

# Стандартизация состава питательных субстратов при получении противогрибкового антибиотика

Е.П. Яковлева, В.А. Колодязная, О.В. Топкова

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет;  
Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14А

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Яковлева Елена Павловна** – профессор кафедры биотехнологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (СПХФУ), доктор биологических наук. Тел.: +7 (921) 776-28-26. E-mail: elena.yakovleva@pharminnotech.com

**Колодязная Вера Анатольевна** – заведующая кафедрой биотехнологии СПХФУ, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (921) 570-30-40. E-mail: vera.kolodyaznaya@pharminnotech.com.

**Топкова Оксана Владимировна** – доцент кафедры биотехнологии СПХФУ, кандидат биологических наук. Тел.: +7 (911) 958-94-30. E-mail: oxana.topkova@pharminnotech.com

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** В биотехнологической промышленности в качестве источника углеводов применяют натуральное сырье с нестабильным химическим составом. Обладающие антимикробной активностью синтетические сахара, арилзамещенные производные ксилиты лишены этого недостатка.

**Цель работы** – изучение синтетических сахаров как дополнительного источника углеводов в составе питательной среды, а также как средства защиты процесса культивирования продуцента от возможной контаминации.

**Материал и методы.** Объектом исследования служил продуцент антибиотика имбрицина актиномицет *Streptomyces imbricatus* штамм 0112/90 и синтетические сахара.

**Результаты.** Показано, что синтетические сахара не могут служить дополнительным источником углеводного питания, но обладают антимикробным действием.

**Заключение.** Синтетический сахарид – (3,4-динитрофенил-β-D-ксилоксилопиранозид) в концентрации 0,1% можно рекомендовать для добавления в состав питательной среды в качестве средства защиты от возможной контаминации на стадии ферментации.

**Ключевые слова:** процесс культивирования, арилзамещенные сахараиды, антимикробная активность, контаминация.

**Для цитирования:** Яковлева Е.П., Колодязная В.А., Топкова О.В. Стандартизация состава питательных субстратов при получении противогрибкового антибиотика. Фармация, 2019; 68 (5): 22–26. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-05-04>

## STANDARDIZATION OF THE COMPOSITION OF GROWTH SUBSTRATES FOR OBTAINING AN ANTIFUNGAL ANTIBIOTIC

E.P. Yakovleva, V.A. Kolodyaznaya, O.V. Topkova

Saint Petersburg State Chemopharmaceutical University, 8, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376, Russian Federation

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

**Elena P. Yakovleva** – Professor of the Department of Biotechnology, St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, Doctor of Biological Sciences, Professor. Tel.: +7 (921) 776-28-26. E-mail: elena.yakovleva@pharminnotech.com

**Vera A. Kolodyaznaya** – Head of the Department of Biotechnology of the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor. Tel.: +7 (921) 570-30-40. E-mail: vera.kolodyaznaya@pharminnotech.com

**Oksana V. Topkova** – Associate Professor of the Department of Biotechnology of the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor. Tel.: +7 (911) 958-94-30. E-mail: oxana.topkova@pharminnotech.com

## SUMMARY

**Introduction.** Natural raw materials with their unstable chemical composition are used as a source of carbohydrates in the biotechnology industry. Synthetic sugars, aryl-substituted xylose derivatives possessing antimicrobial activity do not have this disadvantage.

**Objective:** to investigate synthetic sugars as an additional source of carbohydrates in the composition of a growth medium, as well as a means of protecting the cultivation process of a producer from possible contamination.

**Material and methods.** The investigation object was an antibiotic imbricin producer by the actinomycete *Streptomyces imbricatus* strain 0112/90, as well as synthetic sugars.

**Results.** It was shown that synthetic sugars could not serve as an additional source of carbohydrate nutrition, but have an antimicrobial effect.

**Conclusion.** The synthetic saccharide (3,4-dinitrophenyl- $\beta$ -D-xyloxylopyranoside) at a 0.1% concentration can be recommended for addition to the composition of a growth medium as a means of protection against possible contamination at the fermentation stage.

**Key words:** cultivation process, aryl-substituted saccharides, antimicrobial activity, contamination.

**For citation:** Yakovleva E.P., Kolodyaznaya V.A., Topkova O.V. Standardization of the composition of growth substrates for obtaining an antifungal antibiotic. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2019; 68 (5): 22–26. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-05-04>

## Введение

В технологическом цикле получения биотехнологического продукта главной и продуктивной является стадия культивирования продуцента [1, 2]. Для роста и развития продуцента, а также для синтеза целевого биотехнологического продукта необходимо обеспечить его питательными веществами. Углеводы являются одной из важнейших составных частей питательных сред для культивирования продуцентов биологически активных веществ (БАВ). В биотехнологической промышленности в качестве источника углеводов широко применяют натуральные виды сырья, такие как крахмал, кукурузная и пшеничная мука, имеющие нестабильный химический состав [2–4].

