

Фізико-хімічні і біологічні властивості **ландоміцину Е** і його продукування культурою STREPTOMYCES GLOBISPORUS 3-1 [Текст] : автореф. дис... канд. біол. наук : 03.00.07 / О.В. Тимчик; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. - К., 2006. - 22 с. - Бібліогр.: с.18. -

УДК

[615.33](#)

1. НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д.К.
ЗАБОЛОТНОГО

ТИМЧИК ОЛЕСЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.181.5:579.2:615.332

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ І БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
ЛАНДОМІЦИНУ Е І ЙОГО ПРОДУКУВАННЯ КУЛЬТУРОЮ

STREPTOMYCES GLOBISPORUS 3-1

03. 00. 07 – мікробіологія

А в т о р е ф е р а т

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2006

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі генетики мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного

Національної Академії Наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України Мацелюх Богдан Павлович, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, завідувач відділу генетики мікроорганізмів

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, Пирог Тетяна Павлівна, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, провідний науковий співробітник відділу біології газоокислюючих мікроорганізмів

доктор біологічних наук, професор, Дуган Олексій Мартем'янович, Національний технічний університет КПІ, професор кафедри промислової біотехнології

Провідна організація: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, кафедра мікробіології і загальної імунології, Кабінет Міністрів України

Захист відбудеться “15” березня 2006 р. о 1000 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.233.01 Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України за адресою м. Київ ДСП, Д 03680, вул. Заболотного, 154

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України за адресою м. Київ ДСП, Д 03680, вул. Заболотного, 154

Автореферат розісланий “ 10 ” лютого 2006 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 26.233.01,

кандидат біологічних наук, с.н.с. Пуріш Л.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Більшість відомих на сьогодні антибіотиків, які успішно використовуються в медицині, ветеринарії і сільському господарстві як антибактеріальні, протипухлинні і антигельмінтні препарати, продукують стрептоміцети – одні з найчисельніших і найбільш розповсюджених ґрунтових бактерій.

Висока вартість протипухлинних антибіотиків насамперед зумовлена відносно низькою антибіотичною активністю штамів-продуцентів та їх здатністю синтезувати складні суміші кінцевих продуктів, серед яких лише декілька мають терапевтичну цінність.

Переважна більшість дослідників [Булкіна, 1991; Алеханова и др., 2001; Norwood, 2001] визнає, що антрациклінові антибіотики проявляють цитостатичний та цитотоксичний ефект по відношенню до пухлинних клітин ссавців і мають антибактеріальні властивості. В літературі недостатня кількість робіт, присвячених комплексній оцінці біосинтезу антрациклінів у штаммах-продуцентах та зв'язку антибіотичної активності із стійкістю до антибіотиків.

Актуальною проблемою сьогодення залишається пошук нових протипухлинних антибіотиків у зв'язку з виникненням множинної резистентності злоякісних пухлин до хімотерапевтичних агентів, які

упродовж багатьох років використовувались у медичній практиці.

Streptomyces globisporus 3-1 є високоактивним продуцентом нового антибіотика ландоміцину E [Поліщук та ін., 1996; Мацелюх та ін., 1999; Korynevskaya et al., 2003], що відноситься до родини ангуциклінів і має протипухлинну активність. Низка важливих властивостей ландоміцину E (стабільність, антибіотичний спектр, мутагенність і токсичність) та його продуцента (біосинтетична активність, антибіотикорезистентність і репараційна здатність), яким присвячена дана робота, до цих пір не досліджувалася.

Зв'язок роботи з науковими програмами організації, де виконувалась дисертація. Робота виконувалася у відповідності з напрямом науково-дослідних робіт Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України в межах бюджетної тематики відділу генетики мікроорганізмів № 0101V003061/17.65 (2001-2005) „Генетичні і біотехнологічні аспекти синтезу біологічноактивних речовин стрептоміцетами” та № 0104V007733/17.17 (2004-2006) „Біотехнологія одержання нового протиракового антибіотика ландоміцину E на основі генетичних та генно-інженерних підходів”.

Мета і завдання досліджень. Метою даної роботи було вивчення фізико-хімічних і біологічних властивостей ландоміцину E та його продукування штамом *S. globisporus* 3-1 на різних середовищах.

Для реалізації даної мети необхідно було вирішити наступні завдання:*

вивчити морфологічні, культуральні і фізіологічні особливості штаму *S. globisporus* 3-1 - високоактивного продуцента

протипухлинного антибіотика ландоміцину E;*

вияснити динаміку і ефективність продукування ландоміцину E культурою штаму 3-1 при вирощуванні в рідких повноцінних середовищах в колбах на качалках і в лабораторному ферментері; *

вивчити вплив різних концентрацій глюкози і рН середовища на біосинтез ландоміцину E і його стабільність відповідно;*

встановити чутливість штамів *S. globisporus* 3-1 та *S. globisporus* Spo1 до антибіотиків з різними механізмами дії на бактеріальну клітину;*

вивчити чутливість вихідного штаму *S. globisporus* 1912 та його похідних мутантів 3-1 і Spo1 до ДНК - тропних факторів;*

встановити LD50 ландоміцину E на моделі лабораторних тварин;*

вияснити мутагенність ландоміцину E на тестерних культурах *Salmonella typhimurium* TA98 і TA100.

Об'єктами дослідження були вихідний штам *S. globisporus* 1912 і його похідні – високоактивний мутант 3-1 – продуцент ландоміцину E і УФ-чутливий ландоміциннедостатній мутант Spo1.

