

На правах рукописи

Савушкин Вячеслав Алексеевич

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОСИНТЕЗА АНТИБИОТИКА
ВИРДЖИНИАМИЦИНА**

Специальность: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева».

Научный руководитель: **Камионская Анастасия Михайловна**, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе, ведущий научный сотрудник лаборатории системной биологии растений Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Официальные оппоненты: **Бибикова Маргарита Васильевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ИП Бибикова Мария Николаевна.

Стацюк Наталия Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела болезней картофеля и овощных культур Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно – исследовательский институт фитопатологии»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «19» ноября 2019 г. в 16³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.10 на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127550, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел/факс: +7(499)976 -21-84.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте www.timacad.ru

Автореферат разослан «___» сентября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Р.Н. Киракосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Надёжное обеспечение населения мясной и молочной продукцией, являющейся основным источником животного белка, представляет собой одно из важнейших условий достижения продовольственной безопасности государства. Удовлетворить потребности населения в мясе и молочных продуктах в значительной степени можно за счёт наращивания объемов их производства в регионах страны. Одним из способов решения данной проблемы является применение биологически активных веществ, в частности, антибиотиков с целью профилактики заболеваемости и как результат, повышения продуктивности сельскохозяйственных животных.

Необходимость использования антибиотиков в животноводстве определяется несколькими факторами. Во-первых, крупные животноводческие и птицеводческие хозяйства характеризуются тем, что большое поголовье птиц или животных содержится на относительно малых площадях, что создает риск масштабного распространения различных инфекций. Во-вторых, выращивание и содержание животных предусматривает проведение определенных обработок с применением медицинских препаратов, в т.ч. антибиотиков. В-третьих, профилактический прием антибиотиков рекомендуется в ряде случаев при транспортировке птицы и животных для снятия стресса. Наконец, некоторые антибиотики используются для стимуляции роста сельскохозяйственных животных (Черенков, 2011).

Антибиотики группы стрептограминов, к которым относится вирджиниамицин, успешно применяются в ветеринарии как терапевтические вещества для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта птиц, свиней и крупного рогатого скота.

Вирджиниамицин представляет собой природную смесь макроциклических пептидолактонов M1 и S1. Коммерческий препарат вирджиниамицина содержит ~75% фактора M1 и ~5-25% фактора S1. Именно в таком соотношении компоненты проявляют синергизм в подавлении синтеза белка в клетках чувствительных микроорганизмов, нарушая трансляцию РНК (Mast Y., 2014). Эта уникальная черта синергического взаимодействия также важна для объяснения отсутствия значительной резистентности микроорганизмов к вирджиниамицину после многих лет интенсивного его использования в животноводстве.

Несмотря на то, что в России заболеваемость сельскохозяйственных животных, связанная с болезнями ЖКТ, в последние годы составляет 42,7-51,2% от оборота стада, собственное производство вирджиниамицина в РФ отсутствует.

Основное производство препаратов, содержащих вирджиниамицин, сосредоточено на бразильских фабриках компании РАНС; кроме того, существует ряд других зарубежных индийских, китайских и американских компаний, производящих аналогичные препараты.

Очевидным путем решения проблемы является создание современного конкурентоспособного производства субстанций антибиотиков, а в частности, субстанции вирджиниамицина.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы была разработка эффективной лабораторной технологии биосинтеза антибиотика вирджиниамицина.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) Определить оптимальный состав питательной среды, способствующий максимальной продуктивности штамма-продуцента *Streptomyces virginiae*.

2) Подобрать оптимальные технологические параметры ферментации, способствующие максимальной продуктивности штамма-продуцента *Streptomyces virginiae*.

3) Разработать оптимальную технологическую схему биосинтеза вирджиниамицина в лабораторной ферментационной установке.

Научная новизна. Впервые определены основные питательные потребности штамма *S. virginiae* IB 25-8 - продуцента антибиотика вирджиниамицина, в частности источники углерода, азота и макроэлементов, определены оптимальные условия культивирования данного штамма, способствующие максимальному накоплению вирджиниамицина в культуральной жидкости, а также изучено влияние синтетических адсорбирующих смол на рост и продуцирующую способность штамма *S. virginiae* IB 25-8 в процессе его глубинного культивирования.

На основании полученных результатов впервые была разработана оптимальная технологическая схема биосинтеза вирджиниамицина в лабораторной ферментационной установке, позволяющая значительно повысить накопление вирджиниамицина в культуральной жидкости.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное масштабирование технологии биосинтеза вирджиниамицина при глубинном культивировании штамма *S. virginiae* IB 25-8 продемонстрировало возможность проведения процесса биосинтеза вирджиниамицина с использованием данного штамма в лабораторных и опытно-промышленных ферментационных установках.

Подбор оптимального состава питательной среды, параметров и условий глубинного культивирования данного штамма, позволяют в дальнейшем разработать технологию получения антибиотика вирджиниамицина на опытно-промышленном и промышленном уровне.

На основе данных, полученных в результате исследования, получен патент RU 2637857 C1 на изобретение «Штамм *Streptomyces virginiae* - продуцент вирджиниамицина и способ получения вирджиниамицина».

Методология и методы исследования. При выполнении диссертационной работы использовались микробиологические методы, методы лабораторного культивирования микроорганизмов, методы микроскопии, различные методы количественного определения веществ. Более детальное описание представлено в разделе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту.

1) Определен оптимальный состав питательной среды, способствующий максимальной продуктивности штамма-продуцента *Streptomyces virginiae*.

2) Подобраны оптимальные технологические параметры ферментации, способствующие максимальной продуктивности штамма-продуцента *Streptomyces virginiae*.

3) Разработана оптимальная технологическая схема биосинтеза вирджиниамидина в лабораторной ферментационной установке с использованием дополнительного источника углеводного питания и синтетической адсорбирующей смолы.

4) Проведено масштабирование процесса культивирования штамма *S. virginiae* IB 25-8 и тем самым продемонстрирована возможность использования разработанной технологии биосинтеза вирджиниамидина на опытно-промышленном уровне.

Степень достоверности и апробация работы. Диссертационная работа выполнена на современном оборудовании с использованием современных общепринятых и адаптированных для данной работы методик.

Материалы работы были представлены на: V Научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», 2017г., г. Ялта (Крым); XXXXI международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы современной науки», 2019 г., г. Санкт-Петербург; XXXIII международной научно практической конференции «Вопросы современной науки: проблемы, тенденции и перспективы», 2019г, г. Москва.

Личный вклад диссертанта. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 9 работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и/или Web of Science, 3 тезиса в сборниках российских и международных научных конференций, а также получен патент на изобретение RU 2637857 C1.

Структура и объем работы. Диссертационная работа имеет стандартную структуру и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, заключение, список публикаций по теме диссертации, список литературы и приложение. Работа изложена на 100 страницах машинописного текста, содержит 18 рисунков, 14 таблиц, 1 приложение. Список литературы включает 79 работ, в том числе 64 иностранных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Обоснована актуальность научного исследования, сформулированы основная цель и задачи исследования.

