

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА РІВЕНЬ СИНТЕЗУ АРАНЦІАМІЦИНУ ШТАМОМ *STREPTOMYCES* *ECHINATUS* DSM40730

Д. О. Климишин

Інститут біології тварин НААН України

*Підібрано оптимальне середовище для синтезу протипухлинного антибіотика аранціаміцину штамом *Streptomyces echinatus* DSM40730. Досліджено вплив різних концентрацій глюкози на рівень біосинтезу цього антибіотика. Високі концентрації глюкози в ферментаційному середовищі приводять до незначного зростання рівня синтезу аранціаміцину. Наявність в середовищі джерел Нітрогену та Фосфору не суттєво впливає на рівень антибіотиків у *S. echinatus*. Найвищий синтез аранціаміцину спостерігається на п'яту добу культивування *S. echinatus* у рідкому середовищі SG за температури вирощування 28–30 °C та нейтрального значення pH.*

Ключові слова: *STREPTOMYCES ECHINATUS*, АРАНЦІАМІЦИН, ДЖЕРЕЛА ЖИВЛЕННЯ, ПРОТИПУХЛИННІ АНТИБІОТИКИ

На сьогодні стрептоміцети є продуцентами більшості відомих антибіотиків природного походження [1, 2]. Сполуки, що синтезуються цими бактеріями знайшли широке застосування у медицині, сільському господарстві та ветеринарії [1, 2, 3]. Особливу увагу привертають до себе протипухлинні антибіотики, більшість з яких належить до класу антрациклінів. Одним з антибіотиків, що характеризується потужними протипухлинними властивостями є аранціаміцин, що синтезується штамом *Streptomyces echinatus* DSM40730 [4, 5]. Молекула аранціаміцину складається з аранціаміцинону, до якого у сьомому положенні приєднаний цукор 2-О-метил-L-рамноза (рис. 1.). Похідні цього антибіотика є інгібіторами синтезу ДНК цілої низки пухлинних ліній. На відміну від більшості антрациклінів, ці сполуки також є специфічними інгібіторами колагенази і широко використовуються у медицині [5].

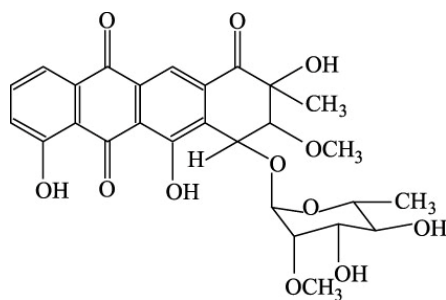


Рис. 1. Структурна формула аранціаміцину

Кластер генів біосинтезу аранціаміцину секвеновано та клоновано. Вивчено роль окремих генів, що задіяні у біосинтезі аранціаміцину, а шляхом експресії цих генів за гетерологічних умов одержано низку його похідних [4].

Проте на сьогодні не описано впливу основних компонентів ферментаційних середовищ, таких як джерела Карбону, Нітрогену, Фосфору на рівень синтезу аранціаміцину, а також оптимальних умов культивування цих бактерій. Тому метою роботи було дослідження впливу джерел живлення, температури, а також pH середовища на синтез аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730

Матеріали і методи

У роботі використано штам *Streptomyces echinatus* DSM40730 — продуцент аранціаміцину дикого типу. Як тест-культуру для визначення антибіотичної активності екстрактів антибіотиків отриманих з *S. echinatus* використали *Sarcina lutea*. Для культивування *S. echinatus* DSM40730 використано рідкі поживні середовища: YEME, SG, та TSB [2, 3], а також вівсяне середовище [6]. *Sarcina lutea* вирощували на середовищі LB [2]. Штам *S. echinatus* DSM40730 вирощували за температур 20–40 °С, а *Sarcina lutea* — 37 °С.

Аранціаміцин екстрагували з культуральної рідини рівним об'ємом хлороформу, випаровували до сухого стану і розчиняли у метанолі. Антибіотичну активність *S. echinatus* DSM40730 визначали методом дифузії екстрактів антибіотиків із паперових дисків однакового діаметру у агар. На кожен диск наносили по 30 мкл екстрактів. У подальшому визначали діаметр зони пригнічення росту тест-культури. Середнє значення індексу продуктивності (ІП) екстрактів антибіотиків визначали за відношенням зони пригнічення росту тест-культури до діаметру диска, на який наносили екстракти.