Предметом дослідження була здатність культури стрептоміцету продукувати ландоміцин E в різних умовах вирощування; чутливість штамів стрептоміцетів, що відрізняються рівнями синтезу ландоміцину E і репарацією піримідинових димерів, до антибіотиків і мутагенних факторів; токсичність і мутагенність ландоміцину E.

Методи дослідження. Для виконання поставлених завдань використовували мікробіологічні, біохімічні і генетичні методи

дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше встановлено, що більш оптимальним для продукування ландоміцину E культурою *S. globisporus* 3-1 є повноцінне середовище з кукурудзяним борошном, на якому спостерігається максимальний вихід антибіотика (200 мг/л) у порівнянні із середовищем з соєвою мукою і пептонно - дріжджовим середовищем. Ландоміцин E інтенсивно синтезується у фазі експоненціального росту культури паралельно із накопиченням біомаси міцелію, засвоєнням глюкози і поглинанням розчиненого кисню і досягає максимуму на 48 год вирощування. Показано, що глюкоза в концентраціях 1 - 4 % не впливає на синтез ландоміцину E штамом 3-1. Виявлено високу чутливість дводобового фрагментованого міцелію штаму 3-1 і спор штаму Sp01 до летальної дії стрептоміцину і УФ – світла відповідно. Вивчено антибіотичний спектр нативного ландоміцину E та його дегідратованої сполуки до ряду грампозитивних та грамнегативних бактерій і дріжджів. Ландоміцин E проявляє на 10 % більшу антибіотичну активність по відношенню до грампозитивних мікроорганізмів, особливо представників порядку Actinomycetales, у порівнянні з його дегідратованою формою. Виявлено, що при тривалому вирощуванні культури *S. globisporus* 3-1 на середовищі з соєвою мукою, а також при довготривалому зберіганні розчинів ландоміцину E в етанолі молекула останнього дегідратується і перетворюється в сполуку фіолетового кольору із зміненими фізико-хімічними властивостями - максимумом поглинання і хроматографічною рухливістю. Встановлено, що LD50 ландоміцину E для лабораторних мишей та щурів становить 75 мг/кг маси тварин. Показано слабу мутагенну активність ландоміцину E на штаммах *S. typhimurium* TA 98 і TA 100 в умовах метаболітної

активації.

Практичне значення отриманих результатів. Дослідження гострої токсичності (LD50) і мутагенності ландоміцину E є необхідною умовою доклінічного вивчення антибіотика і майбутнього встановлення терапевтичної дози препарату. Параметри вирощування штаму продуцента в лабораторному ферментері будуть враховуватися при розробці біотехнології одержання ландоміцину E.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота була спланована та виконана автором у співпраці з науковим керівником. Дисертантом особисто проведено дослідження антибіотичної, токсичної і мутагенної активності ландоміцину E на ряді штамів бактерій, дріжджів, грибів, на тестерних культурах *S. typhimurium* TA98 і TA100 і лабораторних тваринах – білих мишах та щурах. Дисертант вивчила параметри росту штаму *S. globisporus* 3-1 та вплив певних факторів на динаміку продукування ландоміцину E в рідких середовищах - колбах на качалках і в лабораторному ферментері; виявила зміни у спектрах нативного і дегідратованого антибіотика, встановила чутливість штаму *S. globisporus* 3-1 до власного та деяких полікетидних антибіотиків з різними механізмами дії на бактеріальну клітину.

Аналіз результатів та їх узагальнення, інтерпретацію даних, формулювання основних положень та висновків дисертації здійснено з участю керівника д.б.н. Б. П. Мацелюха і висвітлено у спільних друкованих працях.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідалися на Міжнародних конференціях студентів і аспірантів „Шевченківська весна” у Національному університеті ім. Т. Г.

Шевченка (м. Київ, 2003, 2004 рр.), Х з'їзді Товариства мікробіологів України (м. Одеса, вересень 2004 р.), конкурсі експериментальних робіт молодих дослідників Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (м. Київ, грудень 2002, 2003; січень і листопад 2005 рр.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових праць (5 статей у фахових журналах і 3 – тези доповідей).

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 139 сторінках машинописного тексту і складається з “Вступу”, розділів “Огляд літератури”, “Матеріали і методи досліджень”, п'яти розділів результатів власних досліджень, а також “Заклучення” та “Висновків”. Список використаних джерел містить 242 посилання, з яких 185 іноземних авторів. Робота містить 10 таблиць та 24 рисунків.

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглядається будова, механізм дії, токсичність і мутагенність полікетидних антибіотиків, а також їх біосинтез і регуляція. Висвітлено основні механізми стійкості стрептоміцетів до антибіотиків та їх генетичний контроль.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Розділ 2. Матеріали та методи досліджень

В роботі використано штами *S. globisporus* 1912 і одержані від нього мутанти *S. globisporus* 3-1 і *S. globisporus* Spo1. Вихідний штам 1912 дикого типу був виділений з ґрунтів Вірменії співробітниками відділу загальної і ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Високоактивний аспорогенний продуцент

ландоміцину Е штам 3-1 був одержаний під впливом нітрозогуанідину на спори вихідної культури 1912 у відділі генетики мікроорганізмів. Неактивний мутант Spo1 був виділений у вигляді окремої споруючої колонії із газону суцільного лізису при індукції дефектного профага у штаму *S. globisporus* 1912.

