

Л.В. Поліщук, С.Л. Голембіовська, Б.П. Мацелюх, В.В. Лук'яничук

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д 03680, Україна*

СПАДКОВА МІНЛИВІСТЬ ОЗНАКИ СИНТЕЗУ КАРОТИНОЇДІВ У *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912

Сімнадцять спонтанних та індукованих мутантів, які набули нову ознаку – синтез бета-каротину та лікопіну, отримано у штаму *Streptomyces globisporus* 1912. Встановлено, що спонтанні мутанти більш стабільно успадковують набутий каротиногенез порівняно з індукованими варіантами.

Синтез каротиноїдів у всіх виділених культур *Crt⁺* та *Lcp⁺* є конститутивною ознакою. Показано, що мутанти *4 Crt⁺*, *6 Crt⁺*, *7 Crt⁺*, *RV Crt⁺* і *R3 Crt⁺* синтезують одночасно каротин та лікопін, в той час як мутанти *TrpS16-1*, *TrpS16-2*, *4 Lcp⁺* та *R3 Lcp⁺* – тільки лікопін.

Одержані каротинсинтезуючі мутанти *S. globisporus* 1912 характеризуються одночасною зміною двох чи трьох фенотипових ознак: синтезу антибіотика ландоміцину *E*, спорутворення та каротиногенезу. Можна припустити, що висока мінливість ознаки каротиногенезу у штаму *S. globisporus* 1912 пов'язана з локалізацією кластера *crt*-генів на кінцевій ділянці лінійної хромосоми поруч із ділянкою *TIR*, в якій, згідно з даними літератури, відбуваються часті структурні перебудови ДНК.

Ключові слова: каротиноїд, бета-каротин, лікопін, *Streptomyces globisporus*, мутант, мінливість.

В літературі представлено дані щодо біосинтезу каротиноїдів представниками різних родин мікроорганізмів, серед яких стрептоміцетам належить помітне місце. Масова доля стрептоміцетів, які можуть продукувати каротиноїди, складає до 15 %. Синтез каротиноїдів більш поширений у представників жовтої групи стрептоміцетів – до 35 % досліджених штамів синтезували ці пігменти [3]. Дослідження біосинтезу каротиноїдів проводилося у *Streptomyces chrysomallus* var. *carotenoides*, *S. mediolani*, *S. setonii*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) та ряду інших стрептоміцетів [9–11, 16].

Встановлено, що синтез каротиноїдів у більшості стрептоміцетів є фотоіндукованим процесом, однак у ряду видів цих мікроорганізмів він може бути конститутивним [15]. Фотоіндукція призводить до п'ятикратного збільшення накопичення каротиноїдів у міцелії стрептоміцетів [3]. Необхідно зазначити, що здатність стрептоміцетів синтезувати каротиноїди є нестабільною ознакою, яка втрачається з великою частотою.

Дослідження каротиногенезу у стрептоміцетів виявили ізопреноїдний шлях їх біосинтезу, який дає початок і іншим важливим природним продуктам.

Виявлено значну подібність будови кластерів генів, що детермінують каротиногенез у ряду видів стрептоміцетів (*S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. setonii*, *Streptomyces avermitilis*) та їх аналогічне розташування на хромосомі [8, 11]. Показано локалізацію кластерів генів, що детермінують синтез вторинних метаболітів і ряду інших властивостей, втрата яких не є летальною для клітини, в ділянці кінцевих інвертованих повторів. Мутанти *S. setonii* і *S. rimosus*, які синтезують каротиноїди, отримані за допомогою індукованого мутагенезу [9]. В той же час *S. avermitilis* та *S. griseus* містять в своїх геномах гени біосинтезу каротиноїдів, але продуцентів останніх до цих пір не було виділено [11, 14].

У даній роботі представлено узагальнюючі результати дослідження синтезу каротиноїдів у 17 мутантів штаму *Streptomyces globisporus* 1912, стабільність успадкування даної ознаки та її залежність від способу отримання мутантів, а також склад каротиноїдів, синтезованих *Crt⁺* та *Lcp⁺* мутантами.

