

УДК 661.734.1:577.15:663.15

Н.Ю. ШАРОВА

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок»
(ФГБНУ ВНИИПД), Санкт-Петербург, 191014

e-mail: natalya_sharova1@mail.ru

Биосинтез ингибитора амилаз культурами стрептомицетов

Исследовано влияние источников углерода и азота, макро- и микроэлементов на биосинтез ингибитора амилаз, синтезируемого штаммами *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 и *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743. Показано, что регуляция биосинтеза ингибитора амилаз может осуществляться за счет лимитирования по углероду и кислороду, путем поддержания постоянного соотношения концентраций углеводных компонентов среды (декстрины, мальтоза, глюкоза) и соотношения С:N, а также дополнительного введения в питательную среду органического азотсодержащего компонента. Синтезируемые ингибиторы имеют псевдоолигосахаридную природу.

Ключевые слова: биосинтез, ингибитор амилаз, штамм *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743, штамм *Streptomyces violaceus* Ас-1734.

Известно, что полисахариды, попадая в организм человека, сначала подвергаются действию амилазы слюны, что приводит к образованию незначительного количества глюкозы и олигосахаридов, которые далее становятся объектом гидролитического действия глюкозидаз тонкого кишечника. Ингибиторы амилаз представляют интерес в качестве биологически активных веществ, которые, замедляя процесс переваривания углеводов, образования глюкозы и поступления ее в кровь, значительно снижают риск заболевания сахарным диабетом и сопутствующих нарушений углеводного обмена. Зарубежными исследователями показана перспективность применения ингибиторов амилаз в качестве субстанций для разработки антидиабетических лекарственных средств [1–3].

Известные ингибиторы амилаз в основном являются продуктами микробного синтеза и пред-

ставляют собой полипептиды, неустойчивые при нагревании, с трудом или совсем не поддающиеся диализу и теряющие активность при обработке протеазами, что создает трудности при их выделении и хранении. Среди нашедших практическое применение ингибиторов известны вещества, имеющие название «псевдосахариды», так как их структура помимо глюкозных единиц включает, например, аминсахара, циклитол [4]. Они устойчивы в широком интервале рН и температуры и частично поддаются диализу. Среди них акарбоза в составе коммерческой формы Глюкобай, нойиримицин и 1-дезоксинойиримицин — активные основы препаратов Миглитол и Эмиглитат (Bayer AG, Германия). Производные указанных ингибиторов вошли в состав препаратов Воглибоза, Glyset, Xenical, Glucophage XR, TZDs. Известны одиночные публикации о введении ингибиторов амилаз в

Шарова Наталья Юрьевна.

Список сокращений: АС — амилолитическая способность; БАВ — биологически активное вещество; БАД — биологически активная добавка; ИЕ — ингибиторная единица; КЖ — культуральная жидкость, КМЦС — способность гидролизовать карбоксиметилцеллюлозу; ММ — молекулярная масса; ДЕ — декстрозный эквивалент.

рацион питания в сочетании с высококалорийными пищевыми продуктами, в частности, сладкими напитками (нойиримицин и его производные), хлебом и кондитерскими изделиями пшеничных сортов (трестатины). Упомянутые выше ингибиторы в большей мере подавляют активность ферментов второй стадии расщепления углеводов пищи, т.е. глюкозидаз тонкого кишечника. Однако достижение более выраженного эффекта снижения скорости поступления глюкозы в кровь может быть обеспечено за счет применения ингибитора, обладающего высоким сродством не только к глюкозидазам тонкого кишечника, но к амилазам слюны и поджелудочной железы. Российскими исследователями получен препарат Гипоглюкин (находящийся на лабораторной стадии исследования), который в высокой степени угнетает α -амилазу и глюкоамилазу из организма животных и проявляет ингибиторную активность более высокую, чем акарбоза [5]. Продуцентами указанных выше ингибиторов являются стрептомицеты, которые отличаются особой требовательностью к условиям выращивания и нестабильностью [6]. Уровень их ингибиторной активности может быть повышен за счет изменения условий культивирования.

Стрептомицеты обладают сложной ферментной системой, благодаря которой хорошо усваивают органические вещества, что делает легким и быстрым их культивирование в искусственных условиях и объясняет их широкое распространение в природе. В результате скрининга штаммов р. *Streptomyces* из коллекции ФГБНУ ВНИИПД и их селекции выделены два наиболее продуктивных штамма, синтезирующих ингибитор панкреатической амилазы: *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734.

Целью исследований являлось установление путей регуляции биосинтеза ингибитора этими штаммами.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили штаммы *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ас-1743 [5] и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ас-1734 [6].

Посевной мицелий выращивали на среде следующего состава, г/л: соевая мука (соевая полуобезжиренная дезодорированная мука 1 сорта, ООО «Тагрис Молоко», Россия) — 10,0; глюкоза («Днепропетровский крахмалопаточный комбинат», Украина) — 10,0; натрий хлористый (ООО «ХлоренХима», Россия) — 5,0; кальций углекислый (ООО «Химфарминвест», Россия) — 1,0; рН среды 7,0. Инокулят вносили в ферментационную среду, со-

держащую, г/л: гидролизат крахмала или муки (см. ниже) — 20; соевую муку — 5,0; натрий хлористый — 3,0; калий фосфорнокислый однозамещенный (ООО «Компонент-Реактив», Россия) — 1,0; магний сернокислый семиводный (ООО «Компонент-Реактив») — 0,5, рН среды 7,0. Культуры выращивали в качалочных колбах (750 мл) со 100 мл среды при 28° и частоте вращения 200 об/мин; время выращивания в шейкере-инкубаторе Multitron (INFORS, Швейцария) [5, 6] составляло 96 ч. Ферментацию проводили в биореакторе Biostat® Cplus вместимостью 30 дм³ (Sartorius, Германия).

В качестве источника углерода использовали крахмалсодержащее сырье и его гидролизаты (ГОСТ Р 52672-2006): крахмал — кукурузный (ООО «Ярснаб», Россия), картофельный (нативный, ООО «Алтика-Прайм» и растворимый, Avebe, Германия), пшеничный (Roquette, Франция) и ржаной (опытная партия ГНУ ВНИИ крахмалопродуктов); муку — ржаную обдирную (ООО «Ричлан», Россия), рисовую («Балтийская мельница», Россия). В качестве альтернативного углеводного субстрата исследовали глюкозу (ПАО «Днепропетровский крахмалопаточный комбинат», Украина), мальтозу (Anhui Elite Industrial Co., Ltd., Китай), сахарозу (Advanced Technology & Industrial Co., Ltd, Китай) и декстрины (ЗАО «Декстринозавод», Россия).

