

УДК 2788.579.6

## Разработка нового высокопродуктивного штамма *Amycolatopsis orientalis* – продуцента антибиотика эремомицина

© 2017 г. В.В. ДЖАВАХИЯ<sup>1,\*</sup>, Е.В. ГЛАГОЛЕВА<sup>1</sup>, Е.Д. ПОПОВА<sup>1</sup>, А.И. ОВЧИННИКОВ<sup>1</sup>, К.Г. СКРЯБИН<sup>1</sup>, Д.Л. ШОБОЛОВ<sup>2</sup>, В.Ю. БАЛАБАНЬЯН<sup>2</sup>, М.Г. ЧЕРНОБРОВКИН<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 117312

<sup>2</sup>ООО «Технология лекарств», Московская обл., Химки, 141400

\*e-mail: engbio@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.05.2016

Принята в печать 18.07.2016

В результате многоступенчатого УФ-индуцированного мутагенеза штамма – продуцента эремомицина *Amycolatopsis orientalis* ВКПМ Ас-1125, характеризующегося невысокой производительностью по данному антибиотику (0,5 г/л), с последующей селекцией наиболее продуктивных мутантных штаммов был получен новый штамм *A. orientalis* Е 13-26, характеризующийся повышенным уровнем биосинтеза эремомицина. Проведенная методом многофакторного анализа оптимизация ферментационной среды (конечный состав, %: глицерин – 8,0; соевая мука – 2,0; MgCl<sub>2</sub> – 0,02; КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 0,02; КNO<sub>3</sub> – 0,6; СаСl<sub>2</sub> – 0,3; СОМ – 0,46; глюкоза – 0,8) позволила повысить продуктивность штамма до 3,42 ± 0,17 г/л. Полученный штамм-продуцент является генетически стабильным и перспективным для использования в дальнейшей селекционной работе, а также для промышленного производства эремомицина.

**Ключевые слова:** вторичные метаболиты, гликопептидные антибиотики, эремомицин, УФ-мутагенез, *Amycolatopsis orientalis*.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2017-33-1-42-52

Гликопептидные антибиотики применяются для лечения инфекционных заболеваний, вызванных грамположительными патогенными бактериями. В настоящее время в клинической практике используются только три из известных гликопептидных антибиотиков: природные соединения – ванкомицин и тейкопланин и полусинтетический антибиотик – телаванцин.

Антибиотики данного типа действуют путем образования комплекса с С-концевой последовательностью (N-Acyl-D-Ala-D-Ala) предшественника пептидогликана клеточной стенки бактерий. Это приводит к эффективной изоляции субстрата от двух ключевых ферментов, необходимых для синтеза пептидогликана клеточной стенки, что вызывает ее разрушение и гибель клетки [1].

Ванкомицин был впервые выделен в 1953 г. из штамма бактерии *Amycolatopsis orientalis*, найденного в образце почвы с о. Борнео. Ванкомицин широко используется во всех странах для лечения

стафилококковых инфекций, вызванных метициллин-устойчивыми штаммами стафилококка (MRSA), которые резистентны к другим препаратам. Однако его применение ограничено проявлением нефро- и ототоксичности, а также специфической псевдоаллергической реакцией, выражающейся в развитии эритемы лица, шеи и верхней половины туловища – так называемый «синдром красного человека» [2]. Кроме того, ванкомицин очень быстро выводится из организма (период его полувыведения составляет 6–8 ч) и слабо накапливается в тканях, в связи с чем, он не применяется, например, при лечении пневмонии [3].

Появление энтерококковой резистентности к ванкомицину в конце 1980-х годов привело к необходимости поиска новых антибиотиков того же класса. К таким антибиотикам и относится эремомицин, разработанный в ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе РАМН (ГУ НИИНА).

**Список сокращений:** ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; КЖ – культуральная жидкость; МКВ – метод крутого восхождения; МФЭ – многофакторный эксперимент; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СОМ – сухое обезжиренное молоко; УФ – ультрафиолетовый.

Согласно проведенным исследованиям, эремомоцин по многим важным показателям превосходит существующие препараты этой группы ванкомицин и тейкопланин. Эремомоцин в 2–4 раза более активен в отношении MRSA, различных штаммов стрептококка, а также анаэробных грамположительных бактерий – клостридий и кокков. Он также обладает более высокой химиотерапевтической активностью [4].

Эремомоцин может служить субстратом для получения полусинтетических антибиотиков, которые могут обладать более высокой биологической активностью в отношении ванкомицин-резистентных штаммов микроорганизмов и лучшей способностью к распределению в организме. Показано, что химические модификации антибиотика эремомоцина оказывают влияние на спектр его активности в отношении резистентных бактерий, в том числе устойчивых к ванкомицину энтерококков с измененной мишенью взаимодействия [5].

Помимо использования в клинической практике антибиотик эремомоцин может быть применен для разделения энантиомеров третбутоксид(БОК)-, бензоил- и бензоксикарбонил(КБЗ)-производных аминокислот. Высокая селективность и эффективность, особенно при разделении КБЗ-производных, показывают, что данный сорбент перспективен для препаративного разделения этих энантиомеров [6]. Кроме того, эремомоцин является хиральным селектором с высокой энантиоселективностью по отношению к N-производным аминокислот и может быть рекомендован для разделения их оптических изомеров [7]. Этот процесс представляет особую важность, поскольку является единственным способом определения с высокой точностью содержания данных изомеров при их низкой концентрации [8].

