

УДК 619:611.

Хмель Ю.І., аспірант ©

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького**ПІДБІР ОПТИМАЛЬНОГО ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ
КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ *S.SIOYAENSIS* - ПРОДУЦЕНТА
ТІОПЕПТИДНОГО АНТИБІОТИКА СІОМІЦИНУ**

Досліджено зміни антибіотичної активності у продуцента тіопептидного антибіотика сіоміцину *S.sioyaensis rif51* в залежності від складу повноцінних поживних середовищ. В роботі було використано 5 середовищ на основі вівсяної, кукурудзяної та соєвих круп. Для отримання спорової суспензії штаму *S. Sioyaensis rif51* рекомендовано використовувати середовище ВСА, титр спор при цьому становив $1,34 \times 10^9$, що є відносно високим. Спостерігається позитивний вплив амарантового борошна на антибіотичну продуктивність *S. Sioyaensis rif51*. Враховуючи отримані дані, а також вартість інгредієнтів поживних середовищ, ми дійшли висновку, що слід надати перевагу середовищу ССА для використання у подальших дослідженнях.

Ключові слова: *Streptomyces sioyaensis*, сіоміцин, тіопептидні антибіотики, поживне середовище, амарант.

Одним з основних елементів біотехнологічного виробництва антибіотиків є високоактивний штам – продуцент. Підвищення антибіотичної активності і удосконалення інших технологічних показників штамів-продуцентів – один з головних шляхів збільшення виробництва антибіотиків. Продуцентами більшості відомих антибіотиків, в тому числі тих, що утримуються в промислових масштабах – є актиноміцети. Актиноміцети належать до групи міцеліальних ґрунтових мікроорганізмів, яким властива складна морфологічна диференціація. Однією з основних особливостей цих бактерій є здатність синтезувати різноманітні за своєю структурою, механізмом дії та спектром застосування антибіотичні сполуки. Антибіотики використовують як антибактерійні, протигрибкові, імуносупресорні, протипухлинні препарати та ін.. Чільне місце займають представники роду *Streptomyces*, які синтезують до 80% усіх відомих антибіотичних сполук, що продукують актиноміцети. Недоліком природних штамів є низький рівень синтезу активних речовин, що зумовлює високу вартість цільових продуктів. Тому існує потреба у розробці методів конструювання та селекції стабільних високоактивних штамів-продуцентів, які б утворювали необхідні цільові продукти антибіотичної природи.

© Науковий керівник – д.с.-г.н., професор Буцяк В.І.
Хмель Ю.І., 2013

Селекція промислових штамів актиноміцетів продуцентів антибіотиків здійснюється в основному з допомогою індукованого мутагенезу. Відомо, що мутагенні фактори, які традиційно використовуються в селекції, викликають утворення точкових мутацій. Безперервна багатолітня селекція стрептоміцетів призвела до накопичення в їх геномі великої кількості мутацій такого роду. Насичення геному точковими мутаціями є однією із причин низької ефективності подальшої селекції. Тому використання в генетично-селекційній практиці факторів, що викликають значні геномні перебудови у стрептоміцетів, може сприяти успішному проведенню подальшої селекції промислових продуцентів і здійснювати селекцію нових продуцентів біологічно активних речовин. Однак розвиток генетики, клітинної та генної інженерії актиноміцетів дозволило суттєво розширити арсенал методів створення високопродуктивних штамів, що утворюють антибіотики. Проблема пошуку нових антибіотичних речовин є однією з найбільш актуальних у сучасній біотехнології. Зростаюча потреба у нових антибактерійних і протипухлинних агентах, зумовлена насамперед розповсюдженням резистентності збудників інфекцій і ракових клітин до широкоживаних антибіотиків. В зв'язку з цим увагу дослідників знову привертають тіопептиди, зокрема тіострептон і сіоміцин. Однак механізм біосинтезу цих антибіотиків, його генетичний контроль, а також генетичні особливості актиноміцетів, які їх продукують, вивчені недостатньо. Лише нещодавно клоновано кластери генів біосинтезу цих антибіотиків і доведено, що їхній пептидний попередник синтезується на рибосомах, і зроблено перші кроки у напрямі створення ефективної системи клонування генів у *S. sioyaensis*. Для з'ясування генетичного контролю біосинтезу сіоміцину та отримання його біотехнологічних продуцентів треба опрацювати систему селекції мутантів *S. sioyaensis*. Необхідно проводити відбір клонів із підвищеним рівнем синтезу антибіотика. Це завдання є актуальним і для *S. sioyaensis*.

