

ние процессов дыхания и фосфорилирования, позволяет говорить о наличии серьезных органических нарушений в дыхательной цепи митохондрий. Более выраженное снижение дыхательного коэффициента по Чансу-Вильямсу указывает, что ухудшение тканевого дыхания вызвано нарушением интактности мембран митохондрий, вызванное их взаимодействием с полиэлектролитами. Таким образом, в отношении невирусных ферментов ингибирующие концентрации оказались достоверно выше. Вследствие чего, можно заключить, что диапазон концентраций от 0 до 19 мМ для ПСС-8 и от 0 до 9 мкМ для ПАА (6 кДа) является нетоксическим для организма, как было показано ранее, но с сохранением выраженного противовирусного эффекта, обусловленного ингибированием нейраминидазной активности вируса гриппа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Артюшенко С.В., Контаров Н.А., Юминова Н.В., Зверев В.В., Контарова Е.О., Балаев Н.В. Влияние полиэлектролитов на инфекционность вируса кори. Журн. микробиол. 2011, 4: 36-40.
2. Барковский Е.В., Бокуть С.Б., Бородинский А.Н. Современные проблемы биохимии. Минск, Вышэйша школа, 2013.
3. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., МГУ, 1976.
4. Контаров Н.А., Ермакова А.А., Гребенкина Н.С., Юминова Н.В., Зверев В.В. Изучение противовирусной активности полиэлектролитов в отношении вируса гриппа. Вопросы вирусологии. 2015, 60 (4): 5-9.
5. Мейхи Б.В. Дж. Вирусология: Методы. М., Мир, 1988.
6. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. Kinetics of oxygen utilization. J. Biol. Chem. 1955, 1 (217): 383-393.
7. Lardy H.A., Wellman H. Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. J. Biol. Chem. 1952, 1(195): 215-224.

Поступила 07.03.19

Контактная информация: Контаров Николай Александрович, к.б.н.,  
119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2, р.т. (499)246-99-01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*А.О.Смирнова<sup>1,2</sup>, С.А.Барановская<sup>2</sup>, М.М.Токарская<sup>2</sup>, С.И.Елкина<sup>2</sup>, Н.Е.Ястребова<sup>2</sup>*

## **МОДЕЛИ ЗАВИСИМОСТИ КОЛИЧЕСТВА БИОМАССЫ STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE И ЕГО КАПСУЛЬНОГО ПОЛИСАХАРИДА ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ**

<sup>1</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева, <sup>2</sup>НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова, Москва

*Цель.* Разработка полусинтетической питательной среды, обеспечивающей получение максимального количества капсульного полисахарида (КПС). *Материалы и методы.* В работе использовали штамм 521 S. pneumoniae серотипа 23F. Культивирование проводили в пробирках с 10 мл полусинтетической питательной среды определенного состава. Количество полисахарида в пробах определялось с помощью ракетного иммуноэлектрофореза. Построение моделей и сравнение влияния различных компонентов осуществлялось согласно методике, указанной в учебном пособии. Расчет коэффициентов уравнения и оценка адекватности самих уравнений проводился с применением пакетов RStudio версии 1.0.153. *Результаты.* В результате серии экспериментов были вычислены коэффициенты уравнений регрессии, оценена их значимость и построены модели зависимости продукции биомассы и КПС в зависимости от состава питательной среды. Для решения поставленной задачи был проведен эксперимент согласно методу Бокса-Уилсона. В качестве оптимизируемых параметров были выбраны концентрации пептона и глюкозы.

Величина шага  $\Delta S_i$  в направлении увеличения градиента рассчитывалась, исходя из коэффициентов регрессионного уравнения. Одновременно с этим определялся точный характер зависимости. Оптимальные расчетные концентрации пептона и глюкозы, при которых образование КПС максимально, составляют 32,6 и 12,1 г/л соответственно. При этом прогноз выхода полисахарида составляет 239 мг/л. *Заключение.* С помощью метода дробного факторного эксперимента были получены модели зависимости количества биомассы *S. pneumoniae* и его капсульного полисахарида от состава питательной среды. Были найдены оптимальные концентрации компонентов среды, которые позволяют увеличить по сравнению со стандартной прописью уровень образования биомассы на 10%, а КПС — в 1,5 — 2 раза.

