

УДК: 579.873.11: 579.66

## Влияние низших грибов на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д

© 2019 В.Ю. ПОШЕХОНЦЕВА<sup>1,2</sup>, В.В. ФОКИНА<sup>2,3,\*</sup>, Г.В. СУХОДОЛЬСКАЯ<sup>2</sup>, А.А. ШУТОВ<sup>2</sup>, М.В. ДОНОВА<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Пуцинский естественно-научный институт, Пуцино, Московская обл., 142290

<sup>2</sup>ФГБУН Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуцино, Московская обл., 142290

<sup>3</sup>ООО «Фарминс», Пуцино, Московская обл., 142290

\*e-mail: vvfokina@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.07.2019 г.

После доработки 02.08.2019 г.

Принята к публикации 23.08.2019 г.

Изучено влияние инактивированных клеток дрожжей, отдельных компонентов дрожжевых клеток и инактивированной биомассы низших грибов разного таксономического положения на биосинтез иммунодепрессанта такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Фракции растворимых и нерастворимых компонентов дрожжевых клеток положительно влияли на биосинтез такролимуса с достижением его концентраций 447,1±22,4 мг/л и 514,3±25,7 мг/л, соответственно. При этом, более значительный эффект оказывали нерастворимые компоненты клеток дрожжей, включающие клеточные стенки и цитоплазматические мембраны. Присутствие в сложной питательной среде целых клеток пекарских дрожжей и мицелиального гриба *Aspergillus ochraceus* стимулировало продукцию такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д (667,5±33,4 мг/л и 633,5±31,7 мг/л FK-506, соответственно). Биомасса дейтеромицета *Curvularia lunata* не оказывала влияния на биосинтез такролимуса (288,4±14,4 мг/л FK-506). Напротив, биомасса гриба *Gongronella butleri* полностью подавляла рост и биосинтез такролимуса *S. tsukubensis*. Увеличение продукции такролимуса в средах, содержащих клетки низших грибов, главным образом, связано с полисахаридным составом их клеточных стенок и не зависит от эргостерина. Результаты расширяют представления о физиологии *S. tsukubensis* и могут быть использованы при разработке биотехнологии получения такролимуса.

**Ключевые слова:** такролимус, биосинтез, *Streptomyces tsukubensis*, дрожжи, грибы, эргостерин.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-5-42-50

Такролимус (FK-506), 23-членный макролидный лактон, в настоящее время признан наиболее эффективным иммунодепрессантом среди других лекарственных препаратов данного класса (циклоспорин, аскомицин, микофеноловая кислота и т.д.). Такролимус продуцируется бактериями рода *Streptomyces*, такими как *S. tsukubensis*, *S. tacrolimicus* и *S. clavuligerus* (всего описано

около 20 продуцентов) [1]. FK-506 широко используется в медицинской практике при трансплантации органов и тканей [2, 3], для лечения атопических дерматитов [4], ряда иммунных (ревматоидный артрит) [5], вирусных [6, 7] и воспалительных кишечных заболеваний (язвенный колит, болезнь Крона) [8], перспективен для применения в терапии злокачественных опухолей [9];

**Список сокращений:** ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; СПД – сухие пекарские дрожжи; ЭН – эргостерин; FK-506 – такролимус; FKBP12 – FK-506 binding protein (FK-506 связывающий белок).

для такролимуса показаны противогрибковая [10], нейропротекторная и нейрогенеративная активности [11, 12]. Спектр клинического применения такролимуса постоянно расширяется.

Молекулярные механизмы иммуносупрессорного и противогрибкового действия такролимуса очень похожи и включают ингибирование белков-мишеней. Такролимус, будучи гидрофобным соединением, проникает в эукариотическую клетку путем диффузии и связывается с внутриклеточным белком FKBP12 (FK-506 binding protein). Образующийся такролимус-белковый комплекс ингибирует кальциневрин. Кальциневрин выполняет различные функции в клетках низших эукариотов, включая регуляцию генов и катионный гомеостаз. Как такролимус-связывающий белок FKBP12, так и кальциневрин являются ферментами, высоко консервативно представленными после эволюционного процесса в 1 млрд. лет в клетках человека и таких низших эукариотов, как дрожжи и мицелиальные грибы [13]. Исходно противогрибковая активность такролимуса, направленная на белок FKBP12 и кальциневрин низших эукариотов, трансформировалась в ходе эволюции в иммуносупрессорную активность такролимуса в клетках человека [8, 14–16].

В настоящее время исследования по увеличению продукции такролимуса сосредоточены на оптимизации питательных сред и генной инженерии штаммов путем увеличения копияности генов биосинтеза такролимуса [17, 18].

Как следует из данных литературы, работы по оптимизации питательных сред, используемых для роста культуры продуцента и биосинтеза такролимуса, в основном, включают подбор их состава, изучение влияния непосредственных предшественников такролимуса и стрессовых агентов. Как правило, для биосинтеза такролимуса используют среды, включающие в качестве базовых компонентов несколько источников углерода и органического азота. В ряде работ было показано негативное влияние легкоусвояемых источников углерода, таких как глюкоза или глицерин, на биосинтез такролимуса *S. tsukubaensis* [19]. В качестве компонентов среды наиболее предпочтительно использование комплексных органических источников, таких как меласса, отходы переработки зерна [20], перьевая мука [21]. Установлены преимущества использования в качестве источников углерода низко- и высокомолекулярных полисахаридов, включая декстрины и растворимые крахмалы различного происхождения [22, 23].