Глава I. Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрены физико-химические свойства, механизм действия и биосинтез вирджиниамицина. Описаны существующие способы применения вирджиниамицина и его производных в промышленном производстве топливного спирта, а также показана ценность использования вирджиниамицина в качестве антибиотической кормовой добавки для лечения и профилактики различных заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц. Особое внимание уделено способам повышения продуктивности промышленных штаммов – продуцентов биологически активных веществ, в частности особенностям подбора питательных сред и оптимизации условий культивирования.

Глава II. Материалы и методы

Исследования проводились на базе лаборатории биотехнологии физиологически активных веществ Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Штамм-продуцент *Streptomyces virginiae*

В работе использовался штамм *S. virginiae* с присвоенным индексом IB 25-8, полученный из исходного штамма *S. virginiae* ВКПМ Ас-790 в результате применения многоступенчатого мутагенеза с последующей селекцией. Продуктивность данного штамма составила 1,1 г вирджиниамицина в 1л культуральной жидкости. Соотношение вирджиниамицинов М1 и S1 во время культивирования вновь полученного штамма составляло 70-75% и 25-30% соответственно.

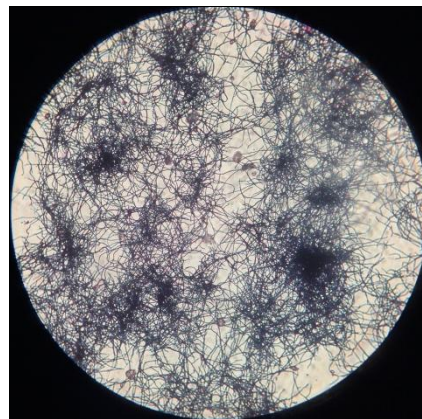
Культурально-морфологические признаки штамма

Рост штамма на агаризованных средах

При культивировании на среде Гаузе-1 штамм образует слегка выпуклые круглые колонии диаметром 7-9 мм. Поверхность колонии гладкая, споры серого цвета, по краям колоний узкий (0,5 мм) ободок белого цвета. Субстратный мицелий коричневый. Вокруг колонии - нечеткая зона гидролиза крахмала диаметром 3-5 мм (рисунок 1, а)



а)



б)

Рисунок 1. Колонии штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 на агаризованной среде (а) и жидкой ферментационной среде при увеличении 40X (б)

Рост штамма на жидких средах

При культивировании на жидкой ферментационной среде (состав %: солодовый экстракт - 1,0; дрожжевой экстракт - 0,1; CaCO_3 - 0,5; глюкоза - 0,5; мясной пептон - 0,25; pH среды 7,0-7,2) штамм образует крупные сплетения гиф (рисунок 1,б). На первые сутки ферментации культуральная жидкость приобретает оттенки темно-серого цвета. Цвет осадка соответствует цвету среды.

Для выращивания, поддержания и хранения штамма культуры *S. virginiae* использовали агаризованную среду следующего состава (%): агар-агар – 2,0; кукурузный крахмал – 2,0; KH_2PO_4 – 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; KNO_3 – 0,1; NaCl – 0,5; FeSO_4 – 0,001; дистиллированная вода до 100; pH=6,8–7,0. Культивирование штамма осуществляли при температуре 28°C в течение 6-7 суток.

Для получения посевного материала использовали жидкую вегетативную среду следующего состава (%): глюкоза – 0,1; мясной пептон – 0,3; дрожжевой экстракт – 0,1; гидролизат казеина – 0,5; CaCO_3 – 0,05; вода дистиллированная – до 100; pH 7,0 – 7,2. Культивирование осуществляли на качалочной установке «Innova 44» при 220-240 об/мин (эксцентриситет 5 см) и температуре 28°C в течение 24-26 часов.

В качестве исходной ферментационной среды использовали среду следующего состава (%): глюкоза – 0,5; мясной пептон – 0,25; дрожжевой экстракт – 0,1; солодовый экстракт – 1,0; CaCO_3 – 0,5; вода дистиллированная – до 100; pH 6,8 – 7,0. Культивирование осуществляли на качалочной установке при 250 об/мин (эксцентриситет 2,5 см), температуре 28°C в течение 96 часов.

Разработку технологии биосинтеза вирджиниамицина проводили на ферментационных установках, состоящих из биореакторов объемом 15л и 100л.

Концентрацию биомассы актиномицета определяли весовым методом.

Определение содержания восстанавливающих сахаров в культуральной жидкости проводили согласно общепринятой методике Бертрана (Жданов и др., 1973).

Для предварительной оценки продуктивности штамма использовали метод тонкослойной хроматографии на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F 254 “Merck” (Germany), в системе хлороформ и метанол в соотношении 80:20 соответственно.

Количественное определение содержания вирджиниамицина в культуральной жидкости осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для определения использовали жидкостной хроматограф 1200 Series (Agilent, США). В качестве стандартного образца вирджиниамицина использовали коммерческий стандарт V0292 (Sigma, Германия), хроматографическая чистота более 95%.

Оптимизацию состава питательной среды и условий культивирования проводили методом эмпирического подбора основных регуляторных факторов.

Глава III. Результаты исследования

Идентификация исходного и полученного штаммов

Для генетической идентификации исходного (Ac 790) и полученного (IB 25-8) штаммов *S. virginiae* было проведено секвенирование штаммов и определена частичная последовательность амплификата гена (1472 bp), кодирующего 16S рРНК. Нуклеотидные последовательности ПЦР-фрагментов для обоих образцов оказались идентичными между собой. Согласно полученным результатам, уровень сходства исходного штамма *S.virginiae* Ac-790 и полученного *S.virginiae* IB 25-8 с типовым штаммом *Streptomyces virginiae* NBRC 12827 (AB184175) составил 99,4%.

Оптимизация состава питательных сред для культивирования штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8

Для того чтобы выяснить какие компоненты питательной среды и в каком количестве способствуют повышению продуктивности, был проведен ряд опытов, в которых подбирался оптимальный состав ферментационной среды. Результаты оценивали по изменению продуцирующей способности штамма *S. virginiae* IB 25-8. Исследуемые компоненты добавляли к питательной среде перед стерилизацией.

Влияние различных источников углерода на рост штамма *Streptomyces virginiae* и биосинтез вирджиниамицина M1 и S1

В процессе исследования изучалась способность исходного штамма *S.virginiae* ВКПМ Ac-790 и вновь полученного штамма с индексом IB 25-8 утилизировать различные источники углерода (таблица 1).

Таблица 1. Утилизация различных источников углерода

Источники углерода	<i>S.virginiae</i> ВКПМ Ас-790	<i>S.virginiae</i> IB 25-8
Глюкоза	+	+
Арабиноза	-	-
Ксилоза	-	-
Лактоза	-	-
Галактоза	-	-
Мальтоза	+	+
Сахароза	-	+
Фруктоза	-	-
Крахмал	-	+
Раффиноза	-	-

В ходе данного опыта было показано, что штамм *S.virginiae* IB 25-8, в отличие от штамма *S.virginiae* ВКПМ Ас-790, способен утилизировать сахарозу и разжижать крахмал. К остальным источникам углерода оба штамма относятся одинаково.