Журн. микробиол., 2019, № 4, С. 68—72

Ключевые слова: пневмококк, биомасса, капсульный полисахарид, полнофакторный эксперимент, математическое прогнозирование, коэффициенты уравнений регрессии

*A.O.Smirnova*<sup>1,2</sup>, *S.A.Baranovskaya*<sup>2</sup>, *M.M.Tokarskaya*<sup>2</sup>, *S.I.Elkina*<sup>2</sup>, *N.E.Yastrebova*<sup>2</sup>

## MODELS OF DEPENDENCE OF THE QUANTITY OF THE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* BIOMASS AND HIS CAPSULAR POLYSACCHARIDE FROM THE COMPOSITION OF THE FEEDING ENVIRONMENT

<sup>1</sup>Mendeleev Russian University of Chemical Technology, <sup>2</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* The development of a semi-synthetic nutrient medium that provides the maximum amount of capsular polysaccharide (CPS). *Materials and methods.* We used the strain 521 of *S. pneumoniae* serotype 23F. Cultivation was carried out in test tubes with 10 ml of polysynthetic nutrient medium of a specific composition. The amount of polysaccharide in the samples was determined using rocket immunoelectrophoresis. Building models and comparing the effects of various components was carried out according to the methodology specified in the tutorial. The calculation of the coefficients of the equation and the assessment of the adequacy of the equations themselves was carried out using RStudio version 1.0.153. *Results.* As a result of a series of experiments, the coefficients of the regression equations were calculated, their significance was evaluated, and models of dependence of biomass production and CPS were constructed depending on the composition of the nutrient medium. To solve the problem, an experiment was carried out according to the Box-Wilson method. The peptone and glucose concentrations were selected as optimized parameters. The step size  $\Delta S_i$  in the increasing gradient direction was calculated based on the coefficients of the regression equation. At the same time, the exact nature of the dependence was determined. The optimal calculated concentrations of peptone and glucose, at which the formation of CPS is maximum, are 32.6 and 12.1 g/l, respectively. In this case, the forecast yield of the polysaccharide is 239 mg/l. *Conclusion.* Using the method of fractional factorial experiment, models of the dependence of the biomass amount of *S. pneumoniae* and its capsular polysaccharide on the composition of the nutrient medium were obtained. The optimal concentrations of the components of the medium were found, which make it possible to increase the level of biomass formation by 10% compared to the standard formulas, and the CPS — by 1.5—2 times.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 4, P. 68—72

Key words: pneumococcus, biomass, capsular polysaccharide, full factorial experiment, mathematical prediction, coefficients of regression equations

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наблюдается постоянный рост числа случаев внебольничной пневмонии, 30—50% которых вызваны *Streptococcus pneumoniae*. Основной проблемой лечения является формирование устойчивости пневмококка ко многим классам антибиотиков, что влечет за собой значительное снижение эффективности лечебных мероприятий [2]. По этой причине, особую актуальность приобретает вакцинация в качестве методики борьбы с такими заболеваниями. Так как основной стадией производства вакцины является получение капсульного полисахарида, важно подобрать оптимальные условия культивирования штаммов-продуцентов *S. pneumoniae*.

Целью данного исследования явилась разработка полусинтетической питательной среды, обеспечивающей получение максимального количества капсульного полисахарида (КПС). Поскольку эмпирический подбор концентраций каждого компонента является трудоемким процессом, мы прибегнули к методам математического прогнозирования. Для этого была оценена степень их влияния на количество биомассы и КПС после суточного культивирования *S. pneumoniae*, путем проведения ряда опытов по плану полнофакторного эксперимента (ПФЭ).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была выбрана культура *S. pneumoniae* серотипа 23F шт. 521. Штамм выделен в естественных условиях из трахеального аспирата детей с заболеванием органов дыхания в лаборатории микробиологии НЦЗД РФ.

В качестве минерально-солевой основы для питательной среды использовалась пропись Ледерберга (на 1 л среды): 7 г  $K_2HPO_4$ ; 3 г  $KH_2PO_4$ ; 0,1 г  $MgSO_4$ ; 1 г  $(NH_4)_2SO_4$ ; 6 г NaCl [4]. «Нулевые» концентрации для соевого пептона и глюкозы составляли 20 г/л и 12,5 г/л соответственно. Дополнительно вносилась смесь витаминов, содержащая 1,6 мг рибофлавина мононуклеотида; 1,6 мг никотиновой кислоты; 8 мг тиамин хлорида; 8 мг пиридоксина.

