

3. *Кульчицкая М.А.* Разработка аппаратных методов совместного культивирования кишечных бактерий, применяемых при производстве окarina // Вест. ун-та Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. – 2001. – №1(3). – С. 90–92.
4. *Нуртдинова А.Н.* Разработка и изучение биологических свойств комплексного препарата – бифидоспорина: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Уфа. 2003. – 22 с.
5. *Осадчая А. И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Козачко И.А., Смирнов В.В.* Стимуляция роста и спорообразования *Vacillus subtilis* оптимизацией углеродного питания при глубинном культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – 33, №3. – С. 321–324.
6. *Перт Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток / Пер. с англ. Петровой Т.А., Позмоговой И.Н.; Ред. Работнова И.Л. – М.: Мир, 1978. – 330 с.
7. *Печуркин Н.С.* Популяционная микробиология, Новосибирск: Наука Сибирское отделение, 1978. – 275 с.
8. *Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Иляш В.М.* Синбиотики: перспективы создания на основе бактерий рода *Vacillus* и лактата // Лікарська справа. – 2007. – №4. – С. 3–8.
9. *Штанько Т.В.* Біологічні властивості бацилл та лактобактерій, перспективних для створення комплексного пробіотика: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2009. – 19 с.
10. Пат. №76669 Україна А61К35/74. Біопрепарат для лікування та профілактики кишкових інфекцій у тварин / Сафронова Л.А., Кудрявцев В.О., Осадча А.І. // Опубл. 15. 08. 2006 Б. № 8.
11. *Bull A.T.* Mixed microbial culture technology // Biochem. Soc. Trans. – 1984. – 12, N 6. – P. 1137–1140.

Отримано 09.12.2010

УДК 579.873:575.224

В.Я. Лаврінчук, К.А. Котенко, С.Л. Голембіовська, Б.П. Мацелюх

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, ДОЗ680, Україна*

ОДЕРЖАННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТІВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 З ПІДВИЩЕНИМ БІОСИНТЕЗОМ ЛАНДОМІЦИНУ Е

*У *Streptomyces globisporus* 1912 одержано вісім УФ-індукованих мутантів з підвищеним біосинтезом ландоміцину Е, частота виділення яких становила 2×10^3 . Вивчена динаміка біосинтезу антибіотика в межах 24-96 годин культивування. Максимум накопичення ландоміцину Е є на агаризованому середовищі досягався на 48 годину вирощування. Мутанти 1-1, 1-1ж, 1-2ж, 1-2 і 4-1 продукували ландоміцин Е на рівні 175-187,5 мг/л, а 1-1-к, 1-3 і 4-1-1 – від 80 до 100 мг/л.*

*К л ю ч о в і с л о в а: *Streptomyces globisporus* 1912, антибіотична активність, ландоміцин Е, ультрафіолет, мутанти.*

Природний штам *Streptomyces globisporus* 1912 продукує ландоміцин Е з високою протипухлинною активністю [6, 7, 10]. Як і багато інших представників стрептоміцетів, цей продуцент належить до високоваріабельних мікроорганізмів. Одні спонтанні варіанти штаму 1912 продукують ландоміцин Е у кількості 2,5-3,1 мг/л [9], а інші – до 40 мг/л [5]. Поряд із цим, у штаму 1912 виникають спонтанні мутанти з біосинтезом каротиноїдів, які на відміну від вихідного штаму, чутливого до ультрафіолету, набувають резистентності до цього агента [1, 2], а також відомі мутанти з повним блоком біосинтезу ландоміцину Е і високопродуктивні, індуковані різними мутагенами [4, 9]. На сьогодні основним джерелом одержання ландоміцину Е є стабільний високопродуктивний аспорогенний мутант 3-1, який на 48 годину росту накопичує до 200 мг/л нативного червоно-помаранчового антибіотика ландоміцину Е ($C_{37}H_{44}O_{14}$). Поряд із нативним ландоміцином Е, на тонкошарових хроматограмах реструються також його мінорні компоненти, зокрема окислений ландоміцин Е ($C_{37}H_{42}O_{14}$) коричневого забарвлення, дегідратований ($C_{37}H_{42}O_{13}$) – фіолетового забарвлення і антибіотик ландоміцин D – червоного забарвлення, який на відміну від ландоміцину Е містить в молекулі не три, а два цукрових залишки [5, 11, 12]. Сумарний кольоровий спектр цих метаболітів полегшує первинну ідентифікацію колоній із високою продуктивністю.