Для дальнейшего исследования были выбраны источники углерода, которые способен утилизировать высокопродуктивный штамм с индексом IB 25-8 и проверено их влияние на синтез вирджиниамицина в форме M1 и S1 (Таблица 2).

Таблица 2. Состав питательных сред

Компоненты питательной среды	Содержание г/л											
	К	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Глюкоза	5	10	20									
Сахароза				10	20	30						
Мальтоза							10	20	30			
Крахмал										10	20	30
Мясной пептон	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Дрожжевой экстракт	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Солодовый экстракт	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
CaCO ₃	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Таблица 3. Влияние различных источников углерода на биосинтез вирджиниамицина

Питательная среда	Количество вирджиниамицина (M1+S1), г/л	Содержание формы M1, % ($\pm 5\%$)	Содержание формы S1, % ($\pm 5\%$)
К	1,1 \pm 0,2	73	27
1	1,2 \pm 0,1	57	43
2	1,3 \pm 0,05	55	45
3	1,5 \pm 0,05	68	32
4	1,7 \pm 0,07	70	30
5	1,95\pm0,15	72	28
6	1,2 \pm 0,13	42	58
7	1,25 \pm 0,05	40	60
8	1,4 \pm 0,1	49	51
9	1,3 \pm 0,1	58	42
10	1,5 \pm 0,16	59	41
11	1,6 \pm 0,08	61	39

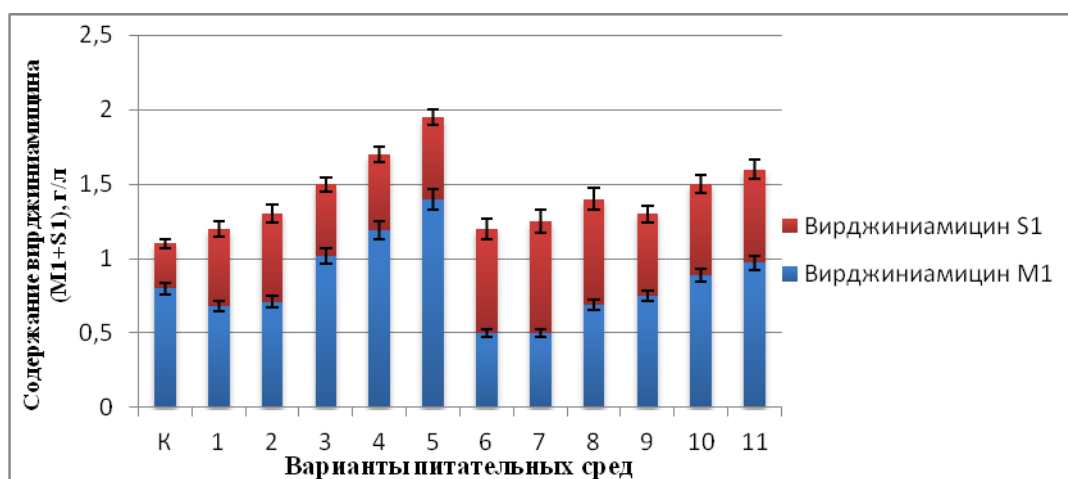


Рисунок 2. Графическое соотношение форм M1 и S1 в зависимости от источников углерода (1,2-глюкоза; 3-5 – сахароза; 6-8 – мальтоза; 9-11 – крахмал)

Исходя из данных, представленных в таблице 3, можно отметить, что максимальный биосинтез вирджиниамицина (1,95 \pm 0,15 г/л) наблюдается во время культивирования штамма с индексом IB 25-8 на питательной среде, содержащей исходно сахарозу в концентрации 30 г/л. При этом соотношение факторов M1и S1 составило 72% ($\pm 5\%$) и 28% ($\pm 5\%$) соответственно.

Влияние различных источников азота на биосинтез вирджиниамицина

Источники органического азота

Таблица 4. Влияние различных источников органического азота на рост и продуцирующую способность штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8

Среда №	Дополнительный источник азота	Содержание, г/л	Количество вирджиниамицина (M1+S1), г/л	Фактор S1, % (±5%)	Фактор M1, % (±5%)
К	-	-	1,95±0,15	27	73
1	Соевая мука	10	2,85±0,2	55	45
2		20	2,85±0,18	55	45
3	Гороховая мука	10	3,08±0,13	25	75
4		20	1,95±0,1	35	65
5	Перьевая мука	10	2,10±0,1	25	75
6		20	1,80±0,05	20	80
7	Кукурузная мука	10	1,80±0,05	52	49
8		20	1,65±0,2	48	52
9	Овсяная мука	10	1,80±0,12	39	61
10		20	1,65±0,15	30	70

В качестве контрольной среды (к) использовалась среда следующего состава (%): дрожжевой экстракт - 0,1; мясной пептон 0,25; солодовый экстракт - 1,0; CaCO₃ - 0,5; сахароза - 3,0; вода дистиллированная - до 100.pH до стерилизации 7,0-7,2.

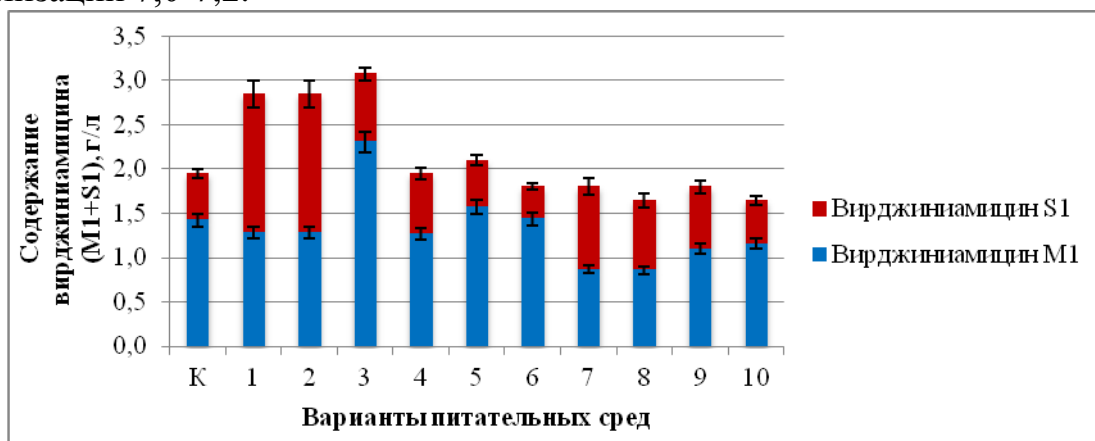


Рисунок 3. Влияние различных источников органического азота на биосинтез вирджиниамицина (1, 2 - соевая мука; 3, 4 – гороховая мука; 5, 6 - перьевая мука; 7,8 -кукурузная мука; 9, 10 -овсяная мука)

Из полученных данных можно сделать вывод, что наибольшая концентрация вирджиниамицина в КЖ (3,08±0,13 г/л), а также оптимальное соотношение факторов M1 и S1, необходимое для максимального синергизма наблюдается при культивировании штамма *S. virginiae* IB 25-8 на среде, с добавлением гороховой муки в концентрации 10 г/л.