Используемое сырье неоднородно по своему составу. Поэтому оно не обеспечивает стандартные условия ферментации, что влияет на качество получаемого биотехнологического продукта.

В настоящей работе в качестве источника углеводов решено было использовать синтетические сахара, относящиеся к классам ксилозы и содержащие различные функциональные группы [4]. Указанные синтетические сахара исследовали, можно ли их использовать как дополнительный источник углеводов в составе питательной среды, а также в качестве средства защиты процесса культивирования продуцента от возможной контаминации. Это и стало целью настоящей работы.

## Материал и методы

Объектом исследования служил актиномицет *Streptomyces imbricatus* штамм 0112/90, из коллекции СПХФУ. Посевной материал продуцента выращивали в течение 48 ч, 10% его пересевали на ферментационную синтетическую среду. Культивирование актиномицета проводили в шейкере-термостате CERTOMAT (*Sartorius*) при температуре  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  ( $n=220$  мин<sup>-1</sup>) в течение 5 сут.

Содержание антибиотика в культуральной жидкости определяли спектрофотометрическим методом.

Антимикробную активность синтетических сахаров устанавливали методом диффузии в агар, используя в качестве тест-микроорганизмов *Staphylococcus aureus* шт. 5а и *Escherichia coli* шт. 112 [3, 5]. Содержание редуцирующих сахаров в исходной питательной среде и в процессе ферментации продуцента антибиотика определяли методом Пеха и Трейси с использованием 2,3,5-трифенилтетразолия [2].

Для моделирования нестерильной ферментации в питательную среду после её стерилизации и на 3-и сутки ферментации продуцента вносили по 1 мл взвеси бактерии *Micrococcus luteus* шт.210. По окончании процесса культивирования определяли наличие жизнеспособных бактерий-контаминантов методом агаровых пластинок [6].

## Результаты и обсуждение

На 1-м этапе исследования изучена антимикробная активность синтетических сахаров в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-культур. Для исследования были предоставлены 13 образцов синтетических сахаров, содержащих, кроме углеводного фрагмента, различные функциональные группы: нитро-, окси-, метокси-, фенильные, нафтильные и др. (см. табл.1).

Согласно данным табл. 1, синтетические сахара обладали разным уровнем антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-бактерий. Вещества SP-4, 12 и 17 не имели биологической активности, а у 4 соединений (SP-2, SP-6, SP-11 и SP-19) отмечали задержку роста только в отношении *S. aureus* шт. 5а. Наибольший уровень антибактериальной активности установлен у 4 соединений (SP-1, SP-3, SP-5, SP-7). Последние и были выбраны для дальнейших исследований.

**Антимикробная активность синтетических сахаров в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-микроорганизмов**

Table 1

**Antimicrobial activity of synthetic sugars against gram-positive and gram-negative test microorganisms**

Обозначения веществ	Химическое название и брутто-формула	Диаметр зон задержки роста, мм	
		<i>S. aureus</i> шт. 5a	<i>E. coli</i> шт. 112
SP-1	4-нитрофенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>7</sub> )	18,7±3,2	10,2±0,8
SP-2	3-нитрофенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>7</sub> )	11,3±0,9	0
SP-3	3,4-динитрофенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> )	21,7±3,2	15,3±1,3
SP-4	2,5-динитрофенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> )	0	0
SP-5	2,4,6-трихлорофенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>5</sub> )	23,8±4,8	17,2±1,9
SP-6	4-метоксифенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> )	15,2±1,1	0
SP-7	2-нафтил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> )	20,4±3,1	11,7±0,6
SP-11	2,4,6-трихлорофенил-α-L-арабинофуранозид (C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>5</sub> )	19,6±2,7	0
SP-12	3,4-динитрофенил-α-L-арабинофуранозид (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> )	0	0
SP-17	Фенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub> )	0	0
SP-18	4-бромфенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> BrO <sub>5</sub> )	12,9±2,3	11,9±2,1
SP-19	3,4-диметилфенил-β-D-ксилопиранозид (C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> )	14,6±1,9	0
SP-20	4-нитрофенил-β-D-ксилобиозид (C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>11</sub> )	16,8±2,4	13,5±1,8

Установить какую-либо зависимость между химическим строением исследуемых соединений и уровнем их биологической активности не представлялось возможным. Например, вещество SP-5, содержащее 2,4,6-трихлорфениловый фрагмент, присоединенный к сахару ксилопиранозе, обладает биологической активностью как в отношении *S. aureus* шт. 5a, так и в отношении *E. coli* шт. 112. Вместе с тем соединение SP-12, содержащее аналогичный фрагмент, но соединенный с арабинофуранозой, не обладало биологической активностью. Определение зависимости между химическим строением синтетических сахаров, содержащих различные функциональные группировки, и их биологической активностью может быть предметом отдельного специального исследования.

