

МЕТАБОЛІТИ МУТАНТІВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912

Наведено дані дослідження комплексу вторинних метаболітів мутантів *Streptomyces globisporus* 1912. В результаті спонтанного та індукованого мутагенезу отримано штаб суперпродуцент ландоміцину Е (3-1), ряд мутантів (А2, В1, В2, 4ж, 7ж, КЗ-Б), які втратили здатність синтезувати антибіотик ландоміцину Е, а також мутанти, що набули здатності продукувати каротиноїди (4ж, 7ж, R3-4), нову речовину з антибіотичними властивостями (В1, 141, 142, 143) чи накопичувати в значних кількостях регуляторний ізофлавоноїд (В1, 7ж).

За даними наукової літератури, представники роду *Streptomyces* здатні синтезувати біологічно активні речовини, такі як антибіотики, ферменти, пігменти та вітаміни. Досить часто один і той же штаб синтезує одночасно декілька біологічно активних речовин різної хімічної природи [4; 10].

Відомо, що в результаті мутацій, як спонтанної, так і індукованої, можуть виникнути такі зміни в генотипі мікроорганізма, що приведуть до значних змін у складі комплексу синтезованих ним речовин. Створення колекції мутантів штабу продуцента, дослідження їх генетичних та фенотипових характеристик має велике значення для вивчення генетичного контролю біосинтезу антибіотика, для встановлення шляху його синтезу та отримання менш токсичної чи більш активної речовини [3].

У статті представлено результати дослідження метаболітів мутантів, що були отримані в результаті спонтанного та індукованого мутагенезу.

Матеріали та методи дослідження

Як ми вже повідомляли раніше, *S. globisporus* 1912 одночасно синтезує комплекс речовин: антрациклінові антибіотики ландоміцини Е та Д, регуляторний ізофлавоноїд даїдзеїн та ряд інших речовин недослідженої структури [6; 8].

У дослідженні використано штаб дикого типу *S. globisporus* 1912 та ряд його мутантів, отриманих у результаті спонтанного та індукованого мутагенезу. Кілька мутантів (4ж, 7ж, 3-1) було виділено в результаті розсіву вихідної культури *S. globisporus* 1912. Мутанти (А2, В1, В2, 141, 142, 143, R3-4, R3-В) було отримано під дією N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину на протопласти (50 мкг/мл, 60 ХВ) [7].

Метаболіти екстрагували з агаризованого соєвого середовища (4) сумішшю хлороформу й ацетону (2:1), випарювали в роторному вакуумному випарнику при температурі 40-45 °С. Екстракт

розчиняли етанолом і розподіляли методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) в системі бензол – етилацетат – етанол (4:2:1:0,5) на пластинках Silicagel 60 F₂₅₄ фірми «Merck». Після ТШХ розподілення метаболітів носій, що містив окремі речовини, збирали з нього речовини, екстрагували етанолом і піддавали спектрофотометричному дослідженню.

Для одержання каротиноїдів мутант вирощували на агаризованому середовищі S [8], субстратний міцелій збирали, підсушували, розтирали з кварцевим піском і екстрагували гексаном. Розчинник випарювали в роторному вакуумному випарнику при температурі 40–45 °С і після розчинення в ацетоні піддавали спектрофотометричному дослідженню.

Антибіотичну активність мутантів досліджували пригніченням газону тест-культури *S. levoris* 165 [8]. Після розподілення екстракту за допомогою тонкошарової хроматографії методом біоавтографії визначали антибіотичну активність окремих метаболітів: тонкошарову пластинку заливали агаризованим середовищем Оканіші, що містили спори *S. levoris* 165, і інкубували при 37 °С.

Результати досліджень

Streptomyces globisporus 1912 є продуцентом антрациклінового антибіотика ландоміцину Е. Відомо, що антибіотики такої хімічної природи широко застосовуються в хіміотерапії пухлин, але це використання часто обмежене їх значною токсичністю [1; 2].

Метою роботи було накопичення колекції мутантів продуцента ландоміцину Е для дослідження регуляції та шляхів синтезу антибіотика, для вивчення можливості синтезу менш токсичних чи більш активних похідних ландоміцину Е. Завдяки мутагенезу є можливість отримати мутанти, що набули здатності продукувати нові метаболіти, які не синтезує вихідна культура. Мутанти були отримані в результаті як спонтанного, так і індукованого мутагенезу.

