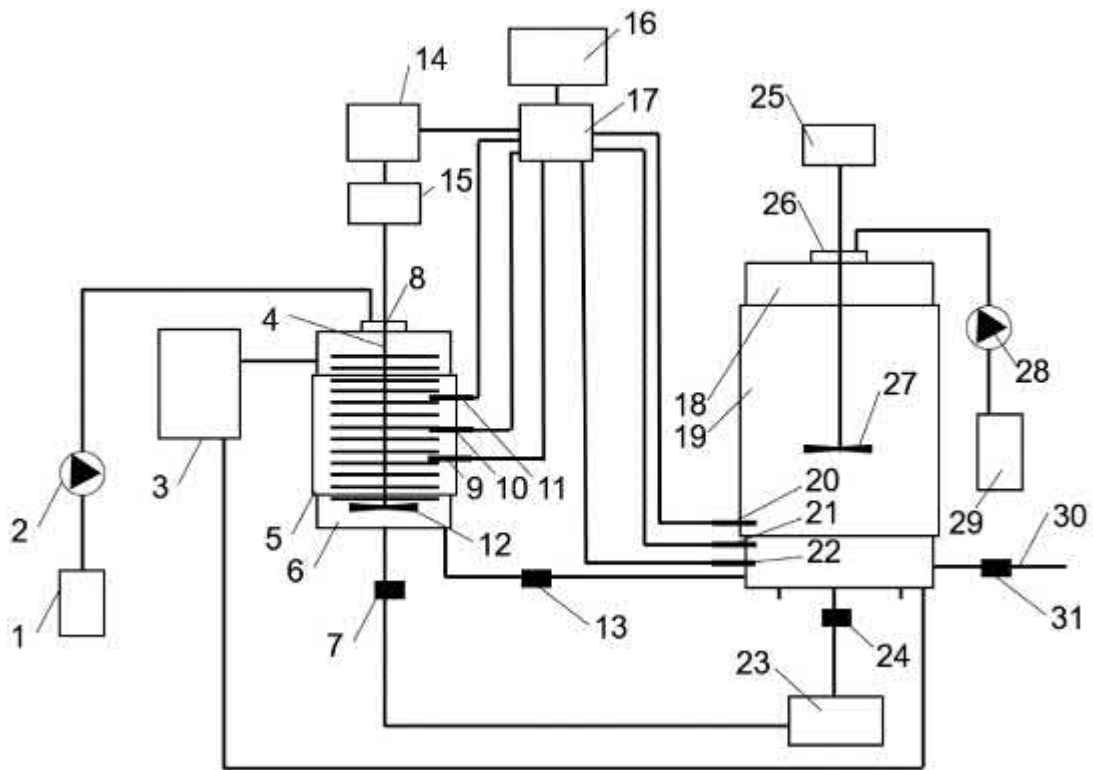


Рисунок 27 – Блок-схема биореактора

Технический результат достигается тем, что погружная антенная решётка (4) имеет размер сопоставимый с внутренним сечением реактора (6) и располагается соосно. Материал покрытия антенной решётки должен быть выполнен из химически инертного материала, прозрачного для СВЧ-излучения, выдерживающего многократные режимы очистки и стерилизации. Вход антенной решётки соединён с разъемом (на рисунке не изображён), расположенным на верхней крышке биореактора (8).

Функционирование биореактора.

Перед началом технологического цикла с помощью блока управления (16) включается СР-мойка (3) и проводится процесс очистки с последующей стерилизацией ёмкости реактора (6) с помощью СВЧ-облучения. После каждого цикла мойки блок управления передаёт управляющий сигнал на открытие клапана слива (на рисунке не изображён) и отработанная жидкость сливается через патрубок слива (на рисунке не изображён).

На начальном этапе в реактор (6) вносится питательная среда и маточная культура, с помощью блока управления (16) настраиваются параметры инкубирования и запускается технологический цикл. Окно уровня (на рисунке не изображён) позволяет контролировать уровень взвеси в реакторе. После запуска цикла включается термостатическая рубашка (5), электродвигатель (15), который обеспечивает вращение погружной антенной решётки (4) и мешалки (12). Включается компрессор (23) и открывается клапан (7), которые посредством линии циркуляции газов проводят аэрацию в реакторе (6). После достижения необходимой концентрации клеток клапан (7) закрывается и включается генератор высокочастотный (15). Проводится этап обработки бактериальной взвеси электромагнитным излучением по заданным параметрам. После, генератор (15) отключается и открывается клапан (7). Линия циркуляции газов имеет патрубки отвода и подвода газа, клапаны, которые закрываются в момент слива наработанной биомассы или мойки реактора. Датчик кислотности (10) подает сигналы на контроллер (17), который в свою очередь при отклонении от запрограммированных значений подаёт сигнал на насос (2) для внесения в биореактор 1 (6) корректирующей жидкости. При завершении производственного цикла контроллер (17) отключает термостатическую рубашку (5) закрывается клапан (7) и открывается клапан (13) для перегрузки взвеси микроорганизмов в биореактор 2 (18).

Условия обработки:

- рабочая частота $36,84 \div 37,04$ ГГц в режиме непрерывной генерации;
- поток мощности излучения $5 \div 10$ мВт/см²;
- продолжительность обработки 20 ± 1 мин.

Технологическая схема культивирования представлена на рисунке 28. Технология получения бактериальной взвеси может быть использована при производстве ряда биопрепаратов на основе штаммов *E. coli*.

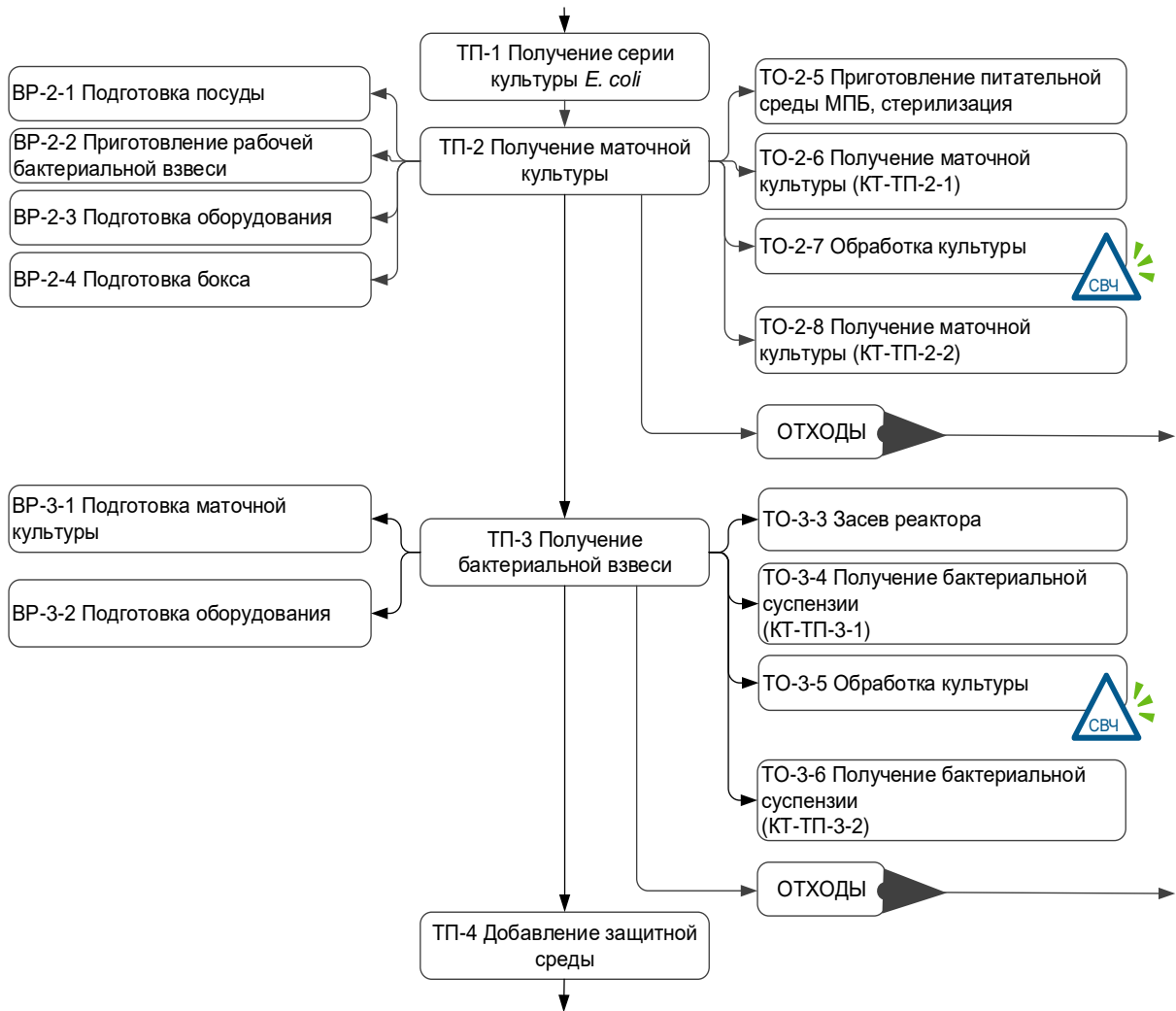


Рисунок 28 – Технологическая схема получения биомассы *E. coli*

Заключение по главе

Определены оптимальные параметры и разработана технология микроволновой интенсификации биопроцесса, обеспечивающая прирост биомассы *E. coli* K12 TG1 на 64% и *E. coli* LEGM-18 на 84%. Проведена оценка продукции штаммами *E. coli* белка и метаболитов методами билюминесцентного тестирования. Установлено, что эффект прироста биомассы при СВЧ-облучении зависит от концентрации малоподвижных протонов в системе. Разработаны технологическая схема upstream process и технические решения для её осуществления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с требованиями GMP «Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance» изготовление продукции и её качество обеспечивается за счёт разработки эффективных и действенных производственных процессов. Процессы должны быть основаны на механистическом понимании влияния факторов на характеристики продукта. Полученные данные демонстрируют наличие различных эффектов воздействия ЭМИ на бактериальную культуру и существование различных переменных, которые на них влияют. Установлено, что имеется связь между ростовыми характеристиками бактериальной культуры и концентрацией клеток (фазой роста), при которой производится её облучение ЭМИ. Ряд авторов обращали внимание на данный аспект, однако попыток объяснения указанного эффекта в литературе не обнаружено [56, 57]. В настоящей диссертационной работе даётся не только интерпретация наблюдаемых эффектов и обсуждаются механизмы их возникновения, но и вносится ясность в взаимосвязь между этими переменными.

На основе наших данных, оптимальная концентрация клеток, обеспечивающая улучшение ростовых свойств культуры при обработке ЭМИ, соответствует значениям концентрации клеток культуры на ранней стадии замедленного роста (Рисунок 29). Аналогичные данные получены ранее на штамме *E. coli* K12 AB1157 [56, 57]. Это явление заслуживает более тщательного изучения. Вероятно, наблюдаемый эффект является универсальным в целом для вида *E. coli*.