Повышению выхода FK-506 способствует внесение близких предшественников молекулы такролимуса, таких как пипеколат, хоризмат и шикимат [24–26], однако высокая стоимость и ограниченная доступность этих соединений препятствуют их широкому использованию. Как показано для *S. tsukubaensis* NRRL 18488, добавление стрессовых агентов, таких как диметилсульфоксид или тиосульфат натрия может оказывать ограниченный стимулирующий эффект на синтез такролимуса в [17]. Отрицательное влияние на биосинтез такролимуса штаммом *S. tsukubaensis* отмечено для высоких концентраций фосфатов [22], а также N-ацетилглюкозамина [27].

В естественной среде обитания стрептомицеты продуцируют вторичные метаболиты, такие как такролимус, как правило, для обеспечения защиты питательных субстратов от их использования другими конкурирующими микроорганизмами, включая грибы. Противогрибковая активность такролимуса показана в отношении ряда условно-патогенных грибов и дрожжей, таких как *Cryptococcus neoformans*, родов *Candida* и *Aspergillus* [28–30]. Ранее было показано повышение биосинтеза такролимуса культурами *Streptomyces* в ответ на присутствие в среде целых клеток пекарских дрожжей [31–33]. Однако в целом влияние низших грибов, различающихся по химическому составу клеточных оболочек, на особенности роста и вторичный метаболизм стрептомицетов, продуцирующих такролимус, практически не изучено.

Штамм *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д является высокопроизводительным продуцентом такролимуса. Максимальный выход такролимуса при использовании данного штамма наблюдали в сложной питательной среде с инактивированной биомассой пекарских дрожжей [33].

Целью данной работы было изучение влияния дрожжей и низших мицелиальных грибов различного таксономического положения на продукцию такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы

В работе использовали растворимый крахмал (Difco, США), кукурузный экстракт (Sigma-Aldrich, США), солодовый экстракт (Sigma-Aldrich), пекарские дрожжи («Саф-Момент», Франция), дрожжевой экстракт (Helicon, Россия),

глюкозу («Диа-М», Россия), агар-агар (PanReac, США), стандартный препарат такролимуса для ВЭЖХ (Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd., Китай), эргостерин (Steraloids, США).

### Микроорганизмы и условия их поддержания

Бактериальный штамм *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и штаммы грибов *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-830, *Curvularia lunata* ВКМ F-644 и *Gongronella butleri* ВКМ F-1033 были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук (ВКМ ИБФМ РАН).

Штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д поддерживали на плотной питательной среде следующего состава (г/л): крахмал – 10, дрожжевой экстракт – 4, солодовый экстракт – 10, агар – 20, рН 7. Штаммы грибов поддерживали на 3%-ном солодовом агаре.

### Культивирование штаммов и биосинтез такролимуса

Для получения криогенной культуры 2-3 колонии штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д переносили в колбы объемом 750 мл, содержащие по 50 мл среды А следующего состава (г/л): глюкоза – 5, крахмал – 75, кукурузный экстракт твердый – 10, сухие пекарские дрожжи (СПД) – 15, CaCO<sub>3</sub> – 3, MnSO<sub>4</sub> – 0,05, рН 7. Культивирование осуществляли в аэробных условиях при 25 °С и 220 об/мин в течение 48 ч. Полученной культурой (10% об.) инокулировали свежую среду А, культивирование вели в тех же условиях в течение 24 ч. Выросшую культуру смешивали с 50%-ным глицерином (1:1 об./об.), разливали в пробирки и замораживали при минус 70 °С (получали криогенную культуру).

Посевную культуру для биосинтеза такролимуса получали из криогенной культуры. Криогенную культуру (5% об.) переносили в колбы объемом 750 мл, содержащие 250 мл среды А, и инкубировали при 25 °С и 220 об/мин в течение 48 ч.

Для биосинтеза такролимуса в среду А дополнительно вносили (г/л): L-лизин – 5; сорбент ХАД-7 НР – 40, таким образом получая среду Б. В колбы объемом 750 мл, содержащие по 50 мл среды Б, вносили 10% об. посевной культуры, инкубировали при 25 °С и 220 об./мин в течение 10 сут. С 4-ых по 7-ые сут ферментации вели подпитку стерильным 9%-ным раствором крахмала (концентрация в одной добавке – 5,4 г/л).

Влияние СПД на биосинтез такролимуса исследовали при концентрациях 0, 5, 10, 15, 20 и

25 г/л; СПД добавляли в среду А, не содержащую СПД. Влияние эргостерина (ЭН) изучали при концентрациях 0, 2 и 4 г/л (в соответствии с физиологическим содержанием ЭН в плазматической мембране дрожжей, составляющем в среднем 1,6 г/л); ЭН добавляли в среду Б, содержащую и не содержащую СПД.

