РАЗРАБОТКА ВЫСОКОАКТИВНОГО ШТАММА – ПРОДУЦЕНТА ВИРДЖИНИАМИЦИНА

Савушкин Вячеслав Алексеевич
Аспирант
Российский Государственный Аграрный Университет-
МСХА имени К.А.Тимирязева,
127550, РФ, Москва Тимирязевская ул. 49.

DEVELOPMENT HIGH-ACTIVITY STRAIN - VIRGINIAMYCINE PRODUCER

Savushkin Vyachtslav Alekseevich
Postgraduate
Russian State Agrarian University – Moscow
Timiryzev Agricultural Academy,
127550, Russian Federation, Moscow, Timiryazevskaya st. 49.

Аннотация

Кормовой антибиотик вирджиниамицин, продуцируемый некоторыми представителями рода *Streptomyces*, представляет собой природную смесь макроциклических компонентов, основными из которых являются синергически взаимодействующие факторы M1 и S1. Максимальная активность вирджиниамицина наблюдается в присутствии 25-40% S1, при котором активность M1 увеличивается в 3,5-4 раза. В связи с большим количеством генов, вовлеченных в биосинтез вирджиниамицина, проблема получения высокопродуктивных штаммов, способных синтезировать M1 и S1 в синергическом соотношении при общей продуктивности более 3 г/л, остается актуальной. Методом многоступенчатого УФ-мутагенеза коллекционного штамма *Streptomyces sp*. DSM 40559 был получен высокоактивный штамм S 15-30, производительность которого на базовой среде существенно превышала таковую родительского штамма (2,6 и 0,35 г/л вирджиниамицина, соответственно), а отношение M1:S1 находилось в синергическом диапазоне (72:28). Был подобран состав ферментационной среды, обеспечивающие конечный выход вирджиниамицина на уровне 3,9 ± 0,09 г/л с сохранением оптимального соотношения его компонентов M1 и S1 (72:28). Впервые показана вариабельность соотношения M1:S1 в общем содержании антибиотика в зависимости от различных компонентов среды.

Abstract

Virginiamycin, an antibiotic produced by some Streptomyces species, is widely used in veterinary and bioethanol production. It represents a natural mix of two different macrocyclic components, among which M1 and S1 factors are the main acting components. M1 and S1 act synergistically when present in the optimum ratio of 60-75% of M1 and 25-40% of S1. Due to a large number of genes involved into the virginiamycin biosynthesis, the development of overproducing strains able to synthesize M1 and S1 at a synergistic ratio with the total productivity exceeding 3-4 g/L still remains a relevant problem. Using a multistep random UV mutagenesis of the Streptomyces sp. strain DSM 40559, a highly active strain S 15-30 was obtained, which virginiamycin titer on a basic medium significantly increased that of the parental strain (2.6 and 0.35 g/L, respectively), and the M1:S1 ratio remained synergistic (72:28). Various sources of carbon, nitrogen, and macroelements were evaluated for medium improvement, and several different types of synthetic macroporous resins were tested to provide the highest virginiamycin titer in culture broth of the developed strain. The resulting improved fermentation medium supplemented strain productivity up to 3.9 ± 0.09 g/L with the simultaneous maintenance of the M1:S1 ratio within the synergistic range (72:28). The variability of the M1:S1 ratio in the total antibiotic titer depending on various medium composition and resin type was first demonstrated.

Ключевые слова: вирджиниамицин, *Streptomyces*, штамм-суперпродуцент, индуцированный мутагенез.

Key words: virginiamycin, *Streptomyces*, strain improvement, induced mutagenesis.

На первом этапе исследований по созданию высокоактивного штамма было определено оптимальное время УФ-воздействия и осуществлена оценка выживаемости и частоты морфологических мутаций родительского штамма *Streptomyces sp*. DSM 40559 в интервале экспозиции от 10 до 15 мин. Согласно полученным данным, экспозиция в течение 12 минут оказалась максимально эффективной для получения морфологических мутантов (частота возникновения составила 20,4-26,1%); при этом выживаемость штамма DSM 40559 при облучении УФ в течение 12 мин составила 0,06%. Основываясь на этих данных, в дальнейшей работе использовали время экспозиции, равное 12 мин.