Сіоміцин А – тіопептидний антибіотик, який продукується актиноміцетним штамом *Streptomyces sioyaensis*. Цей антибіотик пригнічує синтез білка у грам-позитивних бактерій, активний проти збудника малярії *Plasmodium falciparum*[3,4], а також діє як імуносупресант і протипухлинний агент. Донедавна вважали, що тіопептиди синтезуються за допомогою нерибосомних пептидсинтеаз. Однак, клонувавши кластер генів біосинтезу сіоміцину і дуже близького до нього за будовою тіострептону, довели, що їхній пептидний попередник синтезується на рибосомах[10]. Хоча тіопептиди відкриті ще у 50-х роках ХХ століття, вони мали обмежене застосування у ветеринарній медицині, що спричинене в основному через їхню низьку розчинність у воді.

Мета нашої роботи полягала у дослідженні впливу різноманітних факторів, що можуть впливати на рівень синтезу вторинних метаболітів штамом *S. Sioyaensis* rif51. Нами вивчено вплив джерел живлення та підібрано оптимальне поживне середовище, що забезпечує найвищий рівень синтезу сіоміцину досліджуваним штамом.

У роботі використано штам *S. sioyaensis* rif51 із колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків ЛНУ імені Івана Франка. Як тест-культури для визначення антибіотичної активності використали штам *Sarcina lutea*[1,5].

Штам *S. Sioyaensis* rif51 вирощували при температурі 28°C протягом 7 діб на таких середовищах: вівсяному (ВС; овес мелений – 40 г, NaCl – 5 г, глюкоза –10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); вівсяно-амарантовому (ВСА; овес мелений 36г, амарантове борошно – 4г, NaCl – 5 г, глюкоза –10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); соєвому №14 (СС-14; соєве борошно – 20г, NaCl – 5 г, глюкоза – 10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); соєво-амарантовому (ССА; соєве борошно – 10г, амарантове борошно – 10г, NaCl – 5 г, глюкоза – 10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л); кукурудзяному №7 (КС-7; кукурудзяне борошно – 20 г, NaCl – 5 г, глюкоза – 10 г, агар – 15 г, вода водопровідна – до 1 л). *Sarcina lutea* вирощували при температурі 37°C протягом 18 годин[5]. Антибіотичну активність штаму *S. sioyaensis* визначали методом дифузії в агар за пригніченням росту тест-культури. Визначали індекси продуктивності (ІП) окремих клонів культури[9].

Фундаментальним етапом створення технології промислового синтезу поряд з підбором штамів продуцентів є підбір і оптимізація поживного середовища, технологічних режимів культивування, що б забезпечували успішний ріст і розвиток мікроорганізмів[1,2]. Тому першим етапом нашої роботи був Підбір середовища, оптимального для росту й антибіотичної активності *S. Sioyaensis* rif51. Ми вивчили зміни антибіотичної активності штамів в залежності від складу різних поживних середовищ. Вивчено ріст та антибіотичну активність на 5 середовищах: ВС, ВСА, СС-14, ССА, КС-7; які різняться між собою за вмістом поживних речовин. Не спостерігали суттєвих відмін за нагромадженням біомаси на вказаних середовищах. Однак найвищий показник утворення спор спостерігався на середовищі ВСА і становив $1,34 \times 10^9$, в порівнянні - на ВС середовищі цей показник становив $2,31 \times 10^8$. Зважаючи на це рекомендовано використовувати ВСА середовище для отримання високого титру спор *S. Sioyaensis* rif51. Вивчення антибіотичної активності культури *S. Sioyaensis* rif51 показало, що на середовищі КС середнє значення індексу продуктивності (ІП) було найнижчим і становило $3,6 \pm 0,02$ (таб.1). На середовищі КС частка «плюс»-варіантів становила 4,3% (клони, антибіотична активність яких перевищує значення $M+2\sigma$, де M – середнє значення антибіотичної активності, а σ – середнє квадратичне відхилення), а частка «мінус»-варіантів становила 3,5% (клони, антибіотична активність яких менша ніж $M-2\sigma$), варіабельність культури дорівнювала 31,7%[1]. Клони вирощені на середовищі КС характеризуються найвищою кількістю «мінус»-варіантів та найнижчим середнім ІП і відсотком кореляції з усіх вибірок. На середовищах ВС та ВСА середнє ІП збільшувалось в порівнянні з КС і становило від $4,2 \pm 0,04$ до $4,6 \pm 0,8$, відповідно. Частка «плюс»-варіантів становила 4,4 – 4,6%, частка «мінус»-варіантів на середовищі ВС була 1,2%, а коефіцієнт варіації культури

дорівнював 32,8%; на середовищі ВСА частка «мінус»-варіантів становила 1,1%, а коефіцієнт варіації був на рівні 34,2%.