Гидролизаты крахмала и рисовой муки получали методом ферментативного гидролиза с использованием Амилосубтилина ГЗХ (ОАО «Восток», Россия), а гидролизат ржаной муки — последовательным ферментативным гидролизом препаратами Целловиридин ГЗХ и Амилосубтилин ГЗХ (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия) [7]. В гидролизатах оценивали количество углеводов методом Зихерда-Блейера в модификации Смирнова и рассчитывали значение декстрозного эквивалента (DE) по величине суммарного количества глюкозы и мальтозы в пересчете на сухие вещества [8].

В качестве источников азота, альтернативных соевой полуобезжиренной дезодорированной муке первого сорта (ООО «Тагрис»), исследовали аммоний азотнокислый (ООО «ХлоренХима»), пептон сухой ферментативный (ФГУП ГНЦПМ, Россия) и дрожжевой экстракт («Хеликон», Россия).

Ингибиторную активность по отношению к панкреатической α -амилазе (КФ 3.2.1.1; 1,4- α -D-глюкан-глюкангидролаза, Sigma, США) определяли спектрофотометрическим методом, описанным в работе [9], дегидрогеназную активность — по методу [10]. Взаимодействие с грибной глюкоамилазой (КФ 3.2.1.3; 1,4- α -D-гликан-глюкогидролаза) *Aspergillus awamori* (ООО «Ладыжинский за-

вод био- и ферментных препаратов «Энзим», Беларусь) изучали с помощью глюкозооксидазного метода [11].

В качестве бактериальной амилазы использовали α -амилазу *Bacillus subtilis* (ООО ПО «Сиббиофарм», Россия); взаимодействие ингибитора с ней изучали методом [9].

Препарат ингибитора получали в соответствии со способом, описанным в патентах [5, 6].

За единицу активности ингибитора (ИЕ) принимали количество ингибитора, которое при 37° и pH 7,0 подавляет активность панкреатической α -амилазы на 50%.

ММ ингибитора определяли методом гель-фильтрации на сефадексе G-25 (Pharmacia, Швеция) (колонка 2,2 × 65 см) с использованием в качестве маркеров N- α -бензоил-аргинина (ММ 439,95 кДа; Sigma-Aldrich GmbH, Германия), NADF-Na (ММ 765,4 кДа; Sigma-Aldrich GmbH), витамина B₁₂ (ММ 1579,6 кДа; ОАО «Верофарм», Россия), полиэтиленоксида (ММ 2000 кДа; ООО «РусХимтрейд», Россия), а в качестве элюента — дистиллированной воды; скорость элюции составила 6 мл/ч/см².

Для определения pH-стабильности 0,1%-ный раствор ингибитора в 0,1 М универсальном буферном растворе (pH 1,68—10,01) (HANNA Instruments, Германия) термостатировали в течение 3 ч при температуре (25±1)°, после чего измеряли ингибиторную активность.

Температурную стабильность ингибитора изучали, выдерживая его 0,1%-ный раствор в дистиллированной воде в интервале температур от 25° до 200° не менее 3 ч и затем также определяя ингибиторную активность.

ИК-спектры ингибиторов регистрировали на приборе Specord 75 R (Германия) в режиме пропускания: разрешение — 4,000, усиление — 8,0, скорость зеркала — 0,6329; диафрагма — 100,00; детектор — DTGS KBr, светоделитель — KBr.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние источников углерода на биосинтез ингибиторов амилаз

При биоконверсии полисахаридов актиномицеты синтезируют ингибиторы амилаз (α -амилазы, глюкоамилазы). В данной работе ингибиторную активность оценивали в отношении свиной панкреатической α -амилазы, по специфичности действия близкой к амилазе из поджелудочной же-

лезы человека и катализирующей гидролиз сложных углеводов, в частности, крахмала. Распространенными источниками углерода для биосинтеза ингибиторов амилаз являются крахмал и продукты его гидролиза — декстрины, олигосахариды [12]. Для исследований использовали растворимый крахмал, ферментативные гидролизаты крахмала различного происхождения, рисовой и ржаной муки и индивидуальные сахара, такие как глюкоза, мальтоза, декстрины. В зависимости от дозировки ферментного препарата получены гидролизаты с различным содержанием моно, ди- и полисахаридов (табл. 1). Растворимый крахмал близок по составу к гидролизатам нативного картофельного крахмала, полученным при дозировке Амилосубтилина ГЗХ 1—1,5 ед. АС/г.

Мука имеет более сложный состав по сравнению с крахмалом. В ней присутствуют моносахариды (глюкоза, фруктоза, арабиноза, галактоза), дисахариды (сахароза, мальтоза, раффиноза) и полисахариды, такие как крахмал, целлюлоза и гемицеллюлозы. Гемицеллюлозы представлены гексозанами, состоящими из маннозы, галактозы, фруктозы, или пентозанами, содержащими ксилозу и арабинозу, которые набухают в воде и образуют вязкую слизеобразную массу. Перечисленные вещества, взаимодействуя с крахмалом, затрудняют доступ к крахмальному субстрату амилаз, как присутствующих в муке, так и вводимых извне. Гидролиз ферментами целлюлолитического и амилолитического действия позволил деструктурировать полисахариды муки, в том числе и слизеобразующие соединения, и получить гидролизаты, по вязкости сходные с гидролизатами крахмала ((0,88±0,01—1,69±0,03) мПа·с).

В результате экспериментов установлено, что наиболее продуктивно ингибитор амилаз синтезируется при культивировании стрептомицетов на гидролизатах кукурузного крахмала: для штамма *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 предпочтителен гидролизат с DE 22—33%, а для штамма *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734 — с DE 32—35%. В опытах с картофельным крахмалом (растворимым и гидролизатом нативного) и гидролизатами пшеничного крахмала и рисовой муки штаммы тем более продуктивно синтезировали ингибитор при ферментации, чем выше была степень деструкции субстрата (табл. 2).