В результате проведения многоступенчатого мутагенеза был получен штамм S 15-30, продуктивность которого составила 2.6 ± 0.05 г/л вирджиниамицина, что значительно превысило данный показатель исходного штамма DSM 40559 (0.35 г/л), а процентное соотношение синтезируемых M1 и S1 оказалось равным 72:28, т.е. в рамках синергического диапазона. Генетическая стабильность штамма S 15-30 была проверена путем трех

последовательных пересевов на агаризованной среде с проверкой продуктивности при каждом пересеве; согласно полученным результатам, уровень биосинтеза вирджиниамицина оставался неизменным.

Для полученного штамма-суперпродуцента S 15-30 был осуществлен анализ и подбор количественного и качественного состава ферментационной среды, способной дополнительно увеличить продуктивность отобранного штамма.

В частности, было изучено влияние различных источников углерода и их содержания в ферментационной среде на продуктивность штамма S 1530 и соотношение M1:S1. Для этого штамм культивировали в среде следующего состава (г/л): кукурузный глютен – 5,0; мясной пептон – 2,5; дрожжевой экстракт – 1,0; мальтозный экстракт – 10,0; мел – 5,0; KH_2PO4 – 1,6; Na_2HPO_4 – 1,0. В качестве источника углерода в среду добавляли один из четырех утилизируемых штаммом углеводов (глюкоза, сахароза, манноза и крахмал) в четырех разных концентрациях. Согласно полученным результатам, максимальный уровень биосинтеза вирджиниамицина (3.05 ± 0.10 г/л) наблюдали при использовании в качестве источника углерода глюкозы в концентрации 50,0 г/л; при этом соотношение M1:S1 составило 74:26. Следует отметить, что использование различных источников углерода приводило к достаточно заметным вариациям данного соотношения (от 75:25 до 60:40).

Также было проведено исследование влияния различных источников азота (как органических так и не органических) на продуктивность штамма S 15-30 и соотношение отдельных компонентов вирджиниамицина M1 и S1. Максимальное содержание вирджиниамицина в культуральной жидкости было отмечено в случае использования среды с добавлением соевой муки в качестве источника органического азота в концентрации 15 г/л и нитрата аммония в концентрации 1 г/л (3.76 ± 0.11 г/л), сохранив при этом оптимальное соотношение факторов M1 и S1.

Проведенная оценка эффективности внесения дополнительных источников некоторых макроэлементов ($MgCl_2$, KNO_3, NaCl, $MgSO_4$) в концентрациях от 0,5 до 3,0 г/л на биосинтез вирджиниамицина показала незначительное увеличение содержания антибиотика в культуральной жидкости при добавлении в среду, оптимизированную по источникам углерода и азота хлористого магния в концентрации 0,5 г/л; при этом во всех исследованных вариантах соотношение M1:S1 находилось в пределах максимального синергизма (23-30% фактора S1 и 70-77% фактора M1).

Полученные данные позволяют отметить, что продуктивность полученного высокоактивного штамма S 15-30, способного синтезировать компоненты вирджиниамицина M1 и S1 в синергическом соотношении, после подбора состава питательной среды находится на высоком мировом уровне (3.9 ± 0.09 г/л).

Список литературы:

1. 1. Mast Y., Wohlleben W. (2014) Streptogramins – two are better than one! Int. J. Med. Microbiol., 304(1): 44-50.
2. Biot A.M. (1984) Virginiamycins: properties, biosynthesis, and fermentation. In: Biotechnology of Industrial Antibiotics (Vandamme E.J. ed.). New York–Basel: Dekker. P. 695–720.
3. Zhao W., Zhang Z., Cheng Q. Culture medium for biosynthesis of virginiamycin M // Patent CN101538539. – 2011.
4. Han F., Li G., Zou J., Deng J., Huang L. Method for biosynthesizing virginiamycin by streptomycete // Patent CN102943102. – 2013.

Reference:

1. Mast Y., Wohlleben W. (2014) Streptogramins – two are better than one! Int. J. Med. Microbiol., 304(1): 44-50.
2. Biot A.M. (1984) Virginiamycins: properties, biosynthesis, and fermentation. In: Biotechnology of Industrial Antibiotics (Vandamme E.J. ed.). New York–Basel: Dekker. P. 695–720.
3. Zhao W., Zhang Z., Cheng Q. Culture medium for biosynthesis of virginiamycin M // Patent CN101538539. – 2011.
4. Han F., Li G., Zou J., Deng J., Huang L. Method for biosynthesizing virginiamycin by streptomycete // Patent CN102943102. – 2013.