Источники неорганического азота

Таблица 5. Влияние различных источников минерального азота на биосинтез вирджиниамицина

Ферментационная среда	Источник минерального азота	Концентрация, г/л	Содержание вирджиниамицина, г/л
К	-	-	3,08±0,13
1	Сульфат аммония ((NH₄)₂SO₄)	0,1	3,18±0,05
3		0,5	3,26±0,1
4		1	3,35±0,05
5	Хлорид аммония (NH ₄ Cl)	0,1	3,02±0,1
6		0,5	3,18±0,03
7		1	3,26±0,05
8	Аммоний лимоннокислый (C ₆ H ₈ O ₇ *2NH ₃)	0,1	3,18±0,08
9		0,5	3,26±0,04
10		1	3,02±0,1
11	Нитрат калия (KNO ₃)	0,1	2,95±0,06
12		0,5	2,87±0,13
13		1	2,64±0,2
14	Мочевина (CH ₄ N ₂ O)	0,1	2,95±0,013
15		0,5	2,71±0,05
16		1	2,33±0,11

Исходная ферментационная среда (контроль) имела следующий состав (%): дрожжевой экстракт - 0,1; мясной пептон - 0,25; солодовый экстракт - 1,0; CaCO₃ - 0,5; сахароза - 3,0; гороховая мука - 1,0; вода дистиллированная - до 100. рН до стерилизации 7,0-7,2. Для получения сред №1-16 к контрольной среде добавляли неорганические источники азота в концентрациях, указанных в таблице 5.

Соотношение факторов M1 и S1 в процессе культивирования на всех средах (№1-16) находилось в необходимых пределах 25-35% фактора S1 и 65-75% фактора M1.

В процессе исследования было отмечено, что штамм *S. virginiae* IB 25-8 не способен утилизировать мочевину и нитраты (в частности KNO₃). Хорошо усваивает азот в виде солей аммония ((NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, C₆H₈O₇*2NH₃). При этом максимальная продуктивность вирджиниамицина (3,35±0,05 г/л) наблюдается при использовании сульфата аммония в концентрации 1 г/л в исходной питательной среде.

Влияние минеральных веществ (макроэлементов) на биосинтез вирджиниамицина (факторов M1 и S1)

В результате данного исследования было изучено влияние внесения в питательную среду дополнительных источников макроэлементов (фосфора, магния, калия) на биосинтез вирджиниамицина (таблица 6).

Таблица 6. Влияние источников макроэлементов на биосинтез вирджиниамицина

Питательная среда	Дополнительные источники макроэлементов	Концентрация г/л	Количество вирджиниамицина, г/л
К	-	-	3,35±0,05
1	MgSO₄	0,1	3,30±0,05
2		0,5	3,65±0,1
3		1,0	3,40±0,05
4		0,1	3,25±0,14
5	KCl	0,5	3,35±0,06
6		1,0	3,30±0,15
7		0,1	3,20±0,09
8	KH₂PO₄	0,5	3,35±0,12
9		1,0	3,60±0,09
10		0,1	3,35±0,11
11	Na₂HPO₄	0,5	3,45±0,05
12		1,0	3,25±0,1

Максимальная продуктивность вирджиниамицина наблюдалась при добавлении к исходной питательной среде следующих минеральных солей: MgSO₄ в концентрации 0,5 г/л и KH₂PO₄ в концентрации 1 г/л. При этом соотношение факторов вирджиниамицина M1 и S1 во всех проверенных средах находится в пределах 65-75% и 25-35% соответственно.

Дальнейшее изучение влияния совместного внесения данных минеральных солей дало положительный эффект на биосинтез вирджиниамицина. Концентрация вирджиниамицина (M1+S1) при одновременном использовании MgSO₄ в концентрации 0,5 г/л и KH₂PO₄ в концентрации 1 г/л в контрольной среде достигла 3,80±0,05 г/л.

Влияние синтетических адсорбирующих смол на рост и продуцирующую способность штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8

Для уменьшения негативного влияния метаболитов, выделенных в культуральную жидкость в процессе культивирования штамма и повышения биосинтеза вирджиниамицина использовались синтетические адсорбирующие смолы различной химической природы (таблица 7). Смолы добавлялись в ферментационную среду перед стерилизацией в количестве 20 г/л.

Таблица 7. Влияние адсорбирующих смол на биосинтез вирджиниамицина

Адсорбирующая смола	Вирджиниамицин на сорбенте			Вирджиниамицин в культуральной жидкости			Продуктивность г/л
	% от общего количества (±5%)	M1, % (±5%)	S1, % (±5%)	% от общего количества (±5%)	M1, % (±5%)	S1, % (±5%)	
Контроль	-	-	-	100	78	22	3.97±0,1
DIAION HP20	65	63	37	35	63	37	4.25±0,15
DIAION HP21	98,5	74	26	1,5	70	30	5.05±0,17

Amberlite IRA900	12	89	11	88	90	10	2.25±0,1
Amberlite IR120	3	25	75	97	20	80	2.95±0,14

Синтетические адсорбирующие смолы IRA 900 и IR 120 ингибируют синтез вирджиниамицина. В то время как смолы HP20 и HP21 индуцируют синтез вирджиниамицина (M1+S1), причем смола HP 21 оказывает наиболее эффективное положительное воздействие на биосинтез целевого вещества. Содержание вирджиниамицина на данной стадии разработки штамма *S. virginiae* IB 25-8 составило 5,05±0,17 г в 1л культуральной жидкости. При этом соотношение его активных форм M1 и S1 равно 75% (±5%) и 25% (±5%) соответственно.

Культивирование штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 в лабораторной ферментационной установке

Для повышения выхода целевого вещества в условиях лабораторной или промышленной ферментаций, одним из ключевых аспектов является поддержание оптимальных условий ферментации на постоянном уровне для уменьшения микробного стресса и повышения направленности метаболизма. Подбор оптимальных условий разрабатывается в индивидуальном порядке для каждого штамма-продуцента (Schmidt, 2005).

Культивирование штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 в режиме регистрации основных технологических и биохимических параметров

В первом эксперименте культивирование штамма проводили в ферментационной установке №1, состоящей из трех биореакторов объемом 15 литров, в режиме регистрации основных технологических параметров. Культивирование осуществляли в 3-х параллельных повторностях с использованием оптимизированной питательной среды следующего состава (%): сахара – 3,0; мясной пептон – 0,25; дрожжевой экстракт – 0,1; солодовый экстракт – 1,0; CaCO₃ – 0,5; гороховая мука – 1,0; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; MgSO₄ – 0,05; KН₂PO₄ – 0,1. Ферментацию проводили при стандартных условиях. Аэрацию поддерживали на уровне 0,5 л/л/мин, работу перемешивающего устройства поддерживали на уровне 250 об/мин. В процессе роста культуры было отмечено повышение pH среды от 7,1 до 8,3 (рис. 4). Содержание сырой биомассы на 60 ч ферментации достигло 18,3% (рис. 4), после чего ее количество стало уменьшаться, что предположительно говорит о лизисе культуры. Подтверждением лизиса стало и заметное увеличение pH среды к 92ч ферментации. Содержание вирджиниамицина в КЖ к концу периода культивирования достигло 3,5±0,15 г/л (рисунок 4).

