

на правах рукописи

Пошехонцева Вероника Юрьевна

**БИОСИНТЕЗ МАКРОЦИКЛИЧЕСКОГО ПОЛИКЕТИДА
ТАКРОЛИМУСА ШТАММАМИ *STREPTOMYCES TSUKUBAENSIS***

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2021

Работа выполнена в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Научный руководитель: **Донова Марина Викторовна,**
доктор биологических наук [03.02.03 – микробиология], Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пушкино, лаборатория микробиологической трансформации органических соединений, главный научный сотрудник

Официальные оппоненты: **Коршунова Татьяна Юрьевна,**
доктор биологических наук [03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)], Уфимский Институт биологии – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения Уфимского Федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа, лаборатория биотехнологий, ведущий научный сотрудник

Потехина Наталья Викторовна,
доктор биологических наук [03.02.03 – микробиология], Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, лаборатория физиологии и биохимии микробов Кафедры микробиологии Биологического факультета, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, Факультет биотехнологии и биологии, г. Саранск

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. в _____ ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по защите прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 350.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Разработка эффективных способов производства иммуносупрессорных агентов нового поколения является важным направлением биотехнологии, прикладной микробиологии и биомедицины. Одним из наиболее востребованных в медицинской практике препаратов является такролимус (FK-506) – 23-членный макроциклический природный поликетид.

Наряду с другими известными макролидами (рапамицин, аскомицин) и их некоторыми производными такролимус подавляет иммунный ответ; востребован в хирургической практике для предотвращения отторжения чужеродных органов и тканей при их пересадке (Rath, 2013), а также в терапии атипичных дерматитов: псориаза, гангренозной пиодермии и др. (Akimoto *et al.*, 2008; Venson *et al.*, 2008), аутоиммунных болезней: ревматоидного артрита, красной волчанки и др. (Karvas *et al.*, 1992; Mortola *et al.*, 1998; Briggs *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2006). Такролимус и другие макролиды проявляют антимикробную активность против различных бактерий, дрожжей, паразитов и грибов, ингибируя их рост; перспективен для применения в терапии злокачественных опухолей (Periyasamy *et al.*, 2007).

Препараты на основе такролимуса демонстрируют неуклонный прирост в общем объеме фармацевтического рынка в связи с ростом числа пациентов, перенесших трансплантацию органов, а также с открытием его новых терапевтических эффектов. В связи с этим актуальной является задача разработки эффективных способов его биосинтеза.

В мировой практике биосинтез такролимуса осуществляют природными, мутантными и генетически модифицированными штаммами актинобактерий рода *Streptomyces*. К настоящему времени описано свыше 15 штаммов-продуцентов такролимуса (Barreiro and Martínez-Castro, 2014). Анализ данных патентной и научной литературы свидетельствует о том, что основными проблемами, препятствующими эффективному практическому получению макролидов, в большинстве случаев являются низкий уровень биосинтетической активности и ее недостаточная стабильность у ряда штаммов-продуцентов, их выраженная диссоциация и фенотипическая изменчивость, окислительная деградация такролимуса на конечных этапах биосинтеза, образование нежелательных побочных продуктов, таких как аскомицин (FK-520), обуславливающее низкую эффективность процедуры выделения и очистки конечного продукта.

В связи с этим актуальными проблемами являются поиск и изучение новых микробных продуцентов и разработка на их основе эффективных способов биосинтеза такролимуса.

Степень разработанности темы. Такролимус «Tsukuba Macrolide Immunosuppressant» впервые был обнаружен в культуральной жидкости актиномицета *Streptomyces tsukubaensis* в 1984 г. во время скрининга, проводимого компанией «Fujisawa Pharmaceutical Co.» (в настоящее время «Astellas Pharma Inc.»). Штамм-продуцент был выделен из образца почвы в регионе Цукуба (Япония), а такролимус стал первым иммунодепрессантом с макролидной структурой (Kino *et al.*, 1987a; 1987b). С тех пор исследования по поиску новых продуцентов, селекции, изучению и улучшению биосинтетических свойств штаммов, продуцирующих такролимус и его структурные аналоги, интенсивно ведутся во многих странах.

Согласно современным представлениям, такролимус синтезируется гибридной системой, состоящей из поликетидсинтазы I и нерибосомальной пептид-синтетазы (PKSI-NRPS). Система PKSI-NRPS кодируется *fkб*-кластером генов, включающим, по крайней мере, 19 генов – так называемый кластер с редуцированным набором генов (представлен у штаммов *S. tacrolimicus*, *S. kanamyceticus*), а так называемый кластер с полным набором ге-

нов содержит 25-26 генов (штаммы *S. tsukubaensis* NRRL 18488^T, *S. tsukubaensis* L19 и *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP) (Goranovič *et al.*, 2012).