Матеріали та методи. У роботі було використано мутанти *S. globisporus* 1912, які синтезують каротиноїди, з колекції відділу генетики мікроорганізмів ІМВ НАНУ (табл. 1).

При виконанні роботи використовували соєве, Гаузе 1, картопляне та соєво-кукурудзяне агаризовані середовища [4].

© Л.В. Поліщук, С.Л. Голембіовська, Б.П. Мацелюх, В.В. Лук'яничук, 2013

Дослідження мінливості каротинсинтезуючих мутантів здійснювали визначенням частоти змін Crt⁺ фенотипу окремих колоній стрептоміцета при повторних пересівах. Виявлення мутацій проводили на твердому середовищі візуально за зміною забарвлення досліджуваних колоній, які відносили до червоних (Crt⁺), непігментованих (Crt⁻) і рожевих (Lcp⁺).

Виділення та аналіз каротиноїдів проводили за методикою, описаною раніше [1]. Екстракцію контрольних каротиноїдів отримували аналогічним методом з плодів томатів (сорт «Рожевий гігант») і міцелію муковорова гриба *Blakeslea trispora*.

Результати. Штам *S. globisporus* 1912, виділений у 1990 році із зразку ґрунту Вірменії, є продуцентом нового протиракового антибіотика ландоміцину Е.

Як видно з табл. 1, спонтанно від *S. globisporus* 1912 отримано ряд похідних: безплазмідний варіант, що втратив здатність синтезувати ландоміцин Е (б/п) і ряд каротинсинтезуючих мутантів – 4 Crt⁺, 6 Crt⁺ та 7 Crt⁺. Мутант 7 Crt⁺, на відміну від двох попередніх, не синтезував ландоміцин Е.

В нашій роботі представлені також дані дослідження метаболітів мутантів, отриманих під дією нітрозогуанідину і УФ-променів. Цими мутагенами обробляли вихідну культуру *S. globisporus* 1912 та її похідні варіанти (табл. 1 та 2). Під впливом нітрозогуанідину було отримано низку мутантів із зміненими біосинтетичними властивостями. Так, наприклад, мутанти RV, R3 і Y4 проявили здатність синтезувати каротиноїди.

Таблиця 1

Використані в роботі мутанти *S. globisporus* 1912

Мутант	Фенотип	Спосіб отримання
Вихідна культура		
<i>S. globisporus</i> 1912	Дикий тип Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁺	Ізольовано зі зразку ґрунту Вірменії
Червоні культури		
4 Crt ⁺	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Спонтанно від <i>S. globisporus</i> 1912
6 Crt ⁺	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁺	Спонтанно від <i>S. globisporus</i> 1912
7 Crt ⁺	Crt ⁺ LndE ⁻ Spo ⁻	Спонтанно від <i>S. globisporus</i> 1912
RV	Crt ⁺ LndE ⁻ Spo ⁺	Нітрозогуанідин, RS2
R3	Crt ⁺ LndE ⁻ Spo ⁻	Нітрозогуанідин, <i>S. globisporus</i> 3-1
R3-Ч	Crt ⁺ LndE ⁻ Spo ⁻	Розщеплення R3
Y4	Crt ⁺ LndE ⁻ Spo ⁻	Нітрозогуанідин, <i>S. globisporus</i> 1912
Помаранчеві мутанти		
R3-О	Crt ⁺ LndE ⁻ Spo ⁻	Розщеплення R3
Білі мутанти		
R3-Б	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	Розщеплення R3
4W1	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	УФ-опромінювання 4 Crt ⁺
4W	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	Спонтанно від 4 Crt ⁺
7W2	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	УФ-опромінювання 7 Crt ⁺
7W6	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	УФ-опромінювання 7 Crt ⁺
Рожеві мутанти		
4 Lcp	Lcp ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Спонтанно від 4 Crt ⁺
7 Y	Lcp ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Спонтанно від 7 Crt ⁺
TrS16-1	Lcp ⁺ LndE ⁻ Spo ⁻ Trs ^R	Трансформація мутанта б/п гібридною плазмідною TrS16
TrS16-2	Lcp ⁺ LndE ⁻ Spo ⁻ Trs ^R	
Інші мутанти		
б/п	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁺	Спонтанно від <i>S. globisporus</i> 1912
3-1	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	Нітрозогуанідин, <i>S. globisporus</i> 1912

Під дією УФ-променів на мутанти 4 Crt⁺ та 7 Crt⁺ було отримано тільки неактивні мутанти, що втратили здатність синтезувати каротиноїди (4W1, 7W2 і 7W6) (табл. 2).