Для получения биомассы низших грибов, грибные культуры выращивали в среде В, содержащей (г/л): крахмал – 45; дрожжевой экстракт – 3; кукурузный экстракт – 10; CaCO<sub>3</sub> – 3; MgSO<sub>4</sub> – 0,5; FeSO<sub>4</sub> – 0,05; рН 6,5–6,8. Суспензию спор в 3–5 мл стерильной дистиллированной воды переносили в колбы объемом 750 мл, содержащие 50 мл указанной среды, и инкубировали при 28 °С и 220 об/мин в течение 48 ч. Выросший мицелий отделяли на мелкоячеистом сите от среды выращивания, дважды промывали стерильной дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу при 65 °С. Биомассу измельчали и добавляли в среду Б в концентрации 15 г/л. Биосинтез проводили, как описано выше. Среда Б с СПД (15 г/л) служила положительным контролем.

### Фракционирование клеток пекарских дрожжей

Сухие пекарские дрожжи (200 г) растворяли в 400 мл стерильного физиологического раствора и выдерживали при 4 °С в течение 24 ч. Полученную пасту замораживали при минус 70 °С и разрушали на френч-прессе. Полученный гомогенат добавляли в среду Б для биосинтеза вместо СПД в эквивалентной концентрации, составившей с учетом разведения 45 г/л. Другую часть гомогената разбавляли в 8 раз стерильным физиологическим раствором и центрифугировали при 4 °С в течение 15 мин при 800 g. Осадок и супернатант добавляли в среду для биосинтеза вместо СПД в концентрациях, эквивалентных их содержанию в клетках дрожжей, с учетом разведения составивших 31 г/л и 364 мл/л, соответственно. Биосинтез проводили, как описано выше.

### Световая микроскопия

Морфологию культуры *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д исследовали на окрашенных метиленовым синим препаратах на 2-ые и 9-ые сут биосинтеза с использованием светового микроскопа ECLIPSE 50i (Nikon, Япония).

### Определение биомассы

Оценку роста *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в зависимости от концентрации СПД проводили в среде А, при этом концентрацию СПД

варьировали от 0 до 25 г/л с шагом в 5 г/л. В колбы объемом 750 мл, содержащие по 50 мл указанной среды, переносили 10% об. криогенной культуры, культивирование вели при 25 °С и 220 об/мин в течение 48 ч. Рост оценивали по сухому весу. Для этого образцы культуральной жидкости (содержимое всей колбы) отбирали на 0-м, 12, 24, 36 и 48-м ч роста (максимальное количество биомассы достигалось на 2-ые сут культивирования), затем центрифугировали при 4000 g, дважды отмывали дистиллированной водой и высушивали при 80 °С в течение 48 ч. Измеряли общий вес осадка, содержащего как биомассу пекарских дрожжей, так и бактериальную биомассу.

### Выделение и анализ такролимуса

Культуральную жидкость после 10 сут культивирования центрифугировали при 15300 g в течение 40 мин при 4 °С для отделения осадка, содержащего сорбент с такролимусом. Такролимус двукратно элюировали этанолом. Для анализа использовали объединенный этанольный экстракт. Концентрацию такролимуса в объединенном этанольном экстракте определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием системы Agilent 1200 (Agilent Technology, Германия) с колонкой LiChrospher®100 RP-18 (5 мкм, 125×4 мм) (Merck, США) и с предколонкой Daltosil 100, RP-18 (4 мкм, 4,6×76 мм) (Serva, Германия). Состав мобильной фазы: вода, ацетонитрил, метилтретбутиловый эфир, трифторуксусная кислота (58,3:34,4:7,3:0,01, об.об.); скорость потока 1,5 мл/мин; температура 60 °С. Детекцию осуществляли при 200 нм. Расчет концентрации такролимуса проводили по калибровке с внешним стандартом на основании значений площадей пиков.

### Статистический анализ

Экспериментальные данные получены в трех повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

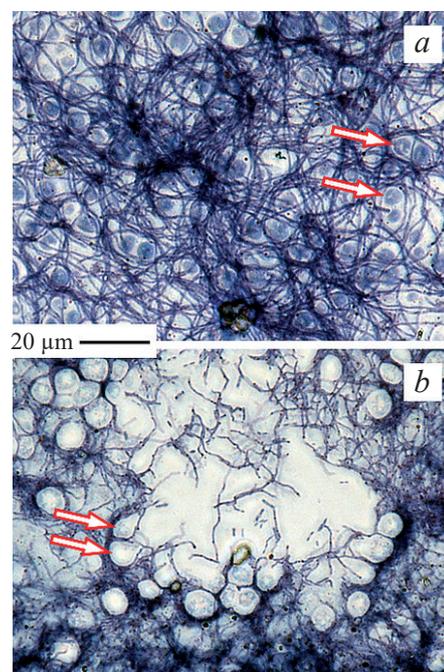
### Влияние пекарских дрожжей и компонентов их клеток на продукцию такролимуса

Влияние автоклавированной биомассы целых клеток дрожжей на рост и биосинтез такролимуса штаммом *S. tsukubensis* VKM Ac-2618Д исследовали в интервале концентраций от 0 до 25 г/л. Культура стрептомицета представляла собой ми-

целиальную сеть из плотно переплетенных длинных разветвленных гиф. Клетки дрожжей интегрировались в мицелиальную сеть стрептомицета (рис. 1). На начальных этапах биосинтеза дрожжевые клетки были интактны с отчетливой визуализацией внутриклеточного содержимого (рис. 1a). На более поздних этапах биосинтеза наблюдалось увеличение количества «пустых» клеток дрожжей (рис. 1b).