В последние десятилетия исследования по увеличению продукции такролимуса, главным образом, сосредоточены на оптимизации состава питательных сред (Singh and Behera, 2009; Martínez-Castro *et al.*, 2013 и др.) и генной инженерии штаммов (Mo *et al.*, 2009; 2013; 2016; Van *et al.*, 2016 и др.). Биосинтез FK-506 осуществляют в богатых питательных средах, содержащих органические источники углерода и азота, аминокислоты, витамины. Благодаря достижениям транскриптомики, протеомики и метаболомики многократно возросли возможности улучшения биотехнологических процессов получения такролимуса. Метаболомный анализ позволил идентифицировать ключевые интермедиаты биосинтеза макролида, что стало основой рациональной стратегии дизайна питательных сред. Существенно повысить выход целевого продукта позволяет внесение в среду близких предшественников такролимуса (Huang *et al.*, 2013a; 2013b; Turlo *et al.*, 2012), таких как шикимат, хоризмат, однако их использование в промышленных технологиях ограничивается их высокой стоимостью и существенным удорожанием продукта (Zhu *et al.*, 2010).

Несмотря на клиническую значимость такролимуса, многие аспекты его биосинтеза остаются невыясненными. Некоторые результаты не могут быть однозначно интерпретированы в связи со значительными физиологическими различиями, зависящими от штамма и условий культивирования. Имеются лишь отрывочные сведения, касающиеся утилизации ряда сложных источников углерода и азота стрептомицетами, продуцирующими такролимус и другие макролиды.

Таким образом, существующий дисбаланс между клинической востребованностью такролимуса и низкой производительностью его продуцентов определяет необходимость поиска перспективных такролимус-синтезирующих штаммов, обладающих высоким промышленным потенциалом, и разработки экономически выгодных способов производства данного макролида.

Целью исследования являлось исследование особенностей биосинтеза такролимуса штаммами *Streptomyces* spp. и разработка эффективного биотехнологического способа его получения.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Сравнительная оценка штаммов стрептомицетов, продуцирующих такролимус, уточнение таксономического положения и изучение морфофизиологических особенностей наиболее активного штамма-продуцента. Установление условий поддержания штамма в стабильно активном состоянии;
2. Выявление факторов, способствующих повышению эффективности биосинтеза такролимуса. Оптимизация условий роста и биосинтеза такролимуса для повышения продуктивности штамма;
3. Изучение влияния состава и структуры сложных полимеров (крахмалов), клеток низших эукариотов (дрожжей и грибов), а также полимерных сорбентов на биосинтез такролимуса;
4. Разработка способа микробиологического синтеза такролимуса;
5. Масштабирование биопроцесса и разработка метода выделения такролимуса. Получение субстанции такролимуса высокой степени очистки.

Научная новизна. Охарактеризованы два новых такролимус-продуцирующих штамма стрептомицетов – *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *S. tsukubensis* Т60. Показаны преимущества *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в качестве продуцента такролимуса. Расшифрован полный геном *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и выявлено наличие кластера биосинтеза такролимуса с полным набором генов (26 генов).

Изучена фенотипическая изменчивость штамма и определен колониально-морфологический вариант, обеспечивающий высокий уровень продукции такролимуса. Определены критерии селекции высокопродуктивных диссоциантов данного штамма и выявлены условия их поддержания в стабильно активном состоянии. Впервые установлен эффект стимуляции биосинтеза такролимуса у стрептомицетов клетками низших эукариотов (дрожжей и мицелиальных грибов), содержащих в клеточной стенке глюкозаны, маннаны, и хитин.

Выявлены условия культивирования и биосинтеза, способствующие образованию целевого поликетиды. Впервые изучено влияние высоко- и низкомолекулярных крахмалов различной структуры на биосинтез такролимуса и найдены условия, обеспечивающие повышение его выхода в условиях периодического культивирования с подпиткой.

Изучено влияние полимерных сорбентов различного типа и показаны преимущества бромированного стирол-дивинилбензолного сорбента, обеспечивающего повышение эффективности биосинтеза за счет снижения нежелательной деструкции такролимуса, а также упрощения процедуры его выделения из культуральной среды. С применением оригинального метода очистки получен кристаллический продукт высокой степени очистки, по качественным показателям соответствующий требованиям современной фармакопеи.