Результати й обговорення

Підбираючи оптимальне середовище для культивування *S. echinatus* DSM40730, використано рідкі поживні середовища: YEME, SG, та TSB. Ці середовища найчастіше застосовуються для культивування стрептоміцетів та відрізняються джерелами Нітрогену, Карбону та Фосфору [7, 8]. У середовищі TSB культура росла не достатньо однорідно, що ускладнювало подальші маніпуляції з біомасою *S. echinatus*, а в середовищі YEME ріст культури був грубодисперсним та дуже слабким. Тому ми використали середовище SG, яке забезпечувало дисперсний ріст культури, а накопичення біомаси у ньому становило $5,0 \pm 0,1$ мг/мл. Ці показники роблять середовище SG найбільш оптимальним для культивування *S. echinatus*.

Наступні дослідження полягали у вивченні динаміки біосинтезу аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730. Ці дослідження проводили з метою визначення часу максимального антибіотикоутворення у *S. echinatus* протягом інкубування. Екстракцію антибіотика та дослідження пригнічення ним росту тест-культури, протягом семи діб. Виявлено, що синтез антибіотика штамом *S. echinatus* DSM40730 є найвищим на п'яту добу культивування. За цих умов середнє значення ІП становить $2,0 \pm 0,2$.

Ми дослідили рівень синтезу аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730 у середовищі SG за різних температур вирощування (20–40 °С). Показано, що рівень синтезу аранціаміцину не суттєво залежить від температури культивування *S. echinatus*, проте найбільше накопичення цим штамом біомаси спостерігалось при його вирощуванні за температури 28–30 °С.

Найдоступнішим джерелом Карбону для стрептоміцетів є глюкоза. Вона є основним попередником в біосинтезі аглікону та цукрових залишків, що входять до складу антибіотиків, що синтезуються цими бактеріями. Проте для більшості стрептоміцетів характерне явище катаболітної репресії процесів вторинного метаболізму та морфологічної диференціації. Відомо, що формування повітряного міцелію, а також продукція антибіотиків у більшості штамів стрептоміцетів пригнічується на середовищах з високими концентраціями цього вуглеводу [8, 9, 10]. Ми дослідили вплив глюкози на рівень біосинтезу аранціаміцину та накопичення біомаси штамом *S. echinatus* DSM40730. Для цього у роботі використано модифіковане середовище SG з різними концентраціями глюкози. Показано, що штам *S. echinatus* DSM40730 ефективно нагромаджував біомасу на усіх досліджуваних концентраціях. Також виявлено, що для продуцента аранціаміцину не характерне пригнічення продукції антибіотиків на середовищах з високими концентраціями глюкози (рис. 1). Найвищий рівень синтезу антибіотика спостерігався при вирощуванні *S. echinatus* DSM40730 на середовищі з 5 % глюкози. Пригнічення синтезу антибіотика спостерігали вже на середовищах з 7–10 % вуглеводу. Зростання рівня синтезу антибіотиків внаслідок збільшення концентрації глюкози у ферментаційному середовищі описане для окремих штамів стрептоміцетів. Зокрема, підвищення рівня синтезу ландоміцину Е штамом

S. globisporus спостерігається при його вирощуванні за присутності високих концентрацій глюкози.

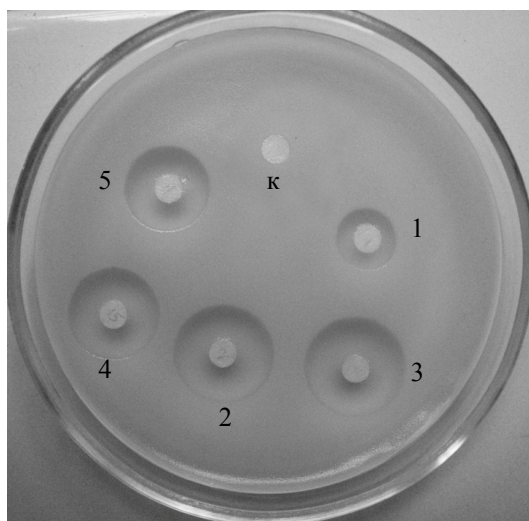


Рис. 2. Пригнічення росту тест-культури екстрактами антибіотиків *S. echinatus* DSM40730, одержаних із середовища з різними концентраціями глюкози: 1 — 1%, 2 — 2%, 3 — 5%, 4 — 7%, 5 — 10%, К — негативний контроль (метанол, використаний як розчинник аранціаміцину)