Промышленное производство биопрепарата невозможно без наличия достаточно высокого уровня активности у штамма-продуцента. Анализ существующих научных публикаций, посвященных продуцентам эремомоцина, показал, что максимальная производительность по антибиотику была отмечена у мутантного штамма *Amycolatopsis orientalis* subsp. *eremomycini* (450–520 мг/л) [9]. Кроме того, в одном из российских патентов упоминается штамм *A. orientalis* ВКПМ Ас-807 с заявленной продуктивностью 2,3 г/л [10].

В научной литературе последних лет отсутствуют сведения о получении высокопродуктивных штаммов эремомоцина. Можно предположить, что существует возможность получения штамма, по своим характеристикам превосходя-

щего известные на данный момент штаммы-продуценты, что было бы выгодно с экономической точки зрения.

Одним из основных способов создания новых штаммов, обладающих ценными промышленными свойствами, в течение многих лет остается мутагенез, индуцируемый физическими, химическими или биологическими факторами, или их комбинацией и обладающий рядом преимуществ по сравнению с другими способами, такими как скрининг природных штаммов или генная модификация. Так, метод скрининга является гораздо более длительным и трудоемким, а генетически модифицированные штаммы-продуценты не всегда способны сохранять генетическую стабильность и высокий уровень продуктивности в течение продолжительного времени. Кроме того, использование генномодифицированных штаммов часто осложняется общей настороженностью общества по отношению к таким организмам и существующими в ряде стран законодательными запретами на их использование.

Целью данного исследования было получение нового высокоактивного штамма *A. orientalis* с помощью многоступенчатого УФ-мутагенеза с последующей селекцией наиболее продуктивных изолятов, а также достижение максимально высокого уровня биосинтеза эремомоцина полученным высокоактивным штаммом посредством оптимизации питательной среды.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Продуцент эремомоцина и среда для его культивирования.** В качестве исходного штамма использовали штамм *Amycolatopsis orientalis* ВКПМ Ас-1125, продуктивность которого составляла 0,5 г/л эремомоцина. Для выращивания, поддержания и хранения штамма использовали агаризованную среду следующего состава, %: глюкоза – 2,0; соевый пептон – 1,5; дрожжевой экстракт – 0,1; агар-агар – 2,0 (все компоненты среды производства HiMedia, Индия) рН 7,0. Исходный штамм и полученные из него изоляты культивировали при 28°C в течение 5–7 дней. На используемой агаризованной среде исходная культура *A. orientalis* образовывала компактные колонии неправильной формы со светло-бежевым воздушным мицелием. Споруляция отсутствовала.

**УФ-мутагенез.** Мицелий 4–6-дневной культуры смывали с поверхности агаризованной среды стерильной водой и фильтровали через ватный фильтр для отделения крупных конгломератов мицелия. Затем суспензию фильтровали через

стеклянный фильтр (размер пор 100 мкм) (ООО «Русский химик», Россия) для получения равномерной суспензии мелких фрагментов мицелия и обрабатывали на ультразвуковой бане (Bandelin, Германия) при температуре 28°C и частоте колебаний 20 кГц в течение 30 мин, после чего облучали коротковолновой ультрафиолетовой (100–280 нм) лампой Short Wave Ultraviolet Mineralight (США) мощностью 12,5 Вт. Расстояние от источника облучения до обрабатываемой суспензии составляло 40 см, время облучения – 20 мин, а интенсивность облучения – 0,25 мВт/см<sup>2</sup>. После облучения суспензию высевали на поверхность агаризованной среды (0,1 мл на чашку Петри) и инкубировали в термостате при 28°C в течение 7–10 дней.

#### **Скрининг и отбор мутантных штаммов.**

На первом этапе были построены кривые выживаемости колоний исходной культуры *A. orientalis* в зависимости от времени облучения, а также установлена зависимость частоты возникновения морфологических мутаций от продолжительности облучения. С учетом этих данных была определена оптимальная продолжительность облучения, дающая максимальное число морфологически измененных изолятов и в то же время обеспечивающая определенную степень выживаемости дрожжей (соотношение выросших колоний до и после УФ-облучения). Колонии с измененной морфологией отбирали, пересеивали на свежую агаризованную среду, затем проводили ферментацию в жидкой среде и определяли содержание эремомицина в культуральной жидкости (КЖ) для отбора наиболее продуктивных изолятов.

**Ферментация.** Отобранные изоляты *A. orientalis* выращивали на ферментационной среде в колбах объемом 50 мл с 10 мл питательной среды в течение 7 сут. Для этого с помощью микробиологической петли фрагмент мицелия 4–6-дневной культуры переносили в колбу со средой следующего состава, %: глицерин – 6,0; соевая мука – 2,0; MgCl<sub>2</sub> – 0,02; KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 0,02; KNO<sub>3</sub> – 0,6; СаСl<sub>2</sub> – 0,3 (все реагенты, за исключением соевой муки (HiMedia, Индия), были приобретены у ООО «Русский химик») рН 6,8–7,0. Колбы инкубировали при 28°C в течение 144–168 ч на термостатируемой качалочной установке Inforce НТ (Дания) при скорости вращения 280 об/мин (эксцентриситет 2,5 см). После отбора анализируемые пробы КЖ в микропробирках смешивали с водой и метанолом («ЭКОС-1», Россия) в соотношении 1:2:1 и далее центрифугировали при 18000 g в течение 5 мин. Супернатант отбирали и анализировали с помощью ВЭЖХ.

#### **Оптимизация состава ферментативной среды путем однофакторного эксперимента.**

Подбор оптимальной среды для полученного высокоактивного штамма осуществляли при помощи серии экспериментов с различным содержанием таких компонентов среды, как глицерин, сухое обезжиренное молоко (ОАО «Северное Молоко», Россия), дрожжевой экстракт (HiMedia), дрожжевой автолизат (HiMedia), пептон ферментативный (HiMedia) и соевый пептон (HiMedia). Ферментацию проводили на термостатируемой качалочной установке Inforce НТ в условиях, аналогичных вышеописанным.