Теоретическая и практическая значимость работы. Штамм *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и разработанная на его основе биотехнология могут быть рекомендованы в качестве основы для промышленного получения высоковольтребованной фармацевтической субстанции такролимуса по технологии полного цикла.

Результаты исследования генома *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д могут быть использованы для получения новых продуцентов с улучшенными биосинтетическими возможностями.

Предложенные в данном исследовании методы и подходы могут быть применены также в биосинтетических процессах производства других высоковольтребованных поликетидов (рапамицина, аскомицина и др.). Это касается применения полимерных сорбентов стирен-дивинилбензольного ряда для предотвращения биодегградации поликетидов и облегчения процедуры выделения целевых макролидов из ферментационных сред, а также дизайна питательных сред для этапов культивирования и биосинтеза, режимов ферментации, способов поддержания диссоциантов в стабильно активном состоянии, уникальных способов очистки целевых макролидов от близких структурных аналогов.

Полученные результаты вносят вклад в понимание физиологических особенностей стрептомицетов, продуцирующих макроциклические поликетиды, и факторов, способствующих их максимальной продукции в процессах биосинтеза.

Личный вклад автора. Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Продуцирующие такролимус штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 относятся к виду *Streptomyces tsukubensis*. Штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д превосходит *S. tsukubensis* Т60 по целевой биосинтетической активности;
2. Филогенетический анализ, хемотаксономические характеристики и анализ полного генома штамма ВКМ Ас-2618Д подтверждают его видовую принадлежность (*Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д). Геном содержит кластер из 26 генов биосинтеза такролимуса, включая гены *fbkR*, *tcs6*, *allSOPNM*, отсутствующие в аналогичных

кластерах других продуцентов такролимуса, таких как *S. tacrolimicus* ATCC 55098 и *S. kanamyceticus* КСТС 9225;

3. В условиях роста и биосинтеза такролимуса наблюдается диссоциация штамма с образованием нескольких вариантов, различающихся по морфологии колоний. Выявлен диссоциант, обладающий максимальной биосинтетической активностью. Оптимизированный режим хранения обеспечивает длительное сохранение стабильной активности диссоцианта;
4. Синтез такролимуса наиболее интенсивно протекает в среде, содержащей растворимый крахмал, клетки пекарских дрожжей, кукурузный экстракт, сульфат марганца (II), лизин, в условиях периодического культивирования с подпиткой. Оптимальными для биосинтеза такролимуса условиями являются нейтральный pH среды, температура 24-26°C и степень аэрации не менее 30%. Сорбция такролимуса в процессе ферментации на полимерных смолах предотвращает его деструкцию продуцентом и способствует облегчению процедуры выделения из культуральной среды;
5. Разработанный микробиологический способ получения такролимуса масштабирован до лабораторно-технологического уровня с выходом целевого продукта 701 ± 52 мг/л. Разработан метод выделения и очистки такролимуса фармакопейной чистоты (99,8%) с выходом не менее 50%.

Степень достоверности и апробация результатов. Математическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программ «Microsoft Word 2016», «Microsoft Excel 2016» и «SigmaPlot ver. 12.5». Массив экспериментальных данных получен с использованием современных методов и оборудования в трех-пятикратной повторности; результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке.

Основные результаты диссертации были представлены на российских и международных конференциях: Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, Россия, 2014), II Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Современные проблемы микробиологии, иммунологии и биотехнологии» (Пермь, Россия, 2015), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2016» (Москва, Россия, 2016), 19-й и 20-й Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия, 2015; 2016), II, III и IV Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино, Россия, 2015; 2016; 2017), I Российском Микробиологическом конгрессе (Пущино, 2017), стендовых конференциях молодых ученых ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН (Пущино, Россия, 2014; 2015), в рамках проекта «УМНИК» (Пущино, 2017-2019) и государственного задания (№0114-2018-0004).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 18 печатных работах, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в реферативную базу РИНЦ, международные реферативные базы по научным публикациям WoS и Scopus. Часть научно-технических решений защищена Патентом РФ 2722699.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность научному руководителю д.б.н. Доновой Марине Викторовне за внимание и помощь в работе, а также всему коллективу Лаборатории микробиологической трансформации органических соединений за практическую помощь и поддержку при написании диссертации. Особую благодарность автор выражает сотрудникам ИБФМ РАН: м.н.с. Шутову А.А. за проведение ВЭЖХ-анализа такролимуса и его производных; к.б.н. Рыжмановой Я.В. за помощь в проведении филогенетического анализа; с.н.с., к.б.н. Арискиной Е.В. за