Микроорганизмы – продуценты различных БАВ могут потреблять различные углеводы, чаще всего – органические вещества (например, глюкозу) или углеводы растительного происхождения (крахмал, кукурузную муку). Данных об использовании синтетических сахаров как компонентов питательных сред в литературе не найдено.

Синтетический сахар SP-5 был испытан как углеродсодержащий компонент питательной среды. Вещество вносили в состав ферментационной среды в концентрации 1,0 и 2,0% дополнительно к 45 г/л глюкозы, а также полностью заменяли глюкозу на сахарид SP-5. При этом было установлено, что дополнительное внесение синтетического сахара даже в концентрации 2% не влияло на синтез антибиотика. При полной замене глюкозы на синтетический сахарид SP-5 образование антибиотика в процессе культивирования значительно снижалось и актиномицет плохо развивался.

Проанализировали количественное содержание редуцирующих сахаров в питательной среде при добавлении синтетического сахара в разной концентрации. Установлено, что синтетический сахар, содержащий углеводную составляющую, даже внесенный дополнительно в состав среды в большей концентрации (2%) не проявлял свойств редуцирующих сахаров, что характерно при добавлении в среду органических углеводов. Согласно полученным данным, синтетические сахара не могут служить дополнительным

источником углеводного питания в питательной среде для выращивания микроорганизма-продуцента.

Контроль качества биотехнологического продукта осуществляется на всех стадиях производства, начиная от поступления исходного сырья до выпуска готовой продукции. На современных биотехнологических предприятиях вводят правила GMP, которые четко регламентируют правила асептики на производстве. Самым надежным способом защиты целевого продукта является предотвращение контаминации, а не ее выявление и устранение. Для некоторых биотехнологических производств предусмотрено введение в состав питательной среды специальных химических веществ, которые предотвращают рост и развитие посторонней микрофлоры [2–4, 7–9].

Поскольку исследуемые синтетические сахара оказывают антимикробное действие, решено было изучить их влияние на подавление роста посторонней микрофлоры в процессе ферментации продуцента противогрибкового антибиотика. В качестве микроорганизма-контаминанта была выбрана культура *Micrococcus luteus* шт. 210.

Влияние указанной бактерии на процесс культивирования актиномицета *S. imbricatus* изучали в 2 вариантах опытов. Первый вариант – за-

ражение питательной среды – осуществляли в начале ферментации. При этом в исходную ферментационную среду после стерилизации вносили одновременно раствор синтетического сахара SP-5 (концентрация 0,1%) и 1 мл взвеси культуры *Micrococcus luteus* шт. 210 в концентрации 109 клеток. Вторым вариантом – в исходную ферментационную среду после стерилизации вносили стерильный раствор синтетического сахара SP-5 и инфицирование микроорганизмом-контаминантом осуществляли по ходу процесса культивирования.

Как следует из полученных данных (табл. 2), только при инфицировании исходной питательной среды бактерией *Micrococcus luteus* шт. 210, т.е. в самом начале ферментации, синтетический сахар в ее составе подавляет развитие постороннего микроорганизма. Активность культуральной жидкости в этом случае была на уровне контрольной ферментации (1-й вариант). При заражении культуральной жидкости на 3-и сутки ферментации синтез антибиотика значительно снижался (2-й вариант). Каждые сутки ферментации актиномицета *S. imbricatus* отбирали пробы культуральной жидкости, в которых определяли жизнеспособность культуры *Micrococcus luteus* шт. 210. при одновременном росте с продуцентом антибиотика.

Полученные данные свидетельствуют о том, что вещество SP-5, внесенное в исходную ферментационную среду после стерилизации, защищает процесс ферментации от контаминации, подавляя рост бактерии *Micrococcus luteus*. В течение 72 ч ферментации в культуральной жидкости клетки бактерии полностью отсутствовали, а культура продуцента развивалась нормально.