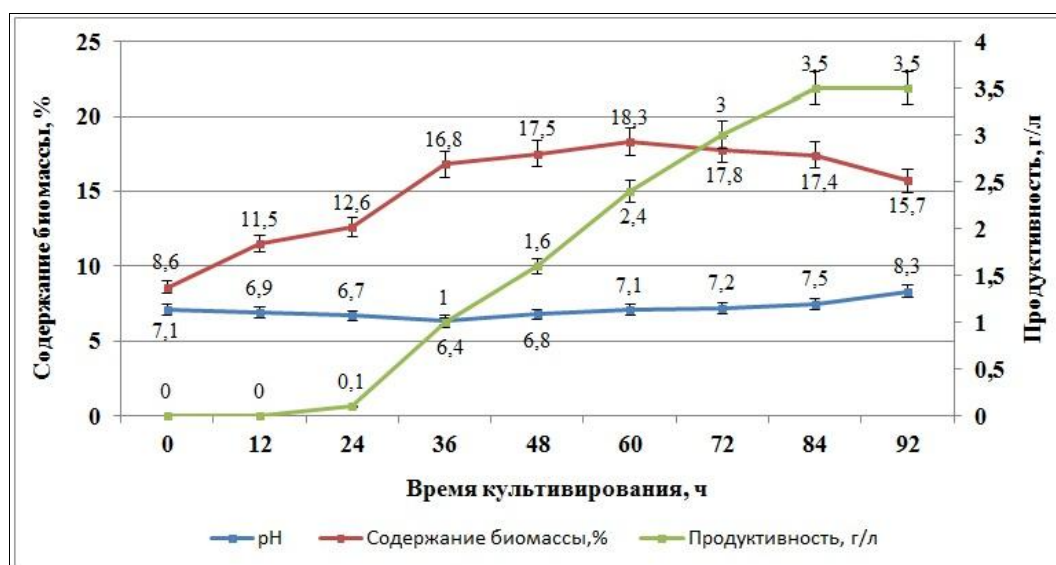


Рисунок 4. Культивирование штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 в режиме регистрации основных параметров

Продуктивность штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 на ферментационной среде в режиме контроля параметра pH

Для проверки предположения о негативном влиянии pH на биосинтез целевого продукта и определения оптимального значения pH был проведен ряд ферментаций при различных pH среды. Культивирование осуществляли в ферментационной установке №1, состоящей из трех биореакторов объемом 15 литров, с использованием оптимизированной питательной среды следующего состава (%): сахароза – 3,0; мясной пептон – 0,25; дрожжевой экстракт – 0,1; солодовый экстракт – 1; CaCO_3 – 0,5; гороховая мука – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; MgSO_4 – 0,05; KH_2PO_4 – 0,1. Поддержание заданных уровней pH производили путем подачи 5% р-ра HCl при помощи перистальтического насоса в автоматическом режиме. В качестве контрольной выступала ферментация в режиме регистрации основных технологических и биохимических параметров без регуляции активной кислотности среды. Результаты проведенного эксперимента показаны на рисунке 5. Наилучшие показатели на 84 ч ферментации были достигнуты при уровне pH, равном 7,0. В последующих экспериментах pH среды поддерживали на уровне 6,8-7,0.

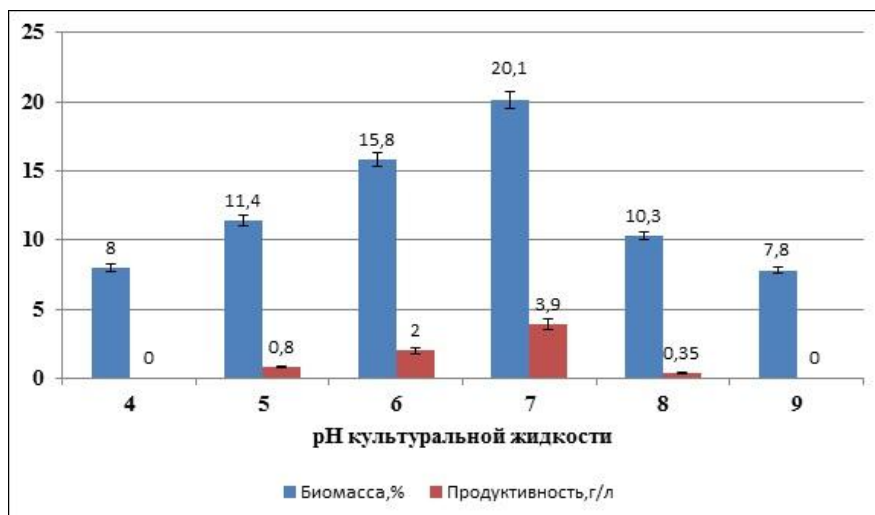


Рисунок 5 . Накопление биомассы и вирджиниамицина в культуральной жидкости штамма *S. virginiae* IB 25-8 при различных уровнях pH среды к 84 ч ферментации

Продуктивность штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 на ферментационной среде в режиме контроля по параметрам pH и pO₂

Одним из важных факторов, влияющих на продуктивность биосинтеза микроорганизмами биологически активных веществ, в том числе и вирджиниамицина, является содержание растворенного кислорода в ферментационной среде (ShioyaS., 1999). В связи с этим был проведен эксперимент по оценке влияния различных концентраций растворенного кислорода на рост биомассы и продуктивности штамма *S. virginiae* IB 25-8 в условиях автоматического контроля значения pH на уровне 6,8-7,0. Культивирование осуществляли в ферментационной установке №1 с использованием оптимизированной питательной среды следующего состава, (%): сахара – 3; мясной пептон – 0,25; дрожжевой экстракт – 0,1; солодовый экстракт – 1; CaCO₃ – 0,5; гороховая мука – 1; (NH₄)₂SO₄ – 0,1; MgSO₄ – 0,05; KН₂PO₄ – 0,1. Содержание растворенного кислорода в среде изменяли путем изменения оборотов перемешивающего устройства и изменения количества расходуемого в процессе ферментации воздуха. Наибольшая продуктивность по вирджиниамицину и максимальный прирост биомассы были отмечены при концентрации растворенного кислорода 50% и составили 4,2±0,1 г/л и 23,6% (±2%) соответственно (рисунок 6).