помощь в определении Г+Ц состава ДНК и проведении анализа ДНК-ДНК гибридизации *in vitro*; н.с., к.б.н. Стародумовой И.П. и н.с. Тарлачкову С.В., с.н.с. к.б.н. Фокиной В.В. за помощь в проведении биоинформатического анализа и ДНК-ДНК гибридизации *in silico*; с.н.с., к.б.н. Сузиной Н.Е. за помощь в проведении микроскопических исследований; Кошелеву А.В. и другим сотрудникам УЛФ за помощь в работе с ферментерами. Автор приносит благодарность с.н.с., к.б.н. Штратниковой В.Ю. за проведение полногеномного секвенирования; с.н.с., к.х.н. Николаевой В.М. и сотрудникам компании ЗАО «БиоХимМак» (г. Москва) за помощь в разработке способа выделения и очистки такролимуса, сотрудникам ЦКП «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта за секвенирование последовательности гена 16S рРНК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа содержит 149 страниц машинописного текста, включает 18 таблиц и 43 рисунка. Библиография содержит 274 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микроорганизмы. Штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д, *Streptomyces* sp. Т60 и *Streptomyces tacrolimicus* ATCC 55098^T были предоставлены ООО «Фарминс» (г. Пушкино, РФ), штаммы *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-830, *Curvularia lunata* ВКМ F-644 и *Gongronella butleri* ВКМ F-1033 – получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Культуры стрептомицетов поддерживали при 4°С на среде (МДА) состава (г/л): крахмал растворимый – 10, дрожжевой экстракт – 4, солодовый экстракт – 10, агар – 20, рН 6,8-7,0. Культуры грибов поддерживали на 3% солодовом агаре.

Морфологию колоний штаммов стрептомицетов описывали согласно стандартному протоколу ISP (International Streptomyces Project; Shirling and Gottlieb, 1966), использовали следующие ISP среды: ISP-1 (агар с триптоном и дрожжевым экстрактом), ISP-2 (агар с дрожжевым экстрактом и солодовым экстрактом), ISP-3 (овсяной агар), ISP-4 (агар с неорганическими солями и крахмалом), ISP-5 (глицерин-аспарагиновый агар). Тип и орнамент споровой цепи изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6510LV («JEOL», Япония).

Физиолого-биохимические и хемотаксономические характеристики. Способность штаммов стрептомицетов утилизировать различные субстраты в качестве единственного источника углерода определяли с помощью набора тестов API 50 CH. Энзиматические активности штаммов определяли с помощью набора ферментативных экспрестестов API ZYM. Очищенные препараты клеточных стенок получали по методу Schleifer и Kandler (1972). Определение аминокислотного состава препаратов пептидогликанов проводили на аминокислотном анализаторе фирмы Hitachi (Япония). Выделение и очистку изопреноидных хинонов проводили по методике Collins и Jones (1981), состав менахинонов определяли на масс-спектрометре MAT 8430 (Германия). Состав жирных кислот определяли по методу Evtushenko *et al.* (1989). Метилвые эфиры жирных кислот анализировали на газовом хроматографе Perkin-Elmer F-17 (Германия).

Молекулярно-генетические методы. Выделение и очистку хромосомной ДНК проводили модифицированным методом Marmur (1961). Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония). Амплификацию гена 16S рРНК осуществляли на амплификаторе «Герцик» («ДНК-Технология», РФ). Для амплификации ис-

пользовали универсальные бактериальные праймеры 27f (AGAGTTT-GATC(A/C)TGGCTCAG) и 1492r (ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT). Секвенирование нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 («Applied Biosystems», США) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1. Филогенетический анализ и построение дендрограмм проводили с помощью пакета программ MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) с применением метода «neighbor-joining» (Saitou *et al.*, 1987).

Библиотеку из фрагментов ДНК (300-400 п.н.) получали с помощью набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit для Illumina. Секвенирование библиотеки проводили на Illumina HiSeq 2500 с использованием HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2 и HiSeq Rapid SBS Kit v2 (500 циклов). Качество полученных прочтений оценивали с помощью FastQC 0.11.8 (Andrews, 2010). Удаление фрагментов адаптеров и PhiX проводили с использованием BBDuk v38.35. Затем проводили очистку прочтений от возможной контаминации человеческой ДНК. Сборку очищенных прочтений осуществляли с помощью SPAdes v3.13.0 (Bankevich *et al.*, 2012). Аннотацию генома выполняли с помощью сервиса NCBI PGAAP. Среднюю нуклеотидную идентичность (ANI) и цифровую ДНК-ДНК гибридизацию (dDDH) рассчитывали, используя программу JSpecies 1.2.1 (Richter and Rossello-Mora, 2009) и сервис GGDC 2.1 (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013), соответственно.