Ингибиторная активность в нативном растворе, полученном в результате ферментации гидролизатов картофельного крахмала, была ниже в 1,2—2 раза по сравнению с таковой для гидролизатов кукурузного крахмала (см. табл. 2), что, по-видимому, связано со структурными особенностями присутствующих в них полисахаридов. Использо-

Состав деструктурированного крахмалсодержащего сырья

Доза ферментного препарата, ед. АС/г*; (ед. АС+ед. КМЦС)/г**	Доля углеводов в сумме сахаров в гидролизатах, %			DE, %
	Глюкоза	Мальтоза	Декстрины	
<i>Гидролизаты нативного картофельного, кукурузного, пшеничного, ржаного крахмала и рисовой муки* /ржаной муки**</i>				
0,5*; (0,5+0,5)**	1,8±0,1; 1,7±0,1	10,3±0,1; 18,1±0,1	87,9±0,1; 80,2±0,1	12,5±0,1; 21,1±0,1
1,0*	3,1±0,1	19,8±0,1	77,1±0,1	20,9±0,5
1,5*; (1,5+1,5)**	3,3±0,1; 3,7±0,1	24,2±0,1; 20,5±0,1	72,5±0,1; 75,8±0,1	25,1±0,1; 27,5±0,1
2,0*; (2,0+2,0)**	4,4±0,1; 5,6±0,1	27,4±0,1; 21,8±0,1	68,2±0,1; 72,8±0,1	31,8±0,1; 32,2±0,1
2,5*	5,5±0,1	31,9±0,3	62,6±0,1	35,5±0,1
3,0*; (3,0+3,0)**	6,3±0,2; 7,7±0,1	39,5±0,3; 42,1±0,1	54,2±0,3; 50,3±0,1	42,1±0,1; 44,5±0,1
<i>Растворимый картофельный крахмал</i>				
—	2,7±0,1	23,5±0,1	73,8±0,1	24,3±0,1

*Доза ферментного препарата выбрана в пересчете на 1 г абсолютно сухого крахмала по амилолитической способности в отношении гидролизатов крахмала и рисовой муки;

**Доза ферментного препарата выбрана в пересчете на 1 г абсолютно сухого крахмала по карбоксиметилцеллюлазной и амилолитической способности в отношении гидролизата ржаной муки.

мый в опытах картофельный крахмал содержит 20%, а кукурузный — 15% амилозы; соответственно в гидролизатах картофельного крахмала присутствует больше неразветвленных декстринов, которые более предпочтительны в качестве субстратов-индукторов для амилаз (рис. 1). При ферментации гидролизатов рисовой муки и гидролизатов пшеничного крахмала ингибитор панкреатической α-амилазы синтезировался с низким уровнем активности (в 3—7 раз ниже по сравнению с гидролизатами кукурузного крахмала) (см. табл. 2), что приводило к более высокой АС при росте на указанных субстратах (см. рис. 1). Возможно, это связано с большим содержанием аминокислот, которые способствуют синтезу ферментов, в частности, амилолитических. Несмотря на то, что количество глюкозы, мальтозы и декстринов в исследуемых гидролизатах ржаной муки близко к таковому для гидролизатов крахмала и рисовой муки (см. табл. 1), ингибиторная активность актиноми-

цетов при росте на гидролизате ржаной муки в отношении панкреатической α-амилазы в нативном растворе не была обнаружена (данные не приведены). Одной из возможных причин является присутствие в ржаной муке гемицеллюлозы, которая в крахмале отсутствует. Продукты ее гидролиза, являясь индукторами биосинтеза собственных целлюлазы и ксиланазы стрептомицетов, могут замедлять или подавлять синтез ингибитора амилаз. Не исключено и влияние высокого содержания фосфора, стимулирующего биосинтез протеаз и амилаз (в ржаной муке — 0,49%, в рисовой муке — 0,305%, в крахмале — 0,045—0,176%). Аналогичная тенденция обнаружена и при оценке активности синтезируемых ингибиторов бактериальной α-амилазы (см. табл. 2).

При замене гидролизатов крахмала на индивидуальные углеводы (декстрины, глюкозу, мальтозу или сахарозу) синтезировался ингибитор, активный в отношении глюкоамилазы *A. awamori*,

Продукция ингибитора α -амилазы при культивировании актиномицетов на гидролизатах крахмалсодержащих субстратов

Штамм	DE, %	Ингибиторная активность, ИЕ/мл, в отношении различных субстратов							
		Гидролизат кукурузного крахмала		Гидролизат картофельного крахмала, растворимый крахмал		Гидролизат пшеничного крахмала		Гидролизат рисовой муки	
		Панкреатическая амилаза	Бактериальная амилаза	Панкреатическая амилаза	Бактериальная амилаза	Панкреатическая амилаза	Бактериальная амилаза	Панкреатическая амилаза	Бактериальная амилаза
<i>S. lucensis</i> ВКПМ Ас-1743	14,5 ± 1,5	1620±140	184±10	825±70	125±6	210±4	192±2	280±10	165±5
	22,5 ± 2,5	3564±50	356±25	1200±100	185±10	310±8	205±7	650±10	245±7
	33,5 ± 1,5	2336±120	402±12	1700±50	240±12	490±10	258±9	780±10	350±10
	38,5± 1,5	1960±80	257±13	1536±70	185±8	510±14	200±8	320±10	254±5
<i>S. violaceus</i> ВКПМ Ас-1734	14,5 ± 0,5	820±50	120±5	860±40	85±5	180±5	92±5	410±10	100±5
	22,5 ± 2,5	2020±110	250±7	1750±120	110±8	310±5	128±6	820±10	145±8
	33,5 ± 1,5	3000±20	354±15	2250±120	130±6	510±5	142±5	1000±10	162±8
	38,5± 1,5	2310±56	250±12	2500±50	110±5	560±12	135±5	500±10	145±5

