Московский Государственный Университет Инженерной Экологии

На правах рукописи

Мичурина Татьяна Анатольевна

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЭРИТРОМИЦИНА А ФАКТОРАМИ, СНИЖАЮЩИМИ ЛИЗИС В КУЛЬТУРЕ SACCHAROPOLYSPORA ERYTHRAEA

03.00.23 - Биотехнология ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель кандидат биологических наук

Сергеева Алла Владимировна

Москва 2007

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6

ГЛАВА 1. Обзор литературы 11

1.1. Эритромицины: свойства, биогенез, регуляция биосинтеза 11

1.1.1. Структура и свойства эритромицинов 11

1.1.2. Биогенез молекул эритромицинов 15

1.1,2. а. Биосинтез 6-деоксиэритронолида В 17

1.1.2.6. Биосинтез углеводных компонентов эритромицинов 18

1.1.3. Регуляция биосинтеза эритромицинов 19

1.1.3 .а. Физиологическая регуляция 19

1.1.3.6. Биохимическая и генетическая регуляция 20

1.2. Взаимосвязь морфологических изменений и биосинтеза эритромицинов в глубинной культуре S. erythraea 24

1.2.1. Развитие актиномицетов-продуцентов антибиотиков

в глубинной культуре 24

1.2.2. Особенности развития S. erythraea 25

1.2.3. Рост S. erythraea и биосинтез эритромицинов в азот-лимитированных условиях 27

1.2.4. Взаимосвязь морфологии гиф и биосинтеза эритромицинов 29

1.3. Образование активных форм кислорода

и защита от них в клетках микроорганизмов 37

1.3.1. Свободные радикалы и их воздействие на

клеточные структуры 37

1.3.2. Источники образования АФК у бактерий 39

1.3.3. Супероксиддисмутаза и катал аза: их защитная роль 42

1.4. Особенности катаболизма липидов у актиномицетов 46

1.4.1. Альтернативные пути катаболизма липидов 46

з

1.4.2. Окислительный стресс у актиномицетов

при утилизации липидов и защита от него 52

1.5. Ферментативное получение субстанции эритромицинов

в мировой практике 59

ГЛАВА 2. Материалы и методы 63

2.1. Штаммы, использованные в работе 63

2.2. Питательные среды 64

2.2.1. Агаризованные среды для проведения селекционной работы, поддержания и хранения культуры S. erythraea 64

2.2.2. Среды для глубинного культивирования S. erythraea 65

2.3. Хранение, поддержание и глубинное культивирование продуцента эритромицина 66

2.4. Морфологическая характеристика культуры 67

2.5. Определение количества биомассы в культуральной

жидкости S. erythraea 68

2.6. Определение концентрации ДНК 69

2.6.1. Определение концентрации ДНК

в биомассе (ДНКБМ) 69

2.6.2. Определение концентрации ДНК

в нативной жидкости (ДНКцж) 71

2.7. Количественное определение липидов 71

2.8. Количественное определение антибиотиков эритромицинового комплекса 71

2.9. Количественное определение углеводов 72

2.10. Определение содержания редуцирующих веществ 73

2.11. Получение мутантов, устойчивых к антибиотикам 73

2.12. Определение активности сукцинатдегидрогеназы 74

2.13. Оптимизация ферментационной питательной среды 75

2.14. Статистическая обработка данных 75

4

ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение 78

3.1. Схема экспериментальных исследований 78

3.2. Характеристика развития S. erythraea при глубинном культивировании 79

3.2.1. Морфологические изменения мицелия S. erythraea 79

3.2.2. Определение ДНК в глубинных культурах S. erythraea 81

3.2.2.1. Определение ДНК на модельной среде 82

3.2.2.2. Определение ДНК на комплексной среде 84

3.2.3. Влияние аммонийного азота в среде

на степень лизиса мицелия 86

3.3. Селекция мутантов S. erythraea , устойчивых к антибиотикам - ингибиторам синтеза клеточной стенки 88