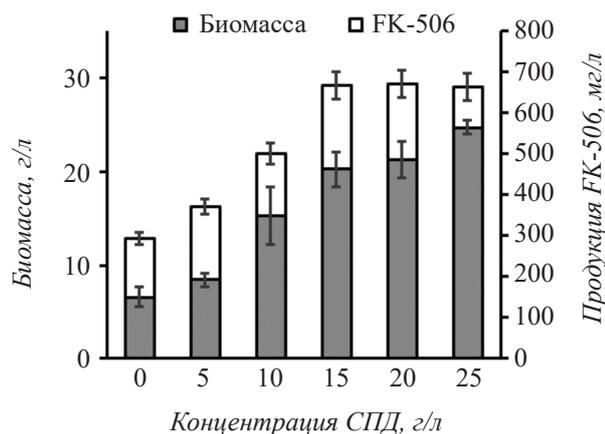
Оценка роста бактериальной культуры в процессе биосинтеза осложнялась невозможностью отделения мицелия стрептомицета от клеток дрожжей, поэтому проводили измерение общей массы. Биомасса достигала максимального значения на 48-м ч культивирования и составляла 20 г/л в среде, содержащей 15 г/л СПД; увеличение концентрации СПД до 20 г/л не приводило к значительному приросту биомассы (рис. 2).

Добавление СПД стимулировало биосинтез такролимуса и приводило к достижению титра 667,5±33,4 мг/л, что на 126% выше по сравнению с контролем (295,0±14,8 мг/л в среде без СПД). Выход такролимуса коррелировал с количеством биомассы в средах с разными концентрациями



**Рис. 1.** Рост *S. tsukubensis* VKM Ac-2618Д в жидкой среде после двух (a) и девяти (b) дней ферментации (световая микроскопия). Стрелками указаны инактивированные клетки дрожжей

**Fig. 1.** The growth of *S. tsukubensis* VKM Ac-2618D in liquid culture after two (a), and nine (b) days of fermentation (light microscopy). The arrows indicate inactivated yeast cells



**Рис. 2.** Влияние сухих пекарских дрожжей (СПД) на рост и продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Контроль – среда без СПД

**Fig. 2.** Effect of the dried yeast powder (DYP) on the growth and tacrolimus production by *S. tsukubensis* VKM Ac-2618D. Control – the medium without DYP

СПД, при этом увеличение концентрации СПД свыше 15 г/л не приводило его к достоверному повышению.

В питательных средах для культивирования бактериальных штаммов наиболее часто используют дрожжевой экстракт и дрожжевой автолизат в качестве источника органического азота и витаминов группы В [34], однако, влияние отдельных компонентов клеток дрожжей на биосинтез вторичных метаболитов стрептомицетами остается невыясненным. Для выяснения роли отдельных компонентов клеток дрожжей в биосинтезе такролимуса дрожжевые клетки были разрушены и фракционированы; полученные гомогенат, фракции нерастворимых (осадок) и растворимых (супернатант) компонентов использовали для приготовления среды биосинтеза.

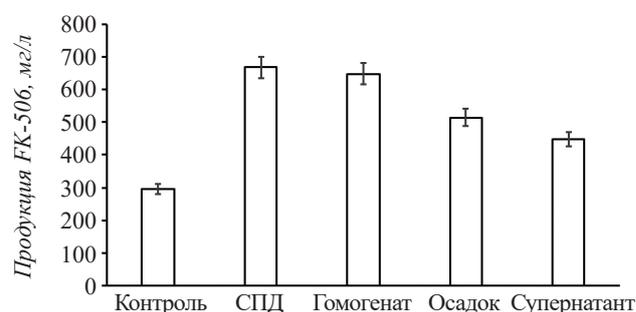
Как следует из рис. 3, все фракции компонентов дрожжевых клеток положительно, но в разной степени влияли на биосинтез такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, что выражалось в 52–74%-ном увеличении его выхода (рис. 3). Титр такролимуса в среде, содержащей супернатант, составил  $447,1 \pm 22,4$  мг/л и был до 23% ниже по сравнению с выходом в среде с фракцией нерастворимых компонентов дрожжевых клеток ( $514,3 \pm 25,7$  мг/л), но на 52% выше, чем в контроле – среде без добавления компонентов дрожжей – ( $295,0 \pm 14,8$ ) (рис. 3). Эти результаты свидетельствуют, что поверхностные структуры дрожжей, включающие клеточные стенки и цитоплазматические мембраны, а также ряд других нераствори-

мых компонентов дрожжевых клеток, стимулируют биосинтез такролимуса *S. tsukubensis*. При этом не исключено, что возможную сигнальную роль в активации каскада реакций биосинтеза такролимуса могут выполнять поверхностные компоненты клеток дрожжей наряду с тем, что дрожжи являются признанным источником витаминов и белкового азота в составе питательных сред.