Важливими факторами, що впливають на вторинний метаболізм стрептоміцетів є джерела Нітрогену та Фосфору. Ми дослідили вплив цих компонентів середовища на продукцію аранціаміцину. Як джерела Нітрогену та Фосфору ми використали неорганічні солі цих елементів – фосфати та нітрати калію в концентраціях від 0,1 до 2%. Штам *S. echinatus* DSM40730 вирощували у середовищі SG із вказаними концентраціями солей протягом п'яти діб та визначали за цих умов рівень синтезу аранціаміцину. В результаті ми не помітили суттєвого впливу як джерел Нітрогену (табл. 1) так і Фосфору (табл. 2) на рівень синтезу антибіотика у *S. echinatus* та нагромадження ним біомаси.

Таблиця 1

Нагромадження біомаси та синтез аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730 за різних концентрацій Нітрогену у середовищі SG

KNO ₃ , %	біомаса <i>S. echinatus</i> (суха вага, мг/мл)	ІП
0,1	4,9±0,2	1,9±0,3
0,5	4,9±0,1	1,8±0,2
1	5,0±0,2	2,0±0,1
2	5,0±0,1	2,0±0,2

Очевидно, що ці компоненти середовища не є ключовими для синтезу аранціаміцину, на відміну від низки інших антибіотиків, що продукуються стрептоміцетами [8]. Зокрема, синтез окситетрацикліну у *S. rimosus* спостерігається при його вирощуванні за високих концентрацій фосфатів [11].

Також важливим фактором, що впливає на синтез антибіотиків стрептоміцетами є значення рН середовища. Було досліджено рівень синтезу аранціаміцину та накопичення біомаси штамом *S. echinatus* DSM40730 за різних значень рН середовища.

Таблиця 2

Нагромадження біомаси та синтез аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730 за різних концентрацій Фосфору у середовищі SG

K ₂ HPO ₄ , %	біомаса <i>S. echinatus</i> (суха вага, мг/мл)	ІП
0,1	5,1±0,2	2,0±0,2
0,5	4,9±0,3	1,8±0,3
1	5,0±0,1	2,0±0,1
2	5,1±0,2	2,0±0,2

Показано, що продуцент аранціаміцину характеризувався слабким та грубодисперсним ростом при його вирощуванні у кислому середовищі (рН 3), що не дозволило нам визначити рівень накопичення біомаси *S. echinatus*. Відповідно, за таких умов ми не спостерігали і синтезу антибіотиків. За низьких значень рН середовища (4–5) аранціаміцин синтезувався у слідових кількостях, а найвищий рівень синтезу антибіотика спостерігався при вирощуванні *S. echinatus* у середовищі із значенням рН 7–8. У середовищі із лужним значенням рН (10–12) спостерігається зниження синтезу аранціаміцину.

Висновки

1. Оптимальним середовищем для синтезу протипухлинного антибіотика аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730 та накопичення ним біомаси є середовище SG. Найвищий рівень синтезу аранціаміцину спостерігається при вирощуванні *S. echinatus* за нейтральних значень рН цього середовища та температури 28–30 °С.

2. Досліджено вплив різних концентрацій глюкози на синтез аранціаміцину штамом *S. echinatus* DSM40730. Показано, що найвищий рівень синтезу аранціаміцину спостерігається при культивуванні *S. echinatus* на середовищах з 5 % цього вуглеводу. Підвищення концентрації глюкози призводить до зниження процесів синтезу антибіотика.

3. Наявність у середовищі джерел Нітрогену та Фосфору не суттєво впливає на рівень синтезу аранціаміцину та нагромадження біомаси штамом *S. echinatus* DSM40730

Перспективи подальших досліджень. Дослідження впливу умов культивування штаму *S. echinatus* DSM40730 на рівень синтезу аранціаміцину є важливим етапом у подальшому вивченні синтезу цього антибіотика з метою одержання штамів — надпродуцентів аранціаміцину

D. O. Klymyshin

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS ON THE LEVEL OF ARANCIAMYCIN PRODUCTION BY *STREPTOMYCES ECHINATUS* DSM40730

Summary

Culturing media, providing the highest level of aranciamycin production for *Streptomyces echinatus* DSM40730 strain is optimized. The influence of different concentrations of glucose on aranciamycin production is investigated. High concentrations of glucose caused increasing of the level of antibiotic biosynthesis. The highest antibiotic accumulation is observed on the 5-th day of growth in SG media. The optimal temperature for *S. echinatus* culturing is 28–30 °C.