В процесі спонтанного мутагенезу було ізольовано, з одного боку, штам 3-1, який продукує антибіотик ландоміцин Е в 10–20 разів більше, ніж вихідна культура, з іншого – отримано ряд мутантів (4ж, 7ж, R3-4), що набули здатності синтезувати червоний пігмент, що не дифундує. Деякі з цих «червоних» мутантів (4ж та 7ж) втратили здатність синтезувати ландоміцин Е. Спектри поглинання цих пігментів характеризуються максимумами абсорбції в ацетоні (446–448, 472–474 та 501–507 нм), притаманними каротиноїду лікопіну [7].

Мутант R3 було отримано в результаті дії нітрозогуанідину на протопласти спонтанного мутанта 3-1 [6]. На відміну від стабільних спонтанних мутантів 4ж та 7ж, індукований мутант R3 є нестабільним. Червоний варіант (R3-Ч) мутанта R3 при моноклональному розсіві утворює з великою частотою жовті (R3-Ж) та білі колонії (R3-Б), з яких останні – стабільні, а жовті колонії можуть утворювати при розсіві червоні та білі. Наші дослідження виявили, що жовті колонії, як і червоні, продукують каротиноїд з тими ж максимумами абсорбції, але в значно меншій кількості.

Заданими наукових досліджень, пучки *crt*-генів, що контролюють біосинтез каротиноїдів, виявлено у деяких видів стрептоміцетів. Так, на одному з кінців генетичної карти лінійної хромосоми *S. coelicolor* A3(2) локалізовано кластер *crt*-генів [14]. Генетичні карти стрептоміцетів характеризуються консервативністю розташування генетичних локусів, і тому можна припустити аналогічну локалізацію *crt*-кластеру у *S. globisporus* 1912. Встановлено, що саме ця ділянка хромосоми є найбільш нестабільною через наявність кінцевих інвертованих повторів [14]. У більшості випадків *crt*-гени перебувають у криптичному стані [15]. Індукується синтез каротиноїдів за допомогою специфічного фактора сігма [13]. Встановлено наявність *crtS* гена, що відповідає за синтез сігма фактора в стресових ситуаціях у *S. setonii* ISP 5395. Можна зробити припущення, що *S. globisporus* 1912 також має кластер *crt*-генів, у якому в результаті спонтанної мутації індукувався синтез каротиноїду лікопіну. Необхідно відзначити стабільність отриманих спонтанних мутацій у більшості «червоних» мутантів.

У результаті обробки М-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідином протопластів мутанта 3-1 було також отримано ряд мутантів (A2, B1, B2, 141, 142, 143), які втратили здатність синтезувати ландоміцин Е [5]. Виявлено, що мутанти B1 та B2 мають блоки на різних етапах синтезу антибіотика [6]. Мутант B1 набув здатності накопичувати ізофлавоноїд дацзеїн у великій кількості. Ця здатність культури накопичувати регуляторний ізофлавонон використовується для розподілення мутантів, які не синтезують антибіотик, на три групи: секретери, які виділяють дацзеїн у середовище в значно більшій кількості, ніж *S. globisporus* 1912 (B1, 141, 142, 143 та R3-4), конвертори, які не синтезують даний регулятор, але можуть використовувати ендогенний (B2) та мутанти, що не реагують на екзогенний даїдзеїн (A2, 4ж та 7ж) [5; 6].

Крім того, було встановлено, що деякі мутанти, які не синтезують ландоміцин Е (B1, 141, 142,

143), набули здатності синтезувати новий метаболіт з антибіотичними властивостями, відсутню у вихідній культурі. Після ТШХ розподілення новий метаболіт має показник хроматографічної рухливості $R_f = 0$ (на відміну від $R_f = 0,5$ ландоміцину). Нова антибіотична речовина характеризується спектром поглинання в етанолі 202–204 нм, у той час як максимум абсорбції ландоміцину Е знаходиться у видимій зоні спектра (450 нм).

Виявлення у мутантів В1, 141, 142, 143 нового метаболіту з антибіотичними властивостями може бути результатом як активації криптичних генів синтезу, так і накопичення мінорного чи модифікованого метаболіту на шляху синтезу

ландоміцину Е (як наслідок блоку біосинтезу в результаті мутації та змін у метаболізмі).