В літературі описана значна вірогідність одержання варіантів із зміненими генотипом і фенотипом в експериментах по трансформації та трансфекції різних мікроорганізмів. Два каротинсинтезуючі мутанти (TrS16-1, TrS16-2) були одержані після трансформації безплазмідного варіанта *S. globisporus* 1912 б/п гібридною плазмідною TrS16 (7,7 тпн).

Гібридна плазміда TrS16 побудована на базі біфункціонального вектора pWHM4 (6,6 тпн), в якому клонувано ПЛР-копію гену *SCO* 1206 *S. coelicolor* A3(2) (1,1 тпн).

Таблиця 2

Частота спадкових змін ознаки каротиногенезу у мутантів *S. globisporus* 1912

Мутанти <i>S. globisporus</i> 1912	Зміни у фенотиповій ознаці	Частота появи мутантів*	Спосіб отримання мутантів
4Crt ⁺	Crt ⁺ → Crt	0,5 x 10 ⁻²	спонтанно
	Crt ⁺ → Lcp ⁺	2 x 10 ⁻⁴	спонтанно
6Crt ⁺	Crt ⁺ → Crt	0	спонтанно
	Crt ⁺ → Lcp ⁺	0	індуковано нітрозогуанідом
7Crt ⁺	Crt ⁺ → Crt	0,7 x 10 ⁻²	спонтанно
	Crt ⁺ → Lcp ⁺	0,8 x 10 ⁻²	індуковано УФ- променями
RV Crt ⁺	Crt ⁺ → Crt	1 x 10 ⁻²	спонтанно
	Crt ⁺ → Lcp ⁺	2 x 10 ⁻⁴	спонтанно
R3 Crt ⁺	Crt ⁺ → Crt	1 x 10 ⁻²	спонтанно
	Crt ⁺ → Lcp ⁺	1 x 10 ⁻⁴	спонтанно
4W	Crt → Crt ⁺	3 x 10 ⁻³	спонтанно
7Y	Crt → Crt ⁺	1,5 x 10 ⁻²	спонтанно
7W2	Crt → Crt ⁺	6 x 10 ⁻²	спонтанно
4Lcp ⁺	Lcp ⁺ → Lcp ⁻	8 x 10 ⁻⁶	спонтанно
		2 x 10 ⁻²	індуковано нітрозогуанідом
		1,5 x 10 ⁻³	індуковано УФ- променями

Позначення: * - дослідження проводилися на картопляному середовищі.

Дослідження стабільності успадкування фенотипових ознак індукованих мутантів RV та R3 виявили появу у них варіантів зі зменшеним синтезом каротиноїдів або втратою останніх. Встановлено, що повітряний і субстратний міцелій мутанта R3 забарвлений в темно-червоний колір завдяки інтенсивному синтезу каротиноїдів. Після кожного розсіву інтенсивно забарвленої в темно-червоний колір колонії (R3-Ч) з'являються з великою частотою (28 %) колонії, що забарвлені в помаранчевий колір (R3-О) та безпігментні колонії R3-Б (27 %).

Наступні дослідження виявили, що варіант R3-Б втратив здатність синтезувати каротиноїди, в той час як R3-О синтезує всі ті ж речовини, що і R3-Ч, але в значно меншій кількості. Білі ревертанти (R3-Б) є стабільними, в той же час продовжується розщеплення R3-О та R3-Ч колоній мутантів за попередньою схемою. Як правило, колонії R3-О та R3-Ч є рівномірно забарвленими, однак виявляються колонії з сектором, що забарвлений інтенсивніше або слабше від більшої частини колонії. Спонтанні мутанти 4 Crt⁺, 6 Crt⁺ та 7 Crt⁺ більш стабільно зберігають дану ознаку протягом багатьох років. Однак, після численних розсівів відібрано кілька колоній (4W, 4 Lcp⁺, Y4), які мають зміни у каротиногенезі. Так, спонтанний мутант 4 Crt⁺ (4W) не синтезує каротиноїдів, а мутанти 4 Lcp та 7Y здатні синтезувати тільки лікопін (табл. 2).