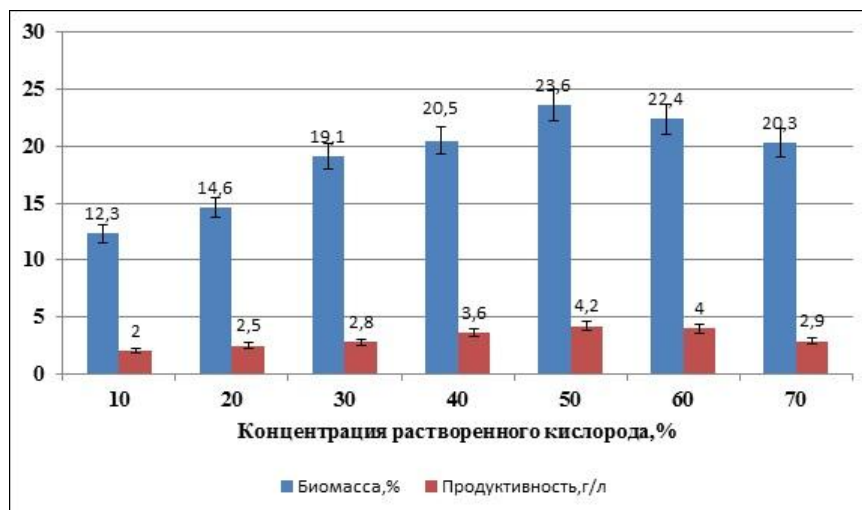


Рисунок 6. Влияние концентрации растворенного кислорода на накопление биомассы и вирджиниамицина в КЖ штамма *S.virginiae* IB 25-8 к 84 ч ферментации

Продуктивность штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 на ферментационной среде с добавлением дополнительного источника углерода

В процессе исследования была изучена динамика потребления источников углерода штаммом *S. virginiae* IB 25-8 (рисунок 7). Культивирование осуществляли в ферментационной установке №1, состоящей из 3-х биореакторов объемом 15 литров, с использованием оптимизированной питательной среды следующего состава, (%): сахароза – 3; мясной пептон – 0,25; дрожжевой экстракт – 0,1; солодовый экстракт – 1; CaCO_3 – 0,5; гороховая мука – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; MgSO_4 – 0,05; KH_2PO_4 – 0,1.



Рисунок 7. Динамика потребления восстанавливающих сахаров

Было подтверждено, что рост высокоактивного штамма *S. virginiae* IB 25-8 сопровождается интенсивным потреблением восстанавливающих сахаров в культуральной жидкости. К 48 часам роста их концентрация находилась на уровне 1-2%, а после 72 часов – менее 0,7%. Лимит субстрата, вероятно, приводит к снижению продуктивности процесса. Для предотвращения негативных последствий лимита субстрата использовалась техника

культивирования с подпиткой, в процессе которой субстрат или другие необходимые компоненты добавляются либо непрерывно, либо по сигналу от соответствующего датчика.

Предварительные исследования штамма *S. virginiae* IB 25-8 показали, что, в отличие от родительского штамма, он был способен усваивать сахарозу, причем данный источник углерода обеспечивал, по сравнению с другими вариантами, не только максимальную продуктивность штамма, но и сохранение оптимального соотношения между компонентами M1 и S1 вирджиниамидина (70-75 : 25-30). В связи с этим в качестве дополнительного источника углерода была выбрана сахароза.

Непрерывную подачу 50% стерильного раствора сахарозы в биореактор осуществляли в автоматическом режиме при увеличении pH выше 6,8, начиная с 48 ч ферментации, в условиях поддержания pH и концентрации растворенного кислорода на ранее определенных оптимальных уровнях (6,8-7,0 и 50%, соответственно). Результаты эксперимента представлены на рисунке 8.

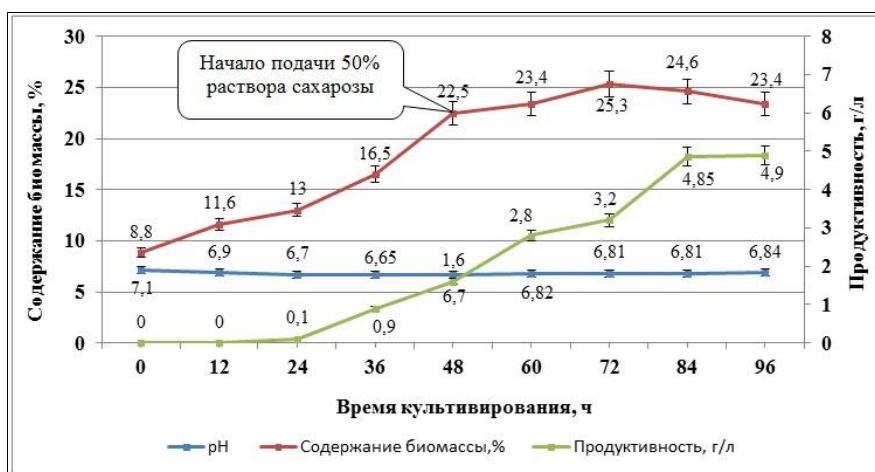


Рисунок 8. Накопление биомассы и вирджиниамидина в КЖ штамма *S. virginiae* IB 25-8 при культивировании в биореакторе с подпиткой 50% раствором сахарозы

Регуляцию подачи дополнительного источника углерода осуществляли согласно результатам измерения скорости потребления подаваемого субстрата методом Бертрана. В процессе исследования содержание восстанавливающих сахаров в КЖ поддерживали на уровнях: 1-2%. Поддержание восстанавливающих сахаров на этом уровне проводили до окончания культивирования. Это положительно сказалось на накоплении вирджиниамидина в культуральной жидкости, достигшем к 84 ч роста $4,9 \pm 0,1$ г/л. Потребление сахарозы культурой в среднем составило 5 г/л/сутки.

Влияние содержания адсорбирующей смолы на продуктивность штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 на ферментационной среде

С целью дальнейшего повышения продуктивности штамма *S. virginiae* IB 25-8 была изучена возможность применения синтетических адсорбирующих смол для связывания синтезируемого вирджиниамидина. На предварительном этапе исследования (биосинтез в колбах объемом 50 мл) был обнаружен

положительный эффект от добавления в исходную ферментационную среду различных видов синтетических смол в концентрации 20 г/л. Результаты представлены в таблице 7.

Согласно полученным результатам, наибольший эффект был получен на сорбенте DIAION HP 21, как в отношении продуктивности штамма, так и по соотношению факторов M1 и S1. Следует также отметить, что этот сорбент показал наилучшие результаты в отношении сорбционной емкости вирджиниамицина (до 98,5%), что обеспечило в дальнейшем оптимизацию процесса выделения и очистки вирджиниамицина.

Исходя из ранее полученных данных, был изучен эффект добавления выбранного сорбента в исходную ферментационную среду на продуктивность штамма IB 25-8 в биореакторе. Культивирование осуществляли в ферментационной установке №1, состоящей из 3-х биореакторов объемом 15 литров, с использованием оптимизированной питательной среды следующего состава, (%): сахара – 3,0; мясной пептон – 0,25; дрожжевой экстракт – 0,1; солодовый экстракт – 1; CaCO_3 – 0,5; гороховая мука – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; MgSO_4 – 0,05; KH_2PO_4 – 0,1. Условия ферментации соответствовали определенным на предыдущем этапе исследования (контроль pH и pO_2 , непрерывная подача стерильного раствора 50% сахара, начиная с 48 ч ферментации, для поддержания количества редуцирующих сахаров на уровне 1 – 2%). Результаты эксперимента представлены на рисунке 9. Добавление сорбента DIAION HP 21 в качестве адсорбирующего агента позволило снизить ингибирующее влияние вирджиниамицина на рост и развитие культуры и увеличить время активного синтеза антибиотика, что, в свою очередь, привело к увеличению содержания сырой биомассы и росту продуктивности к 84 ч ферментации до 29-30% и $5,6 \pm 0,2$ г/л, соответственно.