В основе наблюдаемых процессов может лежать единый механизм, связанный с явлениями на интерфейсах, в том числе с перераспределением зарядов и образованием их градиентов. В ряде проведённых опытов значения ростовых характеристик, как и значения параметров ЯМР-релаксации системы, имеют нелинейный характер при увеличении продолжительности облучения. Можно заключить, что эффект прироста биомассы определяется множеством взаимосвязанных предикторов, влияние которых следует изучить.

В работе [120] показано, что клетки *E. coli* аналогично нервным клеткам способны управлять своим мембранным потенциалом и катионным оттоком в зависимости от химических и физических воздействий. При этом мембранный потенциал может изменяться со скоростью от миллисекунд до нескольких секунд с различной частотой. При помещении клеток в условия аэробного голодания, ингибирования цепи транспорта электронов или ингибирования АТФ-синтазы прекращаются осцилляции мембранного потенциала. Значения мембранного потенциала связаны с концентрацией положительно и отрицательно заряженных частиц и их пропорцией на интерфейсе. Обнаружена прямая связь между мощностью лазерного ИК-излучения и такими эффектами, как контур и частота изменения мембранного потенциала. Чем больше мощность, тем выше частота и амплитуда смены потенциала. Авторы указывают, что эффект носит не тепловой характер [120].

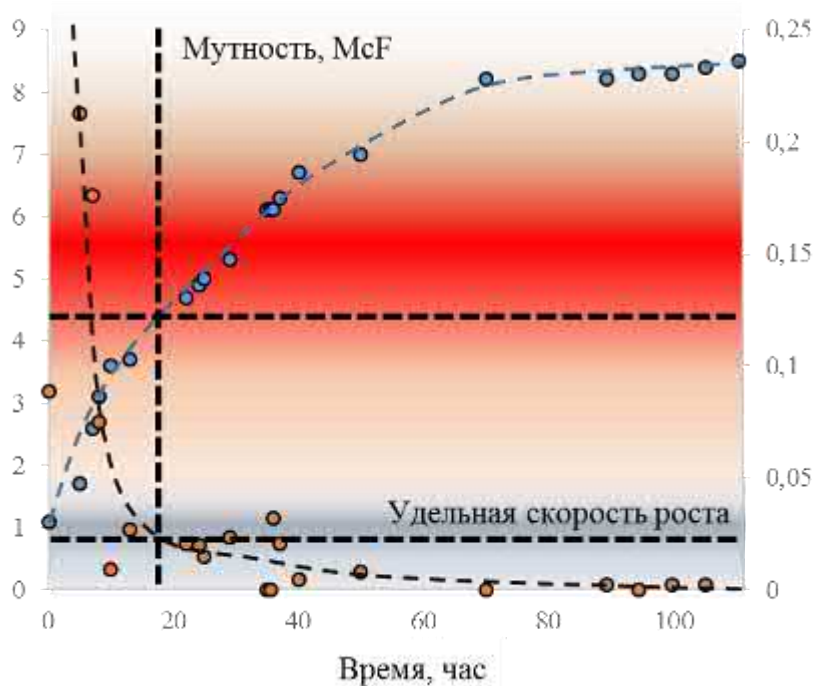


Рисунок 29 – Кривые роста и удельной скорости роста *E. coli* LEGM-18

Примечание: получены нами экспериментально. Точка пересечения пунктирных линий – оптимальная концентрация клеток для стимуляции роста культуры ЭМИ

В работе [157] представлены данные о метаболических колебаниях культуры при ограничении питательных веществ, которые обеспечивают электрохимическую передачу сигналов между удалёнными клетками за счёт регуляции тока ионов через каналы. Показано, что снижение электрохимического потенциала через цитоплазматическую

мембрану *E. coli* с помощью бактериальных сигнальных ингибиторов блокирует деление клеток, а мембранный потенциал необходим для формирования дивисомы²⁷ [71]. Воздействие на электрофизиологическую активность клеток бактерий в культуре может оказывать значительное влияние на их метаболизм и процесс деления. При этом под электрофизиологической активностью надо понимать совокупность процессов переноса положительных и отрицательных зарядов по обе стороны мембраны.

В процессе жизнедеятельности клеток, неиспользованные протоны экспортируются на их поверхность [138, 139, 140], где они распределяются и связываются с компонентами липополисахарида (ЛПС) и основными аминокислотами наружной мембраны клеточной стенки у грамотрицательных бактерий [159]. ЛПС являются компонентом наружной мембраны и занимают преимущественную площадь 4,9 мкм² против 4,1 мкм² фосфолипидов (Таблица 13) [107, 143].

Таблица 13

Основные компоненты внешней мембраны [107, 143]

Компонент	Количество молекул на клетку (10 ⁵)	Количество остатков жирных кислот на клетку (10 ⁵)	Занимаемая площадь (мкм ²)
Липополисахариды	34,6	242	4,9
Порины + OmpA	2	-	1,8
Липопротеины	7	21	0,5
Фосфолипиды	87	174	4,1

ЛПС состоят из гидрофильного полисахаридного остатка, который ковалентно присоединён к гидрофобному липидному остатку. Гидрофильные полисахаридные цепи ЛПС снабжены отрицательно заряженными функциональными группами и притягивают электронные плотности окружающих молекул воды, что ведёт к их поляризации и образованию гидратных оболочек.

В главе 2 показано, что подобные процессы могут происходить в культуральной среде вблизи поверхности клетки. ЭМИ низкой интенсивности оказывает заметное влияние на систему среда-культура только при определённых условиях. Предполагается, что продление log-фазы и увеличение накопления биомассы происходит из-за повышения количества подвижных протонов и утолщения гидратной оболочки на

²⁷ дивисома – аппарат для деления клеток.

интерфейсе мембрана-среда в процессе облучения культуры. Указанный эффект может быть вызван тем, что подвижные протоны могут увеличивать градиент их концентрации, который в последствии расходуется на синтез АТФ. Продукты жизнедеятельности клеток, ограничивающие рост культуры, столкнутся с трудностями при прохождении через барьеры гидратной оболочки. Это может привести как к искажению передачи сигналов между культуральными клетками, так и к экранированию заряда и изменению уровня градиента концентрации протонов, что способствует снижению влияния бактериальных сигнальных ингибиторов на рост культуры, а также оказывает непосредственное влияние на ферментно-каталитические системы клеток.

Ориентация молекул воды внутри жидкости связана с дальнедействующим диполь-дипольным и короткодействующими взаимодействиями водородных связей. При комнатной температуре вода находится в параэлектрической (неупорядоченной) фазе, и, таким образом, средний дипольный момент в любом достаточно большом объёме полярной жидкости исчезает.

На границе жидкости с полярным интерфейсом большинство молекул воды ориентируются вдоль неё, поляризуясь перпендикулярно поверхности (сегнетоэлектричество²⁸), что приводит к образованию стабильной сети водородных связей (Рисунок 30). Данные модели активно используются в квантовой фармацевтике при разработке новых молекул и новых способов синтеза.

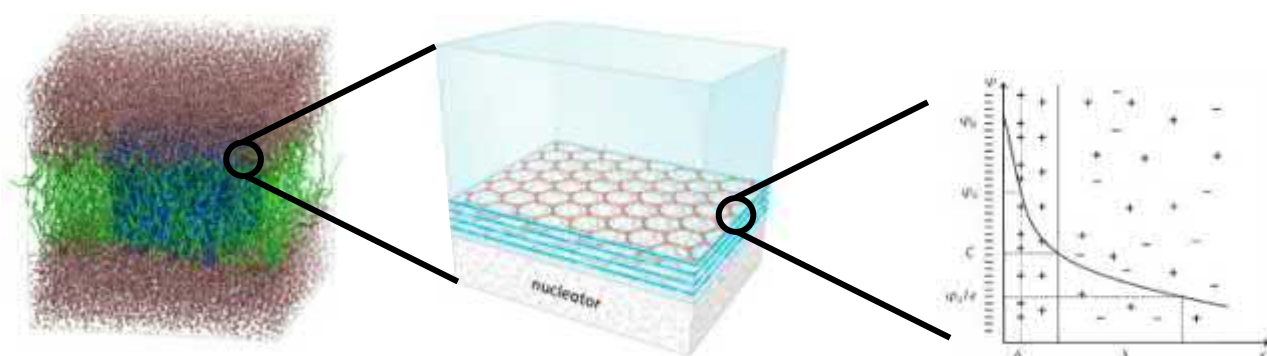


Рисунок 30 – Модель адсорбированной фазы на интерфейсе (слева) и её эпитаксия (в центре), образующая двойной электрический слой (справа) [150]

²⁸ Сегнетоэлектричество – явление возникновения спонтанной поляризации в кристалле, даже в отсутствии внешнего электрического поля, которая может быть переориентирована его приложением.

Гидратную оболочку разделяют на 2 части: вода зоны исключения (EZ) (адсорбированная вода) и вода переходной зоны (TZ) (диффузный слой) [69]. Такая система имеет свойства двойного электрического слоя. Показано, что образование гидратной оболочки на гидрофильной поверхности зависит от природы поверхности (Рисунки 31(а) и (б)), свойств среды (Рисунок 32 (а) и (б)), но не обнаружено статистически достоверной разницы зависимости толщины гидратной оболочки от вида микроорганизмов (Рисунок 33).

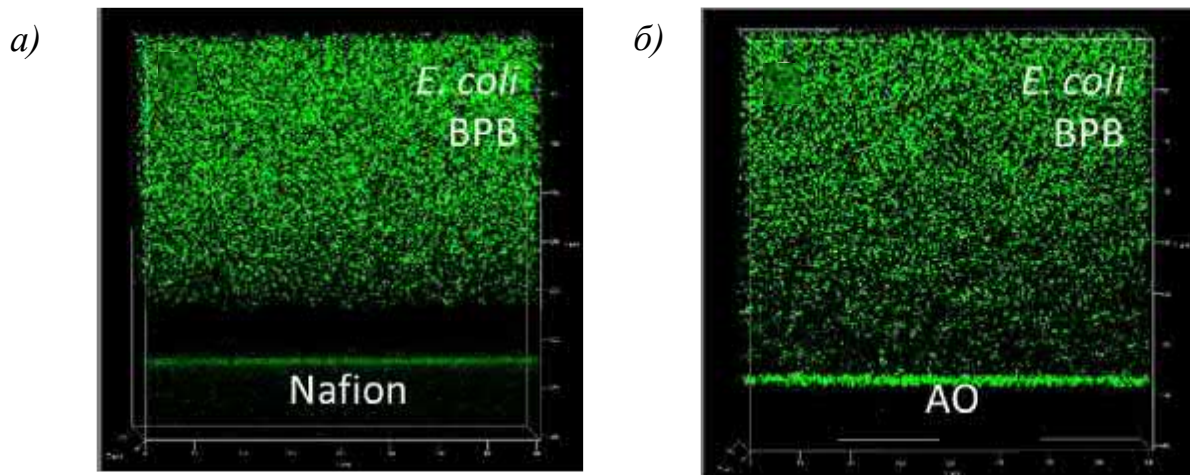


Рисунок 31 – Распределение клеток *E. coli* [69]

Примечание: (а) клетки вблизи интерфейса из Нафiona, (б) клетки вблизи алюминия оксида, суспендированных в фосфатном буфере (BPB)

Предполагается, что биологические эффекты при воздействии микроволновым излучением могут зависеть от процесса эпитаксии или деградации связанной воды на полярном интерфейсе, которая выступает зародышевой фазой (нуклеатором). Следовательно, в суспензии микроорганизмов определяющим фактором является площадь интерфейса и его физико-химические свойства. На рисунке 34 приведена модель S-образной кривой на основе расчёта суммарной площади интерфейсов клеток бактерий в зависимости от их концентрации и % прироста биомассы. Согласно предложенной нами модели, позитивное влияние низкоинтенсивного микроволнового излучения наблюдается при суммарной площади интерфейсов бактериальных клеток ≥ 25 см²/мл, однако с увеличением суммарной площади интерфейсов достигается предел. Разные культуры имеют разные отношения количества клеток к суммарным площадям интерфейсов клеток.