Культивирование проводили в пробирках с 10 мл полисинтетической питательной среды определенного состава. Выращивание проходило при температуре 37°C в атмосфере с повышенным содержанием углекислого газа (5%) в течение 24 часов.

Оптическую плотность (ОП) проб определяли на фотоэлектрокалориметре при длине волны 530 нм. Количество полисахарида в пробах определялось с помощью ракетного иммуноэлектрофореза [3]. Построение моделей и сравнение влияния различных компонентов осуществлялось согласно методике, указанной в учебном пособии [1]. Расчет коэффициентов уравнения и оценка адекватности самих уравнений проводился с применением пакетов RStudio версии 1.0.153.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, необходимые для построения модели и сравнения степени влияния различных компонентов, были получены в ходе проведения дробного факторного эксперимента, разбитого на два ПФЭ. В первой серии опытов варьировались концентрации пептона и глюкозы на двух уровнях: 10 и 30 г/л для пептона, 5 и 20 г/л для глюкозы. Дополнительно исследовался рост пневмококка при пептоне в концентрации 20 г/л, но при полном отсутствии глюкозы. Затем исследовалось изменение количества биомассы и КПС в зависимости от наличия или отсутствия холина (50 мг/л) и витаминов в среде. Все варианты концентраций компонентов представлены в табл.

**Матрица опытов для построения регрессионной модели**

№ опыта	№ варианта	Наименование факторов (концентраций компонентов среды)			
		$x_1$ , соевый пептон, г/л	$x_2$ , глюкоза, г/л	$x_3$ , холин, мг/л	$x_4$ , витамины, мл/л
1	1	(+) 30	(+) 20	0	0,8
	2	(+) 30	(-) 5	0	0,8
	3	(-) 10	(+) 20	0	0,8
	4	(-) 10	(-) 5	0	0,8
	5	20	0	0	0,8
2	6	20	12,5	(+) 50	(+) 0,8
	7	20	12,5	(+) 50	(-) 0
	8	20	12,5	(-) 0	(+) 0,8
	9	20	12,5	(-) 0	(-) 0

Так как количество микроорганизмов может различаться и, следовательно, ОП посевной культуры варьироваться, для построения адекватных моделей в качестве выходных переменных были выбраны натуральный логарифм отношения оптической плотности суточной культуры и в момент посева  $\ln(N/N_0)$  и скорректированное количество полисахарида с учетом заданной начальной ОП, равной 0,2 ( $P \cdot 0,2 / y_{нач}$ ). Этот выбор обусловлен линейной зависимостью ОП от концентрации биомассы и равной вероятностью деления каждой клетки во время процесса культивирования.

В результате серии экспериментов были вычислены коэффициенты уравнений регрессии, оценена их значимость и построены модели зависимости продукции биомассы и КПС в зависимости от состава питательной среды. Адекватность коэффициентов была оценена с помощью критерия Стьюдента  $t$  ( $p = 0,05$  при  $\alpha = 0,95$ ), а полученных уравнений — по критерию Фишера  $F$ .

Отмечено, что количество биомассы и КПС в разной степени зависели от питательных веществ. Холин и витамины существенно повышали рост пневмококка. Предположительно, они не влияли на полисахарид, поскольку, согласно тесту Стьюдента для нескольких независимых выборок, средние значения выборок равны. Глюкоза менее значима, чем пептон, поскольку пневмококк хорошо рос в среде с пониженным ее содержанием. Однако полное отсутствие глюкозы существенно ухудшало рост, то есть ей нельзя пренебрегать при подготовке питательной среды. Выход КПС зависел только от начального содержания пептона, причем полиномиальная зависимость второй степени более точно описывала экспериментальные данные по сравнению с линейной.

Для решения поставленной задачи, а именно нахождения состава оптимальной питательной среды для пневмококка, был проведен эксперимент согласно методу Бокса-Уилсона [1]. В качестве оптимизируемых параметров были выбраны концентрации пептона и глюкозы. Величина шага  $\Delta S_i$  в направлении увеличения градиента рассчитывалась, исходя из коэффициентов регрессионного уравнения. Одновременно с этим определялся точный характер зависимости.