#### **Оптимизация состава ферментативной среды путем многофакторного эксперимента.**

Ферментацию проводили, как указано в предыдущем разделе. Эксперимент проводили в трехкратной повторности. Предварительные однофакторные эксперименты показали, что на уровень биосинтеза эремомицина влияют в наибольшей степени следующие параметры: концентрация глицерина, концентрация СОМ и концентрация глюкозы. Эти показатели и были выбраны в качестве переменных для дальнейшей оптимизации.

Оптимизацию осуществляли методом многофакторного эксперимента (МФЭ) [11]. За функцию отклика была принята концентрация эремомицина в КЖ; факторами служили концентрация глицерина ( $X_1$ ), концентрация СОМ ( $X_2$ ) и концентрация глюкозы ( $X_3$ ) в исходной ферментационной среде; величину  $X_0$  использовали как дополнительный нулевой фактор (см. [11]) ( $X_0 = 1$ ). Каждая переменная была представлена на двух уровнях: высшем (+) и низшем (–).

**Метод крутого восхождения.** Для поиска оптимальных значений факторов был использован МКВ Уилсона–Бокса. Адекватное уравнение позволяет перейти к движению по наиболее короткому пути в направлении градиента функции отклика [12].

#### **Количественное определение содержания эремомицина в культуральной жидкости.**

Оценку содержания эремомицина в КЖ проводили методом ВЭЖХ с помощью хроматографической системы Agilent Technologies [13]. Для анализа использовали колонку Nucleosil 100-5C8 (4 мм×125 мм); детекцию осуществляли при 280 нм; подвижная фаза состояла из фракции А (раствор формиата аммония (6 г/л) с рН, доведенным аммиаком до 7,8–7,9) и фракции В (ацетонитрил) (реактивы для элюции производства Agilent Technologies) и подавалась в градиентном режиме.

Стандартный образец эремомицина был получен в ГУ НИИНА. Чистота образца составляла не менее 97%.

**Определение устойчивости продуцента к антибиотикам.** Исходный штамм и полученный высокопродуктивный изолят рассевали на селективные среды, содержащие в основе следующие компоненты, %: глюкозу – 2,0; соевый пептон – 1,5; дрожжевой экстракт – 0,1; агар-агар – 2,0; pH 7,0. Селекцию осуществляли при добавлении в среду антибиотиков канамицина, ванкомицина и эремомицина в различных концентрациях. Штаммы инкубировали в термостате при 28°C в течение 7–10 дней, после чего оценивали воздействие антибиотиков на рост исходной и полученной культур.

**Идентификация полученного мутантно-го штамма.** Для ПЦР и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК была использована универсальная праймерная система 1492r (5'-tacggtaccttgtagactt-3') [14].

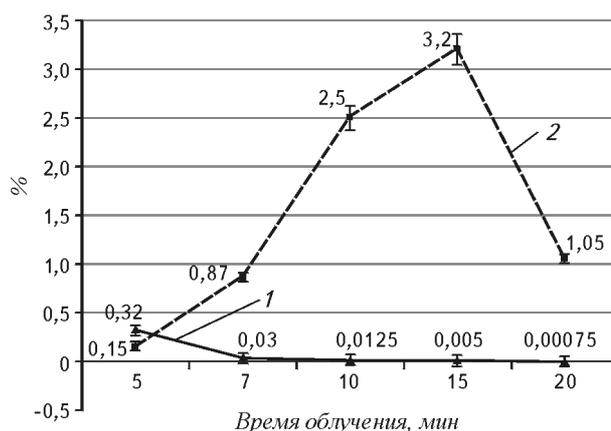
Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-ном геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см (камера для горизонтального электрофореза Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad Laboratories, США)). Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps (Promega, США) согласно рекомендациям производителя.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе были определены степень выживаемости и частота появления морфологически измененных колоний под воздействием УФ-облучения (рис. 1). Частота возникновения морфологических мутаций является косвенным признаком эффективности УФ-мутагенеза, что, в свою очередь, может коррелировать с появлением колоний с повышенной продуктивностью. Видно, что максимальный уровень возникновения мутаций наблюдался при продолжительности облучения 10–15 мин; были отмечены как колонии с измененной морфологией и пигментацией мицелия, так и колонии, отличающиеся замедленным ростом.

Таким образом, для отбора морфологически измененных колоний в основном использовали экспозицию 10 или 15 мин. Количество морфологически измененных изолятов среди единичных выживших мутантов при этом составляло 2–3%.

Для определения возможной взаимосвязи между морфологическими характеристиками и повышенной продуктивностью колоний все типы



**Рис. 1.** Выживаемость (1) и частота проявления мутаций (2) у штамма *A. orientalis* VKPM Ac-1125 в зависимости от продолжительности УФ-облучения

**Fig. 1.** Survival (1) and frequency of mutations (2) in *A. orientalis* VKPM Ac-1125 strain depending on time of UV irradiation

возникающих морфологических форм были протестированы на уровень биосинтеза эремомицина при глубинном культивировании. Были отобраны четыре различных морфологических типа колоний (табл. 1).

Тестирование показало, что колонии 1-го типа обладают способностью к повышенному уровню биосинтеза эремомицина; их отбирали для дальнейших циклов УФ-мутагенеза.