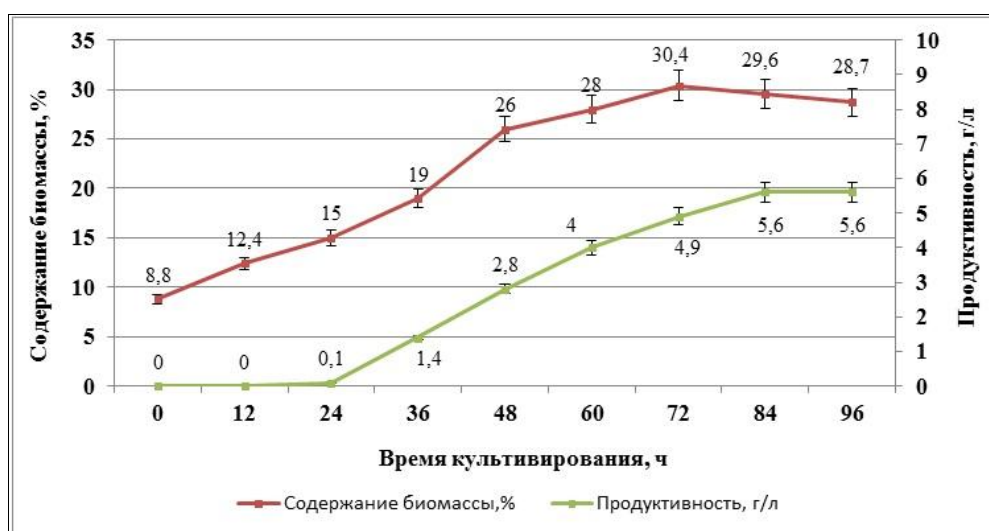


Рисунок 9. Накопление биомассы штамма-продуцента и вирджиниамицина в КЖ при культивировании в биореакторе с добавлением синтетической смолы DIAION HP 21

Масштабирование процесса биосинтеза вирджиниамицина штаммом *Streptomyces virginiae* IB 25-8 в ферментационной установке объемом 100 л

Масштабирование процесса биосинтеза вирджиниамицина осуществляли в ферментационной установке №2, состоящей из 2-х биореакторов объемом 100 литров, с использованием оптимизированной питательной среды следующего состава, (%): сахароза – 3,0; мясной пептон – 0,25; дрожжевой экстракт – 0,1; солодовый экстракт – 1,0; CaCO_3 – 0,5; гороховая мука – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1; MgSO_4 – 0,05; KH_2PO_4 – 0,1; смола DIAION HP 21 – 2,0. Условия ферментации соответствовали определенным на предыдущем этапе исследования (контроль pH и pO_2 , непрерывная подача стерильного раствора 50% сахарозы, начиная с 48 ч ферментации, для поддержания количества редуцирующих сахаров на уровне 1 – 2%). Результаты эксперимента представлены на рисунке 10.

Подготовку посевного материала осуществляли в ферментационной установке №1. Объем посевного материала – 10% от рабочего объема ферментационной среды. Культивирование посевного материала проводили на вегетативной среде следующего состава, (%): глюкоза – 0,1; мясной пептон – 0,3; дрожжевой экстракт – 0,1; гидролизат казеина – 0,5; CaCO_3 – 0,05; вода дистиллированная – до 100; pH до стерилизации 7,0 – 7,2.

Режим выращивания посевного материала продуцента *S. virginiae* для масштабирования в ферментационной установке объемом 100 л:

Время ферментации – 24 - 26 часов.

Температура ферментации – $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

pH в начале ферментации – 6,8-7,0.

Расход воздуха-35-40 л/мин.

Содержание растворенного кислорода-50%.

Избыточное давление в аппарате 0,03-0,05 МПа.

Перемешивание постоянное, 250-300 об/мин.

При микроскопии выросшей культуры наблюдается негустая базофильная сетка, протоплазма в гифах дифференцирована. Посторонняя микрофлора в посевном материале должна отсутствовать. Выросший посевной материал передавали из инокулятора в ферментационный аппарат через заранее простерилизованную паром материальную линию.

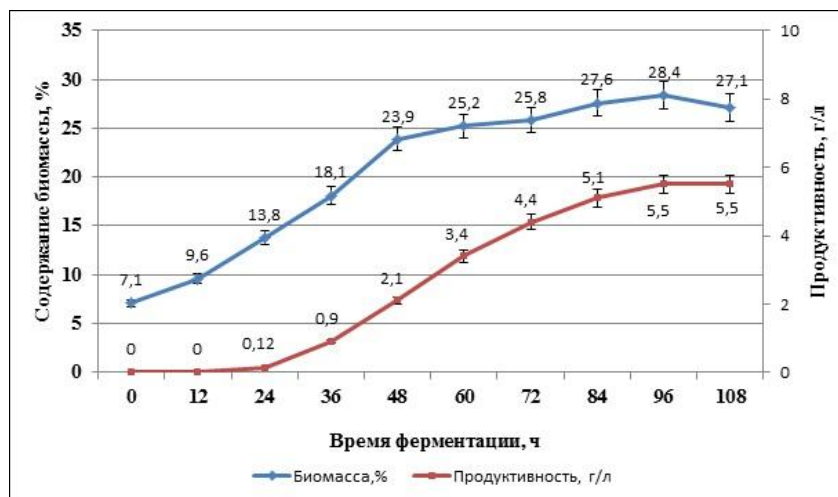


Рисунок 10. Накопление биомассы и вирджиниамицина в культуральной жидкости штамма *Streptomyces virginiae* IB 25-8 при культивировании в биореакторе объемом 100л

На первоначальном этапе, проведенное масштабирование процесса биосинтеза вирджиниамицина, показало, что культивирование в опытно-промышленных ферментационных установках происходит с удлинением лаг – фазы и, как следствие, с незначительным увеличением времени культивирования. Максимальная концентрация вирджиниамицина $5,53 \pm 0,15$ г/л была достигнута на 92 – 96 ч ферментации, максимальное содержание биомассы - 28,4 % ($\pm 2\%$) на 90 – 94 часа роста культуры. Соотношение факторов вирджиниамицина M1 и S1 при масштабировании процесса находилось в пределах 65-75% и 25-35% соответственно. По остальным показателям (рН, rO_2 , динамика потребления восстанавливающих сахаров) процесс культивирования в биореакторе объемом 100л был подобен процессу культивирования в лабораторном биореакторе объемом 15л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как правило, технологии микробиологического биосинтеза разрабатываются сначала для лабораторных условий, затем масштабируются до опытно-промышленного уровня, и затем уже процессы масштабируются до производственного уровня. Основной задачей масштабирования микробиологического производства является увеличение объемов производимого продукта при условии сохранения или даже увеличения продуктивности используемого штамма микроорганизма и поддержания требуемого качества конечного продукта (Schmidt F.R., 2005).

Для обеспечения успешного масштабирования важное значение имеет подбор условий ферментации. Высокая плотность клеток, образующаяся в биореакторах значительно отличается от естественных условий роста микроорганизмов, что приводит к стрессам, связанным с различными внешними факторами, такими как изменение в процессе ферментации температуры, рН среды, осмотических концентраций и т.п. (Mattanovich D., 2004). Заметное влияние на рост и развитие клеток и биосинтетические процессы оказывают

также концентрация субстрата и уровень растворенного кислорода (Schmidt F.R., 2005; Garcia-Ochoa F., 2009).