© В.Я. Лаврінчук, К.А. Котенко, С.Л. Голембіовська Б.П. Мацелюх, 2011

Метою даної роботи було одержання у *Streptomyces globisporus* 1912 УФ-індукованих мутантів із підвищеним біосинтезом ландоміцину Е і дослідження їх продуктивної здатності.

Матеріали і методи. Середовище. Для зберігання штаму 1912, одержання мутантів і накопичення ландоміцину Е використовували повноцінне соєве середовище (г/л): соєве борошно – 20,0, NaCl – 5,0, глюкоза – 10,0, агар-агар – 15,0, рН 7,4.

УФ-індукованій мутагенез. Спори десятидобової культури штаму 1912 змивали стерильною водою і фільтрували через ватно-марлевий фільтр. Одержану суспензію (приблизно 10^8 спор в мл) вносили в чашку Петрі, яку ставили на платформу, що обертається зі швидкістю 25 об/хв. Суспензію спор товщиною 2 мм опромінювали лампою БУФ-15, доза 200 Дж/м², t=20хв, яка знижувала виживання спор на 3,2 порядки. Опромінену суспензію спор висівали у відповідних розведеннях на повноцінне середовище в умовах освітлення променями червоного кольору, щоб не допустити процес фоторепарації пошкодженої ультрафіолетом ДНК.

Селекція мутантів з підвищеним синтезом ландоміцину Е. Чашки з опроміненими спорами витримували в термостаті при 28 °С. Після появи колоній діаметром 0,5-1 мм їх колір оцінювали через кожні 2-3 години. Колонії, що першими починали змінювати колір на темніший, відбирали і підрощували 2-3 доби. Найбільш забарвлені з них пересівали квадратами і після 24 годин росту порівнювали з одночасно висіяним штамом 3-1. Мутанти, що не поступалися останньому інтенсивністю забарвлення, відбирали для наступного дослідження.

Антибіотична активність мутантів. Динаміку антибіотичної активності визначали на тест-штамі *S. levoris* 165. З цієї метою мутанти вирощували на агаризованому соєвому середовищі у вигляді газону протягом 24, 48, 72 і 96 годин, вирізали із газону блоки діаметром 9 мм і накладали на свіжозасіяний газон тест-штаму *S. levoris* 165. Зони затримки росту навколо блоків враховували через дві доби.

Тонкошарова хроматографія. Мутанти інкубували на агаризованому соєвому середовищі протягом 48 годин при 28 °С. Екстракцію ландоміцину Е проводили сумішню хлороформ - ацетон у співвідношенні 2:1 в колбах об'ємом 100 мл протягом доби при кімнатній температурі. Екстракт фільтрували через паперовий фільтр і випарювали під зниженим тиском (роторний випарювач при 45 °С). Сухий осад розчиняли в 0,2 мл етанолу. Однакові об'єми розчину наносили на стартову лінію хроматографічної пластинки Silica gel 60 F₂₅₄ фірми "Merck" (Німеччина) та розганяли в системі бензол – етил-ацетат – ацетон – етанол у співвідношенні 8:4:2:1. Хроматограми фотографували у видимому і ультрафіолетовому світлі [4].

Визначення кількості ландоміцину Е у зразках. Хроматографію зразків (по 0,2 мл кожного екстракту на пластинку) проводили як описано вище. Фракцію з ландоміцином Е знімали із носієм, суспендували в 0,3 мл етанолу і носій осаджували центрифугуванням. Розчин ландоміцину Е зливали і процедуру повторювали двічі. Одержаний сумарний розчин хроматографічно очищеного ландоміцину Е наносили на фільтрувальний папір певної ваги. Висушений зразок зважували і визначали кількість нанесеного на папір антибіотика.

Концентрацію нативного ландоміцину Е в етанолі визначали також спектрофотометрично при max поглинання 442 нм з використанням калібрувальної кривої на спектрофотометрі Beckman DU-8B.

