

Влияние органических источников углерода на синтез рекомбинантного белка в клетках *Escherichia coli*

И. Ю. Славченко

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

*Исследовано влияние различных источников углерода на синтез рекомбинантного альфа-2 интерферона человека клетками *E. coli* SG30 (pIF-16). Установлено, что при культивировании продуцента при температуре 37 °С выход рекомбинантного белка увеличивается при добавлении в питательную среду глицерина, рамнозы, фруктозы, сорбита, а уменьшается — при содержании в среде глюкозы, мальтозы, маннита, ксилозы. Показано, что негативное влияние этих веществ носит температурозависимый характер и сопровождается резким понижением рН культуральной среды. Обсуждаются возможные механизмы влияния источников углерода в культуральной среде на синтез рекомбинантного белка в клетках *E. coli*.*

Введение. *E. coli* является наиболее широко используемым микроорганизмом для получения белков как про-, так и эукариотического происхождения. При разработке биотехнологий получения рекомбинантных белков особое внимание необходимо уделять условиям культивирования продуцента, поскольку они могут оказывать существенное влияние на выход целевого продукта. Так, оптимальная температура для роста бактерий не всегда является оптимальной для синтеза рекомбинантного белка. А питательная среда должна обеспечивать не только хороший рост культуры, но и высокий уровень синтеза целевого продукта. При подборе оптимального состава ростовой среды используют различные источники углерода и энергии, азота, витамины, аминокислоты и т. д. При этом за основу берут как раствор, содержащий только неорганические соли [1—3], так и среды, в состав которых входят сложные природные вещества, в частности, дрожжевой экстракт и пептон [4]. В ряде работ показано, что добавление в среду для культивирования продуцента такого легкометаболизированного источника углерода, как глюкоза, обеспечивает увеличение выхода целевого продукта [1, 5].

Однако во многих случаях содержание глюкозы в среде вызывает эффект «Crabtree», сопровождающийся образованием клетками *E. coli* ацетата, что, в свою очередь, оказывает негативное влияние как на рост бактериальных клеток, так и на выход рекомбинантного белка [4, 6—8]. Кроме того, при экспрессии целевых генов под транскрипционным контролем промоторов, чувствительных к катаболитной репрессии, использование глюкозы может также привести к снижению уровня синтеза целевого продукта [5]. Поэтому в последнее время исследователями все большее внимание уделяется изучению эффективности использования различных веществ в качестве источников углерода в средах для культивирования продуцентов целевых белков [1—3, 9—11].

Анализ литературных данных показал, что содержание того или иного источника углерода в среде может существенно влиять на конечный выход целевого продукта. В связи с этим при разработке генно-инженерных биотехнологий получения рекомбинантных белков, в частности, условий культивирования продуцента необходимо учитывать метаболические эффекты, которые могут воздействовать как на рост клеток штамма-продуцента, так и на эффективность синтеза чужеродного продукта. Цель настоящей работы состояла в изу-

чении влияния различных источников углерода в составе культуральной среды на выход биомассы и уровень синтеза рекомбинантного альфа-2b интерферона (ИФН) человека в клетках *E. coli*.

Материалы и методы. В работе использовали ранее полученный нами продуцент ИФН — *E. coli* SG30 (*pIF-16*) *recA* (*F'*, *araD139*, Δ (*argF-lac*)*U169*, *flbB5301*, *deoC1*, *rpsL150*, *relA1*, Δ *lon-100*, *cps-50::Mu d1*) [12, 13]. Рекомбинантная плазида *pIF-16* несет tandem искусственных генов ИФН под контролем тандема триптофановых промоторов [15]. В качестве генетического маркера она содержит ген *bla* (β -лактамазы), обеспечивающий устойчивость трансформированных клеток к ампициллину.

Среды. Для определения способности клеток штамма — продуцента ИФН утилизировать тот или иной источник углерода использовали цветную среду Гисса [16] следующего состава: 100 мл дистиллированной воды; 1 г пептона («Difco», США), 0,5 г NaCl, 0,1 мл 1,6 %-го раствора индикатора бромтимолового синего. Готовую среду разливали по 3 мл в стерильные пробирки с поплавками, расположенными запаянным концом вверх, и автоклавировали при 0,5 атм. на протяжении 30 мин. Во время стерилизации поплавок заполняется доверху питательной средой. Перед засеваем среды в пробирку добавляли стерильный раствор необходимого источника углерода до конечной концентрации 0,5 %. Культуру выращивали в термостате при температуре 37 °С. Среда с данным индикатором имеет болотно-зеленый цвет (рН 7,0—7,2). В результате роста бактерий, сопровождающегося расщеплением углевода с образованием кислых продуктов распада, цвет среды изменяется и она становится желтой.