### Влияние низших мицелиальных грибов на продукцию такролимуса

Как упоминалось ранее, противогрибковая активность такролимуса была продемонстрирована в отношении дрожжей *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* и аскомицетов *Aspergillus fumigatus* [28, 30]. Однако влияние других низших грибов на биосинтез такролимуса стрептомицетами оставалось неисследованным.

В данной работе изучали влияние на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д грибов разных классов: *A. ochraceus* (Eurotiales), *C. lunata* (Pleosporales) и *G. butleri* (Mucorales), инактивированный мицелий которых добавляли в среду для биосинтеза. Как следует из рис. 4, присутствие биомассы *A. ochraceus* стимулировало биосинтез такролимуса и приводило к выходу продукта, сравнимого по количеству с выходом, получаемым в среде с СПД ( $633,5 \pm 31,7$  и  $667,5 \pm 33,4$  мг/л FK-506, соответственно), что на 115% выше, чем в контроле. Биомасса *C. lunata* не оказывала влияния на продукцию такролимуса. Присутствие биомассы мукорового гриба *G. butleri*, напротив, полностью подавляло рост стрептомицета (данные не приведены) и биосинтез FK-506 (рис. 4).



**Рис. 3.** Влияние различных фракций компонентов дрожжевых клеток *S. cerevisiae* (СПД) на продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Контроль – среда без добавления компонентов дрожжей

**Fig. 3.** Effect of the cell components of *S. cerevisiae* (DYP) on the tacrolimus production by *S. tsukubensis* VKM Ac-2618D. Control – the medium without the yeasts or their cell components

Использованные в работе низшие грибы, как известно, различаются по химическому составу клеточных стенок, включающих полисахариды, гликопротеины, хитин-глюкановые и хитозан-глюкановые комплексы с различным соотношением хитин/глюкан и хитозан/глюкан.

В соответствии с моделью строения клеточной стенки аскомицетовых дрожжей (первоначально созданной для *S. cerevisiae* и позднее подтвержденной для *C. albicans*), она представляет собой сеть спиральных  $\beta$ 1,3-глюкановых филаментов, в которой каждая нить трансгликозилирована с образованием разветвленного  $\beta$ 1,6-глюкана. В свою очередь, этот разветвленный глюкан трансгликозилирован хитином и гликозилфосфатидилинозитол-связанными белками [35].

В клеточной стенке дрожжей *S. cerevisiae* преобладают глюканы и маннаны, тогда как содержание хитина незначительно (не превышает 3–4%). Напротив, в клеточной стенке грибов рода *Aspergillus* содержится до 20–22% хитина. Клеточная стенка *G. butleri* содержит полярный положительно заряженный хитозан [36]. Можно предположить, что различия в составе клеточных стенок использованных в работе низших грибов являются причиной их неодинакового влияния на биосинтез такролимуса культурой стрептомицета.

Ранее авторами было выполнено секвенирование и была проведена предварительная сборка генома *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д [37]. Геном депонирован в базу данных DDBJ/ENA/GenBank с номером доступа SGFG00000000. У штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д выявлен кластер генов, отвечающих за биосинтез такролимуса. Поиск в геномной последовательности штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д генов, кодирующих гликозил-гидролазы (ЕС 3.2.1), осуществляющие гидролиз глюканов и хитина, выявил их наличие, тогда как гены ферментов, способных расщеплять хитозан, в геноме не обнаружены.

Отсутствие роста штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в среде, содержащей инактивированную биомассу *G. butleri*, может свидетельствовать о проявлении антагонистической активности мицелия этого мукового гриба. Культура *G. butleri*, принадлежащая к филуму *Zygomycetes*, является важным промышленным продуцентом хитозана (другим источником хитозана является панцирь креветок, но, несмотря на доступность, хитозан из панциря ракообразных практически всегда содержит аллергенный белок, и его клиническое применение поэтому ограничено). Штаммы *G. butleri* способны про-

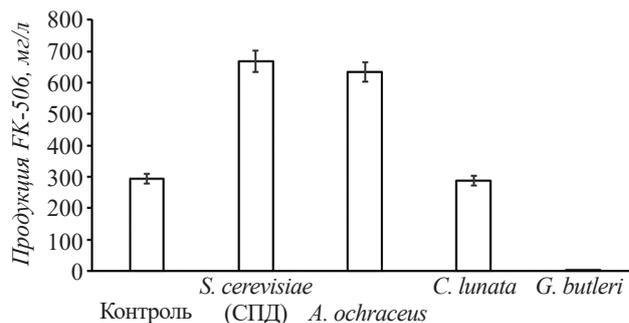


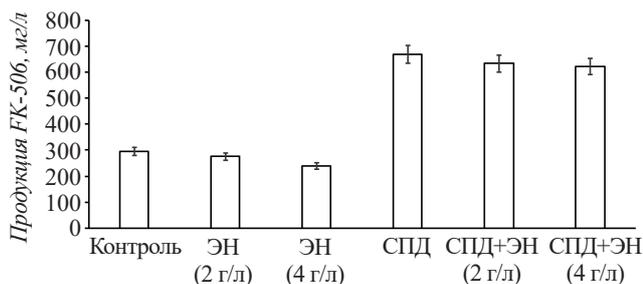
Рис. 4. Влияние разных грибных культур на продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Контроль – среда без биомассы низших грибов