Таблиця 1

Антибіотична активність штаму *S. sioyaensis* rif51 на різних живильних середовищах

Середовища	Кількість клонів, N	Середнє значення ІП, (M±m)	Частка «плюс»-варіантів, %	Частка «мінус»-варіантів, %	Коефіцієнт варіації, CV, %
BC	515	4,2±0,04	4,4	1,2	32,8
BCA	537	4,6±0,08	4,6	1,1	34,2
CC-14	491	5,0±0,09	5,5	2,2	32,4
CCA	507	5,9±0,1	6,7	2,5	39,8
КС-7	486	3,6±0,02	4,3	3,5	31,7

Середнє значення індексу продуктивності на середовищах СС-14 та ССА становило 5,0±0,09 і 6,7±0,1 відповідно, частка «плюс»-варіантів становила на середовищі СС-14 – 5,5%, на ССА – 6,7%, частка «мінус»-варіантів на середовищі ССА була вищою і становила 2,5%. Коефіцієнт варіації становив 32,4% на середовищі СС-14, і 39,8% на середовищі ССА.

Дані, отримані в роботі, дають змогу визначити кілька основних підходів до селекції штаму *S. Sioyaensis* rif51, спрямованої на підвищення рівня синтезу сіоміцину. Для отримання спорової суспензії штаму *S. Sioyaensis* rif51 рекомендовано використовувати середовище ВСА, титр спор при цьому становив $1,34 \times 10^9$, що є відносно високим. Спостерігається позитивний вплив амарантового борошна на антибіотичну продуктивність *S. Sioyaensis* rif51. Враховуючи отримані дані, а також вартість інгредієнтів поживних середовищ, ми дійшли висновку, що слід надати перевагу середовищу ССА для використання у подальших дослідженнях. Клони, вирощені на ньому, мали найвищий середній рівень антибіотичної активності та відносно високу мінливість за рівнем синтезу сіоміцину. Серед них було й відносно багато «плюс»-варіантів.

Література

1. Громико О. М., Федоренко В. О. Вплив мутагенів на антибіотичну активність *Streptomyces nogalater* ІМЕТ43360 – продуцента протипухлинного антибіотика ногала-міцину // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2005. Вип. 40. С. 16–22.
2. Жукова Р. А., Коммунарская А. Д., Пронина М. И. и др. Методы селекции продуценто антибиотиков и ферментов. Л.: Медицина, 1978. 160 с.
3. Bagley M. C., Dale J. W., Merritt E. A., Xiong X. Thiopeptide antibiotics // Chem. Rev. 2005. Vol. 105. P. 685–714.
4. Bhat U. G., Zipfel P. A., Tyler D. S., Gartel A. L. Novel anticancer compounds induce apoptosis in melanoma cells // Cell Cycle. 2008. Vol. 7. P. 1851–1855.
5. Kieser T., Bibb M., Buttner M., Chater K., Hopwood D. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich, England: John Innes Foundation. 2000. 634 p.

6. Liao R., Duan L., Lei C. et al. Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthe-sized precursor peptides and conserved posttranslational modifications // *Chem. Biol.* 2009. Vol. 16. P. 141–147.

7. McConkey G. A., Rogers M. J., McCutchan T. F. Inhibition of Plasmodium falciparum protein synthesis // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 2046–2049.

8. Myronovskyy M., Ostash B., Ostash I., Fedorenko V. A gene cloning system for the sio-mycin producer *Streptomyces sioyaensis* NRRL-B5408 // *Folia Microbiol.* 2009. Vol. 54. P. 91–96.

9. Trilli A., Costanzi I., Lamanna F., DiDio N. Development of agar disc method for the

rapid screening of strains with increased productivity // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1982. Vol. 32. P. 281–291.

10. Ueno M., Furukawa S., Abe F. et al. Suppressive effect of antibiotic siomicin on antibody production // *J. Antibiot.* 2004. Vol. 57. P. 590–596.

11. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification // *Antimicrob. Ag. and Chemother.* 1995. Vol. 39. P. 577–585.

12. Zhang H.-Z., Schmidt H., Piepersberg W. Molecular cloning and characterization of two lincomycin-resistance genes, *ImrA* and *ImrB*, from *Streptomyces lincolnensis* 78-11 // *Mol. Microbiol.* 1992. Vol. 6. P. 2147–2157.

Рецензент – д.вет.н., професор Гуфрій Д.Ф.