Для визначення спектру антибіотичної дії ландоміцину Е використовували ряд штамів мікроорганізмів - *Bacillus subtilis* УКМ В 901, *B. mycoides* УКМ В901, *Brevibacterium lineius* ATCC 728, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14020, *Escherichia coli* K12, *E. coli* C600, *Erwinia carotovora* 62A - d1, *Gordonia bronchiales* ATCC 25592, *Mycobacterium smegmatis* NCTC 8150, *Nocardia asteroides* ATCC 19247, *N. asteroides* ATCC 673, *Promicromonospora citrea* ВКМ 665, *Pseudomonas aeruginosa* УКМ 900, *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277, *R. rhodochorus* ATCC 13808, *Staphylococcus aureus* УКМ В 4001; стрептоміцетів - *Streptomyces levoris* 165, *S. olivaceus* VKX, *S. coelicolor* А 3 (2) (SCP1+SCP2+), *S. lividans* 66, *S. cyanogenes* 136, *S. glaucescens* 49, *S. fradiae* 2717; гриби - *Candida tropicalis* УКМ 910, *C. albicans* УКМ 912 К42 і дріжджі - *Saccharomyces cerevisiae* УКМ 524, *Schizosaccharomyces pombe* УКМ Y12, одержаних з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України і відділу фізіології промислових мікроорганізмів.

Для вивчення генотоксичності антибіотика в роботі використовували штами *S. typhimurium* TA98 і TA100.

Виділення, тонкошарову хроматографію та кількісне визначення ландоміцину Е проводили згідно методик [Segura et al., 1997; Мацелюх та ін., 1999].

Калібрувальні графіки залежності величини поглинання від

концентрації нативної і дегідратованої сполук ландоміцину E будували при довжині хвиль 442 і 502 нм відповідно за допомогою спектрофотометру фірми Beckman DU-8B.

Особливості росту штаму *S. globisporus* 3-1 і вплив глюкози на продукування ландоміцину E досліджували на соєвому та модифікованому середовищі Оканіші. Глюкозу вносили в колби на початку культивування в концентраціях 1 - 4 %. В 0,75 л круглодонні колби вносили 50 мл вище вказаних середовищ і засівали інокулюмом штаму 3-1. Міцелій вирощували на качалках при 240 об/хв і температурі 28 оС. Кожні 24 год протягом 3 діб відбирали проби культуральної рідини. Міцелій відділяли від культуральної рідини центрифугуванням при 5 тис. об/хв протягом 10 хв. Біомасу висушували в сухожаровій шафі при температурі 100 оС до постійної ваги. Культуральну рідину використовували для визначення антибіотичної активності та кількості утилізованої глюкози. Протягом 24, 48, 72 год спостерігали за наростанням біомаси, синтезом ландоміцину E та зміною рН. Інокулюмом для засіву ферментаційних середовищ була суспензія міцелію 2-добової культури, вирощеної в пробірках 2,0 x 20,0 см на скошеному соєвому середовищі. На 1 літр рідкого середовища у ферментері BioFlo 2000 (New Brunswick Scientific, USA) використовували змив міцелію із чотирьох пробірок. У процесі культивування частота обертів мішалки і температура середовища були постійними і становили 240 об/хв і 28 оС відповідно. Повітря у ферментер подавалося в кількості 4 л/л середовища за хв за допомогою електрокомпресора GM-TR-VX (FIAC, Italia). Процес росту культур тривав 72 - 96 год. Проби культуральної рідини відбирали через кожних 24 год для визначення антибіотичної активності, концентрації глюкози і накопичення біомаси. Контроль розчиненого кисню і рН культуральної рідини у ферментері

проводився постійно за допомогою показників датчиків і аналізаторів.

Утилізацію глюкози штамом 3-1 визначали ферментативним методом за допомогою аналітичного набору Діаглюк-2 виробництва ДП «Львівдіалік». LD50 ландоміцину E вивчали на мишах та щурах альбіносах (по 10 тварин на кожну дозу, масою 20 г і 150 г, відповідно, обох статей). Ландоміцин E вводили тваринам внутрішньоочеревинно, інтравенозно та перорально. Досліджували різні дози ландоміцину E в межах від 20 до 100 мг/кг ваги тварини. Тваринам вводили ландоміцин E через рот за допомогою шприца і голки з тупим потовщеним кінцем в дозах 20, 40, 60, 80 і 100 мг/кг, який змішували з крохмальним клейстером. Загальний об'єм ландоміцину E, що був введений мишам та щурам перорально, складав 0,4 та 1 мл відповідно, а об'єм розчину антибіотика, введеного у хвостову вену тварин – 0,6 мл. Різні варіанти доз досліджували тричі, за станом лабораторних тварин спостерігали протягом десяти днів. Індекс LD50 розраховували за формулою Кербера [Першин, 1971]

Визначення мутагенної активності ландоміцину E за допомогою штамів *S. typhimurium* TA98 і TA100 проводили за загальноприйнятою методикою [Maron et al., 1984]. Якісний тест на антибіотичну активність проб культуральної рідини з колб і блоків агарових культур проводили за допомогою чашкового методу з використанням чутливої тест-культури *S. levoris* 165 [Мацелюх та співавт., 2005]. Визначенні чутливості штамів *S. globisporus* до антибіотиків і ДНК- тропних агентів проводили за методиками [Мацелюх та співавт., 1999; 2004]. Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили за критерієм Стьюдента. Усі отримані результати були оброблені статистично за допомогою пакету програм Excel_97.