Fig. 4. Effect of different fungal cultures on tacrolimus production by *S. tsukubensis* VKM Ac-2618D. Control – the medium without the fungal biomass

изводить свыше 730 мг/л хитозана [38]. Было показано, что гидроглутамат хитозана проявляет антагонистический эффект против *Escherichia coli* V517, *Staphylococcus aureus* MF-31 и *Saccharomyces cerevisiae*, полностью инактивируя вышеуказанные микроорганизмы уже при двухминутной экспозиции [39]. Антибактериальный эффект растворимого хитозана был описан для оральных патогенов *Streptococcus mutans* и *Lactobacilli brevis* [40]. Хитозан (1 г/л) из *Aspergillus niger* и *Mucor rouxii* ингибировал рост *Salmonella typhimurium* [41]. Чувствительность различных организмов к хитозану снижается в следующем порядке: дрожжи и грибы > грамположительные бактерии > грамотрицательные бактерии [42]. Содержащийся в клеточной стенке *G. butleri* (в инактивированной биомассе) хитозан мог ингибировать рост и, соответственно, биосинтез такролимуса грамположительным штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д.

#### Влияние эргостерина на продукцию такролимуса

Эргостерин – один из основных компонентов в цитоплазматической мембране различных низших эукариотов. Его весовое содержание варьирует от 0,2–0,5% до 11% [43]. Структура всех стероидов, включая эргостерин, основана на насыщенном тетрациклическом предшественнике – углеводороде стеране. Стеран найден в осадочных породах, возраст которых составляет более 1,8 млрд. лет; благодаря этому биомаркеру, характерному только для эукариотических клеток, стало возможным определение времени возникновения эпохи эукариотов [44].



**Рис. 5.** Влияние эргостерина на продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д: СПД – сухие пекарские дрожжи, ЭН – эргостерин. Контроль – среда без СПД

**Fig. 5.** Ergosterol effect on tacrolimus production in *S. tsukubensis* VKM Ac-2618D: DYP – dried yeast powder, EL – ergosterol. Control – the medium without DYP

Эргостерин низших эукариотов, как известно, служит сигнальной молекулой, запускающей каскад реакций биосинтеза ряда антибиотиков и фунгицидов [45]. В данной работе изучено влияние эргостерина на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* отдельно и в комбинации с клетками дрожжей (для оценки возможного синергического эффекта). Во всех случаях наблюдали отсутствие влияния или слабый отрицательный эффект эргостерина на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, что свидетельствовало о том, что выявленный стимулирующий эффект присутствия эукариотических клеток на биосинтез такролимуса не связан с эргостерином (рис. 5). Влияние эргостерина на рост культуры также не было выявлено (данные не приведены).

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что присутствие клеток низших грибов или их компонентов в среде культивирования оказывает влияние на биосинтез такролимуса. Эффект зависит от вида низших грибов и опосредован, главным образом, составом их клеточных стенок, но не зависит от эргостерина. Полученные результаты являются приоритетными, способствуют расширению знаний о влиянии низших грибов на биосинтез макроциклических поликетидов стрептомицетами и могут быть использованы при разработке эффективных методов получения такролимуса.

Работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» 16-12 (№ 12081ГУ/2017).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Barreiro C., Martínez-Castro M. Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(2), 497–507. doi: 10.1007/s00253-013-5362-3
2. Trede N.S., Warwick A.B., Rosoff P.M., et al. Tacrolimus (FK506) in allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anemia following orthotopic liver transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1997, 20(3), 257–260. doi: 10.1038/sj.bmt.1700872
3. McCormack P.L., Keating G.M. Tacrolimus: in heart transplant recipients. *Drugs*, 2006, 66(17), 2269–2279. doi: 10.2165/00003495-200666170-00010
4. Remitz A., Reitamo S. Long-term safety of tacrolimus ointment in atopic dermatitis. *Expert Opin. Drug Saf.*, 2009, 8(4), 501–506. doi: 10.1517/14740330902969441
5. Akimoto K., Kusunoki Y., Nishio S., et al. Safety profile of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 2008, 27(11), 1393–1397. doi: 10.1007/s10067-008-0931-z
6. Karpas A., Lowdell M., Jacobson S.K., Hill F. Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89(17), 8351–8355. doi: 10.1073/pnas.89.17.8351
7. Reis S.A., Moussatché N., Damaso C.R.A. FK506, a secondary metabolite produced by *Streptomyces*, presents a novel antiviral activity against Orthopoxvirus infection in cell culture. *J. Appl. Microbiol.*, 2006, 100(6), 1373–1380. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02855.x
8. Benson A., Barrett T., Sparberg M., Buchman A.L. Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2008, 14(1), 7–12. doi: 10.1002/ibd.20263
9. Periyasamy S., Warriar M., Tillekeratne M.P.M., et al. The immunophilin ligands cyclosporin A and FK506 suppress prostate cancer cell growth by androgen receptor-dependent and -independent mechanisms. *Endocrinology*, 2007, 148(10), 4716–4726. doi: 10.1210/en.2007-0145
10. Arndt C., Cruz M.C., Cardenas M.E., Heitman J. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol.*, 1999, 145, 1989–2000. doi: 10.1099/13500872-145-8-1989
11. Klettner A., Herdegen T. FK506 and its analogs – therapeutic potential for neurological disorders. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.*, 2003, 2(3), 153–162. doi: 10.2174/1568007033482878
12. Konofaos P., Terzis J.K. FK506 and nerve regeneration: past, present, and future. *J. Reconstr. Microsurg.*, 2013, 29(3), 141–148. doi: 10.1055/s-0032-1333314
13. Harding M.W., Galat A., Uehling D.E., Schreiber S.L. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, 1989, 341(6244), 758–760. doi: 10.1038/341758a0