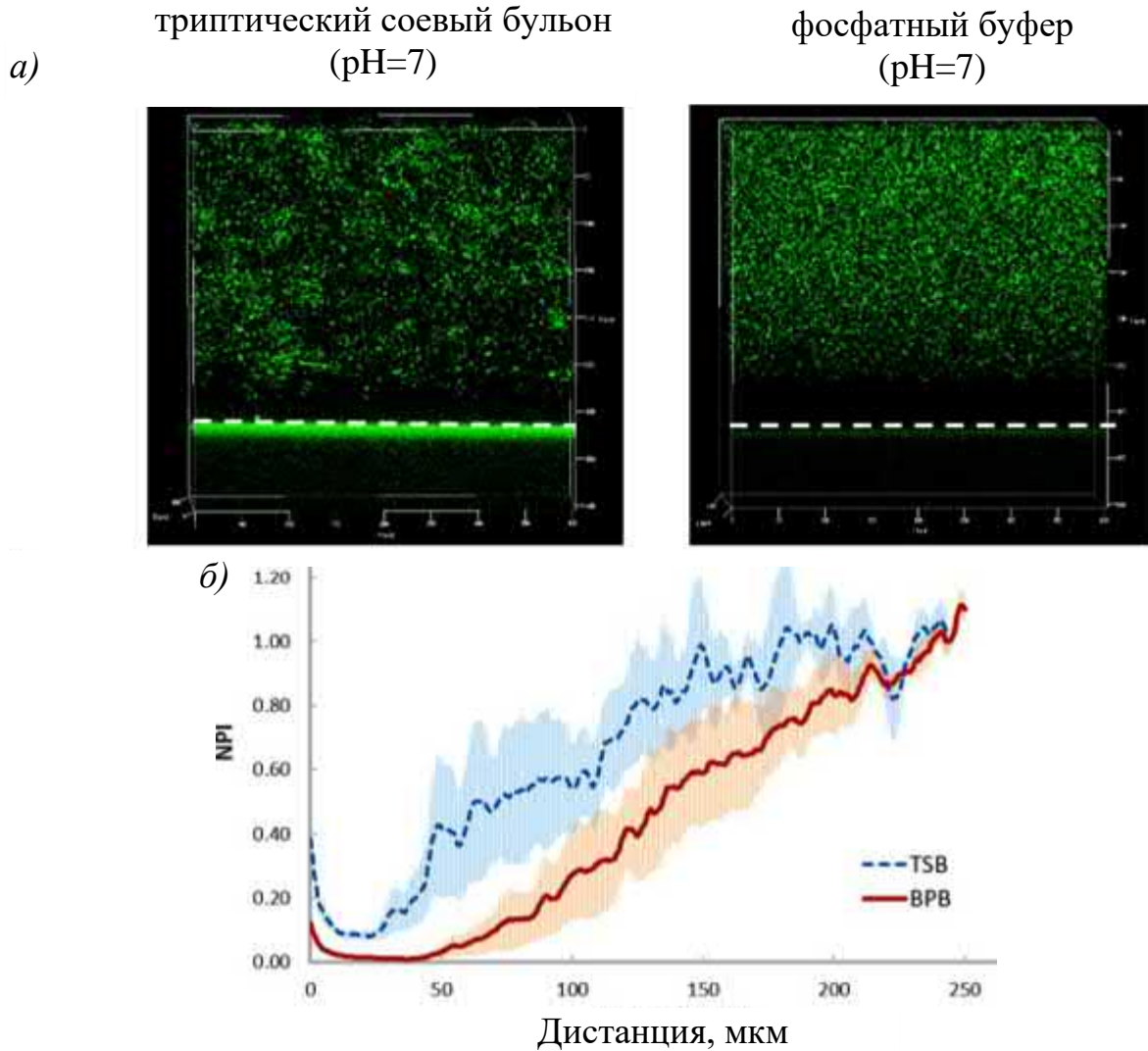


Рисунок 32 – Распределение клеток *E. coli* вблизи поверхности Нафiona, суспендированных в фосфатном буфере (BPB) и триптическом соевом бульоне (TSB) [69]

Примечание: а) 3D-изображения интерфейсов Нафion-жидкость, б) нормализованный профиль интенсивности флуоресценции (NPI) для бактерий, диспергированных в TSB или BPB

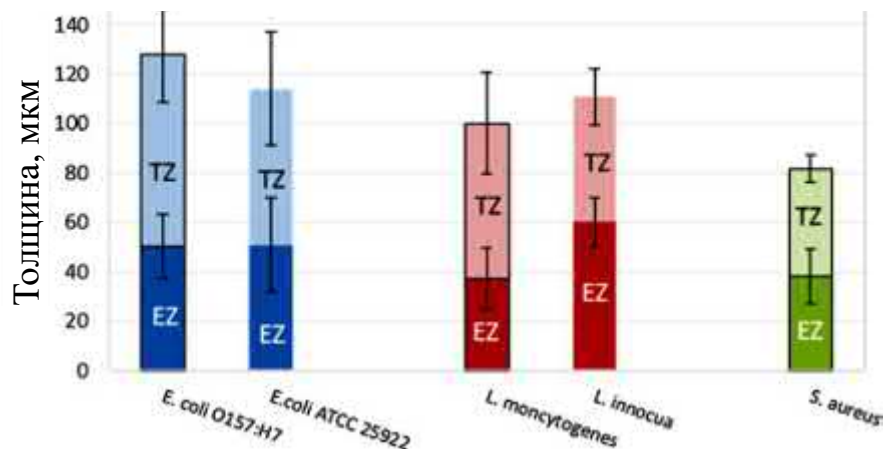


Рисунок 33 – Размер зоны исключения (EZ) и переходной зоны (TZ) для патогенных штаммов (с черными границами) и их соответствующие непатогенные штаммы (без границ), вблизи интерфейса Нафion-триптический соевый бульон [69]

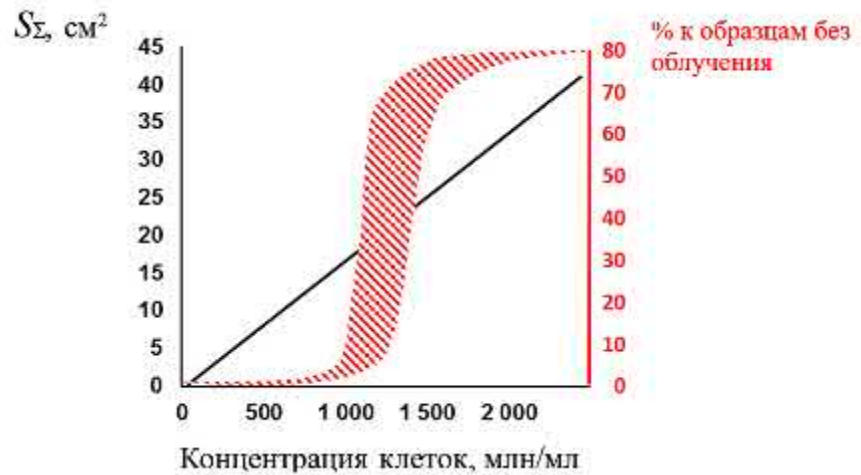


Рисунок 34 – Модель отношения суммарной площади поверхности клеток бактерий в зависимости от их концентрации и взаимосвязь концентрации клеток с эффектом увеличения ростовых характеристик культуры (% к образцам без облучения)

Примечание: получено нами на основе собственных экспериментальных данных

Это является одной из характеристик, которые необходимо контролировать при оптимизации культивирования. Выдвинутая гипотеза механизма влияния низкоинтенсивного ЭМИ на ростовые характеристики культуры *E. coli* подтверждена экспериментальными данными и является научно обоснованной, опираясь на последние достижения в этой области. Множественность эффектов от воздействия излучения не позволяет рассмотреть все цепи механизма в рамках одной работы.

Результаты люминесцентного тестирования с использованием рекомбинантного штамма *E. coli* после облучения ЭМИ показали различный характер развития реакции свечения. Исследования, проведённые для изучения изменений физиологического статуса, продемонстрировали их взаимосвязь с параметрами роста культуры тест-штамма. Нами предлагается механизм влияния ЭМИ на его биолюминесценцию (Рисунок 35).

Эффекты микроволнового воздействия на свечение тест-штамма объясняются особенностями структуры молекулы бактериальной люциферазы, которая состоит преимущественно из α -спиралей и кармана. В структуре люциферазы имеются центры адсорбции молекул воды (Рисунок 35(a)). Активный центр находится в пределах большой внутренней полости α -субъединицы [85].

Kowacz с соавторами [119] показал, что ЭМИ инфракрасного спектра, поглощаясь молекулами воды способно изменять конформацию белка посредством расширения адсорбированных слоёв воды.