Розділ 3. Продукування ландоміцину E при глибинному рості культури *S. globisporus* 3-1 на різних середовищах

Проведені дослідження показали, що одним із високоактивних і стабільних продуцентів ландоміцину E є аспорогенний штам *S. globisporus* 3-1, який синтезує до 200 мг/л ландоміцину E в рідкому кукурудзяному середовищі на відміну від вихідного штаму 1912, що продукує тільки 40 мг/л антибіотика. При дослідженні процесу утворення ландоміцину E на соєвому, кукурудзяному і пептонно-дріжджовому середовищах в чашках Петрі було виявлено, що найбільші зони пригнічення росту тест-культури *S. levoris* 165 виникали навколо блоків газону культури продуцента, що виросла на кукурудзяному середовищі, дещо менші зони - навколо блоків із соєвого середовища, і найменші зони дала культура, що виросла на пептонно-дріжджовому середовищі. Найбільший діаметр зон пригнічення росту тест-культури виявлявся на 48 год культивування продуцента на всіх середовищах. Продовження інкубації культури до 96 год супроводжувалося зниженням її антибіотичної активності. Максимальне накопичення ландоміцину E в середовищі відбувається на 48 год культивування з наступною частинною інактивацією антибіотика за рахунок зміни його структури. Підтвердженням такого припущення може бути хроматографічний аналіз екстрактів газонів культур – поява додаткових смуг коричневого і фіолетового кольору на тонкошарових хроматографічних пластинках, а також зміна кольору агаризованого середовища із шоколадного на більш темний і фіолетово-синій колір після 48 год зберігання чашок із культурою продуцента. Найбільш виражене це явище на соєвому середовищі. Подібні результати одержані при вирощуванні культури 3-1 в рідких середовищах в колбах на качалці (табл.1). Нижча антибіотична активність культуральної рідини із соєвого і пептонно-дріжджового

середовищ може бути також наслідком частинної інактивації ландоміцину E при лужному рН (8,0-8,7), яке не утворює культура при рості на кукурудзяному середовищі (6,6-7,2). Найбільший вихід сухої біомаси має місце при рості культури на соєвому середовищі (14,2 г/л) і найменший - на пептонно-дріжджовому (7,2 г/л). Встановлено, що глюкоза в концентраціях 1 - 4 % в двох різних за складом середовищах не пригнічує біосинтез ландоміцину E. Ця характеристика штаму 3-1 є важливою при розробці біотехнології одержання ландоміцину E як в лабораторних умовах, так і в промисловості.

Таблиця 1

Деякі показники росту культури *S. globisporus* 3-1 на різних середовищах в колбах на качалці (середні значення трьох дослідів)

Трива-лість росту,

год | Середовища

кукурудзяне | соєве | пептонно-дріжджове

АА | рН | СБМ | АА | рН | СБМ | АА | рН | СБМ

24 | 20,0 | 6,48 | 8,0 | 18,0 | 7,6 | 9,0 | 16,0 | 7,4 | 4,8

48 | 22,0 | 6,58 | 10,3 | 20,0 | 8,0 | 13,0 | 18,0 | 7,74 | 5,9

60 | 21,0 | 7,0 | 11,3 | 19,0 | 8,02 | 13,8 | 17,0 | 7,92 | 7,0

72 | 20,0 | 7,06 | 12,0 | 18,0 | 8,05 | 14,2 | 16,0 | 7,96 | 7,2

96 | 18,0 | 7,20 | 11,6 | 16,0 | 8,70 | 12,6 | 12,0 | 8,40 | 6,8

Примітка. АА – антибіотична активність (діаметр зони

пригнічення росту тест-культури в мм); СБМ – суха біомаса в г.

Проведено три незалежних досліди вирощування культури продуцента ландоміцину E в соєвому і кукурудзяному середовищах у ферментері з визначенням динаміки таких показників росту, як поглинання розчиненого кисню, засвоєння глюкози, зміни рН, накопичення біомаси і ландоміцину E (рис. 1 і 2) У фазі активного росту культури відбувається інтенсивне поглинання розчиненого кисню, про що свідчить неухильне зменшення його рівня до 40 % і 20 % в кукурудзяному і соєвому середовищах відповідно. В цій фазі зростають концентрація ландоміцину E і рівень біомаси в обох середовищах. Перехід культури в стаціонарну фазу супроводжується менш інтенсивним поглинанням розчиненого кисню, рівень якого після 48 год вирощування починає зростати. Слід зауважити, що не дивлячись на інтенсивну аерацію культури (4 л/л середовища за хв), нам не вдалося забезпечити високий рівень розчиненого кисню в процесі росту продуцента на соєвому середовищі.

Отже, вихід ландоміцину E у певній мірі залежить від концентрації розчиненого кисню в середовищі культивування продуцента і кукурудзяне середовище є більш сприятливим у цьому відношенні. Як видно із рисунків 1 і 2, фаза логарифмічного росту культури починається після 24 год ферментації і продовжується до 48 год, після чого настає стаціонарна фаза з деяким пониженням рівня біомаси за рахунок частинного лізису міцелію. Визначення фази росту продуцента і максимальної концентрації ландоміцину E дозволило нам встановити оптимальну тривалість процесу при глибинному культивуванні. Концентрація ландоміцину E у культуральному середовищі, як і накопичення біомаси міцелію, сягали найвищого значення наприкінці експоненційної і початку стаціонарної фази росту

культури 3-1. Вага сухої біомаси була більшою на соєвому середовищі, ніж на кукурудзяному. Паралельно із збільшенням біомаси наростає інтенсивність засвоєння глюкози, концентрація якої із початкових 2 % зменшується до 0,05% на другу добу росту культури. Температура і рН середовища протягом всього періоду ферментації підтримувалися на постійному рівні, що становив 28 0C і 6,4 відповідно.