Результати та їх обговорення. Із 3578 колоній, які вирости після опромінення суспензії спор ультрафіолетом, було відібрано вісім мутантів із підвищеним біосинтезом ландоміцину Е. Частота їх виділення $2,2 \times 10^{-3}$. Одержані мутанти стабільно зберігали набуту ознаку протягом тривалого часу. Як видно з даних, наведених у табл. 1, одержані мутанти візуально відрізняються між собою за такими ознаками як здатність до споруляції, колір субстратного міцелію і забарвлення середовища. Так, у мутантів 1-1ж і 1-2ж міцелій жовтуватого кольору, а в 1-2к – темно-коричневий. Поява слабо-жовтого кольору в міцелію може вказувати на експресію кластеру генів біосинтезу каротиноїдів [2]. Мутанти 1-1ж, 1-2 і 1-2ж і 1-1к надають середовищу темно-синьо-коричневого кольору вже у кінці другої доби росту, тоді як 1-3 і 4-1-1 – світло-синьо-коричневого кольору. Мутанти 1-1, 1-2к і 1-3 були аспорогенними і за цією ознакою подібні до високопродуктивного штаму 3-1, а мутант 1-2ж, навпаки, характеризується інтенсивнішим спороношенням, ніж у вихідного штаму 1912.

Візуальне вивчення хроматограми екстрактів, одержаних із середовища і міцелію восьми мутантів, показало, що на кінець другої доби росту п'ять із них, а саме, 1-1ж, 1-2ж, 1-1, 1-2 і 4-1 за продуктивністю не поступаються штаму 3-1, решта три – 1-1к, 1-3 і 4-1-1 продукують антибіотика значно менше, ніж 3-1 (рис. 1, А). Спостерігається ряд відмінностей стосовно інших метаболітів. Так, всі одержані мутанти продукують менше ландоміцину D, ніж 3-1 (смуга а), а 1-1ж, 1-1к, 1-2ж, 1-2 і 4-1 інтенсивніше накопичують дегідратовану форму ландоміцину Е (смуга f). У мутантів 1-2, 1-2ж і 4-1 утворюється більше окисленого ландоміцину Е (смуга с). Вигідно від усіх інших відрізняється на хроматограмі мутант 1-1. Він продукує менше як окисленої, так і дегідратованої форми, і у нього практично відсутня смуга с та трохи нижчий, ніж у інших мутантів, рівень синтезу ландоміцину D. Мутант 1-1 як продуцент з погляду чистоти основного продукту має деякі переваги перед 3-1 і викликає значний інтерес для наступних етапів селекції. Аналіз цієї ж хроматограми, візуалізованої в ультрафіолетових променях, засвідчує присутність ізофлавонів даїдзеїну і геністеїну (рис. 1, Б, смуги d і e).

Мутанти 1-1, 1-1ж, 1-2, 1-2ж і 4-1 на 48 годину росту накопичують від 175 до 187,5 мг/л хроматографічно очищеного ландоміцину Е і за цим показником практично відповідають штаму 3-1. Продуктивність трьох інших (1-1к, 1-3 і 4-1-1) була значно нижчою і складала від 80 до 100 мг/л середовища. Одержані результати добре узгоджуються з візуальною оцінкою хроматограми (рис. 1, А), але різняться за їх фенотиповими характеристиками. Наприклад, мутант 1-2к, що надає середовищу темно-синьо-коричневий колір, згідно з цими оцінками можна помилково віднести до високопродуктивних (табл. 1).

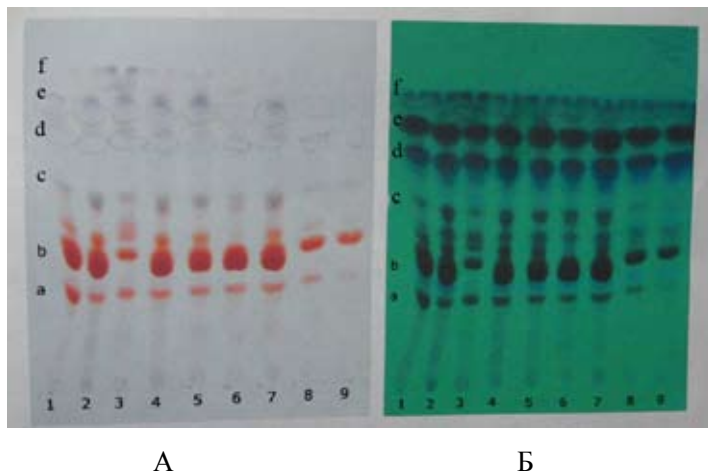


Рис. 1. Тонкошарова хроматограма метаболітів мутантів із підвищеним біосинтезом ландоміцину Е:

А – у видимому світлі;

Б – хроматограма А в ультрафіолетових променях;

1 – мутант 3-1; 6 – 1-1-ж; метаболіти: а – ландоміцин D;

2 – 1-2-ж; 7 – 1-2; б – ландоміцин Е;

3 – 1-1-к; 8 – 4-1-1 в; с – окислений ландоміцин Е;

4 – 4-1; 9 – 1-3. d – даїдзеїн;

5 – 1-1-ж; e – геністеїн;

f – дегідратований ландоміцин Е.