Нами встановлено, що поява спонтанних непігментованих Crt⁻ ревертантів у Crt⁺ мутантів (4 Crt⁺ та 7 Crt⁺) відбувається у середньому з частотою 0,9 %. У штаму 6 Crt⁺ жодної білої колонії не виявлено серед майже семи тисяч досліджених. У мутанта RV виявлено появу спонтанної реверсії даної ознаки у 22 % колоній. Індукований нітрозогуанідом мутагенез призводив до росту рівня реверсій: у штаму 7 Crt⁺ білі варіанти становили 8 % із перевірених 4189 колоній (табл. 2).

Відновлення синтезу каротиноїдів у спонтанних Crt⁻ ревертантів 4W, 7Y та 7W має високу частоту – кількість Crt⁺ колоній становила від 0,03 % до 6 % досліджуваних колоній. Найбільшу кількість колоній ревертантів було виявлено у мутанта 7W (6 % на картопляному середовищі). Найбільш стабільно фенотип зберігав мутант 4W: на картопляному середовищі Crt⁻ колонії становили 0,03 % (табл. 2).

Спонтанно мутант 4 Crt⁺ з частотою 2 x 10⁻⁴ утворює варіанти, що синтезують тільки один каротиноїд – лікопін. В розсівах аспорогенного мутанту 4 Crt⁺ на картопляному середовищі було відібрано мутант 4 Lcp⁺. Результати дослідження генетичної мінливості даної ознаки у мутанта 4 Lcp⁺ виявили появу ревертантів з частотою 10⁻⁶ (табл. 2).

У ряду отриманих Crt^+ -трансформантів протягом певного часу спостерігалося розщеплення фенотипових ознак. Так, наприклад, у клону TrpS16 виявлено чотири фенотипи: 1) $Crt^+ LndE^+ Spo^-$, 2) $Crt^+ LndE^- Spo^+$,

3) $Crt^+ LndE^+ Spo^+$ та 4) $Lcp^+ LndE^- Spo^-$. Лікопінсинтезуючі варіанти (TrpS16-1, TrpS16-2) трансформанту TrpS16 стабільно підтримують отриманий генотип ($Lcp^+ LndE^- Spo^-$) протягом 2 років.

При дослідженні складу комплексу каротиноїдів червоних мутантів (4 Crt^+ , 6 Crt^+ , 7 Crt^+ , RV Crt^+ і R3 Crt^+) за допомогою тонкошарової хроматографії виявлено дві плями речовин з хроматографічною рухливістю R_f 0,5 і 0,8, які відповідають лікопіну і бета-каротину відповідно (рис. 1А, 1Б). В той же час рожеві мутанти TrpS16-1, TrpS16-2, 4 Lcp^+ та R3 Lcp^+ синтезують тільки метаболіт з R_f 0,5 – лікопін (рис. 1А). Кількість лікопіну досягає 80 % від суми всіх каротиноїдів, синтезованих мутантом 4 Lcp^+ при вирощуванні на повноцінних середовищах.

Ідентифікація каротиноїдів проводилася за допомогою визначення спектрів поглинання (рис. 1А, 1Б), а також високоефективної рідинної хроматографії (рис. 2, 3).

Каротиноїд з часом утримання 7,614 хв (пік № 1), який синтезують всі каротинсинтезуючі мутанти *S. globisporus* 1912, є лікопіном, а другий пігмент із R_t 14,598 хв (пік № 2) – бета-каротином. За допомогою ВЕРХ-аналізу також доведено, що каротинсинтезуючі мутанти не утворюють гама- чи фі-каротину, на відміну від ряду інших видів стрептоміцетів [7, 10, 15].