14. Foor F., Parent S.A., Morin N., et al. Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast. *Nature*, 1992, 360(6405), 682–684. doi: 10.1038/360682a0
15. Kunz J., Hall M.N. Cyclosporin A. FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem. Sci.*, 1993, 18(9), 334–338. doi: 10.1016/0968-0004(93)90069-Y
16. Rusnak F., Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.*, 2000, 80(4), 1483–1521. doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1483
17. Ban Y.H., Park S.R., Yoon Y.J. The biosynthetic pathway of FK506 and its engineering: from past achievements to future prospects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 43(2-3), 389–400. doi: 10.1007/s10295-015-1677-7
18. Fu L.F., Tao Y., Jin M.Y., Jiang H. Improvement of FK506 production by synthetic biology approaches. *Biotechnol. Lett.*, 2016, 38(12), 2015–2021. doi: 10.1007/s10529-016-2202-4
19. Ordóñez-Robles M., Santos-Beneit F., Albillos S.M., et al. *Streptomyces tsukubaensis* as a new model for carbon repression: transcriptomic response to tacrolimus repressing carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 101(22), 8181–8195. doi: 10.1007/s00253-017-8545-5
20. Turło J.Z., Gutkowska B., Gajzlerska W. Submerged cultivation of *Streptomyces tsukubaensis* in media composed of waste products of food industry. *Acta Pol. Pharm.*, 2006, 63(5), 463–465.
21. Глаголев В.И., Джавахия В.В., Попова Е.Д., Воинова Т.М. Разработка высокопродуктивного штамма продуцента иммуносупрессанта такролимус и оптимизация ферментационной среды для его культивирования. *Международный научно-исследовательский журнал*, 2017, 11(65), 64–70.
22. Martínez-Castro M., Salehi-Najafabadi Z., Romero F., et al. Taxonomy and chemically semi-defined media for the analysis of the tacrolimus producer *Streptomyces tsukubaensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97(5), 2139–2152. doi: 10.1007/s00253-012-4364-x
23. Пошехонцева В.Ю., Фокина В.В., Суходольская Г.В., и др. Влияние состава крахмала на биосинтез иммунодепрессанта такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2019, 55(5), 481–491.
24. Nielsen J.B., Hsu M-Jo, Byrne K.M., Kaplan L. Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: the enzymology of pipecolate incorporation. *J. Biochem.*, 1991, 30(23), 5789–5796. doi: 10.1021/bi00237a023
25. Turło J., Gajzlerska W., Klimaszewska M., et al. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis. *Enzyme Microb. Technol.*, 2012, 51(6-7), 32–39. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.08.008
26. SangJoon M., Sung-Kwon L., Ying-Yu J., Joo-Won S. Improvement of FK506 Production in the High-Yielding Strain *Streptomyces* sp. RM7011 by Engineering the Supply of Allylmalonyl-CoA Through a Combination of Genetic and Chemical Approach. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 26(2), 233–240. doi: 10.4014/jmb.1506.06032
27. Ordóñez-Robles M., Rodríguez-García A., Martín J.F. Genome-wide transcriptome response of *Streptomyces tsukubaensis* to N-acetylglucosamine: effect on tacrolimus biosynthesis. *Microbiol. Res.*, 2018, 217, 14–22. doi: 10.1016/j.micres.2018.08.014
28. Onyewu C., Blankenship J.R., Del Poeta M., Heitma J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, 47(3), 956–964. doi: 10.1128/aac.47.3.956-964.2003
29. Singh N., Heitman J. Antifungal attributes of immunosuppressive agents: new paradigms in management and elucidating the pathophysiologic basis of opportunistic mycoses in organ transplant recipients. *Transplantation*, 2004, 77(6), 795–800. doi: 10.1097/01.TP.0000117252.75651.D6
30. Steinbach W.J., Schell W.A., Blankenship J.R., Onyewu C., et al. In vitro interactions between antifungals and immunosuppressants against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48(5), 1664–1669. doi: 10.1128/aac.48.5.1664-1669.2004
31. Kino T., Hatanaka H., Hashimoto M., et al. FK506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1987, 40(9), 1249–1255. doi: 10.7164/antibiotics.40.1249
32. Vaid S., Pradeep N., Process for producing tacrolimus (FK506) using vegetable oil as sole source of carbon. Patent of USA, 0142424, A1, C 12 N 17/00, C 12 N 1/20, A 61 K 31/4745. 2007.
33. Суходольская Г.В., Лобастова Т.Г., Гулевская С.А., и др., Способ получения такролимуса методом микробиологического синтеза. Патент РФ, 2495937, C 12 N 1/20, C 12 N 15/52, C 12 P 17/18, A 61 K 31/535. 2013.
34. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. М.: Агропромиздат, 1990, 103–116.
35. Xie X., Lipke P.N. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast*, 2010, 27(8), 479–488. doi: 10.1002/yea.1787
36. Унрод В.И., Солодовник Т.В. Хитин- и хитозансодержащие комплексы из мицелиальных грибов: получение, свойства, применение. *Biopolym. Cell.*, 2001, 17(6), 526–533. doi: 10.7124/bc.0005DB
37. Poshekhontseva V.Y., Bragin E.Y., Fokina V.V., et al. Draft Genome Sequence of FK506-Producing *Streptomyces tsukubaensis* Strain VKM Ас-2618D. *Microbiol. Resour. Announc.*, 2019, 8(24), e00510-19. doi: 10.1128/MRA.00510-19