Исходя из полученного значения шага, проводилось культивирование на пяти питательных средах с соответствующими концентрациями пептона и глюкозы. Солевой состав аналогичен предыдущим средам.

Данные опыта по уточнению зависимости образования продуктов при увеличении концентраций пептона и глюкозы по градиенту говорят о том, что в действительности обе зависимости не являются линейными и имеют максимумы в промежутке концентраций 26 — 32 г/л для пептона и 13,54 — 14,6 г/л для глюкозы. При более высоком содержании этих компонентов, предположительно, происходит ингибирование роста. Поэтому согласно результатам были построены новые модели, представляющие собой полиномы второй степени, которые более точно описывали экспериментальные данные. Зависимости прироста биомассы и образования КПС представлены на рис. 1 и 2 соответственно.

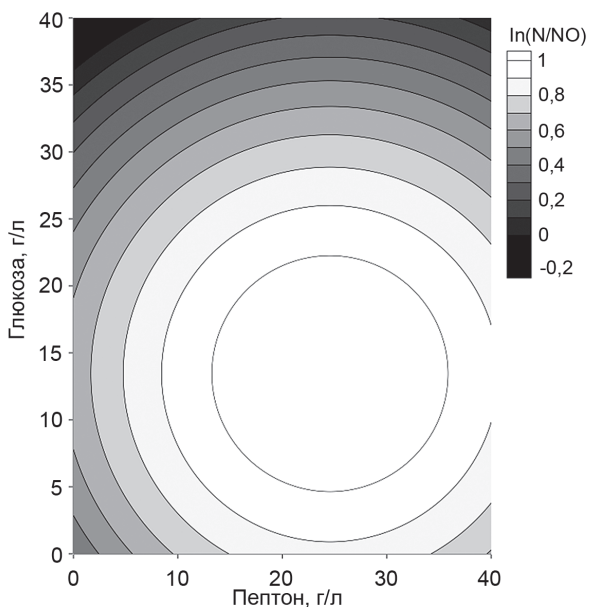
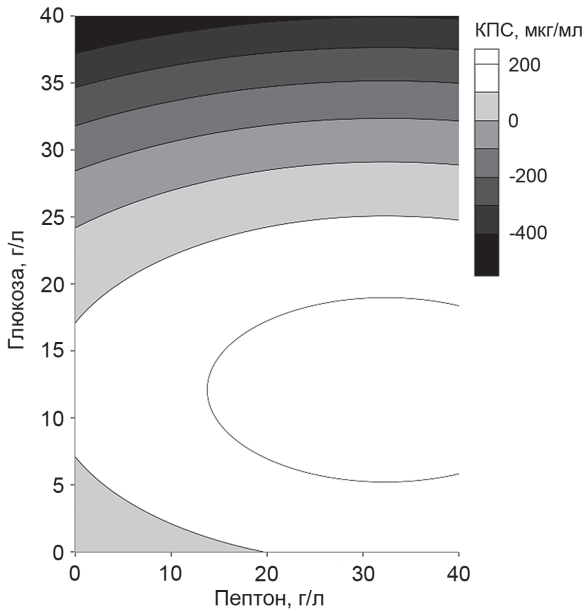


Рис. 1. Поверхность функции отклика  $\ln(N/N_0)$  от концентрации пептона и глюкозы



**Рис. 2.** Поверхность функции отклика количества КПС от концентрации пептона и глюкозы

Таким образом, с помощью метода дробного факторного эксперимента были получены модели зависимости количества биомассы *S. pneumoniae* и его капсульного полисахарида от состава питательной среды. Были найдены оптимальные концентрации компонентов среды, которые позволяют увеличить по сравнению со стандартной прописью уровень образования биомассы на 10%, а КПС — в 1,5 — 2 раза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюков В.В., Галицкая Л.И., Кантере В.М. Основы промышленной биотехнологии. М., Колос, 2004.
2. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2013, 2(3): 91-123.
3. Laurell C.B. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Analytical Biochemistry. 1966, 1(15): 45-52.
4. Lederberg J. Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria. Methods Med. Res. 1950, 195(3): 5-22.

*Поступила 17.10.18*

Контактная информация: Ястребова Наталия Евгеньевна, д.м.н., 105064, Москва, М. Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-07-41