В результате ряда последовательных циклов мутагенеза с последующим скринингом колоний, в том числе колоний с морфологией 1-го типа, был получен высокоактивный штамм Е 13-26, характеризующийся повышенной продуктивностью эремомицина в ферментационной среде ( $1,2 \pm 0,05$  г/л). В отличие от исходного, воздушный мицелий полученного штамма имел светло-бежевый пигмент и был менее плотный.

**Определение устойчивости к антибиотикам.** Высокопродуктивные штаммы микроорганизмов защищаются от синтезируемых ими антибиотиков путем их инактивации ферментами или метаболитами (например, цистеином), а также благодаря наличию генов специфической устойчивости [16], а значит, способны выдерживать присутствие в среде больших их количеств. Менее активные штаммы при тех же концентрациях антибиотика в среде не растут. Резистентность штамма к синтезируемому им антибиотику является его важной характеристикой, необходимой для оценки возможности дальнейшего увеличения его продуктивности. Поэтому на следующем этапе исследования была определена

**Связь между морфологическим типом колоний мутантов штамма *Amycolatopsis orientalis* VKPM Ac-1125 и их способностью к биосинтезу эремомицина**

**Relationship between morphological type and capacity of eremomycin synthesizing in colonies of *Amycolatopsis orientalis* VKPM Ac-1125 mutants**

Тип колонии	Морфологический признак		Средний уровень продукции эремомицина, г/л
	Воздушный мицелий	Пигментация	
Контроль	Хорошо развит	Отсутствует	0,5 ± 0,03
1	Слабо развит	Слабая	<b>1,2 ± 0,05</b>
2	Сильно развит	Отсутствует	0,36 ± 0,07
3	Хорошо развит	Слабая	0,05 ± 0,04
4	Слабо развит	Отсутствует	0,15 ± 0,05

*Примечание:* контролем служили колонии исходного штамма VKPM Ac-1125. Здесь и далее ошибку опыта (±) определяли как случайную ошибку прямых измерений по формуле:  $\Delta x = (x_{\max} - x_{\min})/2$ , где  $x_{\max}$  и  $x_{\min}$  – максимальное и минимальное значения из ряда полученных при повторных измерениях [15].

*Footnote:* colonies of the original VKPM Ac-1125 strain served as control. Hereafter, the experimental error (±) was determined as a random error of direct measurements according to the formula  $\Delta x = (x_{\max} - x_{\min})/2$ , where  $x_{\max}$  and  $x_{\min}$  are the maximum values resulting from the series of repeated measurements [15].

на устойчивость полученного изолята *A. orientalis* E 13-26 и исходного штамма *A. orientalis* VKPM Ac-1125, а также наиболее продуктивного из известных на данный момент штаммов *A. orientalis* VKPM Ac-807 к следующим антибиотикам: соб-

ственному эремомицину, а также ванкомицину (структурному аналогу эремомицина) и канамицину – антибиотику, угнетающему рост актиномицетов. Полученные результаты представлены в табл. 2.

**Устойчивость исходного (VKPM Ac-1125), селекционированного (E 13-26) и референтного (VKPM Ac-807) штаммов *A. orientalis* к различным антибиотикам**  
**Resistance of original (VKPM Ac-1125), selected (E 13-26) and reference (VKPM Ac-807) *A. orientalis* strains to various antibiotics**

Антибиотик	Рост штаммов в присутствии антибиотика в концентрации, г/л						
	0,001	0,01	0,1	1	3	5	10
VKPM Ac-1125							
Эремомицин	++	++	++	+	+	–	–
Ванкомицин	++	++	++	++	–	–	–
Канамицин	+	–	–	–	–	–	–
E 13-26							
Эремомицин	++	++	++	++	++	+	+
Ванкомицин	++	++	++	++	++	+	–
Канамицин	++	+	–	–	–	–	–
VKPM Ac-807							
Эремомицин	++	++	++	++	+	–	–
Ванкомицин	++	++	++	++	++	–	–
Канамицин	++	+	–	–	–	–	–

*Примечание:* “++” – обильный рост, “+” – слабый рост, “–” – отсутствие роста.  
 (++) , abundant growth; (+), poor growth; (–), lacking growth.

**Идентификация мутантного штамма.** Для генетической идентификации полученного штамма E 13-26 было проведено секвенирование ДНК исходного и полученного штаммов. Была определена практически полная последовательность (1165 пн) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК. Нуклеотидные последовательности ПЦР-фрагментов для обоих образцов оказались идентичны.

Кроме того, было выполнено сравнение полученной нуклеотидной последовательности с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank. Согласно результатам сравнения, филогенетически наиболее близкими к штамму E 13-26 оказались штаммы *Amycolatopsis thailandensis* CMU-PLA07 (NR\_116731), *A. coloradensis* DSM 44225 (NR\_114859), *A. umgeniensis* UM16 (NR\_115688). Уровень сходства последовательностей мутантного и вышеупомянутых штаммов составил 99,7%, 99,4 и 99,7%, соответственно.

Согласно существующим в настоящее время представлениям [17], обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рРНК позволяет отнести штамм E 13-26 к роду *Amycolatopsis*.

**Оптимизация состава питательной среды методом постановки однофакторного эксперимента.** После получения нового штамма-продуцента E 13-26 были проведены эксперименты по оптимизации используемой ферментативной среды с целью увеличения уровня биосинтеза

эремомицина. В первые 48 ч интенсивного роста продуцент расходует большую часть источников углерода и азота, так как повышенная продуктивность связана с потребностью штамма в более высоких концентрациях питательных элементов в ферментационной среде.