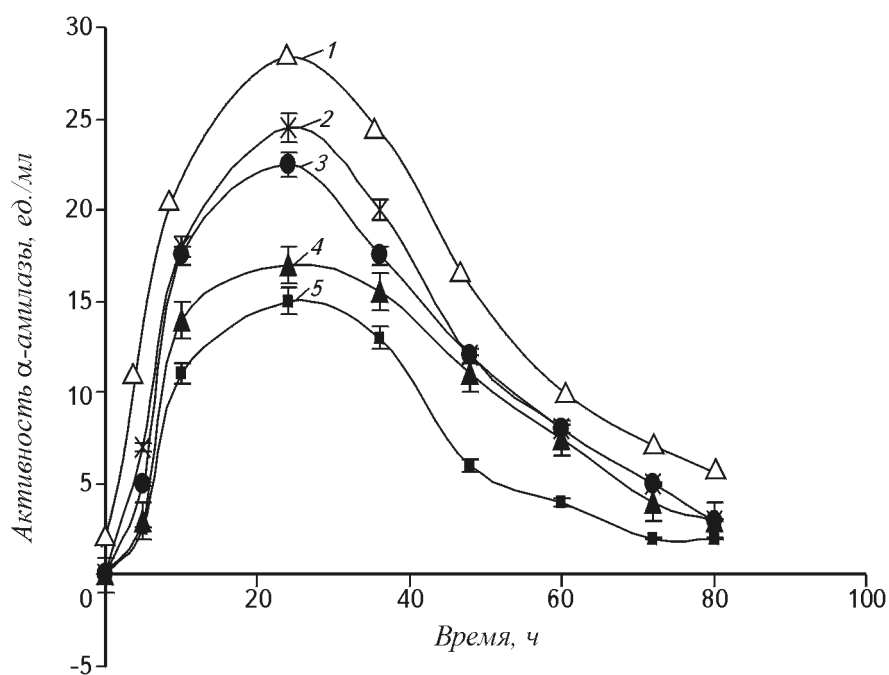


Рис. 1. Амилолитическая активность при ферментации актиномицетом *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 гидролизатов крахмалосодержащего сырья: 1 — рисовая мука; 2 — ржаная мука; 3, 4, 5 — крахмал соответственно пшеничный, картофельный, кукурузный

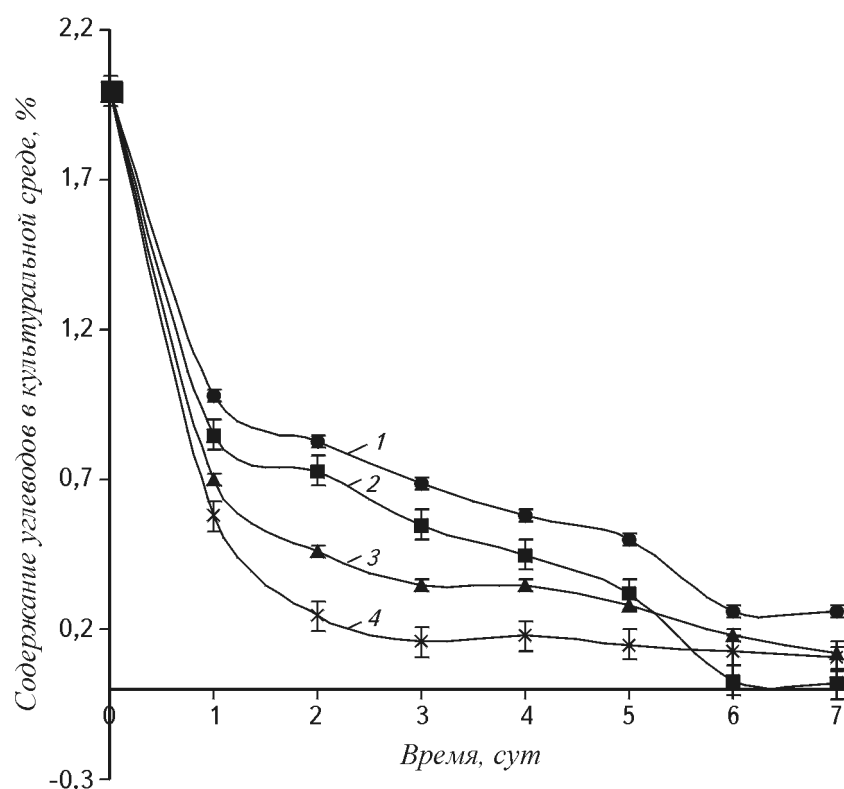


Рис. 2. Динамика потребления индивидуальных углеводов актиномицетами *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *S. violaceus* ВКПМ Ас-1743 (динамика усвоения обоими штаммами совпадает): 1 — глюкоза; 2 — сахароза; 3 — мальтоза; 4 — декстрины

но не действующий на α -амилазы (данные приведены ниже). Синтез был более продуктивным при использовании в качестве углеводного источника мальтозы, хотя активнее продуцентами потреблялись декстрины (рис. 2). Возможно, последние расходуются не только на накопление биомассы, но и на формирование углеродного скелета ингибитора амилаз, о чем упоминается в работе [13]. По нашим данным, ингибирующая активность для *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 при росте на мальтозе составила (2000 ± 100) ИЕ/мл, а для *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734 — (1500 ± 80) ИЕ/мл. Менее интенсивный биосинтез ингибитора наблюдался при ферментации декстринов ($800\text{—}1000$ ИЕ/мл), глюкозы ($500\text{—}660$ ИЕ/мл) или сахарозы ($250\text{—}300$ ИЕ/мл). На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что для биосинтеза ингибитора панкреатической α -амилазы штаммами актиномицетов предпочтительно присутствие в среде не только индивидуальных сахаров, но и поли- и олигосахаридов (см. табл. 1). Предполагаем, что для исследуемых штаммов стрептомицетов характерна тенденция к синтезу ингибитора активности тех ферментов, для которых в питательной среде присутствуют специфические субстраты, либо продукты их гидролиза. Например, акарбоза, полученная в

результате культивирования культуры *Actinoplanes SP* на сахарозосодержащей среде, представляет собой аминопсевдотетрасахарид и подавляет активность микробных ферментов сахаразы *Saccharomyces cerevisiae* (КФ 3.2.1.26; β -фруктофуранозидаса) и мальтазы *A. awamori* (КФ 3.2.1.20; кислая α -глюкозидаза), но не ингибирует действие декстраназы (КФ 2.4.1.19; 1,6- α -D-глюкан-6-глюканаогидролаза) *Aspergillus insuetus* [12].

Результаты исследований показали, что активный биосинтез ингибитора соответствует стационарной фазе развития актиномицета и периоду снижения концентрации углеводов в среде (рис. 3). Очевидно, что лимитирующим фактором синтеза ингибитора амилаз является концентрация углеводов в питательной среде. Эффективный синтез ингибитора происходит при содержании углеводов 20—40%, что в 5—10 раз ниже уровня, необходимого для продуктивного синтеза амилаз. В данном случае можно говорить о специфической направленности процесса, вызванной изменением условий, которые поддерживают нормальное физиологическое состояние продуцента. Для накопления ингибитора продуценту *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734 требуется больше углеводов, чем штамму *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 (рис. 4).