Образование газа в среде определяли по наличию пузырьков, собирающихся в поплавке. Наблюдение за ростом, кислото- и газообразованием проводили ежедневно в течение 5 дней.

Для культивирования продуцента использовали питательную среду следующего состава: вода — 1 л, NaCl — 10 г, дрожжевой экстракт («Difco») — 5 г, пептон («Difco») — 10 г. В среду добавляли ампициллин до конечной концентрации 20 мкг/мл. В зависимости от условий эксперимента в среду вносили 10- или 20 %-й раствор одного из следующих веществ — арабинозы, галактозы, глюкозы, ксилозы, маннозы, рамнозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, фруктозы, целлобиозы, инулина, рафинозы, глицерина, дульцита, инозита, маннита, сорбита, салицина.

Культуры поддерживали на чашках Петри с агаризованной средой, содержащей ампициллин,

без добавления изучаемых источников углерода. Концентрация агара в среде составляла 1,5 %.

Для определения уровня синтеза ИФН клетками *E. coli* SG30 (*pIF-16*) питательную среду, содержащую ампициллин, засеивали в соотношении 1:10 предварительно полученным инокулятом, выращенным в термостате при температуре 37 °С в течение ночи. Затем инокулированную среду по 10 мл разливали в колбы объемом 25 мл и в каждую, кроме контроля, вносили раствор одного из вышеуказанных источников углерода до конечной концентрации 0,5 %. Культуру выращивали на качалке в условиях интенсивной (160 об/мин) аэрации при 37 или 28 °С в течение 18 ч.

Выход биомассы определяли по оптической плотности (ОП) на фотоколориметре КФК-3 (Россия) при $\lambda = 540$ нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Величину рН измеряли на рН-метре-милливольтметре рН-150М («Антех», Беларусь).

Пробы для электрофоретического анализа суммарных белков клетки готовили, как описано в работе [16]. Электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [17] в 12,5 %-м полиакриламидном геле в присутствии 1 %-го SDS с последующим прокрашиванием в растворе кумасси R-250.

Процентное содержание ИФН в лизатах плазмидосодержащих клеток устанавливали денситометрированием соответствующих дорожек геля с помощью прибора Image Master («Pharmacia Biotech», Швеция).

Результаты и обсуждение. Природа и концентрация источника углерода в метаболизме бактерий имеют существенное значение, поэтому изучение влияния этих факторов на биосинтез рекомбинантных белков в бактериальных клетках может позволить разработать новые подходы для оптимизации экспрессии чужеродных генов в *E. coli*. Ранее нами было показано, что при культивировании продуцента ИФН *E. coli* SG30 (*pIF-16*) при температуре 37 °С в среде, содержащей в качестве источников углерода глюкозу или мальтозу, уровень выхода ИФН по сравнению со средой без добавления этих сахаров существенно снижается. При этом установлено, что выход ИФН зависит от температуры культивирования продуцента и концентрации данных сахаров в питательной среде [16]. В этой связи представляло интерес изучение влияния на уровень синтеза рекомбинантного ИФН других источников углерода, для чего необходимо было установить, какие именно источники углерода метаболизируются клетками *E. coli* SG30 (*pIF-16*). С этой целью изучаемую культуру засеивали в питательную среду с индикатором и различными соединениями, как описано в разделе «Материалы

Результаты тестирования способности клеток штамма — продуцента ИФН *E. coli* SG30 (*pIF-16*) образовывать кислоту и газ при росте на среде с различными источниками углерода

Источник углерода	Образование					
	кислоты*			газа**		
	1-е сут	3-е сут	5-е сут	1-е сут	3-е сут	5-е сут
Моносахариды						
Арабиноза	—	—	—	—	—	—
Галактоза	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+
Ксилоза	+	+	+	+	+	+
Манноза	+	+	+	+	+	+
Рамноза	+	+	+	+	+	+
Дисахариды						
Лактоза	—	—	—	—	—	—
Мальтоза	+	+	+	+	+	+
Сахароза	—	—	—	—	—	—
Фруктоза	+	+	+	+	+	+
Целлобиоза	—	—	—	—	—	—
Трисахариды						
Инулин	—	—	—	—	—	—
Рафиноза	—	—	—	—	—	—
Спирты						
Глицерин	—	+	+	—	—	+
Дульцит	—	—	—	—	—	—
Инозит	—	—	—	—	—	—
Маннит	+	+	+	+	+	+
Сорбит	+	+	+	+	+	+
Гликозиды						
Салицин	—	+	+	—	+	+
Контроль	—	—	—	—	—	—

Примечание. *(-) — среда имеет болотно-зеленый и (+) — желтый цвет; **(-) — отсутствие и (+) — присутствие пузырьков воздуха в поплавке.