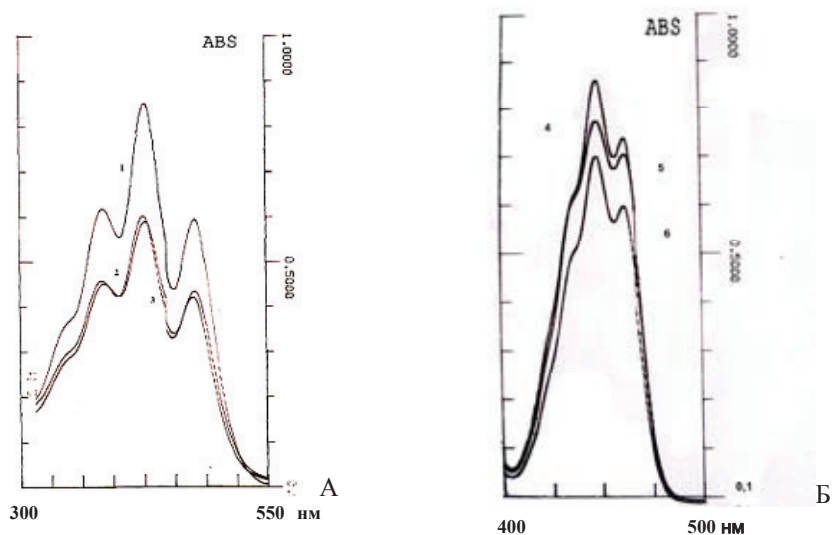


Рис. 1. Спектри поглинання очищених пігментів з $R_f = 0,5$ (а) і $R_f = 0,8$ (б) в ацетоні: 1 – 4 Lcp^+ ; 2 - TrpS16-1; 3 - TrpS16-2. 4 – 7 Crt^+ , 5 – R3 Crt^+ , 6 – 4 Crt^+ . По осі абсцис - довжина хвилі, нм.

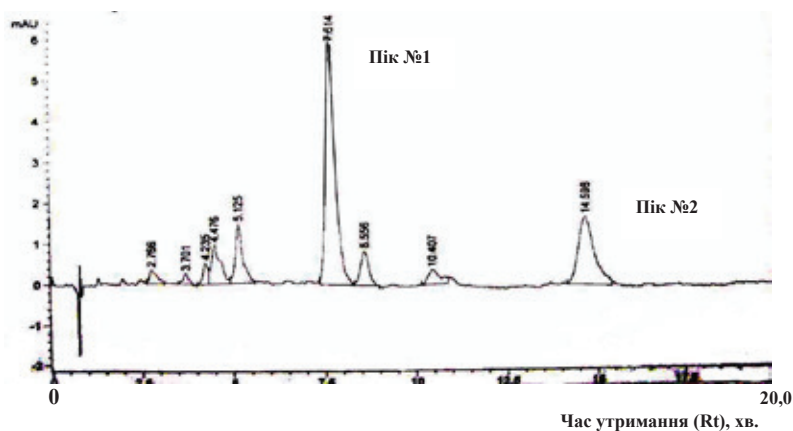


Рис. 2. Результати ВЕРХ-аналізу каротиноїдів мутанту *S. globisporus* 4 Crt^+ при довжині хвилі 450 нм. Пік №1 – лікопін; пік №2 – бета-каротин.

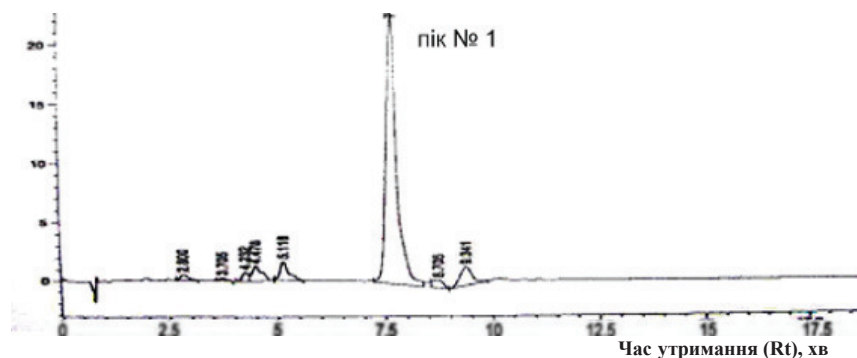


Рис. 3. Результати ВЕРХ-аналізу каротиноїдів мутанту *S. globisporus* 4 Crt^+ при довжині хвилі 450 нм. Пік № 1 – лікопін.