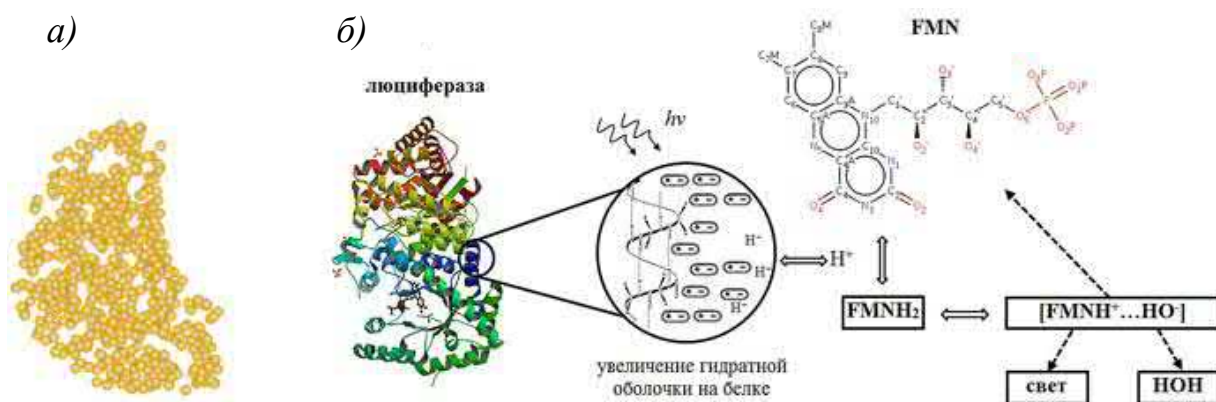


Рисунок 35 – Влияние ЭМИ на люминесценцию бактерий

Примечание: а) адсорбционные центры в виде сильно связанных молекул воды на молекуле бактериальной люциферазы; б) механизм влияния ЭМИ на биолюминесценцию

Воздействия миллиметрового СВЧ-излучения направлены на смещение равновесия в распределении зарядов в системе и расширение адсорбированной фазы. Разделение зарядов приводит к появлению подвижных H⁺ и их миграции в «кислотные резервуары» [65, 200]. После чего эти протоны восстанавливают FMN до FMNH₂ и запускает реакцию люминесценции, выделяя энергию в виде излучения оптического диапазона $h\nu_2$ (Рисунок 35(б)).

Таким образом, изложенное выше доказывает перспективность как изучение механизмов воздействия СВЧ-излучения на бактериальные культуры, так и разработку методов и технологий на их основе для оптимизации *upstream process*.

Итогом представленной диссертационной работы явилось разработка метода повышения M-концентрации, интеграция этого метода с технологией получения биомассы и теоретического представления основных звеньев механизма возникновения СВЧ-эффектов в бактериальной культуре.

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÷10 мВт/см², продолжительность 25±5 мин, концентрация 1200±240 млн кл/мл, температура 37±1° С.
2. При оптимальных параметрах в стерильной питательной среде после СВЧ-облучения обнаружено наличие возбуждённых 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

1. 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 для конкретной среды и диаграммы направленности.
2. При конструировании устройств для пилотного и промышленного производства рекомендуется использовать антенные погружные решетки, которые обеспечат соблюдение условий толщины скин-слоя при глубинном культивировании.
3. 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/см², продолжительность 25 ± 5 мин, концентрация, при которой необходимо проводить облучение 1200 ± 240 млн кл/мл, температура $37 \pm 1^\circ$ 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 не ионизирующего 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 позволит получить разносторонние данные при пилотных испытаниях технологии и следовательно, оптимизировать существующие производственные процессы.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АСМ – атомно-силовая микроскопия

ГРМ-бульон – бульон гидролизата рыбной муки

ДН – диаграмма направленности

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МПБ – мясопептонный бульон

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ИК – инфракрасное излучение

КОЕ – колониеобразующие единицы

МР – методические рекомендации

МРС – среда Мана, Рогоза, Шарпа

ПФЭ – полный факторный эксперимент

РНК – рибонуклеиновая кислота

СВЧ – сверхвысокие частоты

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

ФС – фармстатья

ЭМИ – электромагнитное излучение

ЭМИНИ – электромагнитное излучение низкой интенсивности

ЭМП – электромагнитные поля

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

АТР – аденозинтрифосфорная кислота (АТФ)

АТР-аза (АТР-синтаза) – фермент осуществляет сопряженный с переносом протонов синтез/гидролиз АТР

NASA – National Aeronautics and Space Administration

$\Delta\mu_{\text{H}^+}$ – градиент концентрации протонов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Л.И. Цитоархитектоника органов иммуногенеза при экспериментальном воздействии переменного электромагнитного поля / Л.И. Александрова, М.Ю. Капитонова, Н.Г. Краюшкина // Морфология. – 2008. – 16 с.
2. Александрова, Л.И. Морфологические эффекты экспериментального воздействия электромагнитного поля на органы иммуногенеза / Л.И. Александрова, М.Ю. Капитонова, Н.Г. Краюшкина // Морфология. – 2009. – 8 с.
3. Альтшулер, Е.П. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности / Е.П. Альтшулер, Д.В. Серебряная, А.Г. Катруха // Усп. биол. химии. – 2010. – Т. 50. – С. 203-258.
4. Андреев, В.Е. Использование в биохимическом эксперименте явления межфазной конвекции в водных растворах при поглощении КВЧ-излучения / В.Е. Андреев, И.Г. Полников, К.Д. Казаринов // Электронная техника. Сер. 1., СВЧ-техника. – 2007. – № 2 (490). – С. 35-41.
5. Бецкий, О.В. Миллиметровые волны и живые системы // О.В. Бецкий, В.В. Кислов, Н.Н. Лебедева. – М.: САЙНС – ПРЕСС, 2004. – 272 с.
6. Бецкий, О.В. Волны и клетки / О.В. Бецкий, В.В. Кислов. – М.: Знание. Сер. Физика, 1990. – 62 с.
7. Богомолова, Н.В. Влияние электромагнитных полей КВЧ – диапазона на биоаминное окружение лимфоцитов селезеночного фолликула / Н.В. Богомолова, И.О. Бугаева // Астрахан. Мед. журн. – 2007. – Т. 2, № 2. – С. 36-37.
8. Борисенко, Г.Г. Использование гидродинамической неустойчивости при микроволновом облучении жидких сред в биохимическом эксперименте / Г.Г. Борисенко, И.Г. Полников, К.Д. Казаринов // Электронная техника. Сер. 1, Электроника СВЧ. – 2007. – № 1(489).

- С. 98-106.
9. Волькенштейн, М.В. Биофизика / М.В. Волькенштейн. – М.: Наука, 1981. – 576 с.
 10. Гамаюрова, В.С. Влияние ЭМИ КВЧ нетепловой интенсивности на рост дрожжей *Saccharomices cerevisiae* / В.С. Гамаюрова, А.Ю. Крыницкая, М.Н. Астраханцева // Журнал радиоэлектроники. – 2003. – № 3. – С. 1-6.
 11. ГОСТ Р 51317.4.3-99. «Устойчивость к радиочастотному электромагнитному полю. Требования и методы испытаний».
 12. Данилов, В.С. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / В.С. Данилов, А.П. Зарубина, Г.Е. Ерошников, Л.Н. Соловьева, Ф.В. Карташев, Г.Б. Завильгельский // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. – 2002. – № 3. – С. 20-24.
 13. Дрокина, Т.В. Действие миллиметровых волн на люминесценцию бактерий / Т.В. Дрокина, Л.Ю. Попова // Биофизика. – 1998. – Т. 43, № 3. – С. 522-525.
 14. Дюга, Г. Биоорганическая химия. Химические подходы к механизму действия ферментов / Г. Дюга, К. Пенин. – М.: Мир, 1983. – 512 с.
 15. Егоров, Н.С. Биотехнология: проблемы и перспективы / Н.С. Егоров, А.В. Олескин, В.Д. Самуилов. – М.: Высш. шк., 1987. – 159 с.
 16. Зарубина, А.П. Биолюминесценция генно-инженерного штамма *Escherichia coli* изменяется под действием электромагнитного GSM 905 МГц излучения / А.П. Зарубина, Л.И. Деев, И.М. Пархоменко, А.А. Байжуманов, Л.А. Новоселова // Медицинская физика. – 2010. – Т. 5. – С. 15-17
 17. Зарубина, А.П. Биотестирование тест-системой «Эколюм» влияния электромагнитного поля низкой интенсивности на токсичность бытовых стоков / А.П. Зарубина, М.Г. Гапочка, Л.А. Новоселова,

- Л.Д. Гапочка // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология. – 2012. – № 3. – С. 39.
18. Зверев, В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник / В.В. Зверев, М.Н. Бойченко, А.С. Быков. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 448 с.
19. Зотова, Е.А. Влияние комбинированного электромагнитного излучения и химических реагентов на биологические системы: специальность 03.00.16 «Экология»: автореф. диссертации на соиск. уч. степ. канд. биол. наук / Зотова Елена Анатольевна; ГОУ ВПО «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского». – Саратов, 2007. – 19 с.
20. Иванов, А.П. Особенности гидрофобной структуры иммуноглобулина G, характерного для злокачественного роста / А.П. Иванов, В.П. Коротковучко, Е.И. Чернявский // Украинский биохимический журнал. – 1980. – Т. 52, № 3. – С. 345.
21. Иоффе, И.Л. Проектирование процессов и аппаратов химической технологии / И.Л. Иоффе. – Ленинград: Химия, – 1998. – 411 с.
22. Казаринов, К.Д. Биологические эффекты КВЧ-излучения низкой интенсивности / К.Д. Казаринов // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. – 1990. – Т. 27. – 102 с.
23. Колесников, В.Г. Применение комбинированного воздействия электромагнитных и акустических волн на микроводоросли для выявления резонансных частот / В.Г. Колесников, Н.В. Древаль // Физика живого. – 2010. – Т. 18, № 3. – С. 24-28.
24. Креницкий, А.П. КВЧ - аэротерапия - новый, природный, естественный экологически чистый метод лечения / А.П. Креницкий, А.В. Майбородин // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 2002. – Т. 28, № 4. – С. 15-26.
25. Креницкий, А.П. Квазиоптический КВЧ генераторный комплекс

- моделирования детермированных шумов для биофизических исследований / А.П. Креницкий // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. – № 2. – С. 5–11.
26. Крыницкая, А.Ю. Влияние КВЧ-излучения на структурно-динамическое состояние модельных биомембран / А.Ю. Крыницкая, П.П. Суханов, Ю.Е. Седельников // Радиоэлектроника. – 2011. – №4. – С. 1-9.
27. Лакин, Г.Ф. Биметрия: учебное пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
28. Манувера, В.А. Разработка опухоль-адресованных генно-инженерных препаратов для иммунотерапии рака IV. Клонирование гена про-энтеротоксина В (entB) из *Staphylococcus aureus*, исследование его экспрессии и секреции в *Escherichia coli*. Метод очистки рекомбинантного белка / В.А. Манувера, Н.Н. Мордкович, Л.Б. Гулько, Н.А. Огорокова, В.П. Вейко, В.Г. Дебабов // Биотехнология. – 2008. – № 3. – С. 27-33.
29. Меркулов, А.В. Гигиеническая оценка магнитного поля промышленной частоты 50 Гц в производственных условиях: специальность 03.00.01 «Радиобиология», 14.00.07 «Гигиена»: автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук. / Меркулов Антон Владимирович; ГНЦ – Институт биофизики ФМБА России. – Москва, 2008. – 24 с.
30. Мышкин, В.Ф. Структура и свойства воды, облученной СВЧ излучением / В.Ф. Мышкин // КубГАУ. – 2012. – Т. 7, № 81. – С. 1–12.
31. Никольская, Е.А. Принцип прямого определения влагосодержания целлюлозы на основе ¹H ЯМР-релаксометрии / Е.А. Никольская, Л.Ю. Грунин, Ю.Б. Грунин // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 17, № 2. – С. 153-158.