и методы», а затем учитывали, какие из них подверглись расщеплению под действием ферментов растущих бактерий с образованием кислоты и/или газов. Полученные результаты представлены в таблице.

Клетки продуцента ИФН *E. coli* SG30 (*pIF-16*), согласно генотипу, не должны утилизировать арабинозу благодаря мутации *araD139*, а также лактозу, так как несут делецию $\Delta(\textit{argF-lac})U169$, что мы и наблюдали в данном эксперименте. В контрольном варианте, в который дополнительно не вносили какого-либо источника углерода, образования кислоты и газа также не было. Во всех

случаях, когда наблюдали образование кислоты, имело место и образование газа.

На основании полученных данных для дальнейшей работы отобраны следующие источники углерода: моносахариды — глюкоза, ксилоза, рамноза; дисахариды — мальтоза и фруктоза; спирты — глицерин, маннит, сорбит. Для изучения влияния данных веществ на уровень синтеза ИФН клетками *E. coli* SG30 (*pIF-16*) штамм-продуцент культивировали, как описано в разделе «Материалы и методы». Учитывая ранее полученные нами результаты [16], показывающие, что негативное влияние на синтез рекомбинантного белка может

иметь температурозависимый характер, исследования проводили как при 37, так и 28 °С. В ходе работы осуществляли анализ следующих параметров: выход биомассы определяли по ОП культуры, выход целевого продукта — по процентному содержанию ИФН в суммарном препарате белков клетки, а также контролировали значение pH культуральной среды в конце ферментации.

Полученные данные по выходу биомассы представлены на рис. 1. Так, наименьший выход биомассы отмечен в контроле как при температуре 28 (ОП 3,7), так и 37 °С (ОП 5,5). Наиболее высокая ОП культуры при 28 °С наблюдалась на средах, содержащих глицерин (9,5), маннит (8,8), сорбит (8,5) и мальтозу (7,95). А при температуре 37 °С — на средах с фруктозой (18,0), глицерином (16,0) и сорбитом (15,0). При культивировании продуцента при температуре 37 °С выход биомассы на всех средах был выше, чем при 28 °С.

Выход биомассы из единицы объема является очень важным показателем биотехнологического процесса, поскольку конечный выход рекомбинантного белка определяется не только уровнем синтеза активного целевого продукта в клетке, но и количеством клеток, способных суперпродуцировать чужеродный белок. Полученные результаты показывают, что добавление в ростовую среду тех или иных источников углерода может привести к существенному увеличению биомассы. Так, при культивировании продуцента ИФН при температуре 28 °С добавление в среду глицерина позволило увеличить выход биомассы по сравнению с контролем более чем в 2,5 раза. А при культивировании продуцента ИФН при температуре 37 °С внесение в среду фруктозы привело к увеличению выхода биомассы по сравнению с контролем более чем в 3 раза.

Однако добавление в среду источника углерода может влиять не только на увеличение выхода биомассы, но и на уровень синтеза рекомбинантного белка. В ходе данной работы установлено, что в зависимости от используемого источника углерода и температуры культивирования выход ИФН может как повышаться, так и понижаться (рис. 2). Анализируя результаты, полученные при культивировании продуцента ИФН при температуре 37 °С, используемые в данной работе источники углерода можно разделить на две группы. Первую группу составляют соединения, добавление которых в среду приводит к увеличению выхода целевого продукта (глицерин, рамноза, фруктоза, сорбит), а вторую — соединения, при внесении в среду которых выход рекомбинантного ИФН уменьшается (глюкоза, ксилоза, мальтоза, маннит).