38. Babu A.G., Kim S.W., Adhikari M., et al. A new record of *Gongronella butleri* isolated in Korea. *Mycobiology*, 2015, 43(2), 166–169. doi: 10.5941/MYCO.2015.43.2.166
39. Papineau A.M., Hoover D.G., Knorr D., Farkas D.F. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.*, 1991, 5(1), 45–57. doi: 10.1080/08905439109549790
40. Chen C.Y., Chung Y.C. Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis*. *J. Appl. Oral. Sci.*, 2012, 20(6), 620–627. doi: 10.1590/s1678-77572012000600006
41. Wu T., Zivanovic S., Draughon F.A., et al. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53(10), 3888–3894. doi: 10.1021/jf048202s
42. Badawy M.E.I., Rabea E.I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2011, 2011, 1–29. doi: 10.1155/2011/460381
43. Lippert Hirsch A. Industrial aspects of Vitamin D. In: Vitamin D, 3<sup>rd</sup> edn [Ed. D. Feldman, J. Wesley Pike, J.S. Adams]. Boston, USA: Academic Press, 2011, 73–93.
44. Rasmussen B., Fletcher I.R., Brocks J.J., Kilburn M.R. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature*, 2008, 455(7216), 1101–1104. doi: 10.1038/nature07381
45. Mendes M.V., Recio E., Antyn N., et al. Cholesterol oxidases act as signaling proteins for the biosynthesis of the polyene macrolide pimaricin. *Chem. Biol.*, 2007, 14(3), 279–290. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.01.010

## Effect of Lower Fungi on Tacrolimus Biosynthesis (FK-506) by the *Streptomyces tsukubensis* VKM Ac-2618D Strain

V.Yu. POSHEKHONTSEVA<sup>1,2</sup>, V.V. FOKINA<sup>2,3,\*</sup>, G.V. SUKHODOLSKAYA<sup>2</sup>, A.A. SHUTOV<sup>2</sup>, and M.V. DONOVA<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Pushchino State Natural Science Institute, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

<sup>2</sup>Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

<sup>3</sup>Pharmins, Ltd, Pushchino, Moscow oblast, 142290

\*e-mail: vvfokina@rambler.ru

Received July 17, 2019

Revised August 02, 2019

Accepted August 23, 2019

**Abstract**—The effect of inactivated yeast cells, cell components of yeast cells, and inactivated biomass of the lower fungi of various taxonomic positions on the immunosuppressant tacrolimus (FK-506) biosynthesis by *Streptomyces tsukubensis* VKM Ac-2618D has been studied. The fractions of soluble and insoluble components of yeast cells positively influenced the tacrolimus biosynthesis with its concentrations reaching 447.1±22.4 mg/L and 514.3±25.7 mg/L, respectively. Wherein, the insoluble cell components including cell walls and cytoplasmic membranes had a greater effect. The presence of the baker's yeast whole cells and filamentous fungus *Aspergillus ochraceus* biomass in the complex nutrient medium stimulated the tacrolimus production by *S. tsukubensis* VKM Ac-2618D (667.5±33.4 mg/L and 633.5±31.7 mg/L, respectively). The biomass of deuteromycete *Curvularia lunata* had no effect on the FK-506 biosynthesis (288.4±14.4 mg/L). Conversely, the biomass of fungus *Gongronella butleri* fully inhibited the growth and tacrolimus production by *S. tsukubensis*. The increase in the FK-506 production in media containing cells of the lower fungi is mainly related to the polysaccharide composition of their cell walls rather than the ergosterol content. The results extend the knowledge on the *S. tsukubensis* physiology and could be useful for the development of the tacrolimus biotechnological production.

**Key words:** tacrolimus, biosynthesis, *Streptomyces tsukubensis*, yeasts, fungi, ergosterol

**Acknowledgements**—The study was supported by the FASIE program UMNIK 16-12 (Project no. 12081GU/2017).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-42-50