В данной работе не только определен и подобран оптимальный состав питательной среды и условия культивирования, способствующие максимальной продуктивности штамма, но и проведено масштабирование (от колб до 100-л биореактора) процесса биосинтеза вирджиниамицина с использованием высокопродуктивного штамма *S. virginiae* IB 25-8.

Дополнительными преимуществами предлагаемой технологии являются возможность использования сахарозы как более выгодного с экономической точки зрения основного компонента питательной среды по сравнению с традиционно используемыми глюкозой и D-мальтозой, что связано с особенностями утилизации углеводов штаммом IB 25-8.

Также было выполнено исследование возможности применения синтетической адсорбирующей смолы, обладающей значительной сорбционной емкостью вирджиниамицина (до 98,5%), что обеспечило в дальнейшем оптимизацию процесса выделения и очистки антибиотика, а также привело к увеличению выхода целевого вещества в результате снижения ингибирующего влияния вирджиниамицина на рост и развитие культуры. Несмотря на то, что в последние годы данная методика активно применяется в микробиологическом производстве различных биологически активных веществ, информация об использовании сорбентов в производстве вирджиниамицина в открытых источниках найти не удалось.

В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

1. В результате проведенных экспериментов разработан состав питательной среды, способствующий значительному повышению продуцирующей способности штамма *S. virginiae* IB 25-8 до $5,05 \pm 0,17$ г вирджиниамицина в 1 л культуральной жидкости. В частности:

- подобран дополнительный источник углерода (сахароза – 3,0%),
- подобраны дополнительные источники азота (гороховая мука – 1,0% и сульфат аммония 0,1%)
- подобраны источники макроэлементов (магний сернокислый - 0,05 % и калий фосфорнокислый 1-замещенный - 0,01%)
- подобрана адсорбирующая смола DIAION HP21, обладающая значительной сорбцией вирджиниамицина (до 98,5%), что обеспечивает увеличение выхода целевого вещества и существенное упрощение процесса его выделения и очистки.

2. Подобраны оптимальные условия и параметры культивирования в ферментационных установках:

- определен оптимальный уровень pH (6,8-7,0), способствующий интенсивному накоплению биомассы продуцента и высокому уровню биосинтеза вирджиниамицина;
- определен оптимальный уровень концентрации растворенного кислорода в среде (50%);

3. Определена скорость и режим подачи дополнительного источника углерода в виде 50% раствора сахарозы, обеспечивающие дополнительную стабилизацию pH, повышение содержания сырой биомассы и увеличение фазы активного синтеза вирджиниамицина;

4. Проведено масштабирование процесса культивирования штамма *S. virginiae* IB 25-8, что показывает возможность использования разработанной технологии биосинтеза вирджиниамицина на опытно-промышленном уровне.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и/или Web of Science (авторский вклад 75 %).

Публикации в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных:

1. Dzhavakhiya V.V, **Savushkin V.A.**, Ovchinnikov A., Glagolev V., Savelyeva V., Popova E., Novak N., Glagoleva E // Scaling up a virginiamycin production by a high-yield *Streptomyces virginiae* VKM AC-2738D strain using adsorbing resin addition and fed-batch fermentation under controlled conditions // 3 Biotech.- 2016.- №1.- DOI 10.1007/s13205-016-0566-8

2. **Savushkin V.A.**, Vakhtang V. Dzhavakhiya, Elena V.Glagoleva, Veronika V. Savelyeva, Evgeniya D. Voskresenskaya, Alexander I. Ovchinnikov, Vladislav I. Glagolev, Nikita V. Novak, Yana O. Grebeneva // Enhanced production of virginiamycin with the maintained optimal ratio of its components by a mutant *Streptomyces virginiae* IB 25-8 strain // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.- 2018.-№2.- P. 408 – 415.- DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.021>

3. **Савушкин В.А.**, Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Савельева В.В., Попова Е.Д., Овчинников А.И., Глаголев В.И., Новак Н.В., Дурникин Д.А. // Разработка высокоактивного штамма-продуцента вирджиниамицина и повышение его продуктивности с помощью синтетических адсорбирующих смол // Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University.- 2016.- 6 (3).-№3 P. 195-208.

4. D.A. Durnikin, E.S. Yacenko, I.Yu. Evdokimov, V.B. Akopyan, V.V. Dzhavakhiya, **Savushkin V.A.**, V.I. Glagolev, A.I. Ovchinnikov // Ultrasonic intensification of sorption and desorption processes during the isolation of virginiamycin from the cultural broth of *Streptomyces* sp. S 15-30 // Ukrainian Journal of Ecology.- 2017.- 7(3).- №4.- P. 221-224.- DOI: 10.15421/2017_71

5. D.A. Durnikin, E.S. Yacenko, I.Yu. Evdokimov, V.B. Akopyan, V.V. Dzhavakhiya, E.V.Glagoleva, **Savushkin V.A.**, V.V. Savelyeva // Preconditioning of a virginiamycin solution for crystallization // Ukrainian Journal of Ecology.- 2017.- 7(4).- №5 P. 187-191.- DOI:10.15421/2017_104

Публикации в других журналах и изданиях:

6. **Савушкин В.А.**, В.В. Джавахия, А.И. Овчинников, Я.О. Гребенева // Изучение влияния синтетических адсорбирующих смол на биосинтез

вирджиниамицина // Биотехнология: наука и практика: материалы V межд. науч.-практ. конф. – г.Ялта. – 2017 – с.48 – 50

7. **Савушкин В.А.** // Разработка высокоактивного штамма – продуцента вирджиниамицина // Вопросы современной науки: проблемы, тенденции и перспективы – XXXIII международная научно практическая конференция. – г.Москва, 2019г

8. **Савушкин В.А.** // Усовершенствование технологии биосинтеза антибиотика вирджиниамицина штаммом *Streptomyces virginiae* IB 25-8 // Достижения и проблемы современной науки - XXXXI международная научно-практическая конференция. - г. Санкт-Петербург, 2019 г

Патент на изобретение:

9. Джавахия В.В., Глаголева Е.В., **Савушкин В.А.**, Овчинников А.И., Глаголев В.И., Савельева В.В., Попова Е.Д., Петухов Д.В., Новак Н.В. // **Патент на изобретение RU 2637857 C1:** «Штамм *Streptomyces virginiae* - продуцент вирджиниамицина и способ получения вирджиниамицина» // Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 07.12.2017.

Благодарности. Автор выражает благодарность за помощь при выполнении и подготовке работы своему научному руководителю, к.б.н. Камионской А.М.; сотрудникам лаборатории молекулярной диагностики (ЦКП “Биоинженерия”) за помощь при идентификации штамма; сотрудникам отдела молекулярной биологии ФГБНУ ВНИИ Фитопатологии за помощь в разработке высокоактивного штамма; сотрудникам лаборатории биотехнологии физиологически активных веществ Института Биоинженерии ФИЦ «Биотехнологии» РАН за помощь в проведении ферментаций и поддержку.