Влияние источников углерода на биосинтез эремомицина было изучено путем добавления в исходную ферментационную среду (содержащую глицерин в концентрации 60 г/л) глюкозы, лактозы (HiMedia), сахарозы (ООО «Русский химик»), фруктозы (HiMedia) или мелассы (АО «Капитал-ПРОК», Россия) (10 г/л, 20 или 30 г/л). Уровень продуктивности полученного штамма *A. orientalis* E 13-26 при использовании всех сахаров оказался ниже, чем при использовании глицерина. Исходя из этого, в качестве источника углерода для оптимизируемой ферментационной среды был выбран глицерин.

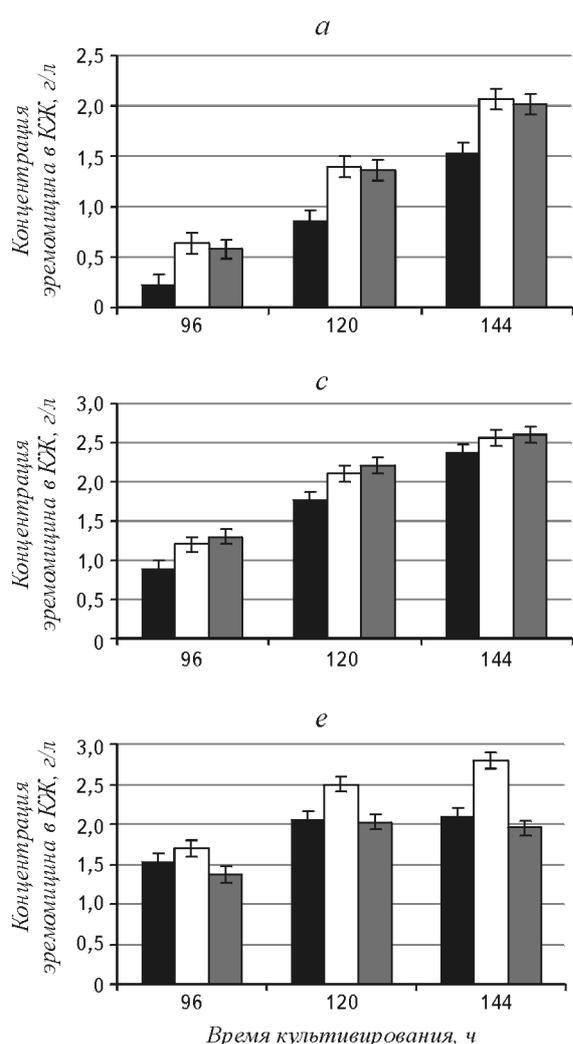
С целью изучения продуцирующей способности полученного штамма содержание глицерина в питательной среде изменяли от 50 до 80 г/л (табл. 3). Глицерин использовали также в качестве дополнительного источника углерода (подпитки) в концентрации 5, 10 или 20 г/л. Подпитку подавали дробно через 24 ч, 48 и/или 72 ч культивирования. Отбор КЖ для определения продуктивности производили через 144 ч после начала ферментации.

Таблица 3

**Зависимость продуктивности по эремомицину штамма *A. orientalis* E 13-26 от содержания глицерина в питательной среде**

**Eremomycin productivity of *A. orientalis* E 13-26 strain as dependant on glycerol content in medium**

Номер тестируемой схемы оптимизации среды	Исходная концентрация глицерина, г/л	Дробная подпитка глицерином (г/л) через			Содержание эремомицина в КЖ, г/л
		24 ч	48 ч	72 ч	
Контроль	60	–	–	–	1,2 ± 0,05
1	50	–	–	–	0,9 ± 0,03
2	70	–	–	–	1,15 ± 0,05
3	80	–	–	–	1,47 ± 0,05
4	60	5	5	–	1,56 ± 0,05
5	60	10	10	–	1,62 ± 0,04
6	60	–	5	5	2,1 ± 0,04
7	60	–	10	10	1,84 ± 0,05
8	60	–	10	–	1,53 ± 0,03
9	60	–	20	–	1,25 ± 0,05



**Рис. 2.** Влияние дополнительных источников белкового азота на продуктивность штамма *A. orientalis* E 13-26: *a* – соевый пептон; *b* – дрожжевой экстракт; *c* – дрожжевой автолизат; *d* – ферментативный пептон; *e* – сухое обезжиренное молоко. Концентрации добавок: черный цвет – 1 г/л, белый – 3 г/л, серый – 5 г/л

**Fig. 2.** Effect of additional protein nitrogen sources on strain *A. orientalis* E 13-26 productivity: (a), soy peptone; (b), yeast extract; (c), yeast autolysate; (d), enzymatic peptone; and (e), dry skim milk. Additive concentrations are as follows: black, 1 g/L; white, 3 g/L; and gray, 5 g/L

Наличие пептона, дрожжевого экстракта и соевой муки в питательной среде, как правило, обеспечивает максимальное накопление биомассы и продуктов вторичного метаболизма бактерий [18]. Исходя из этого, были проведены эксперименты по подбору оптимальных концентраций источников белкового азота.

В процессе поиска дополнительных источников белкового азота в ферментационной среде тестировали такие компоненты, как СОМ, дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат, ферментативный пептон и соевый пептон в концентрации 1 г/л, 3 и 5 г/л каждого. Колбы со средой, содержащей различные дополнительные источники белкового азота, инкубировали в течение 144 ч. Отбор КЖ для определения содержания эремомоцилина производили каждые 24 ч, начиная с 96-го часа культивирования (рис. 2).

Согласно полученным результатам, максимальный уровень биосинтеза эремомоцилина штам-

мом *A. orientalis* E 13-26 ( $2,8 \pm 0,05$  г/л) был достигнут в результате добавления в исходную питательную среду сухого обезжиренного молока в концентрации 3 г/л.