Положительное влияние источника углерода

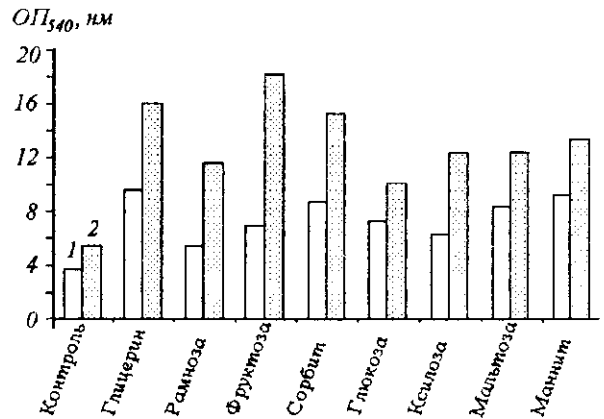


Рис. 1. Выход биомассы при выращивании продуцента ИФН при температуре 28 (1) и 37 (2) °С на средах с различными источниками углерода

на выход рекомбинантного белка может быть связано с увеличением энергетической и питательной ценности среды, поскольку клетке нужны энергия и строительный материал для активного синтеза как клеточных, так и целевого продуктов. Кроме того, недавно показано [9], что углеводы могут усиливать экспрессию чужеродных генов, индуцируя осмотические стрессовые ответы в *E. coli*. В результате осмотического стресса повышается уровень фактора σ^S — сигма-субъединицы РНК полимеразы. Фактор σ^S (или σ^{38}), кодирующийся *groS* геном, играет важную роль в регуляции транскрипции в течение стационарной фазы роста бактериальной клетки [18].

В экспериментах *in vitro* показано, что триптофановый промотор распознается голоферментами РНК-полимеразы, содержащими как σ^{70} , так и σ^S фактор [19]. Поэтому можно предположить, что поскольку гены ИФН в составе плазмиды *pIF-16* находятся под контролем тандема триптофановых промоторов, повышение в клетке количества молекул фактора σ^S может оказывать положительное влияние на инициацию транскрипции непосредственно рекомбинантного гена. Кроме того, σ^S контролирует экспрессию более 50 генов, вовлеченных в клеточный ответ на осмотический стресс, а также другие стрессовые состояния, такие как тепловой шок, голодание, холодный шок (см., обзоры [20, 21]). В их числе могут быть гены, кодирующие факторы, которые тем или иным способом положительно влияют на процесс биосинтеза целевого продукта. Именно этим можно объяснить тот факт, что добавление в культуральную среду такого бедного источника углерода, как глицерин, позволило

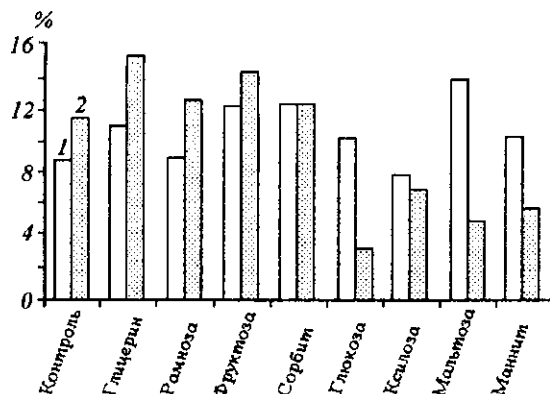


Рис. 2. Выход целевого продукта (% от суммарных белков клетки) при выращивании продуцента ИФН при температуре 28 (1) и 37 (2) °С на средах с различными источниками углерода

нам на 30 % увеличить выход ИФН по сравнению с контролем. Таким образом, наиболее высокий выход ИФН (рис. 2) зарегистрирован нами при культивировании продуцента ИФН при температуре 37 °С в питательной среде, содержащей в качестве источника углерода глицерин. В литературе же описаны примеры как положительного [2, 9, 22], так и отрицательного [11, 23] влияния глицерина на выход целевых белков.

Наблюдаемое в эксперименте резкое угнетение экспрессии рекомбинантного белка при культивировании продуцента при температуре 37 °С на средах с глюкозой, ксилозой, маннитом и мальтозой может обуславливаться несколькими причинами. С одной стороны, эти вещества при данных условиях культивирования могут влиять на уровень синтеза бактериальных белков, тем или иным способом оказывающих негативное влияние на какой-либо из этапов экспрессии чужеродного продукта.