32. Осипова, М.В. Интенсификация процесса брожения методом электронно-ионной обработки (ЭИО) пивных дрожжей: специальность 05.18.07 «Биотехнология пищевых продуктов (пивобезалкогольная, спиртовая и винодельческая промышленности): автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. тех. наук / Осипова Марина Владимировна; Новгородский ГУ им. Ярослава Мудрого. – Москва, 2007. – 26 с.
33. Патент 2073416 С 1 Российская Федерация, МПК А01G 7/00, А01G 7/04. Способ бесконтактного определения степени внешнего воздействия на биологический объект / Д.И. Стом, С.А. Кузнецов, О.Ю. Дмитриев, Т.А. Гиль, А.Э. Балаян, О.В. Бывшев, Т.Ф. Казаринова; заявитель и патентообладатель Д.И. Стом, С.А. Кузнецов, О.Ю. Дмитриев, Т.А. Гиль, А.Э. Балаян. - № 94034347/15; заявл. 30.09.1994; опубл. 20.02.1997. – 4 с.
34. Патент 2187801 С 2 Российская Федерация, МПК G01N 33/15, А61К 35/74. Способ определения антагонистической активности пробиотиков / В.А. Несчисляев, Р.А. Пшеничных, Е.Г. Арчакова, Л.П. Чистохина, И.В. Фадеева; заявитель и патентообладатель Пермское научно-производственное объединение «Биомед». - № 2000118391/14; заявл. 10.07.2000; опубл. 20.08.2002, Бюл. № 23. – 7 с.
35. Патент 2287014 С 2 Российская Федерация, МПК С12N 13/00, (2006.01). Способ изменения биологической активности микроорганизмов / С.А. Вызулин, В.И. Вызулина; заявитель и патентообладатель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Кубанский государственный университет (КубГУ) РФ. - № 2004137407/13; заявл. 21.12.2004; опубл. 10.11.2006, Бюл. № 31. – 15 с.
36. Патент 2291196 С 1 Российская Федерация, МПК С12Q 1/02,

- (2006.01). Способ определения воздействия электромагнитного излучения с помощью биолюминесценции бактерий / Т.В. Дрокина, Л.Ю. Попова, М.А. Битехтина; заявитель и патентообладатель Институт физики им. Л.В. Киренского Сибирского отделения РАН. - № 2005119244/15; заявл. 21.06.2005; опубл. 10.01.2007, Бюл. № 1. – 6 с.
37. Патент 2348694 С 1 Российская Федерация, МПК С12N 13/00, (2006.01). Устройство для облучения клеток биокультуры / А.П. Креницкий, А.В. Майбородин, В.Д. Тупикин, А.П. Рытик, Г.М. Шуб, Е.А. Пронина; заявитель и патентообладатель Открытое акционерное общество Центральный научно-исследовательский институт измерительной аппаратуры (ЦНИИИА) РФ, ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ. - № 2007129978/13; заявл. 06.08.2007; опубл. 10.03.2009, Бюл. № 7. – 7 с.
38. Попов, Е.М. Проблема белка в пяти томах. Структурная организация белка. – М.: Наука, 1997. – Т. 3 – 604 с.
39. Пронина, Е.А. Формирование бактериальных биопленок под воздействием электромагнитного излучения / Е.А. Пронина, И.Г. Швиденко, Г.М. Шуб // Фундаментальные исследования. – 2010. – №10. – С. 40-45.
40. Рехвиашвили, С.Ш. Влияние размерной зависимости поверхностного натяжения жидкой пленки на капиллярную силу в атомно-силовом микроскопе / С.Ш. Рехвиашвили, Б.А. Розенберг, В.В. Дремов // Письма в ЖЭТФ. – 2008. – Т. 88, вып. 11. – С. 887-891.
41. Романовский, Ю.М. Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза – вращающийся молекулярный мотор / Ю.М. Романовский, А.Н. Тихонов // УФН. – 2010. – Т. 180. – С. 931-956.

42. Савельев, С.В. Механизм действия многочастного и хаотического КВЧ-излучения на живые и водосодержащие объекты / С.В. Савельев, О.В. Бецкий, Л.А. Морозова // Журнал радиоэлектроники. – 2012. – №11. – С. 1-9.
43. Сеницын, Н.И. Особая роль структуризации водосодержащей среды в современных биомедицинских радиоэлектронных технологиях и нанотехнологиях будущего / Н.И. Сеницын, В.А. Ёлкин // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника: юбилейный выпуск к 100-летию со дня рождения Н.Д. Девяткова. – 2007. – № 2-4. – С. 31-43.
44. Тамбиев, А.Х. Применение активных частот электромагнитного излучения миллиметрового и сантиметрового диапазона в микробиологии / А.Х. Тамбиев, Н.Н. Кирикова, А.А. Лукьянов // Научные технологии. – 2002. – №1. – С. 212-213.
45. Тамбиев, А.Х. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы / А.Х. Тамбиев; под ред. Ю.В. Гуляева. – М.: Радиотехника, 2003. – 175 с.
46. Тамбиев, А.Х. Влияние добавления в среду цинка и действие КВЧ-излучения на изменение макро и микроэлементного состава клеток цианобактерий *Spirulina platensis* / А.Х. Тамбиев, Н.Н. Кирикова, О.А. Лябушева, Э.М. Седых, Л.Н. Банных, Л.Д. Румш // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. – № 10. – С. 43-56.
47. Тамбиев, А.Х. Возможность применения КВЧ-активаторов воды и водных растворов для стимуляции накопления биомассы у фотосинтезирующих организмов / А.Х. Тамбиев // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2004. – № 1. – С. 83–87.
48. Теппоне, М.В. Крайне высокочастотная (КВЧ)-терапия в онкологии / М.В. Теппоне, Р.С. Авакян // Миллиметровые волны в биологии и

медицине – 2003. – № 1. – С. 3–10.

49. Финкельштейн, А.В. Физика белка: курс лекций / А.В. Финкельштейн, О.Б. Птицын. – М.: Книжный дом университет, 2005. – 456 с.
50. Шепелин, А.П. Разработка технологии приготовления панкреатического гидролизата рыбной муки, используемой для конструирования питательных сред / А.П. Шепелин // ЖИЗНЬ. – 2012. – Т. 7, № 4. – С. 80-86.
51. Ahn, H. T. Effective Cryopreservation of a Bioluminescent Auxotrophic *Escherichia Coli*-Based Amino Acid Array to Enable Long-Term Ready-to-Use Applications / H.T. Ahn, I.S. Jang, T.V. Dang, Y.H. Kim, D.H. Lee, H.S. Choi, M.I. Kim // Biosensors. – 2021. – Vol. 11, № 8. – P. 252.
52. Albini, M. Induced movements of giant vesicles by millimeter wave radiation / M. Albini, S. Dinarelli, F. Pennella, S. Romeo, E. Zampetti, M. Girasole, A. Ramundo-Orlando // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2014. – Vol. 1838, № 7. – P. 1710-1718.
53. Bakowska, A. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex / A. Bakowska, A. Kucharska, J. Oszmianski // Food Chem. – 2003. – Vol. 81, № 3. – P. 349-355.
54. Barth, A. The infrared absorption of amino acid side chains / A. Barth // Progress in biophysics and molecular biology. – 2000. – Vol. 74, № 3. – P. 141-173.
55. Barraud, N. Webb involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* / N. Barraud, D.J. Hassett, S.H. Hwang, S.A. Rice, S. Kjelleberg, J.S. Webb // J. Bacteriol. – 2006. – Vol. 188, № 21. – P. 7344-7353.
56. Belyaev, I.Ya. Some biophysical aspects of the genetic effect of low-intensity millimeter waves / I.Ya. Belyaev // Bioelectrochem. Bioenerg. –

1992. – Vol. 27. – P. 11–18.

57. Belyaev, I.Y. Cooperative response of *Escherichia coli* cells to the resonance effect of millimeter waves at super low intensity / I.Y. Belyaev, Y.D. Alipov, V.S. Shcheglov, V.A. Polunin, O.A. Aizenberg // *Electro- and Magnetobiology*. – 1994. – Vol. 13, № 1. – P. 53-66.
58. Bhambhani, A. Evaluation of Microwave Vacuum Drying as an Alternative to Freeze-Drying of Biologics and Vaccines: the Power of Simple Modeling to Identify a Mechanism for Faster Drying Times Achieved with Microwave / A. Bhambhani, J. Stanbro, D. Roth, E. Sullivan, M. Jones, R. Evans, J. Blue // *AAPS PharmSciTech*. – 2021. – Vol. 22, № 1. – P. 1-16.
59. Bonechi, C. Ordering effect of protein surfaces on water dynamics: NMR relaxation study / C. Bonechi, G. Tamasi, A. Pardini, A. Donati, V. Volpi, G. Leone, C. Rossi // *Biophysical chemistry*. – 2019. – Vol. 249. – P. 1-7.
60. Bordons, A. Els bacteris de la fermentació malolàctica del vi / A. Bordons // *Omnis Cellula*. – 2011. – № 5. – P. 17–24.
61. Brazhkin, V.V. Metastable phases and ‘metastable’ phase diagrams / V.V. Brazhkin // *Journal of Physics: Condensed Matter*. – 2006. – Vol. 18, № 42. – P. 9643.
62. Brown, G.C. NO says yes to mitochondria / G.C. Brown // *Science*. – 2003. – Vol. 299, № 5608. – P.838-839.
63. Brown, G.C. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase / G.C. Brown // *Biochem. Biophys. Acta*. – 2001. – № 1504. – P. 46-57.
64. Buchner, R. The dielectric relaxation of water between 0° C and 35° C / R., Buchner, J. Barthel, J. Stauber // *Chem. Phys. Lett*. – 1999. – № 306. – P. 57-63.
65. Chai, B. Effect of radiant energy on near-surface water / B. Chai, H. Yoo, G. H. Pollack // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2009. – Vol. 113,