**Оптимизация состава питательной среды методом многофакторного эксперимента.** Для каждого фактора были подобраны центр плана и шаг варьирования (табл. 4).

Была построена матрица реализации многофакторного эксперимента типа  $2^3$  (табл. 5).

Были рассчитаны коэффициенты регрессии; полученное уравнение регрессии первого порядка имеет следующий вид:

$$Y = 2,38 + 0,24X_1 + 0,21X_2 - 0,03X_3,$$

где  $Y$  – продуктивность штамма по эремомоцину;  $X_1$  – концентрация глицерина;  $X_2$  – концентрация СОМ;  $X_3$  – концентрация глюкозы.

Рассчитанная ошибка опыта составила  $S = 0.0015$ .

Таблица 4

Новая матрица реализации эксперимента (табл. 6) была построена по методу крутого восхождения (МКВ) Бокса–Уилсона, исходя из нового шага варьирования, рассчитанного по новым коэффициентам регрессии:

$$b_1 = 0,24/0,03 = 8; \quad \text{шаг варьирования} = 10 \times 8/8 = 10;$$

$$b_2 = 0,21/0,03 = 7; \quad \text{шаг варьирования} = 1 \times 7/8 = 0,88;$$

$$b_3 = -0,03/0,03 = -1; \quad \text{шаг варьирования} = 5 \times (-1)/8 = -0,63.$$

Согласно данным табл. 6, увеличение концентрации глицерина и СОМ наряду с уменьшением концентрации глюкозы ведет к плавному увеличению концентрации эремомицина в КЖ. Оптимальной можно считать среду, использованную в эксперименте № 4 (глицерин – 80,0 г/л; СОМ – 4,6 г/л; глюкоза – 8,1 г/л), обеспечившую максимально высокий уровень биосинтеза эремомицина ( $3,2 \pm 0,03$  г/л). При дальнейшем увеличении концентрации глицерина и СОМ и уменьшении концентрации глюкозы продуктивность штамма падает.

Далее для сравнения результатов, полученных с помощью МФЭ и МКВ, были поставлены шесть независимых параллельных экспериментов по определению продуктивности штамма в условиях эксперимента № 5 (см. табл. 5) и эксперимента № 4 (см. табл. 6), обеспечивших наилучшие результаты. Полученные данные представлены на рис. 3.

Максимальное значение продуктивности, полученное путем МФЭ, составило  $2,92 \pm 0,14$  г/л эремомицина в КЖ; в свою очередь максимальное значение продуктивности после применения МКВ составило  $3,42 \pm 0,17$  г/л. Таким образом, применение МКВ для разработки оптимизированной среды ферментации позволяет увеличить продуктивность штамма на 17,1% по сравнению с МФЭ, что свидетельствует о целесообразности использования первого метода в подобных исследованиях.

В настоящее время в научных публикациях, как уже говорилось, практически отсутствует информация о разработке и получении штаммов с высоким уровнем продукции антибиотика эремомицина. В 1997 г. (патент 1981 года) был впервые описан этот антибиотик и способ его получения с использованием выделенного из почвы штамма *Nocardia orientalis* ИНА 238 [19], характеризующегося низким уровнем продуктивности (100–200 мг/л эремомицина). Аналогичной невысокой продуктивностью (115 мг/л) обладает вы-

**Центр плана и шаг варьирования для заданных факторов эксперимента**  
**Plan center and pitch variation for set factors of experiment**

Фактор	Центр плана	Шаг варьирования
$X_1$	60 г/л	10 г/л
$X_2$	3 г/л	1 г/л
$X_3$	15 г/л	5 г/л

Примечание: здесь  $X_1$  – концентрация глицерина,  $X_2$  – СОМ,  $X_3$  – глюкозы.

Footnote:  $X_1$ , glycerol concentration;  $X_2$ , dry skim milk concentration; and  $X_3$ , glucose concentration

деленный китайскими учеными штамм *Nocardia orientalis* NRRL 18098 [20]. В 2001 г. появилась публикация, посвященная увеличению продуктивности штамма *Amycolatopsis orientalis* subsp. *eretomycini* с использованием комбинированной методики, включавшей получение протопластов продуцента, воздействие на них невысоких доз УФ-облучения ( $500$  эрг/мм<sup>2</sup>) и последующую их регенерацию; достигнутый уровень продуктивности составлял 450–520 мг/л [9]. В 1997 г. был запатентован штамм *Amycolatopsis orientalis* subsp.,