С другой стороны, содержание данных веществ в ростовой среде может приводить к накоплению ацетата, который (как это описано для глюкозы) может отрицательно влиять на рост бактериальных клеток и синтез чужеродного продукта. В данной работе угнетения роста клеток *E. coli* SG30 (*pIF-16*) в вариантах, содержащих в питательной среде глюкозу, ксилозу, мальтозу или маннит при культивировании продуцента при температуре как 28, так и 37 °С, мы не наблюдали (рис. 1). Однако было обнаружено, что в конце культивирования продуцента при 37 °С в вариантах, где выход рекомбинантного белка был угнетен, показатели pH культуральной среды были очень низкими — 4,4—4,7 (рис. 3). В то же время во всех вариантах,

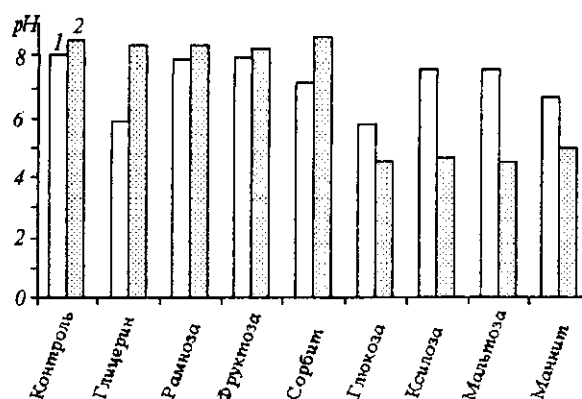


Рис. 3. Значение pH культуральной среды после завершения ферментации. Продуцент ИФН выращивали при температуре 28 (1) и 37 (2) °С на средах с различными источниками углерода

в которых не отмечалось угнетения выхода рекомбинантного белка, величина pH была выше 8,0. Таким образом, в условиях данного эксперимента наблюдается полная корреляция между значением pH и негативным влиянием глюкозы, ксилозы, мальтозы и маннита на выход ИФН при культивировании продуцента при 37 °С. Интересным также является тот факт, что это явление носит температурозависимый характер для всех четырех соединений, что может свидетельствовать о схожем механизме отрицательного воздействия этих веществ на выход рекомбинантного ИФН.

Таким образом, в результате изучения влияния на синтез ИФН клетками *E. coli* SG30 (*pIF-16*) различных источников углерода показано, что при культивировании продуцента при температуре 37 °С их содержание в ростовой среде в концентрации 0,5 % может как увеличивать, так и уменьшать выход целевого продукта. Выход рекомбинантного белка возрастает при добавлении в питательную среду глицерина, рамнозы, фруктозы, сорбита, а уменьшается — при содержании в среде глюкозы, ксилозы, мальтозы, маннита. Установлено, что негативное влияние всех четырех веществ носит температурозависимый характер и сопровождается резким понижением pH культуральной среды. Прирост биомассы в большей или меньшей степени увеличивается при добавлении в среду всех используемых в данной работе источников углерода при культивировании продуцента при температуре как 28, так и 37 °С.

Автор выражает признательность Е. В. Борейко за постановку отдельных экспериментов, Е. Н. Пехоте — за денситометрирование гелей.

I. Yu. Slavchenko

The influence of organic carbon sources on the production of a recombinant protein in *Escherichia coli* cells

Summary

The influence of different carbon sources in growth media on the production of a recombinant protein (IFN) in *E. coli* cells was investigated. It was ascertained that upon the cultivation of the IFN producer *E. coli* SG30 (pIF-16) at 37 °C the carbon sources content in the media may cause either increase or decrease in the yield of target product. The level of recombinant protein production increases when glycerol, rhamnose, fructose, sorbitol are added to the cultivation media, while glucose, maltose, mannitol, xylose decreases it. The negative influence of these carbon sources was shown to be temperature-dependent and followed by strong reduction in pH of medium. Possible mechanisms of influence of carbon sources in the media on the production of a recombinant protein in *E. coli* cells are discussed.

I. Ю. Славченко

Вплив органічних джерел вуглецю на синтез рекомбінантного білка в клітинах *Escherichia coli*