- № 42. – P. 13953-13958.
66. Chari, A. Cellular strategies for the assembly of molecular machines / A. Chari, U. Fischer // Trends Biochem. Sci. – 2010. – № 35. – P. 676-683.
67. Chen, C.S. Force field measurements within the exclusion zone of water / C.S. Chen, W.J. Hsu, I.C. Chung, C.M. Wu, W.C. Chin // Journal of biological physics. – 2012. – Vol. 38, № 1. – P. 113-120.
68. Chen, J. Reconstruction method for producing Vitamin C precursor 2-keto-L-gulonic acid (2-KLG) with gluconobacter oxydans: Patent No. CN102250822A Китай. – 2011.
69. Cheng, Y. Long-range interactions keep bacterial cells from liquid-solid interfaces: Evidence of a bacteria exclusion zone near Nafion surfaces and possible implications for bacterial attachment / Y. Cheng, C. I. Moraru // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2018. – Vol. 162. – P. 16-24.
70. Chilochi, A.A. Effect of millimeter-range electromagnetic radiation on the biosynthesis of extracellular hydrolytic enzymes in *Aspergillus* and *Penicillium micromyces* / A.A. Chilochi, Z.P. Tyurina, S.F. Klapko, M.V. Stratan, S.V. Lablyuk, E.G. Dvornina, V.F. Kondruk // Surface Engineering and Applied Electrochemistry. – 2011. – Vol. 47, № 6. – P. 558-564.
71. Chimerele, C. Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential / C. Chimerele, C.M. Field, S. Piñero-Fernandez, U.F. Keyser, D.K. Summers // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2012. – Vol. 1818, № 7. – P. 1590-1594.
72. Cifra, M. Electromagnetic cellular interactions / M. Cifra, J.Z. Fields, A. Farhadi // Progr. Biophys. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 105, № 3. – P. 223–246.
73. Ciloci, A. Action of millimeter-range electromagnetic radiation on polypeptide spectrum of amyolytic preparations from *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD 02A strain / A. Ciloci, C. Bivol, M. Stratan, J. Tiurina,

- S. Clapco, V. Reva, S. Labliuc // Surface Engineering and App. Electrochem. – 2014. – Vol. 50, № 1. – P. 72–77.
74. Clegg, J.S. Interrelationships between water and cell metabolism in *Artemia* cysts X. Microwave dielectric studies / J.S. Clegg, S. Szwarnowski, V.E.R. McClean, R. J. Sheppard, E.H. Grant // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 1982. – Vol. 721, № 4. – P. 458-468.
75. Clegg, J.S. Microwave dielectric measurements (0.8-70 GHz) on *Artemia* cysts at variable water content / J.S. Clegg // Physics in Medicine & Biology. – 1984. – Vol. 29, № 11. – P. 1409-1419.
76. Cohen, A.G. Effective field theory, black holes, and the cosmological constant / A.G. Cohen, D.B. Kaplan, A.E. Nelson // Phys. Rev. Lett. – 1999. – Vol. 82. – P. 4971–4974.
77. Cope, F.W. Nuclear magnetic resonance evidence using D₂O for structured water in muscle and brain / F.W. Cope // Biophys. J. – 1969. – Vol. 9, № 3. – P. 303-319.
78. Cope, F.W. Cell Potassium by ³⁹K Spin Echo Nuclear Magnetic Resonance / F.W. Cope, R. Damadian // Nature. – 1970. – № 228. – P. 76–77.
79. Das, R. Charge-based forces at the nafion–water interface / R. Das, G.H. Pollack // Langmuir. – 2013. – Vol. 29, № 8. – P. 2651–2658.
80. Debouzy, J.C. Effets biologiques des rayonnements millimétriques (94 GHz). Quelles conséquences à long terme? / J.C. Debouzy, D. Crouzier, V. Dabouis, R. Malabiau, C. Bachelet, A. Perrin // Pathologie biologique. – 2007. – Vol. 55, № 5. – P. 246-255.
81. Helm, D. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy / D. Helm, H. Labischinski, G. Schallehn, D. Naumann // Microbiology. – 1991. – Vol. 137, № 1. – P. 69-79.
82. Elia, V. Physical–chemical study of water in contact with a hydrophilic

- polymer: Nafion / V. Elia, E. Napoli, M. Niccoli // *J. Therm. Anal. Calorim.* – 2013. – Vol. 112, № 2. – P. 937–944.
83. Ericsson, J.D. Enclosed bioreactor system and methods associated therewith : Patent No. 8569050 CIIA. – 2013.
84. Figueroa, X.A. Exclusion-zone formation from discontinuous nafion surfaces / X.A. Figueroa, G.H. Pollack // *Int. J. Des. Nat. Ecodyn.* – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. 286-296.
85. Fisher, A.J. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions / A.J. Fisher, T.B. Thompson, J.B. Thoden, T.O. Baldwin, I. Rayment // *Journal of Biological Chemistry.* – 1996. – Vol. 271, № 36. – P. 21956-21968.
86. Galitskaya E. A. Self-diffusion micromechanism in Nafion studied by ²H NMR relaxation dispersion / E.A. Galitskaya, A.F. Privalov, M. Vogel, I.A. Ryzhkin, V.V. Sinitsyn // *The Journal of Chemical Physics.* – 2021. – Vol. 154, № 3. – P. 034904.
87. Gatti, A. Entangled imaging and wave-particle duality: from the microscopic to the macroscopic realm / A. Gatti, E. Brambilla, L.A. Lugiato // *Phys. Rev. Lett.* – 2008. – Vol. 90, № 13. – P. 133603–133608.
88. Geddes, C.D. Flow and static lysing systems and methods for ultra-rapid isolation and fragmentation of biological materials by microwave irradiation: Patent No. US10294451B2 CIIA. – 2019.
89. Ginesy, M. Tuning of the Carbon-to-Nitrogen Ratio for the Production of L-Arginine by *Escherichia coli* / M. Ginésy, D. Rusanova-Naydenova, U. Rova // *Fermentation.* – 2017. – Vol. 3, № 4. – P. 60.
90. Giudice, E.D. Water dynamics at the root of metamorphosis in living organisms / E.D. Giudice, P.R. Spinetti, A. Tedeschi // *Water.* – 2010. – Vol. 2, № 3. – P. 566-586.
91. Gray, G.L., Heyneker H.L. Recombinant procaryotic cell containing correctly processed human growth hormone: Patent No. US4859600

CIIIA. – 1989.

92. Gregor, C. Bioluminescent Imaging of Single Bacterial Cells Using an Enhanced lux Operon / C. Gregor // *Bioluminescent Imaging*. – Humana, New York, NY. – 2020. – P. 43-52.
93. Gurbatri, C. R. Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies / C.R. Gurbatri, I. Lia, R. Vincent, C. Coker, S. Castro, P.M. Treuting, T. Danino // *Science translational medicine*. – 2020. – Vol. 12, № 530. – P. 1-12.
94. Hagemeyer, C.E. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents / C.E. Hagemeyer, C. von Zur Muhlen, D. von Elverfeldt, K. Peter // *Thromb Haemost.* – 2009. – Vol. 101, № 6. – P. 1012-1019.
95. Hagner, M. Assessing toxicity of metal contaminated soil from glassworks sites with a battery of biotests / M. Hagner, M. Romantschuk, O.P. Penttinen, A. Egfors, C. Marchand, A. Augustsson // *Science of the Total Environment*. – 2018. – Vol. 613. – P. 30-38.
96. Hadjiloucas, S. Preliminary results on the non-thermal effects of 200–350 GHz radiation on the growth rate of *S. cerevisiae* cells in microcolonies / S. Hadjiloucas, M.S. Chahal, J.W. Bowen // *Phys. Med. Biol.* – 2002. – Vol. 47, № 21. – P. 3831–3839.
97. Hazlewood, C.F. A view of the significance and understanding of the physical properties of cell-associated water // *Cell Associated Water* – 1979. – P. 165-259.
98. Hazlewood, C.F. Evidence for a minimum of two phases of ordered water in skeletal muscle / C.F. Hazlewood, B.L. Nichols, N.F. Chamberlain // *Nature*. – 1969. – № 222. – P. 747-750.
99. HeeáCho, C. Liquid water and biological systems: the most important problem in science that hardly anyone wants to see solved / C. HeeáCho, G. WilseáRobinson // *Faraday Discussions*. – 1996. – Vol. 103. – P. 19-

- 27.
100. Heliotis, G. Hybrid inorganic/organic semiconductor heterostructures with efficient non-radiative energy transfer / G. Heliotis, G. Itskos, R. Murray, M.D. Dawson, I.M. Watson, D.D. Bradley // *Advanced Materials*. – 2006. – Vol. 18, № 3. – P. 334-338.
101. Holl, R.A. Methods and apparatus for materials processing. Patent No. US09802037 CIIA – 2001.
102. Huang J. F. Systematic analysis of bottlenecks in a multibranching and multilevel regulated pathway: the molecular fundamentals of l-methionine biosynthesis in *Escherichia coli* / J.F. Huang, Z.Y. Shen, Q.L. Mao, X.M. Zhang, B. Zhang, J.S. Wu, Y.G. Zheng // *ACS synthetic biology*. – 2018. – Vol. 7, № 11. – P. 2577-2589.
103. Huber, R. How many-particle interactions develop after ultrafast excitation of an electron-hole plasma / R. Huber, F. Tauser, A. Brodschelm, M. Bichler, G. Abstreiter, A. Leitenstorfer // *Nature*. – 2001. – Vol. 414, № 6861. – P. 286-289.
104. Ignarro, L.J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide / L.J. Ignarro, C. Napoli, J. Loscalzo // *Circ Res*. – 2002. – № 90. – P. 21-28.
105. Josephson, L. Magnetic nanosensors for the detection of oligonucleotide sequences / L. Josephson, J. M. Perez, R. Weissleder // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2001. – Vol. 40, № 17. – P. 3204-3206.
106. Junior, E.C.P.L. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans / E.C.P.L. Junior, R.A.B. Lopes-Martins, A.A. Vanin, B.M. Baroni, D. Grosselli, T. De Marchi, J.M. Bjordal // *Lasers in medical science*. – 2009. – Vol. 24, № 3. – P. 425-431.
107. Kadner, R.J. Cytoplasmic membrane / R.J. Kadner // *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. – 1996. – Vol. 1. – P. 58-87.