Таблица 5

**Матрица реализации многофакторного эксперимента типа 2<sup>3</sup>**

**Matrix of multifactor experiment of 2<sup>3</sup> type realization**

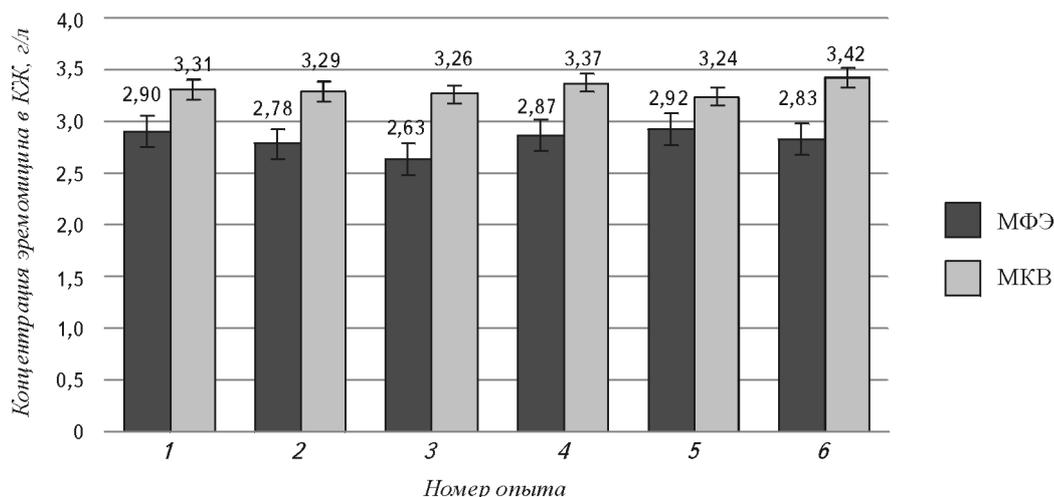
Номер эксперимента	Факторы			Среднеарифметическое функции отклика ( $Y_u$ ), г/л
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	70	4	20	$2,75 \pm 0,05$
2	50	4	20	$2,26 \pm 0,03$
3	70	2	20	$2,34 \pm 0,05$
4	50	2	20	$1,97 \pm 0,02$
5	70	4	10	<b><math>2,9 \pm 0,04</math></b>
6	50	4	10	$2,36 \pm 0,03$
7	70	2	10	$2,41 \pm 0,05$
8	50	2	10	$1,96 \pm 0,02$

**Матрица реализации факторного эксперимента по методу крутого восхождения****Matrix of factor experiment realization using steep ascent method**

Номер эксперимента	Факторы			Среднеарифметическое функции отклика ( $Y_u$ ), г/л
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	50	2	10	1,96 ± 0,02
2	60	2,88	9,37	2,46 ± 0,04
3	70	3,76	8,74	2,9 ± 0,02
4	80	4,64	8,11	<b>3,2 ± 0,03</b>
5	90	5,52	7,48	2,87 ± 0,05
6	100	6,4	6,85	2,29 ± 0,04
7	110	7,28	6,22	1,92 ± 0,02
8	120	8,16	5,59	1,51 ± 0,01
9	130	9,04	4,96	1,37 ± 0,04
10	140	9,92	4,33	1,06 ± 0,02
11	150	10,8	3,7	0,97 ± 0,03
12	160	11,68	3,07	0,46 ± 0,01
13	170	12,56	2,44	0,23 ± 0,05

*eremotycini* ВКПМ-s892, полученный в результате многоступенчатого мутагенеза с использованием этиленimina, нитрозэтилбиурета, метилнитрозогуанидина и гамма-лучей с последующим отбо-

ром мутантных штаммов на средах, содержащих стрептомицин и ванкомицин в качестве селективных агентов. Продуктивность данного штамма составила 1,8 г/л эремомицина [21].



**Рис. 3.** Сравнение продуктивности штамма *Amycolatopsis orientalis* ВКПМ Ac-1125 на оптимизированных средах, разработанных в ходе многофакторного эксперимента (МФЭ, эксперимент № 5, см. табл. 5) и метода крутого восхождения (МКВ, эксперимент № 4, см. табл. 6)

**Fig. 3.** Comparison of *Amycolatopsis orientalis* VKPM Ac-1125 strain productivities on media optimized by MFE (experiment 5, Table 5) and MSC (experiment 4, Table 6)

Наиболее продуктивным из известных на данный момент продуцентов эремомицина является штамм *Amycolatopsis orientalis* ВКПМ-Ас-807, описанный в российском патенте [10]. Данный штамм был получен из известного штамма *Amycolatopsis orientalis* subsp. *eremomycini* ВКПМ-s892 путем последовательного трехступенчатого воздействия на него метилнитрозогуанидина, ультрафиолетовых и гамма-лучей <sup>60</sup>Со и отбора мутантных штаммов с повышенной антибиотической активностью. Согласно приведенным в патенте данным, продуктивность полученного мутантного штамма составила 2,3 г/л эремомицина.

Полученный в данной работе штамм *A. orientalis* Е 13-26 отличается от всех известных на данный момент штаммов – продуцентов эремомицина повышенным уровнем биосинтеза антибиотика; его наивысшая продуктивность на среде, оптимизированной по методу крутого восхождения, составила  $3,42 \pm 0,17$  г/л. Кроме того, данный штамм характеризуется устойчивостью к действию высоких концентраций как собственного, так и родственных ему других антибиотиков. Сохранение продуктивности штамма на указанном выше уровне после пяти последовательных пересевов позволяет сделать вывод о его генетической стабильности и перспективности для использования в промышленном производстве эремомицина.

Авторы благодарны заведующему лабораторией молекулярной диагностики Института биоинженерии РАН Б.Б. Кузнецову за проведение генетической идентификации штамма и сотрудникам НИИНА за предоставление стандарта антибиотика эремомицина.