Приблизне кількісне співвідношення азоту до вуглецю розраховували, виходячи з компонентного складу рідких кукурудзяного та соєвого середовищ. Максимальне накопичення антибіотика культурою *S. globisporus* 3-1 відмічали в рідкому кукурудзяному середовищі, в якому співвідношення C:N = 9,57 (8,04 : 0,84 г/л). При такому співвідношенні вуглецю до азоту вихід ландоміцину E становить 200 мг/л, хоча біомаса накопичувалася в меншій кількості (10 г/л). В соєвому середовищі це співвідношення становило C:N=13,16 (12,04 : 1,12 г/л), в якому вихід біомаси був більшим (12 г/л), а антибіотична активність – меншою (160 – 180 мг/л). Більший вміст вуглецю в соєвому середовищі може бути причиною більшого накопичення біомаси у порівнянні із кукурудзяним середовищем. Але не завжди максимальний вихід біомаси корелює з антибіотикоутворенням. Є певне оптимальне співвідношення між цими показниками і результати даної роботи є першим кроком на шляху розв'язання цієї проблеми.

Ландоміцин E продукується у фазу експоненційного росту культури штаму 3-1, що не є характерним для біосинтезу антибіотиків як вторинних метаболітів. Причиною такого раннього синтезу ландоміцину E може бути виключення негативної регуляції антибіотикоутворення зі сторони двохкомпонентної системи передачі

сигналів під впливом ізофлавону геністеїну – інгібітора відповідної протеїнкінази.

Рис. 1. Показники росту культури штаму *S. globisporus* 3-1 у лабораторному ферментері на кукурудзяному середовищі

Рис. 2. Показники росту культури штаму *S. globisporus* 3-1 у лабораторному ферментері на соєвому середовищі

Розділ 4. Чутливість штамів 3-1 і Spo1 до антибіотиків і ДНК-тропних агентів

В роботі використовували два штами з протилежними властивостями – високоактивний і неспорулюючий штам *S. globisporus* 3-1 та спорогенний і антибіотиконеактивний штам *S. globisporus* Spo1 для перевірки їх чутливості до антибіотиків і мутагенних факторів.

За здатністю використовувати вуглеводи як єдине джерело вуглецю і енергії мутанти не відрізнялися в значній мірі від вихідної культури. Штами *S. globisporus* 1912 та *S. globisporus* 3-1 добре засвоювали глюкозу, арабінозу, ксилозу, манніт, маннозу, фруктозу, рамнозу, гліцерин, мальтозу і погано засвоювали сахарозу, інозит та рафінозу. Як і вихідна культура, мутанти 3-1 та Spo1 повільно розріджували 4 % та 12 % желатину, гідролізували крохмаль, відновлювали нітрати, пептонізували молоко, не утворювали сірководень та меланоїдних пігментів.

Як видно з рисунків 3 і 4, штами *S. globisporus* 3-1 і Spo1 виявилися високочутливими до летальної дії стрептоміцину і ландоміцину E відповідно. Концентрація антибіотиків 5 мкг/мл знижувала виживання клітин на 6,5 порядків у порівнянні з

контролем. Може бути дві причини такої високої чутливості штаму Spo1 до ландоміцину E: 1) наявність дефектної системи репарації ДНК; 2) відсутність функціонування ABC – транспортеру на момент проростання спор. Більшу резистентність на 3,5 порядків штаму Spo1 до стрептоміцину у порівнянні зі штамом 3-1 поки що важко пояснити. Протипухлинні антибіотики доксорубіцин і ландоміцин E характеризуються подібними летальними ефектами на міцелій штаму *S. globisporus* 3-1. Концентрація антибіотиків 15 мкг/мл зменшує виживання міцеліальних клітин на 4 порядки, що свідчить про меншу на 2 порядки чутливість міцелію штаму 3-1 до цих антибіотиків у порівнянні із стрептоміцином. Доксорубіцин є менш токсичним для міцелію штаму 3-1, ніж власний антибіотик ландоміцин E, оскільки виживання незначної долі клітин ще спостерігається при концентрації доксорубіцину 30 мкг/мл, в той час як воно повністю відсутнє при концентрації ландоміцину більше 15 мкг/мл.

Найбільш імовірне пояснення високої чутливості міцелію культури *S. globisporus* 3-1 до власного антибіотика полягає в проникненні останнього в цитоплазму через рвані кінці фрагментів міцелію незалежно від наявності функціонально активного ABC-транспортера. Не виключена також можливість порушення функції даного транспортера в процесі центрифугування, промивання і розтирання (гомогенізації) міцелію. Антибіотики олеандоміцин і тетрациклін проявляють на 1 і 2 порядки відповідно меншу летальну дію на штам 3-1 в порівнянні з доксорубіцином і ландоміцином E. За інтенсивністю летальної дії на міцелій штаму 3-1 названі вище антибіотики розмістились в такій низхідній послідовності: стрептоміцин, ландоміцин E, доксорубіцин, олеандоміцин і тетрациклін; для штаму Spo1 - ландоміцин E, олеандоміцин,

стрептоміцин і тетрациклін.