Особливу увагу привертає динаміка зміни антибіотичної активності мутантів (табл. 2). Так, у мутантів 1-1ж, 1-2 і 4-1-1 активність різко зростає в першу добу росту, причому у 1-1ж цей показник досягає максимального значення. Мутанти 1-2, 1-2к і 4-1-1 проявляють максимум активності в кінці другої доби, а 1-1, 1-2ж, 1-3 і 4-1 – в кінці третьої доби росту. На 96-ту годину росту антибіотична активність у всіх мутантів знижується. Найбільш високий рівень антибіотичної активності мутанта 4-1-1 не узгоджується із середнім рівнем утворюваного ним ландоміцину Е. Частково це відноситься і до високопродуктивного мутанта 1-2, у якого слід було б очікувати високий, але не найвищий рівень антибіотичної активності. Така неуз-

годженість характерна і для вихідного штаму 1912, який проявляє значну антибіотичну активність, в той час як у нього на кінець другої доби рівень біосинтезу ландоміцину Е ще дуже низький. До сказаного слід додати, що у штаму 1912 відомі Uvs-мутанти з повним блоком біосинтезу ландоміцинів Е і D, але які теж проявляють антибіотичну активність [3].

Таблиця 1
Фенотипові характеристики УФ–індукованих мутантів *S.globisporus* 1912 з підвищеним біосинтезом ландоміцину Е

Шифр мутантів	Колір середовища під газомом після 48 год росту	Споруляція	Походження
1912	Не має	+	грунт, Вірменія
3-1	Синьо-коричневий	–	від 1912, НГ
1-1	Синьо-коричневий	–	від 1912, УФ
1-1ж*	Світло-коричневий	+	від 1912, УФ
1-2	Синьо-коричневий	±	від 1912, УФ
1-2ж*	Темно-синьо-коричневий	+	від 1912, УФ
1-2к**	Темно-синьо-коричневий	–	від 1912, УФ
1-3	Світло-синьо-коричневий	–	від 1912, УФ
4-1	Темно-синій	+	від 1912, УФ
4-1-1	Світло-синьо-коричневий	±	спонт, від 4-1

Примітка: * - слабо-жовтий міцелій, ** - коричневий міцелій

Таблиця 2
Залежність зміни антибіотичної активності мутантів *S.globisporus* 1912 від часу їх вирощування

Шифр мутантів	Час вирощування (год) і діаметр зон пригнічення росту <i>S. levoris</i> (мм)			
	24	48	72	96
1912	13,0	16,6	16,0	13,6
3-1	19,3	28,3	26,3	23,0
1-1	20,0	27,0	27,3	20,3
1-1ж*	25,0	23,3	22,6	21,0
1-2	27,0	31,0	27,0	22,0
1-2ж*	21,6	25,3	29,0	25,6
1-2к**	20,6	24,0	23,0	20,0
1-3	20,0	25,6	28,7	23,6
4-1	20,3	26,0	27,3	23,3
4-1-1	26,6	31,0	27,0	23,0

Примітка: * - слабо-жовтий міцелій, ** - коричневий міцелій

З вищенаведеного можна зробити висновок, що антибіотична активність вказаних мутантів і вихідного штаму може бути обумовлена не лише впливом ландоміцинів Е і D. Цілоком можливо, що антибіотично активними можуть бути проміжні метаболіти на шляху біосинтезу ландоміцину Е, в тому числі і незабарвлений антибіотик, як це спостерігається у *S. coelicolor* А3(2) та інших стрептоміцетів [8]. Виділення окремих метаболітів у вихідного штаму 1912, його ландоміцинонедостатніх та деяких високопродуктивних мутантів і їх ідентифікація дасть відповідь на це питання.

В.Я. Лавринчук, К.А. Котенко, С.Л. Голембиовская, Б.П. Мацелюх

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТОВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 С ПОВЫШЕННЫМ БИОСИНТЕЗОМ ЛАНДОМИЦИНА Е

Резюме

У *Streptomyces globisporus* 1912 получено 8 УФ–индуцированных мутантов с повышенным биосинтезом ландоміцина Е, частота выделения которых становила 2×10^{-3} . Изучена динамика биосинтеза ан-

тибиотика в пределах 24-96 часов. Максимум накопления ландомицина Е достигается на 48 час роста. Мутанты 4-1, 1-1ж, 1-2ж, 1-1 и 1-2 продуцировали ландомицин Е в пределах 175-187,5 мг, а 1-1-к, 4-1-1, и 1-3 – от 80-100 мг на 1 литр агаризованной соевой среды.