Встановлено, що всі отримані нами Crt^+ та Lcr^+ мутанти в результаті як індукованих, так і спонтанних мутацій, синтезують каротиноїди конститутивно, без впливу індукуючого фактору. Не виявлено позитивного впливу синього світла на рівень синтезу каротиноїдів досліджуваними штамми.

Обговорення результатів. Як відомо, каротиноїди є природними фотопротекторами та антиоксидантами, які на молекулярному та клітинному рівнях запобігають змінам хромосомної ДНК, що індукуються окисниками, генотоксичними речовинами, рентгенівським та УФ-випроміненням [2, 5, 15]. Традиційно науково-дослідні та виробничі процеси направлені на підвищення рівня виробництва β -каротину, однак в останній час увагу дослідників привертає попередник його синтезу – лікопін. Встановлено, що лікопін – це активний антиоксидант, який використовується як профілактичний та лікувальний засіб при серцево-судинних та онкологічних захворюваннях [2].

Останнім часом у багатьох лабораторіях світу вивчають синтез каротиноїдів стрептоміцетами як промислово важливою групою мікроорганізмів.

Дослідження каротиноїдів проводилося у багатьох видів даного роду мікроорганізмів - *S. chrysomallus* var. *carotenoides*, *S. mediolani*, *S. setonii*, *S. griseus*, *S. coelicolor* A3(2) та ряду інших [9, 11, 13]. Виявлено значну подібність будови кластерів генів біосинтезу каротиноїдів у досліджених стрептоміцетів та їх аналогічне розташування в ділянці кінцевих інвертованих повторів на лінійній хромосомній ДНК. Показано, що здебільшого кластери каротиногенезу містять 7 *crt*-генів та 5 регуляторних *lit*-генів [8, 11]. Встановлено, що на хромосомі одночасно може знаходитися кілька копій кластера каротиногенезу. Хромосома *S. griseus* IFO13350 містить 3 копії даного кластера і всі вони знаходяться у криптичному стані, оскільки не виявлено жодного спонтанного чи індукованого каротинсинтезуючого мутанту [11]. Аналогічні результати отримані і для *S. avermitilis* – даний штам містить один кластер генів, на відміну від вищезгаданого [8]. В той же час у штамів *S. setonii* ISP53951995 і *S. rimosus* були отримані за допомогою індукованого мутагенезу Crt^+ -мутанти [9].

У штаму *S. globisporus* 1912 нами отримано колекцію як спонтанних, так і індукованих Crt^+ -мутантів (таблиця) і досліджено стабільність успадкування каротиногенезу у 17 мутантів. Нітрозогуанідин виявився ефективним мутагеном для індукції Crt^+ -мутантів у *S. globisporus* 1912 порівняно з УФ-опроміненням.

За даними літератури синтез каротиноїдів у більшості стрептоміцетів є фотоіндукованим процесом, однак у ряду видів стрептоміцетів він є конститутивним [14, 15]. Показано, що процес біосинтезу каротиноїдів у ряду стрептоміцетів індукується світлом певної довжини, дією стресових факторів або регенерацією протопластів [7, 9, 14, 15].

У *S. coelicolor* A3(2) промотори *crtE* (P_{crtE}), *crtY* (P_{crtY}), *litR* (P_{litR}) та *litS* (P_{litS}) відповідно, активуються синім світлом, під дією якого активно синтезується білок S (сігма-фактор) - активатор транскрипції генів біосинтезу каротиноїдів. Надекспресія гену *litS* є передумовою конститутивного утворення каротиноїдів у штамі дикого типу [15].