108. Kaiser, F. Coherent oscillations in biological systems: Interaction with extremely low frequency fields / F. Kaiser // *Radio Science*. – 1982. – Vol. 17, № 5S. – P. 17S–22S.
109. Karu, T. Ten lectures on basic science of laser phototherapy / T. Karu // Prima Books AB, GraËngesberg. Sweden. – 2007. – P. 25–30.
110. Karu, T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation / T.I. Karu // *J. Photochem. Photobiol.* – 2008. – № 84. – P. 1091-1099.
111. Karu, T.I. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation / T.I. Karu, L.V.Pyatibrat, N.I. Afanasyeva // *Photochem. Photobiol.* – 2004. – № 80. – P. 366–372.
112. Karu, T.I. Donors of NO and pulsed radiation at $\lambda = 820$ nm exert effects on cells attachment to extracellular matrices / T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, G.S. Kalendo // *Toxicol. Lett.* – 2001. – № 121. – P. 57–61.
113. Karu, T.I. Thiolreactive agents eliminate stimulation of cell attachment to extra-cellular matrices induced by irradiation at $\lambda = 820$ nm: Possible involvement of cellular redox status into low power laser effects / T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, G.S. Kalendo // *Laser Ther.* – 2001. – № 11. – P. 177–187.
114. Karu, T.I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation / T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, S.F. Kolyakov, N.I. Afanasyeva // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2005. – Vol. 81, № 2. – P. 98-106.
115. Kazarinov, K.D. Interface convection in water as a primary mechanism of extra high frequency irradiation / K.D. Kazarinov, A.V. Putvinsky, V.S. Malinin // *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine: Plenum Publishing Corporation*. N.Y. – 1998. – P. 569–572.
116. Kinosita, K. A rotary molecular motor that can work at near 100%

- efficiency / K. Kinoshita, R. Yasuda, H. Noji, K. Adachi // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 2000. – Vol. 355, № 1396. – P. 473-489.
117. Klimov, A. Visualization of charge-carrier propagation in water / A. Klimov, G.H. Pollack // *Langmuir*. – 2007. – Vol. 23, № 23. – P. 11890-11895.
118. Kouzai, M. Characterization of 60GHz Millimeter-Wave Focusing Beam for Living-Body Exposure Experiments / M. Kouzai, A. Nishikata // *Proc. EMC'09*. – 2009. – P. 309-312.
119. Kowacz, M. Infrared light-induced protein crystallization. Structuring of protein interfacial water and periodic self-assembly / M. Kowacz, M. Marchel, L. Juknaitė, J.M. Esperança, M.J. Romão, A.L. Carvalho, L.P.N. Rebelo // *Journal of Crystal Growth*. – 2017. – Vol. 457. – P. 362-368.
120. Kralj, J. M. Electrical spiking in *Escherichia coli* probed with a fluorescent voltage-indicating protein / J.M. Kralj, D.R. Hochbaum, A.D. Douglass, A.E. Cohen // *Science*. – 2011. – Vol. 333, № 6040. – P. 345-348.
121. Laage, D. Water dynamics in the hydration shells of biomolecules / D. Laage, T. Elsaesser, J. T. Hynes // *Chemical Reviews*. – 2017. – Vol. 117, № 16. – P. 10694-10725.
122. Le Quement, C. Whole-genome expression analysis in primary human keratinocyte cell cultures exposed to 60 GHz radiation / C. Le Quément, C. Nicolas Nicolaz, M. Zhadobov, F. Desmots, R. Sauleau, M. Aubry, Y. Le Dréan // *Bioelectromagnetics*. – 2012. – Vol. 33, № 2. – P. 147-158.
123. Leal Junior, E.C.P. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans / E.C.P. Leal Junior, R.Á.B. Lopes-Martins, R.P. Rossi, T. De Marchi, B.M. Baroni, V. De Godoi, J.M. Bjordal // *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*. – 2009. – Vol. 41, № 8. – P. 572-

- 577.
124. Li, J. Evolution of *E. coli* phytase for increased thermostability guided by rational parameters / J. Li, X. Li, Y. Gai, Y. Sun, D. Zhang // *Journal of microbiology and biotechnology*. – 2019. – Vol. 29, № 3. – P. 419-428.
 125. Ling, G.N. A convergence of experimental and theoretical breakthroughs affirms the PM theory of dynamically structured cell water at the theory's 40th birthday. / G.N. Ling // *Water and the Cell*. – 2006. – P. 1-52.
 126. Ling, G.N. A new theoretical foundation for the polarized-oriented multilayer theory of cell water and for inanimate systems demonstrating Long-range Dynamic Structuring of Water Molecules / G.N. Ling // *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*. – 2003. – Vol. 35, № 2. – P. 91–130.
 127. Ling, G.N. *A Revolution in the Physiology of the Living Cell*. Krieger Publ. Co., Malabar, Fl. – 1992. – P. 404.
 128. Ling, G.N. Nano-protoplasm: the ultimate unit of life / G.N. Ling // *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*. – 2007. – Vol. 39, № 2. – P. 111–234.
 129. Luo, Z. Effect of microwave radiation on the physicochemical properties of normal maize, waxy maize and amylo maize V starches / Z. Luo, X. He, X. Fu, F. Luo, Q. Gao // *Starch-Stärke*. – 2006. – Vol. 58, № 9. – P. 468-474.
 130. Luthi, T. Stereoscopic passive millimeter-wave imaging and ranging / T. Luthi, C. Matzler // *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*. – 2005. – Vol. 53, № 8. – P. 2594-2599.
 131. Mani, I. *Microbial Production of Vitamins* / I. Mani // *Engineering of Microbial Biosynthetic Pathways*. – Springer, Singapore. – 2020. – P. 143-152.
 132. Mattson, J. The pioneers of NMR and magnetic resonance in medicine: the story of MRI / J. Mattson, M. Simon // *Ramat Gan: Bar – Ilan University Press*. – 1996. – P. 714.
 133. Matveev, V.V. Native aggregation as a cause of origin of temporary

- cellular structures needed for all forms of cellular activity, signaling and transformations / V.V. Matveev // *Theoretical Biol. Med. Model.* – 2010. – Vol. 7, № 19. – P. 1-22.
134. Methneni, N. Persistent organic and inorganic pollutants in the effluents from the textile dyeing industries: Ecotoxicology Appraisal via a battery of Biotests / N. Methneni, J.A. Morales-González, A. Jaziri, H.B. Mansour, M. Fernandez-Serrano // *Environmental Research.* – 2021. – P. 110956.
135. Mishra, T. Effect of low power microwave radiation on microorganisms and other life forms / T. Mishra, P. Kushwah, K. Dholiya, V. Kothari // *Adv Microwave Wireless Technol.* – 2013. – Vol. 1, № 1. – P. 4-11.
136. Morgan, R. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* / R. Morgan, S. Kohn, S.H. Hwang, D.J. Hassett, K. Sauer // *Journal of bacteriology.* – 2006. – Vol. 188, № 21. – P. 7335-7343.
137. Motzkin, S.M. Effects of low-level millimeter waves on cellular and subcellular systems / S.M. Motzkin, L. Benes, N. Block, B. Israel, N. May, J. Kuriyel, Q. Han // *Coherent Excitations in Biological Systems.* – Springer, Berlin, Heidelberg. – 1983. – P. 47-57.
138. Mulkidjanian, A.Y. Proton transfer dynamics at membrane/water interface and mechanism of biological energy conversion / A.Y. Mulkidjanian, D.A. Cherepanov, J. Heberle, W. Junge // *Biochemistry (Moscow).* – 2005. – Vol. 70, № 2. – P. 251-256.
139. Mulkidjanian, A.Y. Protons@ interfaces: implications for biological energy conversion / A.Y. Mulkidjanian, J. Heberle, D.A. Cherepanov // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.* – 2006. – Vol. 1757, № 8. – P. 913-930
140. Nakajima, H. Overexpression of the robA gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in

- Escherichia coli* / H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi, H. Asako, R. Aono // *Applied and environmental microbiology*. – 1995. – Vol. 61, № 6. – P. 2302-2307.
141. Nesta, B. Vaccines against *Escherichia coli* / B. Nesta, M. Pizza // *Escherichia coli*, a versatile pathogen. – 2018. – P. 213-242.
142. Nicholls, D.G. Bioenergetics 3 / D.G. Nicholls, S.J. Ferguson // San Diego, Calif.: Acad. Press. – 2002. – P. 299.
143. Nikaido, H. Outer Membrane / H. Nikaido // *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. – 1996. – P. 29-47.
144. Ostrovsky, M.A. Comparison of ultraviolet induced photo-kinetics for lens-derived and recombinant b-crystallins / M.A. Ostrovsky, Y.V. Sergeev, D.B. Atkinson, L.V. Soustov, J.F. Hejtmancik // *Mol Vis*. – 2002. – Vol. 8. – P. 72-78.
145. Ovchinnikova, K. Can water store charge? / K. Ovchinnikova, G.H. Pollack // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 25, № 1. – P. 542–547.
146. Pastore, D. Specific He-Ne laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase / D. Pastore, M. Greco, S. Passarella // *Int. J. Radiat. Biol*. – 2000. – Vol.76 – P. 863–870.
147. Perez, J.M. Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions / J.M. Perez, L. Josephson, T. O'Loughlin, D. Högemann, R. Weissleder // *Nature biotechnology*. – 2002. – Vol. 20, № 8. – P. 816-820.
148. Pitkanen, M. More Precise TGD based view about quantum biology and prebiotic evolution (Part I). *DNA Decipher Journal*. – 2015. – P. 111-143.
149. Pokrovskii, V.N. Problems of thermodynamics of living organisms. *Thermodynamics of Complex Systems Principles and applications*. – 2020. – P. 9-1 – 9-15.
150. Pollack, G.H. *The fourth phase of water* // Ebner & Sons publishers, Seattle. – 2013. – P. 14-18.
151. Pollack, G.H. *The minimal cell and life's origin: Role of water and*

- aqueous interfaces / G.H. Pollack, X. Figueroa, Q. Zhao // *The Minimal Cell*. – Springer Netherlands. – 2011. – P. 105–121.
152. Pollack, G.H. Molecules, water, and radiant energy: new clues for the origin of life / G.H. Pollack, X. Figueroa, Q. Zhao // *Inter. J. Mol. Sci.* – 2009. – Vol. 10, № 4. – P. 1419–1429.
153. Pollack, G.H. Why Biological Water Differs from H₂O and Acts Like. Bioelectromagnetic and Subtle Energy Medicine. – 2014. – P. 105.
154. Pollack, G.H. Why Hydrogels Don't Dribble Water / G.H. Pollack // *Gels*. – 2017. – Vol. 3, № 4. – P. 43-50.
155. Postolakyi, O.M. MM radiation influence upon the growth and lipid formation of *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 and its variants / O.M. Postolakyi, S.A. Boortseva // *Surface Engineering and App. Electrochem.* – 2009. – Vol. 45, № 2. – P. 157-160.
156. Powell, W.J., Boehmer, R.D., Johnson, L.L., Swartz, K., Lenci, D. E. Flow tube reactor: Patent No. US8765452 CIIA. – 2014.
157. Prindle, A. Ion channels enable electrical communication in bacterial communities / A. Prindle, J. Liu, M. Asally, S. Ly, J. Garcia-Ojalvo, G.M. Süel // *Nature*. – 2015. – Vol. 527, № 7576. – P. 59-63.
158. Ramundo-Orlando, A. The response of giant phospholipid vesicles to millimeter waves radiation / A. Ramundo-Orlando, G. Longo, M. Cappelli, M. Girasole, L. Tarricone, A. Beneduci, R. Massa // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2009. – Vol. 1788, № 7. – P. 1497-1507.
159. Roberts, I.S. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria / I.S. Roberts // *Annual Reviews in Microbiology*. - 1996. – Vol. 50, № 1. – P. 285-315.
160. Rojas-Lopez, M. Intestinal pathogenic *Escherichia coli*: insights for vaccine development / M. Rojas-Lopez, R. Monterio, M. Pizza, M. Desvaux, R. Rosini // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1-