### Заключение

Для предотвращения возможной контаминации на стадии ферментации целесообразно ввести в пропись питательной среды при культивировании продуцента противогрибкового антибиотика, образуемого культурой *Streptomyces imbricatus*, синтетический сахар SP-5 (3,4-динитрофенил-β-D-ксилопиранозид) в концентрации 0,1%.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Таблица 2

### Влияние посторонней микрофлоры на процесс ферментации продуцента противогрибкового антибиотика

Table 2

### Impact of foreign microflora on the fermentation process of antifungal antibiotic producer

Опыты	Содержание противогрибкового антибиотика в культуральной жидкости	
	мкг/мл	%
Контроль	360±8,3	100
1-й вариант. Заражение исходной ферментационной среды после стерилизации в присутствии сахара SP-5	355±9,4	100
2-й вариант. Заражение культуральной жидкости на 3-и сутки ферментации	292±8,1	83

### Литература

1. Луканин А.В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств. М.: ИНФРА-М, 2016; 304.
2. Колодязная В.А., Яковлева Е.П. Технология культивирования продуцентов БАВ. СПб.: изд-во СПХФА, 2016; 72.
3. Габидова А.Э. Анализ микробиологического риска в производстве пищевых продуктов и лекарственных препаратов. СПб.: Проспект науки, 2016; 384.
4. Belakhov V., Dor E., Hershenhorn J. et al. Family of Thiomercuric Derivatives of Sugars: Synthesis Fungicidal Herbicidal Activity and Application to the X-Ray Structure Determination of the Corresponding Enzymes. *Israel Journal of Chemistry*, 2000; 40 (3–4); 177–88.
5. Тихомирова О.М., Гурина С.В. Промышленная асептика в биотехнологическом производстве. СПб.: изд-во СПХФА, 2014; 80.
6. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011; 691.
7. Бакулин М.К., Грудцына А.С., Плетнева А.Ю. и др. Характеристика антибиотической продуктивности бактерий рода *Streptomyces* при культивировании в среде с добавлением карбогала и перфторметилдекалина. *Биотехнология*, 2006; 5; 39–44.
8. Buschke N., Schafer R., Becker J., Witmann C. Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications – optimization of substrate spectrum and process biosynthesis by rational and evolutive strategies. *Bioresour. Technol.*, 2013; 135; 544–4.
9. Mechaly A., Belachov V., Shoham Y., Baasov T. An efficient chemical-enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl  $\beta$ -xylobioside: a chromogenic substrate for xylanases. *Carbohydrate Research*, 1997 (304); 111–5.
2. Kolodyaznaya V.A., Yakovleva E.P. Technology of cultivation of producers of BAS. SPb.: Publishing house SPCP, 2016; 72 (in Russian).
3. Gabidova A.E. Analysis of microbiological risk in production allowance. SPb.: Prospect of Science, 2016; 384 (in Russian).
4. Belakhov V., Dor E., Hershenhorn J. et al. Family of Thiomercuric Derivatives of Sugars: Synthesis, Fungicidal / Herbicidal Activity and Application to the X- Ray Structure Determination of the Corresponding Enzymes. *Israel Journal of Chemistry*, 2000; 40 (3–4); 177–88.
5. Tikhomirova O.M., Gurina S.V. Industrial Asepsis in Biotechnological Production. SPb.: Publishing house SPCPA, 2014; 80 (in Russian).
6. Freshni R.Ya. Culture of animal cells: practical guidance. Moscow: BINOM. Laboratory of Knowledge, 2011; 691 (in Russian).
7. Bakulin M.K., Grudtsyna A.S., Pletneva A.Yu. et al. Characteristics of the antibiotic productivity of bacteria of the genus *Streptomyces* when cultured in a medium supplemented with carbogal and perfluoromethyldecalin. *Biotekhnologiya*, 2006; 5; 39–44 (in Russian).
8. Buschke N., Schafer R., Becker J., Witmann C. Metabolic engineering of industrial platform microorganisms for biorefinery applications – optimization of substrate spectrum and process biosynthesis by rational and evolutive strategies. *Bioresour. Technol.*, 2013; 135; 544–54.
9. Mechaly A., Belachov V., Shoham Y., Baasov T. An efficient chemical-enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl- $\beta$ -xylobioside: a chromogenic substrate for xylanases. *Carbohydrate Research*, 1997; 304; 111–5.

### References

1. Lukanin A.V. Engineering Biotechnology: Foundations of Technology of Microbiological Productions. M.: INFRA-M, 2016; 304 (in Russian).

*Поступила 22 марта 2019 г.*

*Received March 22 2019*

*Принята к публикации 28 мая 2019 г.*

*Accepted May 28 2019*