Таким чином, нам вдалося виявити у штаму продуцента антрациклінового антибіотика ландоміцину Е *crt*-гени в критичному стані. З даних наукової літератури відомо, що у мікроорганізмів зміни в синтезі пігментів можуть корелювати зі змінами в синтезі й інших біологічно активних речовин [9]. Також повідомляється, що при селекції продуцентів протипухлинних антибіотиків *S. peucetius* (дауноміцин) та *S. alanosinus* (спіроміцин) з використанням мутагенів було виділено мутанти, які були здатні синтезувати нові антибіотичні речовини. Так, мутанти *S. peucetius* набули здатності синтезувати протипухлинний антибіотик андреаміцин [11; 12].

1. Гарт А. М., Сыркина А. В., Бычков Б. М. Противоопухолевая химиотерапия. - М.: Медицина, 1986. - 339 с.
2. Гаузе Г. Ф., Дудник Ю. В. Противоопухолевые антибиотики. - М.: Медицина, 1987. - 175 с.
3. Жукова Р. А., Комунарская А. Д., Пронина М. И., Терезин И. А., Журавлева Н. П., Шабаш М. Н. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов. - Л.: Медицина, 1978. - 160 с.
4. Ингча Е. Ф., Тулемисова К. А., Голубчиков В. С., Никитин Е. Т. Сравнение антибиотических комплексов, образуемых культурами *Streptomyces griseoruber* II Антибиотики и химиотерапия - 1989, -Т. 34. -№ 1. -Р. 13-16.
5. Лутченко В. А., Полищук Л. В., Мацелюх Б. П. Властивості деяких мутантів *Streptomyces globisporus* 1912 II Науковий вісник Чернівецького університету. -2004. -Вип. 194. -Сер. Біологія, - С. 27-33.
6. Мацелюх Б. П., Лаврінчук В. Я. Одержання і характеристика мутантів *Streptomyces globisporus* 1912 дефектних по біосинтезу ландоміцину Е // Мікробіол. журн. - 1999-Т. 61. - № 4-С. 22-26.
7. Мацелюх Б. П., Лутченко В. А., Полищук Л. В. Синтез каротиноїдів мутантними штамами *Streptomyces globisporus* 1912 II Мікробіол. журн.-2003. - Т. 65.-№ 6- С. 24-29.
8. Полищук Л. В., Дехтяренко Т. Д., Стефанишин Е. Е., Заверуха В. Б., Козырицкая В. Е. Плазмиды стрептомицетов глобиспориновой группы // Микробиол. журнал. - 1985. -Т. 47.- № 4. - С. 83-88.
9. Шугаева М. Х. Изменчивость пигментных актиномицетов Алма-Ата: Наука, 1968. - 175 с.
10. Bianchi M. L., Grein A., Julita P., Marnati M. P., Spalla C. *Streptomyces mediolani* (Arcamone et al.) emend. Bianchi et al. and its production of carotenoids. Zeitschrift für allg. Microbiologie - 1970 - V. 10. - № 4 - P. 237-244.
11. Huk J., Blumaerova M. Streptomyces producing daunomycin and related compounds: do we know enough about them after 25 years? // Folia Microbiol. - 1989 - V. 34. - № 4. - P. 111-123.
12. Kanzawa F., Nashio K., Fukuoka K., Sunami T., Saijo N. In vitro interaction of a new derivative of spiramycin, KRNS5500 and other anticancer drugs using a three-dimensional model // Cancer Chemother. Pharmacol. - 1999 - V. 43. - № 5. - P. 353-363.
13. Kato E, Hino T., Nakaji A, et al. Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene *crtS*, whose product is similar to a sigma factor // Mol. Gen. Genet. - 1995 - V. 247. - № 4. - P. 387-390.
14. Kieser T., Bibb M. J. et al. Practical Streptomyces genetics. - Norwich: The John Innes Foundation, 2000. - 613 p.
15. Schumann G., Nurnberger H., Sandman G., Krugel H. Activation and analysis of cryptic *crt*-genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus* // Mol. Gen. Genet. - 1996 - V. 252 - P. 658-666.

L. Polishchuk, V. Lutchenko, B. Matselyukh

METABOLITES OF *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 MUTANTS

Investigation findings of secondary metabolites complexes of *Streptomyces globisporus* 1912 mutants were represented. Strain superproducer of landomycin E (3-1), some mutants (A2, B1, B2, 4ж, 7ж, R3-E) which had lost ability to produce antibiotic landomycin E, another ones which obtained ability to synthesize carotenoid (4ж, 7ж, R3-4) or new substance with antibiotic properties (B1, 141, 142, 143) and strains superproducers of regulative isoflavonoid (B1, 7ж) were results of spontaneous and inductive mutagenesis.