Работа выполнена в ходе реализации государственного контракта № 14411.2049999.19.056 от 19.08.2014 (шифр «2.1 Гликопептиды 2014») при финансовой поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Allen N.E., Le Tourneau D.L., and Hobbs J.N. Molecular interactions of a semisynthetic glycopeptide antibiotic with D-Alanyl-D-Alanine and D-Alanyl-D-Lactate residues. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1997, 41, 66–71.
- Polk R.E. Redman syndrome. *Annals Pharmacotherapy*, 1998, 32(7-8), 840.
- Polk R.E. D. Israel, J. Wang, et al. Vancomycin skin tests and prediction of “red man syndrome” in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, 37, 2139–2143.
- Gause G.F., Brazhnikova M.G., Lomakina N.N., et al. Eremomycin – new glycopeptide antibiotic: chemical properties and structure. *J. Antibiotics*, 1989, 42(12), 1750–1759.
- Olsuf'eva E.N., and Preobrazhenskaya M.N. Structure–activity relationships in a series of semisynthetic polycyclic glycopeptide antibiotics. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2006, 32(4), 303–322.
- Fedorova I.A., Shapovalova E.N., Staroverov S.M., and Shpigun O.A. Enantioseparation of derivatives of amino acids on silica modified by macrocyclic antibiotic eremomycin. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskiye Protsessy* (Sorption and Chromatographic Processes), 2015, 15(6), 769–775.
- Prokhorova A.F., Kuznetsov M.A., Shapovalova Ye.N., et al. Enantioseparations of N-blocked Amino Acids by Capillary Electrophoresis using Macrocyclic Antibiotics. *Vestnik Moskovskogo Gosudarstvennogo Universiteta* (Moscow University Chemistry Bulletin). *Ser. Chemistry*, 2010, 51(5), 359–363.
- Allenmark S.G. Chromatographic enantioseparation methods and applications. Moscow: Mir (Translated into Russian), 177.
- Trenin A.S., Fedorova G.B., Laiko A.V., and Dudnik Iu.V. Increase in eremomycin production by regeneration and UV-irradiation of *Amycolatopsis orientalis* subs. *eremomycini* protoplasts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 46(3), 6–11.
- Lapchinskaya O.A., Fedorova G.B., Pogozheva V.V., et al. An eremomycin-producing *Amycolatopsis orientalis* ВКПМ Ас-807 strain. Patent of RF 2352631, 2007.
- Sannikov R.Kh. Similarity and modeling theory. Planning of engineering experiment. A manual. Ufa, Russia: UGNTU, 2010, 214.
- Bondar' A.G. Mathematic modeling in chemical technology. Kiev: Visshaya Shkola, 1973, 280.
- Kysilka R., and Kren V. J. Determination of lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. *Chromatography*, 1993, 630, 415–417.
- Lane D. J. Nucleic acid techniques in bacterial systematics: 16S/23S rRNA sequencing. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons, 1991, 115–175.
- Aksenova E.N. Methods for processing of Measurement Results. Moscow: MIFI, 2015, 10.
- Egorov N.S. Basic knowledge about antibiotics. Moscow: Nauka, 2004, 41–42.
- Stackebrandt E., and Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, 2006, 33(4), 152–155.
- Dzhavakhiya V., Voinova T., and Glagoleva E. Strain improvement of *Streptomyces xanthochromogenes* RIA 1098 for enhanced pravastatin production at high compactin concentrations. *Indian J. Microbiol.*, 2015, 55(4), 440–446.
- Gause G.F., Preobrazhenskaya T.P., Laiko A.V., et al. Antibiotic of Eremomycin and method for its obtaining. Patent of RF 1475150, 1981.
- Yin M.M., Chen D.J., Zhang Y.X., and Ruan L.G. Fermentation conditions optimization, isolation and purification of eremomycin. *J. Microbiology*, 2010, 4, 22–26.
- Brazhnikova M.G., Laiko A.V., Fedorova, G.B., et al. A strain of *Amycolatopsis orientalis* subs. *eremomycini* ВКПМ-s892 producing Eremomycin antibiotic and method for obtaining of Eremomycin antibiotic. Patent of RF 2110578, 1997.

## Development of a New *Amycolatopsis orientalis* Strain for High-Yield Eremomycin Production

V.V. DZHAVAKHIYA<sup>1,\*</sup>, E.V. GLAGOLEVA<sup>1</sup>, E.D. POPOVA<sup>1</sup>, A.I. OVCHINNIKOV<sup>1</sup>, K.G. SKRYABIN<sup>1</sup>, D.L. SHOBOLOV<sup>2</sup>, V.Yu. BALABANYAN<sup>2</sup>, M.G. CHERNOBROVKIN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russ. Acad. Sci, Moscow, 117312 Russia

<sup>2</sup>The Limited Liability Company “Drug Technologies”, Moscow 141400, Russia

\*e-mail: engbio@rambler.ru

Received May 19, 2016

Accepted July 18, 2016

**Abstract** – A multistep random UV mutagenesis of an eremomycin-producing *Amycolatopsis orientalis* strain VKPMAc-1125 with rather low productivity (0.5 g/L) and the further selection of the most high-yield mutant strains have resulted in a highly productive E 13-26 strain. After the fermentation medium optimization by the method of multifactor analysis, the most efficient composition for the fermentation medium was established, %: glycerol, 8; soybean meals, 2.0; MgCl<sub>2</sub>, 0.02; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02; KNO<sub>3</sub>, 0.6; CaCl<sub>2</sub>, 0.3; skimmed milk powder, 0.46; and glucose, 0.8. The maximum productivity of this strain on the optimized medium reached 3.42 ± 0.17 g/L. Therefore, the obtained strain is considered to be very promising for the further use in the selection and development of the technology for the large-scale eremomycin production.

**Key words:** *Amycolatopsis orientalis*, eremomycin, glycopeptide antibiotics, secondary metabolites, UV mutagenesis.

**Acknowledgements** – Authors are acknowledged to B.B. Kuznetsov, Head of Laboratory for Molecular Diagnostics, Institute for Bioengineering, Russ. Acad. Sci., for the genetic identification of the strain and to the staff of NIINA for the provision of the eremomycin reference preparation.

The work was supported by the State Contract 14411.2049999.19.056, August 19, 2014 (code 2.1 Glycopeptides 2014) from the Ministry of Industry and Trade of Russian Federation.

**doi:** 10.1016/0234-2758-2017-33-1-42-52