Встановлено, що у всіх отриманих нами каротинсинтезуючих варіантів каротиногенез є конститутивним і не виявлено його зростання під дією синього світла.

Можна припустити, що конститутивний синтез каротиноїдів Crt⁺ та Lcp⁺ мутантами *S. globisporus* 1912 є результатом мутації регуляторних генів, які детермінують синтез сигма – або анти-сигма – факторів транскрипції. У геномі *S. coelicolor* A3(2) виявлено 58 факторів сигма, 44 із яких мають позацитоплазматичну функцію координації відповіді на зовнішні фактори [12].

При дослідженні стабільності успадкування каротиногенезу у низки відібраних мутантів *S. globisporus* 1912 було встановлено, що мутанти, які отримано спонтанно (4 Crt⁺, 6 Crt⁺ та 7 Crt⁺) і під дією нітрозогунідину (RV та R3) мають різну стабільність набутої здатності синтезувати каротиноїди. Показано, що спонтанні мутанти *S. globisporus* 1912 характеризуються більшою стабільністю каротиногенезу, ніж індуковані мутанти.

Причиною мінливості ознаки утворення каротиноїдів є нестабільність геному на кінці лінійної хромосоми стрептоміцетів – місці локалізації кластера Crt-генів та TIR-елементів.

Дослідження комплексу метаболітів мутантів методами ТШХ, спектрофотометрії та ВЕРХ-аналізу виявили, що червоні Crt⁺-мутанти (4 Crt⁺, 6 Crt⁺, 7 Crt⁺, RV Crt⁺ і R3 Crt⁺) синтезують каротин та лікопін, в той час як рожеві Lcp⁺-мутанти (TpS16-1, TpS16-2, 4 Lcp⁺ та R3 Lcp⁺) – тільки лікопін.

Як відомо, лікопін є попередником на шляху синтезу бета-каротину і мутації гену crtY, який кодує лікопін циклазу роблять неможливим перетворення лікопіну у бета-каротин і призводять до накопичення лікопіну у клітині мутанта. Ми вважаємо, що Lcp⁺-мутанти мають мутацію в гені crtY, яка і призводить до накопичення лікопіну. Кількість лікопіну у екстракті мутанту 4 Lcp⁺ досягає 80 % від суми всіх синтезованих каротиноїдів (рис. 3).

Л.В. Полищук, С.Л. Голембиовская, Б.П. Мацелюх, В.В. Лукьянчук

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

НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИЗНАКА СИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ У *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912

Резюме

Семнадцать спонтанных и индуцированных мутантов, которые приобрели новый признак – синтез бета каротина и ликопина, получены у штамма *Streptomyces.globisporus* 1912. Установлено, что спонтанные мутанты более стабильно наследуют приобретенный каротиногенез по сравнению с индуцированными.

Синтез каротиноидов у всех выделенных Crt⁺ та Lcp⁺ культур является конститутивным признаком. Показано, что Crt⁺-мутанты (4Crt, 6Crt, 7Crt, RVCrt и R3Crt) синтезируют бета-каротин и ликопин, в то время как Lcp⁺-мутанты (TpS16-1, TpS16-2, 4Lcp и R3Lcp) – только ликопин.

Полученные мутанты и трансформанты *S. globisporus* 1912, синтезирующие каротин, характеризуются одновременным изменением двух или трёх фенотипических признаков: синтеза антибиотика ландомицина Е, споруляции и каротиногенеза. Можно предположить, что высокая нестабильность признака каротиногенеза у штамма *S. globisporus* 1912 связана с локализацией кластера crt-генов в концевой области хромосомы рядом с TIR-элементом, в которой, согласно литературным данным, происходят частые структурные перестройки ДНК.

К л ю ч е в ы е с л о в а: каротиноид, бета-каротин, ликопин, *Streptomyces*, мутация, стабильность наследования.

L.V. Polishchuk, S.L. Golembiovska, B.P. Matselyukh, V.V. Lukyanchuk

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

GENETIC VARIABILITY OF SYNTHESIS FEATURE OF CAROTENOIDS IN *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912

S u m m a r y

Seventeen spontaneous and induced mutants, that acquired a new characteristic – the synthesis of beta-carotene and lycopene, were obtained from strain *Streptomyces globisporus* 1912. It was found that spontaneous mutants inherited more stably the acquired carotenogenesis as compared to induced ones.