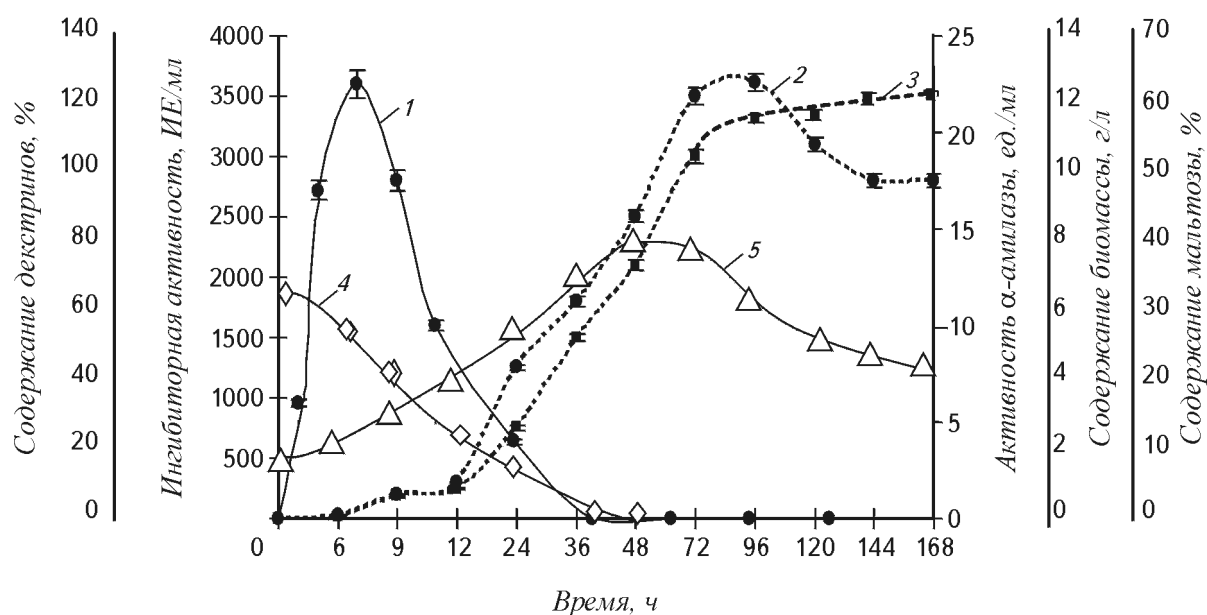


Рис. 3. Амилолитическая (1) и ингибиторная (2) активность, а также накопление биомассы (3) и содержание декстринов (4) и мальтозы (5) в культуральной жидкости и при ферментации гидролизатов кукурузного крахмала (концентрация 20 г/л) актиномицетом ВКПМ Ас-1743

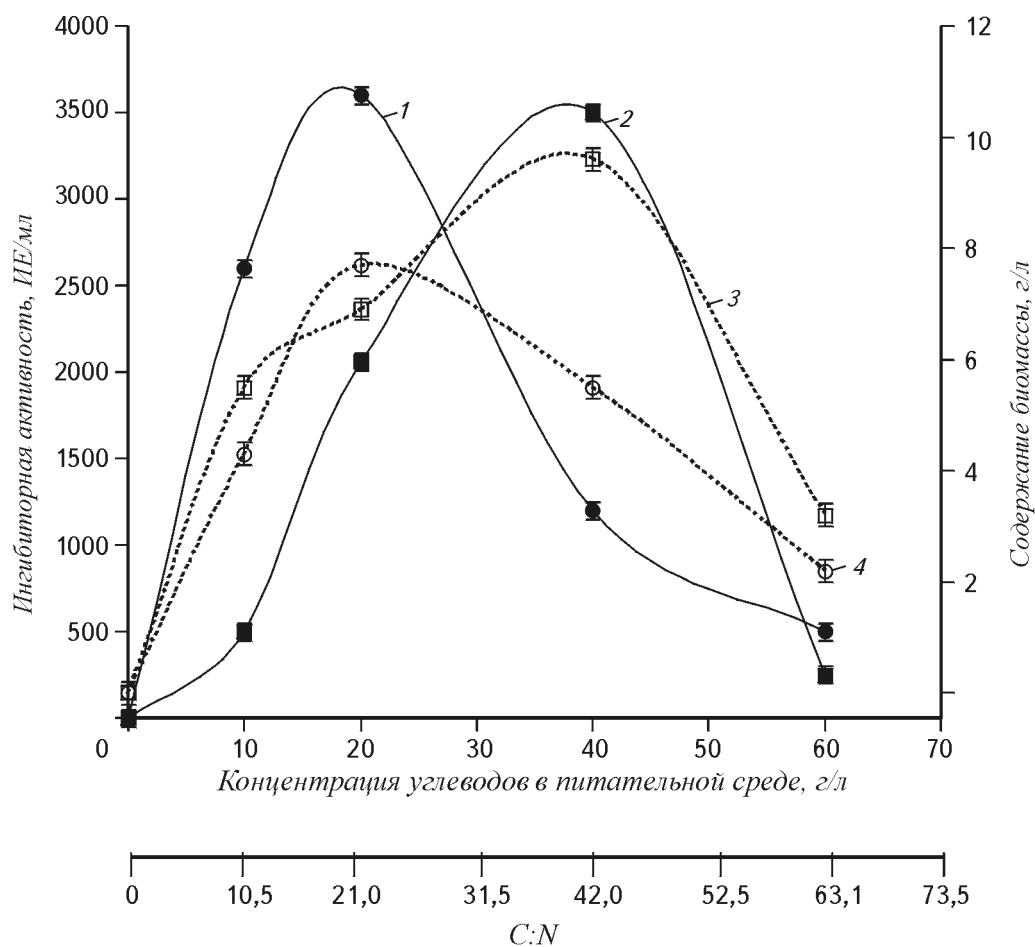


Рис. 4. Зависимость ингибиторной активности и накопления биомассы от концентрации углеводов в составе гидролизатов крахмала и соотношения C:N в питательной среде при культивировании актиномицетов: 1, 4 — *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743; 2, 3 — *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734; 1, 2 — ингибиторная активность; 3, 4 — содержание биомассы

Влияние органического источника азота на уровень активности ингибиторов амилаз

Наименование источника азота	Концентрация источника азота в питательной среде, г/л	Ингибиторная активность, ИЕ/мл	
		<i>S. lucensis</i> ВКПМ Ас-1743	<i>S. violaceus</i> ВКПМ Ас-1734
Соевая мука (контроль)	1,0	1500±30	1100±50
	2,5	3200±40	3100±50
	5,0	3700±50	3500±20
	10,0	3700±50	3500±20
Дрожжевой экстракт	1,0	300±10	220±40
	2,5	540±20	600±20
	5,0	740±10	700±30
	10,0	616±20	580±30
Пептон сухой ферментативный	1,0	480±20	170±20
	2,5	500±10	525±10
	5,0	680±30	710±30
	10,0	530±10	590±30