Ключевые слова: *Streptomyces globisporus* 1912, антибиотическая активность, ландомицин Е, ультрафиолет, мутанты.

V. Ya. Lavrinchuk, K. A. Kotenko, S. L. Golembiovska, B. P. Matselyukh

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

OBTAINING AND CHARACTERISTIC OF *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 MUTANTS WITH HIGH BIOSYNTHESIS OF LANDOMYCIN E

S u m m a r y

Eight highly productive UV-induced mutants of *Streptomyces globisporus* 1912 with high biosynthesis of landomycin E were isolated, their isolation frequency being 2×10^{-3} . Mutants 1-1, 1-4-1, 1-1ж, 1-2ж, 4-1, 1-2 produced 175-187.5 mg of landomycine E and 1-1к, 4-1-1 и 1-3 – 80-100 mg per 1 liter of soybean agar after 48 hours of cultivation. The mutant 4-1-1 had the highest antibiotic activity and middle level of landomyline E production.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: *Streptomyces globisporus* 1912, antibiotic activity landomycin E, ultraviolet, mutants.

The a u t h o r ' s a d d r e s s: *Lavrinchuk V. Ya.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Голембіовська С.Л., Лаврінчук В.Я., Мацелюх Б.П. Резистентність до летальної дії УФ – променів кольорових та білих мутантів *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – **70**, № 5. – С. 23 – 27.
2. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Спонтанна та індукована мінливість ознаки біосинтезу каротиноїдів *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – **70**, № 6. – С. 18 - 23.
3. Лаврінчук В.Я., Кушкіна А.І., Мацелюх Б.П. Високочувливі до ультрафіолету мутанти *Streptomyces globisporus* 1912, їх антибіотична активність і репараційна здатність. // Мікробіол. журн. – 2009. – **70**, №2. – с 43 - 48.
4. Мацелюх Б. П., Лаврінчук В. Я. Одержання і характеристика мутантів *Streptomyces globisporus* 1912, дефектних по біосинтезу ландоміцину Е // Мікробіол. журн. – 1999. – **61**, № 4. – С. 22-27.
5. Мацелюх Б.П., Тимчик О.В., Мацелюх А.Б. Вплив умов вирощування *Streptomyces globisporus* 3-1 на продукування ландоміцину Е // Мікробіол. журн. – 2005. – **67**, № 4. – С. 44–51.
6. Панчук Р., Кориневська А., Остап Б. та інші. Дослідження молекулярних механізмів дії ландоміцину Е на клітини ссавців. // Вісн. Львів Ун-ту. Серія біол. – 2004. – **35**. – С. 54-59.
7. Поліщук Л.В., Ганусевич І.І., Мацелюх Б.П. Вивчення протипухлинної дії антибіотика, що продукується *S. globisporus* 1912, на моделі карциноми Герена щурів. // Мікробіол. журн. – 1996. – **38**, №2. – С. 55-58.
8. Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics // Norwich. – 2000. – 93-95 p.
9. Gromyco O., Rebets Y., Ostash I., Luzhetskyy A., Fukuharsa M., Bechthold A., Nakamura N., Fedorenko V. Generation *Streptomyces* SMY 622 strain with increased landomycin E production and its initial characterization. // The journal of antibiotics. – 2004. – **57**, N6. – P. 383-389.
10. Korynevska A., Heffeter P., Matselyukh B. Mechanism underlying the anticancer of the angucycline landomycin E. // Biochem. Pharmacol. – 2007. – **71**, N12. – P. 713-726.
11. Rebets Y., Ostash I., Luzhetskyy A., Hoffmisten D., Brana A., Mendes C., Salas I.A., Bechthold A., Fedorenko V. Production of landomycins in strains *Streptomyces globisporus* 1912 and *S. cyanogenus* S 136 is regulated by genus encoding putative transcriptional activators. // FEMS Microbiol. Left. – 2003. – **222**, N1. – P. 149-153.
12. Rohr J., Thiirle R. Angucycline group antibiotics. // Natural product reports. – 1993. – **14**. – P. 237-287.

Отримано 23.11.2010