Synthesis of carotenoids by all isolated Crt⁺ Lcp⁺ cultures is a constitutive feature. It was shown that Crt⁺-mutants (4Crt, 6Crt, 7Crt, RVCrt and R3Crt) synthesized beta-carotene and lycopene, while Lcp⁺-mutants (TpS16-1, TpS16-2, 4Lcp and R3Lcp) – only lycopene.

The obtained mutants and transformants of *S. globisporus* 1912, synthesizing carotene were characterized by a simultaneous change of two or three phenotypic characteristics: synthesis of the antibiotic landomycin E, sporulation and carotenogenesis. It can be assumed that the high instability of this characteristic (carotenogenesis) in strain *S. globisporus* 1912 was caused by localization of the crt-genes cluster close to a TIR-element in a chromosome terminal region, frequent structural reorganization of DNA here were reported in the literature.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: carotenoid, beta-carotene, lycopene, *Streptomyces*, mutation, stability of inheritance.

The authors address: Polishchuk L.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Продуктування каротину і лікопіну мутантами *Streptomyces globisporus* 1912. // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 4. – С. 45–50.
2. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов // М.: Наука, 1988. – 197 с.
3. Козырицкая В.Е., Андреев Е.И. Синтез каротиноидов желтыми стрептомицетами // Acta biotechnol. – 1984. – 4, № 1. – С. 59–65.
4. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. // М.: Мир. – 1978. – С. 134–140.
5. Шапкина М.Я., Шапки П.Н., Сергеев А.В. Биодоступность каротиноидов // Вопросы мед. химии. – 1999. – 45, №2. – С. 12–19.
6. Cronin J.R. Lycopene: The powerful antioxidant that makes tomatoes red. // Altern. Complement Ther. – 2000. – 6, N 2 – P. 92–94.
7. Glazebrook M.A., Vining L.C., White R.L. Growth morphology of *Streptomyces akiyoshiensis* in submerged culture: influence of pH, inoculum, and nutrients // Can. J. Microbiol. – 1992. – 38, N 2. – P.98–103.
8. Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Ômura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* // Nat. Biotechnol. – 2003. – 21. – P. 526–533.
9. Kato F., Hino T., Nakaji A., Tanaka M., Koyama Y. Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene crtS, whose product is similar to a sigma factor. / F. Kato, T. Hino, A. Nakaji, M. Tanaka, Y. Koyama // Mol. Gen. Genet. – 1995. – 247, N 10. – P. 387–390
10. Krügel H., Krubasik P., Weber K., Saluz H.P., Sandmann G. Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase // Biochim. biophys. acta. – 1999. – 1439. – P. 57–64.
11. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M., Horinouchi S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 // J. Microbiol. – 2008. – 190, N 11. – P. 4050–4060.
12. Sevcikova B., Rezuchova B., Homerova D., Kormanec J. The anti-anti-sigma factor BldG is involved in activation of the stress response sigma factor $\sigma(H)$ in *Streptomyces coelicolor* A3(2) // J. Bacteriol. – 2010. – 192(21). – P. 5674–5681.
13. Steinbrenner J., Linden H. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis* / J. Steinbrenner, H. Linden // Plant Physiol. – 2001. – 125 – P. 810–817.
14. Takano H., Asker D., Beppu T., Ueda K. Genetic control for light-induced carotenoid production in non-phototrophic bacteria // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – 33. – P. 88–93.
15. Takano H., Obitsu S., Beppu T., Ueda K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster // J. Bacteriol. – 2005. – 187, N 5. – P. 1825–1832.
16. Wang M., Yang H., Gao Jun-lian., Ma Rong-cai. Breeding of high-yield lycopene producing strains of *Streptomyces rimosus* and studies on its flask culture conditions // China Biotechnology. – 2009. – N 12. – C. 13.

Отримано 16.11.2012