Влияние источников азота, макро- и микроэлементов на биосинтез ингибиторов амилаз

В качестве источника азота для получения ингибиторов амилаз обычно используют белоксодержащие соединения, такие как кукурузная мука, дрожжевой экстракт, соевая мука, рыбная мука, обезжиренное молоко [12]. По-видимому, белковый азот в сочетании с углеводами среды индуцирует синтез ингибиторов амилаз. Проведенные эксперименты подтвердили высказанное предположение. Показано, что при замене соевой муки на эквивалентное по азоту количество азотнокислого аммония штаммы *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 и *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734 продуцируют амилазы, но не их ингибитор. Уровень активности амилазы составил 20—25 ед/мл и сохранялся на протяжении всего процесса ферментации (7 сут). При замене соевой муки на дрожжевой экстракт или пептон стрептомицеты синтезировали ингибитор с пониженной в 5—6 раз активностью (табл. 3).

Соотношение углерода и азота С:N, обеспечивающее наиболее продуктивный биосинтез ингибитора амилаз, для *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 составило 20—22, для *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734 — 42—44 (см. рис. 4).

Введение в среду натрия, калия и магния повышало биосинтез ингибитора амилаз в 1,2—1,4 раза по сравнению с контролем (без внесения в среду макро- и микроэлементов). Ионы меди и цинка не влияли на биосинтез ингибитора панкреатической α -амилазы (данные не приведены).

На стадии приготовления посевного материала наибольший эффект на последующую продукцию ингибиторов амилаз оказали ионы натрия (или калия) и кальция в виде солей соответственно соляной и угольной кислот. При ферментации гидролизатов крахмала было эффективным введение в состав среды ионов натрия (или калия) и магния. По-видимому, эти соли способствуют увеличению проницаемости клеточной стенки стрептомицетов, о чем свидетельствует некоторое увеличение массовых концентраций редуцирующих веществ и белка в КЖ по сравнению с контрольными вариантами, которое сохранялось на уровне соответственно 125±3 мг/мл и 0,42±0,02 мг/мл. В отсутствие указанных ионов эти цифры составляли 120±3 мг/мл и 0,22±0,01 мг/мл, соответственно. Ионы калия и магния, вероятно, выполняют функцию стабилизаторов активности ферментной системы.

По совокупности проведенных исследований разработан состав питательных сред для продуктивного биосинтеза ингибитора панкреатической α -амилазы:

— среда для посевного мицелия, г/л: соевая мука — 10,0; глюкоза — 10,0; натрий хлористый — 5,0; кальций углекислый — 1,0; вода до 1 л, рН среды 7,0;

— среда для ферментации, г/л: гидролизат кукурузного крахмала — 20 (DE 20—25 % для *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743) и 40 (DE 30—35 % для *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734); соевая мука — 5,0; натрий хлористый — 3,0; калий фосфорнокислый — 1,0; магний сернокислый семиводный — 0,5; вода до 1 л, рН среды 7,0.

При ферментации сред с разработанным составом в условиях шейкера-инкубатора (частота вращения 160 ± 20 об/мин) при температуре $(30 \pm 2)^\circ$ и длительности процесса 5 сут достигнуты следующие значения ингибиторной активности, ИЕ/мл: *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 — 3700 ± 50 ; *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734 — 3500 ± 20 .

Влияние технологических факторов на продукцию ингибиторов амилаз

Нормальный рост и развитие стрептомицетов происходит при температуре $(26—29)^\circ$. Продукты ингибиторов амилаз синтезируют целевые метаболиты в широком интервале температур (от 24° до 40°) [14, 15]. Изучение влияния температурно-временных факторов на продуктивность биосинтеза ингибиторов амилаз исследуемыми штаммами актиномицетов показало, что интенсивная продукция целевых метаболитов происходит при температуре от $(28 \pm 1)^\circ$ до $(32 \pm 1)^\circ$. При термостагировании в интервале от $(35 \pm 1)^\circ$ до $(38 \pm 1)^\circ$ уровень биосинтеза ингибитора амилаз снижался на $(35 \pm 5) \%$, а при температуре $(24 \pm 1)^\circ$ рост актиномицета отсутствовал.

Известные продуценты ингибиторов амилаз являются аэробами. При изучении влияния уровня аэрации на способность актиномицетов синтезировать ингибитор амилаз найдено, что наибольшая ингибиторная активность детектируется в КЖ при частоте вращения $(160 \pm 5) — (195 \pm 5)$ об/мин. Установлено, что при значении этого параметра 120 об/мин уровень ингибиторной активности снижался в два раза.

Объем культуральной среды для продуктивного биосинтеза ингибитора амилаз должен составлять не более 200 мл (при емкости качалочной колбы 750 мл). Увеличение его до 300 мл или снижение до 50 мл приводило к уменьшению ингибиторной активности на 50—80%.

Важной характеристикой посевного материала является активность его физиологического сос-

тояния. Так, дегидрогеназная активность культуры, которая определяется, например, по времени обесцвечивания вегетативным мицелием метиленового синего характеризует интенсивность дыхания культуры. Так, В.А. Колодяжной [13] установлено, что наибольшей активностью обладает 48-часовой мицелий штамма *Streptomyces* sp. К-20 — продуцента ингибитора панкреатической α -амилазы: время обесцвечивания раствора метиленового синего было минимальным (3 мин) при сравнении с показателем для мицелия в возрасте 24 ч (23 мин) и 72 ч (17 мин). Нами было установлено, что наиболее активный мицелий актиномицетов, который можно направлять на стадию ферментации, формируется в течение 43—48 ч культивирования как *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743, так и *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734 (время обесцвечивания метиленового синего составило 2—3 мин). Мицелий *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734 в возрасте 24 и 72 ч метиленовый синий не обесцвечивал. Для *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 время обесцвечивания составило соответственно 12 и 4 мин.

Количество посевного материала влияет на направленность и продуктивность биосинтеза. Например, согласно способу получения ингибитора амилазы, синтезируемого *Actinoplanaceen* S/E 50/13, этот параметр составляет лишь 1,2 % от объема питательной среды [4]. Как показали наши исследования, количество посевного материала, обеспечивающее формирование активного ингибиторобразующего мицелия в процессе ферментации, составляет 10 % от объема ферментационной среды.