- 17.
161. Roy, R. The structure of liquid water; novel insights from materials research; potential relevance to homeopathy / R. Roy, W.A. Tiller, I. Bell, M.R. Hoover // *Materials Research Innovations*. – 2005. – Vol. 9, № 4. – P. 98-102.
162. Saksonov, M.N. Comparison of the sensitivity of luminescent methods in water Biotesting containing priority pollutants / M.N. Saksonov, A.E. Balayan, N.F. Kashina, O.A. Barkhatova, A.D. Stom // *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*. – 2019. – Vol. 19, № 5.1. – P. 117-123.
163. Samad, A. Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying / A. Samad, P.V. Devarajan // *Aaps Pharmscitech*. – 2010. – Vol. 11, № 1. – P. 304-313.
164. Sandberg T. E. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology / T.E. Sandberg, M.J. Salazar, L.L. Weng, B.O. Palsson, A.M. Feist // *Metabolic engineering*. – 2019. – Vol. 56. – P. 1-16.
165. Shah, U. Effect of infrared and microwave radiations on properties of Indian Horse Chestnut starch / U. Shah, A. Gani, B.A. Ashwar, A. Shah, I.A. Wani, F.A. Masoodi // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Vol. 84. – P. 166-173.
166. Shu, G. Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature / G. Shu, Z. Wang, L. Chen, H. Wan, H. Chen // *LWT*. – 2018. – Vol. 90. – P. 70-76.
167. Sirenko, L.A. Express control of growth and physiological state of microalgae / L.A. Sirenko, T.V., Parshikova, T.Y., Shchegoleva, V. G. Kolesnikov // *International Journal on Algae*. – 2002. – Vol. 4, № 1. – P. 106-117.

168. Spackman, M.A. Dipole moment enhancement in molecular crystals from X-ray diffraction data / M.A. Spackman, P. Munshi, B. Dittrich // *Chemphyschem.* – 2007. – Vol.8, № 14. – P. 2051-2063.
169. Tambiev, A.K. Novel concepts of the causes of EHF-radiation-induced stimulating effects / A.K. Tambiev, N.N. Kirikova // *Critical reviews in biomedical engineering.* – 2000. – Vol. 28, № 5-6. – P. 60-76.
170. Tanaka, S., Tsujimoto, M., Wada, Y., Tsuruoka, N., Nakazato H. Novel polypeptide having an anti-tumor activity and a method of preparation thereof: Patent No. US4948875 CIIIA. – 1990.
171. Taricska, N. Hydration shell differentiates folded and disordered states of a Trp-cage miniprotein, allowing characterization of structural heterogeneity by wide-line NMR measurements / N. Taricska, M. Bokor, D.K., Menyhárd, K. Tompa, A. Perczel // *Scientific reports.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 1-9.
172. Terwilliger, T.C. Maximum-likelihood density modification / T.C. Terwilliger // *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography.* – 2000. – Vol. 56, № 8. – P. 965–972.
173. Thomä S. L. J. Atomic insight into hydration shells around faceted nanoparticles / S.L. Thomä, S.W. Krauss, M. Eckardt, P. Chater, M. Zobel // *Nature communications.* – 2019. – Vol. 10, № 1. – P. 1-7.
174. Torgomyan, H. Changes in ion transport through membranes, ATPase activity and antibiotics effects in *Enterococcus hirae* after low intensity electromagnetic irradiation of 51.8 and 53.0 GHz frequencies / H. Torgomyan, V. Ohanyan, S. Blbulyan, A.Trchounian // *Biophysics.* – 2013. – Vol. 58, № 4. – P. 524-529.
175. Torgomyan, H. Low intensity electromagnetic irradiation with 70.6 and 73 GHz frequencies affects *Escherichia coli* growth and changes water properties / H. Torgomyan, V. Kalantaryan, A. Trchounian // *Cell Biochem. Biophys.* – 2011. – Vol. 60, № 3. – P. 275-281.

176. Torgomyan, H. Effects of low intensity electromagnetic irradiation of 70.6 and 73 GHz frequencies and antibiotics on energy-dependent proton and potassium ion transport by *E. coli* / H. Torgomyan // Indian journal of biochemistry & biophysics. – 2012. – Vol. 49, № 6. – P. 428-434.
177. Toyabe, S. Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of F1-ATPase / S. Toyabe, T. Watanabe-Nakayama, T. Okamoto, S. Kudo, E. Muneyuki // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – Vol. 108, № 44. – P. 17951-17956.
178. Trchunian, A. Membranotropic effects of electromagnetic radiation of extremely high frequency on *Escherichia coli* / A. Trchunian, E. Ogandzhanian, E. Sarkisian, S. Gonian, A. Oganessian, S. Oganessian // Biofizika. – 2001. – Vol. 46, № 1. – P. 69-76.
179. Trevors, J.T. A perspective on the mobilization, localization and delivery of molecules in the crowded bacterial cytoplasm / J.T. Trevors // Curr. Issues Mol. Biol. – 2012. – Vol. 14, № 2. – P. 39-46.
180. Trevors, J.T. Physical and biochemical nature of the bacterial cytoplasm: movement and localization of mRNA and the 30S subunits of ribosomes / J.T. Trevors // Progr. Biophys. Mol. Biol. – 2012. – Vol. 109, № 1. – P. 1-5.
181. Trevors, J.T. Origin of microbial life hypothesis: a gel cytoplasm lacking a bilayer membrane, with infrared radiation producing exclusion zone (EZ) water, hydrogen as an energy source and thermosynthesis for bioenergetics / J.T. Trevors, G.H. Pollack // Biochimie. – 2012. – Vol. 94, № 1. – P. 258-262.
182. Tršić-Milanović, N. The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria. / N. Tršić-Milanović, A. Kodžić, J. Baras, S. Dimitrijević-Branković // Journal of the Serbian Chemical Society. – 2001. – Vol. 66, № 7. – P. 435-441.
183. Trushin, M.V. Light-mediated «conversation» among microorganisms / M.V. Trushin // Microbiol. Res. – 2004. – Vol. 159, № 1. – P. 1-10.

184. Tsimmerman, I.S. Effectiveness of ulcer treatment with electromagnetic radiation of extremely high frequency (EHF therapy) and some mechanism of its therapeutic action / I.S. Tsimmerman, I.I. Teliaper // *Klinicheskaia meditsina*. – 2001. – Vol. 80, № 5. – P. 13-18.
185. Tuner, J. Low Level Laser Therapy, clinical practice and scientific Wavelength / J. Tuner, L. Hode // *Acad. Laser Dentistry. USA*. – 2001. – Vol. 9, № 1. – P. 15-16.
186. Ulmer, T.S. Evaluation of backbone proton positions and dynamics in a small protein by liquid crystal NMR spectroscopy / T.S. Ulmer, B.E. Ramirez, F. Delaglio, A. Bax // *J. American Chem. Society*. – 2003. – Vol. 125, № 30. – P. 9179-9191.
187. Usatii, A. The influence of low intensity millimeter waves on the multiplication and biosynthetic activity of *Saccharomyces carlsbergensis CNMN-Y-15 YEAST* / A. Usatii, E. Molodoi, A. Rotaru, T. Moldoveanu // *Annals of the University of Oradea-Faculty of Biology*. – Romania. – 2010. – № 17. – P. 208-212.
188. Wang, L. Kinetic characterization of a slow chemical exchange between two sites in N, N-dimethylacetamide by CEST NMR spectroscopy / L. Wang, J. Li, J. Xiang, J. Cui, Y. Tang // *Chinese Chemical Letters*. – 2022. – Vol. 33, № 9. – P. 4335-4338.
189. Wang, P.X. Low power microwave irradiation process for breeding lactic acid bacteria: Patent No. CN101045922A Китай. – 2006.
190. Wolf, D.A. Growth stimulation of biological cells and tissue by electromagnetic fields and uses thereof. Patent No. US6485963B1 США. – 2000.
191. Yamamoto, T. Nitric oxide donors / T. Yamamoto, R. Bing, // *PSE BM*. – 2000. – Vol. 225. – P. 200-206.
192. Yang, Q. Effect of microwave irradiation on internal molecular structure and physical properties of waxy maize starch / Q. Yang, L. Qi, Z. Luo, X.

- Kong, Z. Xiao, P. Wang, X. Peng // *Food Hydrocolloids*. – 2017. – Vol. 69. – P. 473-482.
193. Yoo, H. Impact of hydrophilic surfaces on interfacial water dynamics probed with NMR spectroscopy / H. Yoo, R. Paranj, G.H. Pollack // *Phys. Chem. Lett.* – 2011. – Vol. 2, № 6. – P. 532-536.
194. Yu, G. A study on biological effects of low-intensity millimeter waves / G. Yu, E.A. Coln, K.H. Schoenbach, M. Gellerman, P. Fox, L. Rec, S.J. Beebe, L. Shenggang // *IEEE Transactions on Plasma Science*. – 2002. – Vol. 30, № 4. – P. 1489-1496.
195. Zarubina, A.P. Effect of low intensity electromagnetic radiation on the toxicity of domestic wastewater tested with the “ecolum” test system / A.P. Zarubina, M.G. Gapochka, L.A. Novoselova, L.D. Gapochka // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. – 2013. – Vol. 68, № 1. – P. 49–52.
196. Zelovich T. Hydronium ion diffusion in model proton exchange membranes at low hydration: Insights from ab initio molecular dynamics / T. Zelovich, K.I. Winey, M.E. Tuckerman // *Journal of Materials Chemistry A*. – 2021. – Vol. 9, № 4. – P. 2448-2458.
197. Zhao, H. Increasing L-threonine production in *Escherichia coli* by engineering the glyoxylate shunt and the L-threonine biosynthesis pathway / H. Zhao, Y. Fang, X. Wang, L. Zhao, J. Wang, Y. Li // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2018. – Vol. 102, № 13. – P. 5505-5518.
198. Zheng, J. Water and the Cell: Solute exclusion and potential distribution near hydrophilic surfaces / J.M. Zheng, G.H. Pollack // Springer, Netherlands. – 2006. – P. 165-174.
199. Zheng, J.M. Surfaces and interfacial water: evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact / J.M. Zheng, W.C. Chin, E. Khijniak, Jr.E. Khijniak, G.H. Pollack // *Advances in colloid and interface science*.

– 2006. – Vol. 127, № 1. – P. 19-27.

200. Zheng, J.M. Long-range forces extending from polymer-gel surfaces / J.M. Zheng, G.H. Pollack // *Phys. Rev.* – 2003. – Vol. 68, № 3. – P. 031408.1-031408.7.
201. Zolotarev, V.M. Dispersion and absorption of liquid water in the infrared and radio regions of the spectrum / V.M. Zolotarev, B.A. Mikhilov, L.L. Alperovich, S.I. Popov // *Optics and Spectroscopy.* – 1969. – Vol. 27. – P. 430-432.