Резюме

Досліджено вплив різних джерел вуглецю на синтез рекомбінантного альфа-2 інтерферону людини (ІФН) клітинами *E. coli* SG30 (pIF-16). Встановлено, що при культивуванні продуцента за температури 37 °C вихід рекомбінантного білка збільшується при додаванні до поживного середовища гліцерину, рамнози, фруктози, сорбіту, а зменшується — при наявності у середовищі глюкози, мальтози, манніту, ксилози. Виявлено, що негативний вплив цих речовин носить температурозалежний характер і супроводжується різким зниженням pH культурального середовища. Обговорюються можливі механізми впливу джерел вуглецю у культуральному середовищі на синтез рекомбінантного білка в клітинах *E. coli*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmidt R. A., Qu J., Williams J. R., Brusilow W. S. Effects of carbon source on expression of F0 genes and on the stoichiometry of the c subunit in the F1F0 ATPase of *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1998.—180, N 12.—P. 3205.
- Park S. J., Gunsalus R. P. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products // J. Bacteriol.—1995.—177, N 21.—P. 6255—6262.
- Park S. J., Cotter P. A., Gunsalus R. P. Regulation of malate dehydrogenase (*mdh*) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability // J. Bacteriol.—1995.—177, N 22.—P. 6652—6656.
- Nancib N., Branlant C., Boudrant J. Metabolic roles of peptone and yeast extract for the culture of a recombinant strain of *Escherichia coli* // J. Ind. Microbiol.—1991.—8, N 3.—P. 165—169.
- Chagneau C., Heyde M., Alonso S., Portier R., Laloi P. External-pH-dependent expression of the maltose regulon and *ompF* gene in *Escherichia coli* is affected by the level of glycerol kinase, encoded by *glpK* // J. Bacteriol.—2001.—183, N 19.—P. 5675—5683.
- Luli G. W., Strohl W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations // Appl. Environ. Microbiol.—1990.—56, N 4.—P. 1004—1011.
- Van de Walle M., Shiloach J. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation // Biotechnol. Bioeng.—1998.—57, N 1.—P. 71—78.
- Farmer W. R., Liao J. C. Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli* // Appl. Environ. Microbiol.—1997.—63, N 8.—P. 3205—3210.
- Kagawa N., Cao Q. Osmotic stress induced by carbohydrates enhances expression of foreign proteins in *Escherichia coli* // Arch. Biochem. and Biophys.—2001.—393, N 2.—P. 290—296.
- Tseng C. P., Yu C. C., Lin H. H., Chang C. Y., Kuo J. T. Oxygen- and growth rate-dependent regulation of *Escherichia coli* fumarase (*FumA*, *FumB*, and *FumC*) activity // J. Bacteriol.—2001.—183, N 2.—P. 461—467.
- Eppler T., Boos W. Glycerol-3-phosphate-mediated repression of *malT* in *Escherichia coli* does not require metabolism, depends on enzyme IIA^{Glc} and is mediated by cAMP levels // Mol. Microbiol.—1999.—33, N 6.—P. 1221—1231.
- Славченко И. Ю. Отбор чувствительных к бактериофагу λ клонов из устойчивого к нему штамма *Escherichia coli* // Биополимеры і клітина.—2001.—17, № 2.—С. 160—165.
- Славченко И. Ю. Экспрессия альфа-2в интерферона человека в различных штаммах *Escherichia coli* // Биополимеры і клітина.—2001.—17, № 6.—С. 546—550.
- Кравченко В. В., Гилева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувило С. А., Коробко В. Г. Дупликация синтетического гена лейкоцитарного интерферона человека и его экспрессия в составе полицистронных мРНК с сопряженной системой трансляции // Биоорг. химия.—1987.—13, № 9.—С. 1186—1193.
- Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований.—М.: Медицина, 1972.—480 с.
- Славченко И. Ю. Изучение особенностей синтеза альфа-2в интерферона человека в клетках *Escherichia coli* при различных условиях культивирования // Биополимеры і клітина.—2002.—18, № 2.—С. 164—170.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
- Jishage M., Ishihama A. A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1998.—95, N 9.—P. 4953—4958.
- Tanaka K., Takayanagi Y., Fujita N., Ishihama A., Takahashi H. Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90, N 8.—P. 3511—3515.
- Loewen P. C., Hu B., Strutinsky J., Sparling R. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli* // Can. J. Microbiol.—1998.—44, N 8.—P. 707—717.
- Hengge-Aronis R. Back to log phase: σ^S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli* // Mol. Microbiol.—1996.—21, N 5.—P. 887—893.
- Leandro P., Lechner M. C., Tavares de Almeida I., Konecki D. Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system // Mol. and Genet. Metab.—2001.—73, N 2.—P. 173—178.
- Fang A., Demain A. L. Influence of aeration and carbon source on production of microcin B17 by *Escherichia coli* ZK650 // Appl. Microbiol. Biotechnol.—1997.—47, N 5.—P. 547—553.

УДК 579.258 + 577.124

Надійшла до редакції 07.08.01