В результате культивирования продуцентов в ферментере Biostat® Cplus вместимостью 30 л показано, что уровень активности синтезируемого(ых) ингибитора(ов) зависит от режима процесса. Наиболее эффективным является отъемно-доливной способ ферментации, так как при практически одинаковой с периодическим способом интенсивности биосинтеза ингибитора панкреатической амилазы продуктивность 1 г биомассы и абсолютное значение ингибиторной активности при отъемно-доливном режиме были выше, чем при периодическом соответственно в 1,5 и 1,3 раза (табл. 4). Процесс ферментации периодическим способом с подпиткой характеризовался сравнительно низкими показателями. Переход на отъемно-доливной режим осуществляли со вторых на третьи сутки ферментации, когда в КЖ наблюдалось активное накопление ингибиторной активности. Ежедневно из ферментера отбирали пробы в количестве 10 % от суммарного объема КЖ и добавляли эквивалентный объем гидролизата ку-

Показатели процесса ферментации культивирования актиномицетов

Показатель	Способ ферментации	Штамм	
		<i>S. violaceus</i> ВКПМ Ас-1734	<i>S. lucensis</i> ВКПМ Ас-1743
Ингибиторная активность, ИЕ/мл	П	2500±300	2800±200
	О	3375±500	3600±500
	П+П	2000±100	2200±150
Ингибиторная активность за цикл, ИЕ/цикл	П	(40,0±4,8)·10 ⁶	(48,0±3,2)·10 ⁶
	О	(54,0±8,0)·10 ⁶	(56,0±4,8)·10 ⁶
	П+П	(32,0±1,6)·10 ⁶	(35,2±2,4)·10 ⁶
Интенсивность биосинтеза ингибиторов, ИЕ/л/сут	П	(4,4—5,6)·10 ⁵	(5,2—6,0)·10 ⁵
	О	(4,8—5,5)·10 ⁵	(4,4—5,9)·10 ⁵
	П+П	(2,7—3,0)·10 ⁵	(2,9—3,4)·10 ⁵
Содержание биомассы, г/л	П	10—11,7	8,2—9,3
	О	6,0—6,9	5,8—6,2
	П+П	6,0—6,8	5,7—6,1
Продуктивность биомассы, ИЕ/г	П	191,7—225,0	320,0—365,7
	О	372,1—496,1	532,3—634,4
	П+П	262,5—316,7	347,5—398,3
Длительность процесса, сут	П	5	5
	О	7	7
	П+П	7	7

Обозначения: П — периодический; О — отъемно-доливной; П+П — периодический с подпиткой.

курузного крахмала, чтобы массовая концентрация сахара в среде составляла (9±1) г/л для *S. lucensis* ВКПМ Ас-1743 и 18—20 г/л — для *S. violaceus* ВКПМ Ас-1734. Согласно литературным данным, образование вторичных метаболитов у актиномицетов происходит при исчерпании какого-либо компонента питательной среды или при изменении условий аэрации [16]. Большинству представителей актиномицетов свойственен сравнительно медленный рост и высокий уровень эндогенного дыхания. Однако результаты исследований показали, что исследуемые штаммы стрептомицетов активно синтезируют ингибитор амилаз при лимитировании кислорода в среде. При интенсивных перемешивании и расходе воздуха ингибиторная активность снижалась в 1,5—10 раз.

Таким образом, установлены следующие технологические параметры проведения процесса в ферментере: количество посевного мицелия — 10 % от объема ферментационной среды; возраст посевного мицелия — 43—48 ч; температура

ферментации — 28—30°; концентрация углеводов в питательной среде — от 20 до 40 г/л; способ ферментации — отъемно-доливной; скорость перемешивания — от 80 до 150 об/мин и расход воздуха — от 290 до 580 л/ч.

Главное преимущество новых штаммов заключается в способности синтезировать ингибитор(ы) амилаз с активностью, равной или превышающей таковую для известных за рубежом продуцентов ингибиторов (табл. 5).

Химическая природа синтезируемых ингибиторов амилаз

Согласно литературным данным, в зависимости от состава среды актиномицеты синтезируют ингибиторы амилаз белковой, сахаридной или гликопептидной природы, причем представители р. *Streptomyces* являются наиболее распространенными продуцентами псевдосахаридов, содержащих помимо глюкозных остатков производные са-

Активность ингибиторов амилаз при культивировании различных актиномицетов

Штамм	Ингибиторная активность в КЖ, ИЕ/мл	Источник информации
<i>S. lucensis</i> ВКПМ Ас-1743	3600±140	Данные этой статьи
<i>S. violaceus</i> ВКПМ Ас-1734	3500±50	
<i>Streptomyces species</i> 1328-D	2300±120	[12]
<i>Actinoplanaceen</i> S/E 50/13	2800±280*	[17]
<i>Streptomyces dimorphogenes nov. sp.</i> NR-320-OM 7HB	1240±120*	[18]

* Ингибиторная активность представлена в ИЕ в результате пересчета из АИУ [9, 19].

харов [12, 14, 15]. Показано, что ингибиторы амилаз, синтезируемые исследуемыми штаммами, относятся к группе псевдосахаридов или гликопептидов. Они содержат вещества углеводной природы в массовой доле 85—88 %, из которых 7—8 % имеют аминогруппы. Методом гель-фильтрации получены две активные фракции ингибиторов амилаз, имеющие различную молекулярную массу: компонент 1 — от 900 до 1200 кДа, компонент 2 — от 1800 до 2300 кДа. В литературе имеются данные о том, что небольшие значения ММ характерны для известных ингибиторов глюкозидаз углеводной природы, синтезируемых актиномицетами при культивировании на средах, содержащих поли- и олигосахариды (от 1000 до 2000 кДа) [12].

Согласно данным проведенного ИК-спектрального анализа, ингибиторы содержат α -1,2- и α -1,4- глюкозидные связи, двойную связь, альдегидные, гидроксильные, =NH- и -NH₂-группы.

Ингибиторная активность в препаратах находится на уровне и выше активности известных ингибиторов амилаз и сахаразы (500—700 ИЕ/мг) и сохраняется на уровне практически 100 % при длительном хранении (12 мес), изменении pH (2—8) и температуры (20—200°). Полученные данные согласуются с известными общими свойствами микробных псевдосахаридов — ингибиторов глюкозидаз.