Д. А. Климишин

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА УРОВЕНЬ СИНТЕЗА АРАНЦИАМИЦИНУ ШТАММОМ *STREPTOMYCES ECHINATUS* DSM40730

Аннотация

Подобрана оптимальная среда для синтеза противоопухолевого антибиотика аранциамицина штаммом *Streptomyces echinatus* DSM40730. Исследовано влияние разных концентраций глюкозы на уровень биосинтеза этого антибиотика. Высокие концентрации глюкозы в ферментационной среде приводят к незначительному росту уровня синтеза аранциамицина. Наличие в среде источников Нитрогена и Фосфора не существенно влияет

на уровень антибиотиков у *S. echinatus*. Наивысший уровень синтез аранциамицина наблюдается на пятые сутки культивирования *S. echinatus* в жидкой среде SG при температуре выращивания 28–30 °C и нейтрального значения pH.

1. *Hopwood D. A.* Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico [Текст] / D. A. Hopwood // *Microbiol.* — 1999. — Vol. 145. — P. 2183–2202.
2. *Kieser T.* Practical *Streptomyces* genetics [Текст] / T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, et al // Norwich, England: John Innes Foundation. — 2000. — 634 p.
3. *Федоренко В. О.* Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів [Текст] / В. О. Федоренко, Б. О. Осташ, М. В. Гончар, Ю. В. Ребець. — Л. : Видавн. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. — 277 с.
4. *Luzhetskyu A.* Cloning and Heterologous Expression of the Aranciamycin Biosynthetic Gene Cluster Revealed a New Flexible Glycosyltransferase [Текст] / A. Luzhetskyu, Almuth Mayer, J. Hoffmann, S. Pelzer // *Chem. Bio. Chem.* — 2008. — Vol. 8. — P. 599–602.
5. *Bols M.* Inhibition of collagenase by aranciamycin and aranciamycin derivatives [Текст] / M. Bols, L. Binderup, J. Hansen, P. Rasmussen // *J. Med. Chem.* — 1992. — Vol. 35. — P. 2768–2771.
6. *Лужецкий А. Н.* Межродовая конъюгация *Escherichia coli* — *Streptomyces globisporus* 1912 с использованием интегративной плазмиды pSET152 и ее производных [Текст] / А. Н. Лужецкий, Б. Е. Осташ, В. А. Федоренко // *Генетика.* — 2001. — Т. 37. — С. 1340–1347.
7. *Champness W.* Actinomycete development, antibiotic production and phylogeny: questions and challenges [Текст] / W. Champness, Y. V. Brun, L. J. Skimkets // *Prokaryotic development.* American Society for Microbiology. — Washington DC, 2000. — P. 11–31.
8. *Дубицкая Л. П.* Влияние глюкозы на антибиотическую активность и резистентность к антибиотикам у *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 и его мутантов [Текст] / Л. П. Дубицкая, В. А. Федоренко // *Антибиот. химиотер.* — 2002. — Т. 47, № 6. — С. 7–11.
9. *Hodgson D. A.* Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose [Текст] / D. A. Hodgson // *J. Gen. Microbiol.* — 1982. — Vol. 128. — P. 2417–2430.
10. *Vilches C.* Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance [Текст] / C. Vilches, C. Mendez, C. Hardisson, J. A. Salas // *J. Gen. Microbiol.* — 1990. — Vol. 136. — P. 1447–1454.
11. *McDowall I.* Phosphate Control of Oxytetracycline Production by *Streptomyces rimosus* Is at the Level of Transcription from Promoters Overlapped by Tandem Repeats Similar to Those of the DNA-Binding Sites of the OmpR Family [Текст] / I. McDowall, A. Thamchaipenet, I. Hunter // *J. of Bacteriol.* — 1999. — Vol. 181. — P. 3025–3032.

Рецензент: завідувач лабораторії живлення ВРХ, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. наук І. В. Вудмаска.