Рис. 3. Залежність виживання міцелію *S. globisporus* 3-1 від концентрації антибіотиків: стрептоміцин - Stm, доксорубіцин - DR, ландоміцин E - LE, тетрациклін - TC і олеандоміцин - OL.

Рис. 4. Залежність виживання спор *S. globisporus* Spo1 від концентрації антибіотиків: стрептоміцин - Stm, ландоміцин E - LE, тетрациклін - TC і олеандоміцин - OL.

Встановлено, що для досліджуваних штамів стрептоміцетів характерна стійкість до -лактамних, цефалоспоринових, тетрациклінових та макролідних антибіотиків і чутливість до аміноглікозидних, лінкозамідних препаратів та рифампіцину.

При обробці міцелію перекисом водню штам *S. globisporus* 3-1 виявився більш стійким до концентрації 30 мМ у порівнянні із штамми 1912 і Spo1, в яких криві виживання обриваються при концентрації мутагену більше 20 мМ. Показано, що мутант Spo1 слабочутливий до дії азотистої кислоти, в той час як вихідний штам 1912 і мутант 3-1 проявляють на чотири порядки більшу чутливість до цього мутагену. Крім цього, у мутанта Spo1 виявлена висока УФ-мутабільність. Виявлено, що вихідний штам *S. globisporus* 1912 має підвищений рівень чутливості до дії ультрафіолету. Вихідний штам *S. globisporus* 1912 і його похідні мутанти 3-1 і Spo1 мають різні інактиваційні характеристики у відношенні до ультрафіолетового опромінення. Мутант Spo1 проявляє надзвичайно високу чутливість до дії ультрафіолету.

Отже, вихідний штам *S. globisporus* 1912 та похідний від нього

мутант 3-1 не чутливі до дії метилметансульфонату, на відміну від антибіотиконеактивного мутанта Spo1, який проявляє підвищений рівень чутливості до цього мутагену і стійкість до азотистої кислоти. Штам 3-1, як високоактивний і стабільний продуцент ландоміцину E, має активні системи репарації пошкоджень ДНК - піримідинових димерів і алкільованих основ, які викликають УФ-опромінення і метилметансульфонат відповідно. Ця характеристика штаму *S. globisporus* 3-1 є важливою і необхідною умовою для наступної розробки біотехнології одержання ландоміцину E. Одержані результати будуть використані в лабораторії при селекції стрептоміцинорезистентних мутантів з підвищеним синтезом ландоміцину E, а також при дослідженні системи репарації пошкоджень ДНК у різних мутантів – похідних *S. globisporus* 1912.

Розділ 5. Антибіотичні і фізико-хімічні властивості ландоміцину E і його похідних сполук

Виявлено, що після 48 год вирощування культури 3-1 в соєвому середовищі за будь-яких умов (на агаризованому середовищі в чашках Петрі, в рідкому середовищі в колбах на качалках і у ферментері) мажорним компонентом є нативний ландоміцин E червоно-оранжевого кольору, мінорним – ландоміцин D і в слідових кількостях - сполуки коричневого та фіолетового кольору. Нативний ландоміцин E та його похідні сполуки коричневого і фіолетового кольору відрізняються між собою не тільки забарвленням, але і іншими фізико-хімічними характеристиками – хроматографічною рухливістю, максимумами поглинання, молекулярною вагою і структурною формулою (табл.2).

Таблиця 2

Фізико-хімічна характеристика ландоміцину E та його похідних сполук

Назва антибіотику | Молекулярна формула | Молекулярна маса |

Колір антибіотику | Максимуми

поглинання в етанолі, нм |

Rf *

Ландоміцин E дегідратований | C₃₇ H₄₂ O₁₃ | 694,0 | Фіолетовий | 502,0 |

0,85

Ландоміцин E окислений | C₃₇ H₄₂ O₁₄ | 710,0 | Коричневий | 456,0 | 0,49

Ландоміцин E нативний | C₃₇ H₄₄ O₁₄ | 712,2 | Червоно-оранжевий | 440,0 | 0,37

Примітка. Система розчинників: бензол - етил-ацетат- ацетон – етанол

Максимуми поглинання ландоміцину E та його похідних сполук становлять 440, 456 і 502 нм (рис. 5).

Рис. 5. Спектри поглинання ландоміцину E та його похідних сполук червоно-оранжевого (1, 2), коричневого (3) і фіолетового (4) кольорів.

Нативна і дегідратована сполуки ландоміцину E виявилися

активними до ряду тест-культур грампозитивних мікроорганізмів, особливо представників порядку Actinomycetales і не проявляли значної антибіотичної дії на грамнегативні бактерії і дріжджі. Антибіотична активність нативної сполуки ландоміцину E була дещо вищою від його дегідратованої форми.

Таким чином, нами показано, що культура штаму *S. globisporus* 3-1 при вирощуванні в соєвому і кукурудзяному середовищах синтезує ангуцикліновий антибіотик ландоміцин E, який може частково окислятися, особливо при інтенсивній аерації, з утворенням похідної сполуки коричневого кольору і дегідратуватися з перетворенням у сполуку фіолетового кольору в умовах тривалого зберігання етанольних розчинів або підвищеного рН середовища. Одержані результати будуть враховані при розробці біотехнології одержання ландоміцину E, а також його стабілізації шляхом переведення нативної сполуки в гідрохлоридну форму, як це часто застосовується для полікетидних антибіотиків.