В результате проведенных исследований сделан вывод о том, что биосинтез ингибитора амилаз исследуемыми штаммами стрептомицетов можно регулировать за счет:

— лимитирования содержания углерода и кислорода;

— поддержания постоянного соотношения концентраций углеводных компонентов среды (декстрины, мальтоза, глюкоза), что позволяет длительное время сохранять максимальную биоконверсию сахаров;

— поддержания соотношения C:N в питательной среде на уровне, способствующем биосинтезу целевых продуктов;

— дополнительного введения в питательную среду органического азотсодержащего компонента, который способствует сбалансированности углеродного и азотного питания продуцента и позволяет повысить активность ингибиторов ферментов.

Представленный экспериментальный материал свидетельствует о возможности эффективного использования потенциала актиномицетов для получения ингибиторов амилаз, являющихся БАВ и субстанцией для создания БАД и пищевых ингредиентов профилактического назначения.

Получено 26.10.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Chen, X. Voglibose (Basen, AO-128), one of the most important alpha-glucosidase inhibitors / X. Chen, Y. Zheng, Y. Shen // Curr. Med. Chem. — 2006. — V. 13. — N 1. — P. 109—116.
2. Wang, H. The effects of gliclazide, metformin, and acarbose on body composition in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitu / H. Wang, Y. Ni, S. Yang, H. Li, X. Li, B. Feng // Curr. Ther. Res. Clin. Exp. — 2013. — N. 75. — P. 88—92.
3. Scott, L.J. Miglitol: a review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus / L.J. Scott, C.M. Spencer // Grugs. — 2000. — B. 59. — N 3. — P. 521—549.

4. Фроммер В., Пульс В., Шмидт Д. Способ получения ингибитора амилазы // Патент ФРГ № 504502, A23K 1/17, C12P 1/04, A61K 31/445. 1976.
5. Шарова Н.Ю., Позднякова Т.А., Ходкевич О.А. Штамм актиномицета *Streptomyces lucensis* — продуцент ингибитора гликозидаз // Патент РФ № 2355755, C12 N 1/20, 9/24, 9/26, 1/465. 2009.
6. Шарова Н.Ю., Никифорова Т.А., Позднякова Т.А. Штамм актиномицета *Streptomyces violaceus* — продуцент ингибитора гликозидаз // Патент РФ № 2346042, C12/N 9/24, 9/26, 1/20, 1/465. 2009.
7. Шарова Н.Ю. Новые ферментные препараты для подготовки деструктурированного зерна ржи к ферментации в лимонную кислоту / Н.Ю. Шарова, Н.В. Каменькова, О.А. Ходкевич // Хранение и переработка сельхозсырья. — 2012. — № 6. — С. 37—39.
8. Трегубов Н.Н., Костенко В.Г. Технохимический контроль крахмалопаточного производства. — М.: Агропромиздат, 1991. — 272 с.
9. Шарова Н.Ю. Ингибиторы амилаз из *Streptomyces lucensis* ВКПМ Ac-1743 и *Streptomyces violaceus* ВКПМ Ac-1734 // Прикл. биохим. микробиол. — 2015. — Т. 51. — № 1. — С. 46—52.
10. Чухчин Д.Г., Тупин П.А. Способ количественного определения дегидрогеназной активности микроорганизмов // Патент РФ № № 2476598, C12Q1/32 (2006.01), C12N9/02 (2006.01). 2013.
11. Xiao, Z. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities / Z. Xiao, R. Storms, A. Tsang // Anal. Biochem. — 2006. — V. 351. — N 1. — P. 146—148.
12. Акулова Н. Ю. Микробные ингибиторы α -гликозидаз псевдосахаридной природы. / Н. Ю. Акулова, А. А. Селезнева // Прикл. биохим. микробиол. — 1995. — Т. 31. — № 4. — С. 371—380.
13. Kolodjzajnaja, V.A., Jakovleva E.P. Stabilization of α -Glucosidase Inhibitor (An Antidiabetic Drug Gipoglugine) Producer Inoculum: Biotechnol. Industry. — NY: Nova Science Publishers, 2004. — P. 31—37.
14. Yamagishi, T. Total synthesis of the trehalase inhibitor Salbostatin / T. Yamagishi, C. Uchida, S. Ogawa // Chemistry — A European J. — 2006. — V. 1. — Issue 9. — P. 634—636.
15. Vertesy, L. Tendamistat (НОЕ 467), a tight-binding α -amylase inhibitor from *Streptomyces tendae* 4158 / L. Vertesy, V. Oeding, R. Bender // European J. Biochem. — 2004. — V. 141. — N 3. — P. 505—512.
16. Калакуцкий Л.В., Агре Н.С. Развитие актиномицетов. — М.: Наука, 1977. — 287 с.
17. Wehmeier, U.F. The biosynthesis and metabolism of acarbose in *Actinoplanes* sp. SE 50/110: A Progress Report // Biocat. Biotransform. — 2003. — V. 21. — N 4—5. — P. 279—284.
18. Jokose, K. New α -amylase inhibitor trestatin I. Isolation, characterisation and biological activities of trestatins A, B and C / K. Jokose, K. Ogawa, T. Ano // J. Antibiot. — 1983. — N 36. — P. 1157—1165.
19. Bonsch, R., Hohmann, K., Kuhn, J., Cerny, V., Hotek, F., Pendl, J. Verfahren zur Herstellung von Citronensaure und/oder Citraten // Заявка Германии № 19747902, C 12 P 7/48. 1999.

N.Yu. SHAROVA

The All-Russian Institute for Food Additives, 191014, St.-Petersburg Russia

e-mail: natalya_sharova1@mail.ru

Biosynthesis of Inhibitor of Amylases by *Streptomyces* Cultures

The influence of carbon and nitrogen sources, macro- and microelements on the biosynthesis of the inhibitor of amylases synthesized by *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734 and *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 strains has been investigated. It is shown that the regulation of the inhibitor of amylases biosynthesis can be carried out by the limitation of carbon and oxygen, maintenance of the constant ratio of carbohydrate components concentrations in the medium (dextrins, a maltose, glucose) and C:N ratio, and also by the additional introduction of an organic nitrogen-containing component. The synthesised inhibitors have the pseudooligosaccharide origin.

Key words: biosynthesis, inhibitor of amylases, *Streptomyces lucensis* VKPM Ac-1743 strain, *Streptomyces violaceus* VKPM Ac-1734 strain.