3.3.1. Селекция мутантов, устойчивых к ампицилину 88

3.3.2. Селекция мутантов, устойчивых к туникамицину 92

3.3.3. Влияние устойчивости к хлорамфениколу на биосинтез эритромицинов у штамма С-77 и AmpR -мутантов 94

3.3.4. Отбор мутантов, устойчивых совместно

к туникамицину и ампицилину 95

3.3.5. Сравнительное исследование культур

штамма С-77 и мутанта TunR-2 в биореакторах 97

3.4. Влияние антиоксидантов на развитие S. erythraea 99

3.5. Развитие S. erythraea С-11 на «липидных» и «углеводных» ферментационных средах 105

3.6. Влияние янтарной кислоты на биосинтез эритромицинов 108

3.7. Оптимизация питательных сред для штамма

S. erythraea С-11 111

3.7.1. Оптимизация ферментационной питательной среды 111

3.7.2. Подбор условий выращивания посевного материала

для ферментационной среды Ф9 115

5

3.8. Сравнительное исследование ферментаций

на средах Ф и Ф9 117

3.9.0бсуждение главы 3 121

ГЛАВА 4. Экономическая оценка применения новой технологии

биосинтеза эритромицина 129

ВЫВОДЫ 131

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 133

ПРИЛОЖЕНИЯ 157

выводы

 РазработанметодоценкиростаилизисамицелияприглубинномкультивированиинакомплекснойсредеоснованныйнаопределенииконцентрацииДНКвбиомассеивнативнойжидкостисупернатантеУстановленочтолизисвкультуревысокопродуктивногоштаммаСпроявляетсяужевростовойфазеиосновнаяпродукцияантибиотикапроисходитвусловияхлизисазначительнойчастимицелия

 ПолученымутантывысокопродуктивногоштаммаСустойчивыекингибиторамсинтезаклеточнойстенкиМутантустойчивыйктуникамицинупоказалстабильноеповышениепродукцииэритромициновна

 прикультивированиивколбахПриферментациивбиореактореобнаруженаповышеннаяустойчивостьмицелиямутантакмеханическомувоздействиюмешалок

 ВпервыеобнаруженоналичиесильногоокислительногострессаврастущеммицелииСиегонегативноевоздействиенаростовыехарактеристикиприферментациивсредесвысокойконцентрациейуглеродсодержащихсубстратовВсуточнойкультуревприсутствииантиоксидантовцитохромСатокоферолбутилоксианизолзначительноувеличиваетсяприростбиомассыдоиснижаетсястепеньлизисамицелиянаВтожевремяэкзогенныеантиоксидантынеоказываютспецифическогостимулирующеговоздействиянабиосинтезэритромицинов

 Обнаруженосущественноеснижениестепениокислительногострессавкультуреразвивающейсянасредеспреимущественнымсодержаниемсоевогомаслапосравнениюскультуройнасредеспреимущественнымсодержаниемполисахаридов

 Показанодвукратноеувеличениеактивностисукцинатдегидрогеназывмицелиилипиднойкультурыпосравнениюсмицелиемуглеводнойкультурыивлияниеянтарнойкислотынаобразованиеуглеводныхкомпонентовэритромицинов





 Установленочтоосновнымфакторомснижающимстепеньлизисамицелиявглубиннойкультуреявляетсясбалансированностьсоставаферментационнойсредыпосодержаниюуглеводовилипидов

 СприменениемметодовматематическогопланированияэкспериментаоптимизировансоставферментационнойсредыРазработанасредавкоторойсоотношениеполисахаридысоевоемаслосоставляеттогдакаквисходнойсредеНаосновеновойферментационнойсредыразработанлабораторныйрегламентнатехнологиюбиосинтезаэритромицинаприменениекоторогопозволит

аповыситьабсолютноесодержаниеэритромицинаАвкультуральнойжидкостина

бупроститьстадиюприготовленияпитательнойсредыиснизитьзатратынакомпонентысырьявдвараза

воблегчитьстадиювыделенияиочисткиэритромицинаАзасчетповышенияегосодержаниявкомплексеэритромициновнаиболееэффективнойутилизациикомпонентовпитательнойсреды