Розділ 6. Мутагенність і токсичність ландоміцину E

Встановлення токсичності і мутагенної активності різних біологічних препаратів, в тому числі і антибіотиків, є обов'язковою вимогою МОЗ України на етапі їх доклінічних досліджень. Лабораторні тварини переносили введення ландоміцину E в дозі від 20 до 100 мг/кг внутріочеревинно і перорально без летальних випадків. При введенні препарату у хвостову вену встановлено максимально переносиму (40 мг/кг), мінімальну токсичну (60 мг/кг) і максимальну токсичну (100 мг/кг маси тварин) дози. LD50 для мишей та щурів становила 75 мг/кг маси тварин ($p < 0,01$).

Летальна дія ландоміцину E на клітини штамів *S. typhimurium*

ТА98 і ТА100 залежить від дози антибіотика (рис.6). Кількість бактерій, що вижили, стрімко зменшувалась в межах від 25 до 200 мкг/чашку ландоміцину Е і при концентрації антибіотика 300 мкг/чашку складала 10 і 2 % для штамів ТА98 і ТА100 відповідно. Штам ТА98 виявився у 2,0 – 2,5 рази більш стійким до летальної дії антибіотика у порівнянні з штамом ТА100. Концентрація ландоміцину Е 25 мкг/чашку індукувала 1,20 і 1,45 разів вищу частоту появи His⁺ ревертантів у штамів *S. typhimurium* ТА100 і ТА98 відповідно в умовах метаболічної активації. Максимальна частота колоній ревертантів з метаболітною системою активації для штаму ТА100 перевищувала в 1,32 рази рівень спонтанного фону, що свідчить про ефективність функціонування системи мікосомального окислення ландоміцину Е (рис. 7). Більш високі концентрації ландоміцину Е (150 - 200 мкг/чашку) зменшували частоту появи His⁺ ревертантів у штаму ТА100, яка перевищувала у 1,1 рази спонтанний рівень. Ландоміцин Е має виражену летальну дію на клітини сальмонел при концентрації 200 мкг/чашку, зменшуючи їх виживання на 1-2 порядки. Іншу картину стосовно мутагенності ландоміцину Е спостерігали без метаболічної активації.

Рис. 6. Залежність виживання клітин *S. typhimurium* ТА 98 і ТА 100 від концентрації ландоміцину Е

Рис. 7. Частота виникнення His⁺ ревертантів у *S. typhimurium* ТА98 і ТА100, індукованих різними концентраціями ландоміцину Е

Примітка: 1 і 2 - спонтанні His⁺ ревертанти штамів *S. typhimurium* ТА98 і ТА100 відповідно; 3 і 4 - His⁺ ревертанти штамів ТА98 і ТА100 відповідно, індуковані ландоміцином Е без метаболічної активації; 5 і 6 - His⁺ ревертанти, індуковані ландоміцином Е у штамів

ТА98 і ТА100, відповідно з метаболітною активацією.

Криві частоти зворотніх мутацій, індукованих ландоміцином Е в концентраціях 50 мкг/чашку, розміщені нижче частоти спонтанних мутацій для обох штамів. Кількість ревертантів при концентрації антибіотика 100 мкг/чашку для штамів сальмонел була різною: у ТА98 - 19 і ТА100 - 53. Рівень мутагенності при даній концентрації ландоміцину Е був невисокий, тобто в 0,47 і 0,66 разів менше контролю, що вказує на перевагу летальної дії антибіотика над мутагенною. Зростання концентрації антибіотика ландоміцину Е до 150 - 200 мкг/чашку викликало зменшення частоти мутагенезу тільки у штаму ТА100.

Досліджений в даній роботі новий ангуцикліновий антибіотик ландоміцин Е вигідно відрізняється від інших протипухлинних антибіотиків меншою цитотоксичністю і слабкою мутагенною активністю.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що оптимальним для продукування ландоміцину Е культурою *S. globisporus* 3–1 є кукурудзяне середовище, на якому спостерігається максимальне накопичення антибіотика на 48 год ферментації (200 мг/л) у порівнянні із соєвим і пептонно – дріжджовим середовищами. Глюкоза в концентраціях 1 - 4 % не пригнічує біосинтез ландоміцину Е.

2. Встановлено, що ландоміцин Е інтенсивно синтезується у фазі експоненціального росту культури паралельно із накопиченням біомаси міцелію, засвоєнням глюкози і поглинанням розчиненого кисню.

3. Виявлено високу чутливість міцелію штаму 3-1 і спор штаму Spo1 до летальної дії стрептоміцину і ландоміцину E відповідно. Концентрація даних антибіотиків 5 мкг/мл знижує рівень виживання вказаних вище штамів на 6,5 порядків.

4. Показано стійкість штаму 3-1 і високу чутливість штаму Spo1 до ультрафіолетового випромінювання і метилметансульфонату, що вказує на пошкодження систем репарації піримідинових димерів і алкільованих основ в останнього.

5. Вивчено антибіотичний спектр нативного ландоміцину E та його дегідратованої сполуки фіолетового кольору до ряду грампозитивних та грамнегативних бактерій і дріжджів. Ландоміцин E проявляє антибіотичну активність по відношенню до грампозитивних мікроорганізмів, особливо представників порядку Actinomycetales. Нативний ландоміцин E є більш біологічноактивним, ніж його дегідратована форма.

6. Виявлено, що при тривалому (7 добовому) вирощуванні активного продуцента ландоміцину E культури *S. globisporus* 3-1 на соєвому середовищі, а також при довготривалому (6 місяців) зберіганні розчинів ландоміцину E в етанолі молекула останнього втрачає молекулу води (дегідратація) і перетворюється в сполуку фіолетового кольору із зміненими фізико-хімічними властивостями - максимумом поглинання і хроматографічною рухливістю.

7. Встановлено, що LD50 ландоміцину E для мишей та щурів альбіносів становить 75 мг/кг маси тварин. Показано слабу мутагенну активність ландоміцину E на штаммах *S. typhimurium* TA 98 і TA 100 в умовах метаболітної активації.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Мацелюх Б.П., Тимчик О.В., Мацелюх А.Б. Вплив умов вирощування *Streptomyces globisporus* 3-1 на продукування ландоміцину Е // Мікробіол. журн., - 2005. - т.69. - № 4. - С. 37 - 44 (здобувачем особисто вивчено динаміку продукування ландоміцину Е на соєвому та кукурудзяному середовищах при культивуванні штаму у ферментері, визначено вміст глюкози в культуральній рідині протягом 48 год культивування).

2. Тимчик О.В., Мацелюх Б.П. Токсичність полікетидного антибіотика ландоміцину Е на моделях лабораторних тварин // Наук. вісник Ужгород. ун-ту, Серія Біологія. - 2004. – Випуск 15. - С. 68 - 70 (здобувачем особисто екстраговано і очищено ландоміцин Е, проведено відбір лабораторних тварин, годування мишей та щурів, статистичну обробку отриманих результатів).

3. Тимчик О.В., Мацелюх Б.П., Лаврінчук В.Я. Чутливість *Streptomyces globisporus* 3-1 - високоактивного продуцента ландоміцину Е до власного та інших полікетидних антибіотиків // Мікробіол. журн., - 2004. – т.66, № 2. - С. 69 - 73 (здобувачем особисто екстраговано ландоміцин Е та інші метаболіти, досліджено чутливість штаму 3-1 до ландоміцину Е, доксорубіцину, тетрацикліну і олеандоміцину)

4. Тимчик О.В., Поліщук Л. В., Мацелюх Б.П., Лаврінчук В.Я. Морфологічні, фізіологічні та культуральні ознаки мутантів *Streptomyces globisporus* 1912 // Наук. вісник Ужгород. ун-ту, Серія Біологія. - 2005. - Випуск 16. - С. 68 - 70 (здобувачем особисто вивчено біохімічні та фізіологічні особливості штамів *S. globisporus* 3-1 та Sp01).

5. Лаврінчук В.Я, Мацелюх, Б.П, Тимчик О.В. Деякі властивості надчутливого до ультрафіолету мутанта *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн., – 2004. – т.66, №4.- С. 28 – 31 (здобувачем особисто вивчено чутливість штаму 3-1 до мутагенів)

6. Тимчик О.В. Чутливість штаму *Streptomyces globisporus* 1912 до власного та інших антибіотиків // Міжнародна науково - практична конференція Шевченківська весна - 2004. - Збірник тез. - Київ. - 2004. - С. 45 - 46.

7. Тимчик О.В. Чутливість штаму *Streptomyces globisporus* 3-1 до власного та інших антибіотиків // III (X) з'їзд Товариства мікробіологів України. - Збірник тез. - Одеса. - 2004. - С. 340.

8. Лаврінчук В.Я, Мацелюх Б.П., Тимчик О.В. Високочутливі до ультрафіолету мутанти *Streptomyces globisporus* 1912 і їх класифікація за допомогою метилметансульфонату, азотистої кислоти та перекису водню // III (X) з'їзд Товариства мікробіологів України. - Збірник тез. - Одеса. - 2004. - С. 323.

АНОТАЦІЯ

Тимчик О.В. Фізико-хімічні і біологічні властивості ландоміцину E і його продукування культурою *Streptomyces globisporus* 3-1. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07. – мікробіологія. – Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України, Київ, 2006.

Дисертація присвячена дослідженню фізико-хімічних і біологічних

властивостей нового протипухлинного антибіотика ландоміцину E і його біосинтезу високоактивним штамом *S. globisporus* 3-1.

В роботі запропоновано середовище з кукурудзяною мукою і параметри вирощування штаму 3-1 в лабораторному ферментері як основу для розробки біотехнології одержання ландоміцину E. Ландоміцин E інтенсивно синтезується у фазі експоненціального росту культури паралельно із накопиченням біомаси міцелію, засвоєнням глюкози і поглинанням розчиненого кисню. Глюкоза в концентраціях 1 - 4 % не впливає на синтез ландоміцину E штамом 3-1.

Встановлено, що при довготривалому вирощуванні культури штаму 3-1 продуцента ландоміцину E на соєвому середовищі і зберіганні етанольних розчинів ландоміцину E молекула останнього дегідратується і перетворюється в сполуку фіолетового кольору із зміненими фізико-хімічними властивостями - максимумом поглинання і хроматографічною рухливістю. Нативна форма ландоміцину E проявляє вищу антибіотичну активність до грампозитивних мікроорганізмів. LD50 антибіотика для лабораторних мишей та щурів становить 75 мг/кг маси тварин. Ландоміцин E проявляє слабку мутагенну активність в умовах метаболітної активації на штаммах *S. typhimurium* TA98 і TA100.

Виявлено високу чутливість міцелію штаму 3-1 і спор штаму Sp01 до летальної дії стрептоміцину