Содержание ГЦ-пар в ДНК определяли по температуре плавления ДНК (Mesbah *et al.*, 2011; Owen *et al.*, 1985). Постановку реакции ДНК-ДНК-гибридизации проводили в соответствии с протоколом Rossello-Mora *et al.* (2011).

Биосинтез такролимуса. Посевную культуру (инокулят) растили на среде состава (г/л): глюкоза – 1, крахмал растворимый – 10, дрожжевой экстракт – 5, хлопковая мука – 7, триптон – 2, MgSO₄×7H₂O – 0,05 (рН 7,0) в два этапа (48 и 24 ч) в аэробных условиях на шейкере-инкубаторе Multitron Standard («Infors HT», Швейцария) при 200-220 об/мин и 24-30°C. Биосинтез такролимуса в колбах осуществляли в среде состава (г/л): крахмал растворимый – 45, кукурузный экстракт – 10, сухие пекарские дрожжи – 10, CaCO₃ – 3, (рН 6,5-8,0) в колбах 750 мл, содержащих 50-300 мл среды в условиях, описанных выше, в течение 7-15 суток. Среду инокулировали 10% об. посевной культуры.

Биосинтез такролимуса в ферментерах АНКУМ-2М объемом 10 л проводили в оптимизированной среде, дополнительно содержащей 0,4 мл/л пеногасителя «Лапрол», в условиях периодического культивирования с подпиткой при температуре 25°C, скорости перемешивания 300-1000 об/мин, концентрации растворенного кислорода (рO₂) 30-60%, рН 6,5-7,5 в течение 10 суток. Инокулят вносили в количестве 5% об.

Оптимизация условий биосинтеза. Оценивали влияние источников углерода и азота, ионов металлов, сорбентов, рН среды, температуры и аэрации.

В качестве источников углерода использовали крахмал, глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, глицерин и инозит в концентрациях 5-90 г/л. Дополнительно в среде с крахмалом изучали влияние глюкозы, ксилозы, арабинозы, фруктозы, L-рамнозы, маннозы, мальтозы, сахарозы, инозита, которые добавляли в питательную среду вместе инокулятом или на 3 сутки биосинтеза в концентрациях 5-20 г/л.

В качестве источников азота использовали кукурузный и дрожжевой экстракты, кислотный и ферментативный гидролизаты казеина, сухие пекарские дрожжи, соевую и хлопковую муку, соевый пептон в концентрациях 5-20 г/л. Дополнительно в среде с кукурузным экстрактом исследовали влияние (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, KNO₃, NH₄NO₃, которые вносили одновременно с посевной культурой или на 3 сутки биосинтеза в концентрации 2-4 г/л.

Влияние аминокислот L-метионина и L-лизина (0,01-5,0 г/л), а также солей металлов ($MgSO_4$ (0,1-1,0 г/л), $MnSO_4$ (0,05-0,2 г/л), $ZnSO_4$ (0,01-0,04 г/л), $FeSO_4$ (0,01-0,05 г/л), и их комбинаций оценивали в тех же условиях.

В экспериментах по предотвращению деградации такролимуса продуцентом использовали сверхсшитые макропористые сорбенты XAD-4, XAD-7 HP и XAD-16, SP-207, HP-20, HP-21 и HP2MG в концентрациях 20, 40 и 60 г/л. Сорбенты вносили в среду одновременно с инокулятом или через двое-трое суток биосинтеза.

Влияние температуры на биосинтез такролимуса исследовали в диапазоне от 20 до 36°C; pH в интервале 5,5-9,0. Влияние аэрации на биосинтез такролимуса (в колбах) исследовали варьированием соотношения объема среды к объему колбы – 1:15 (коэффициент заполнения 6,7%), 1:7,5 (13,3%), 1:3,75 (26,5%) и 1:2,5 (40%).

Определение состава крахмалов и декстринов. Качественную и количественную оценку состава крахмалов и декстринов проводили согласно ГОСТ 10163-76, а также по методу Закировой *с соавт.* (2010), Рихтера *с соавт.* (1975). Определение редуцирующих веществ (РВ) осуществляли по методу Gusakov *et al.* (2011), связанной глюкозы – по методу Sinner и Puls (1978).

Фракционирование клеток пекарских дрожжей. Сухие пекарские дрожжи растворяли в стерильном физиологическом растворе, выдерживали при 4°C в течение 24 ч, затем замораживали при -70°C, разрушали на френч-прессе. Гомогенат, осадок и супернатант, полученные из гомогената центрифугированием при 800 x g и 4°C в течение 15 мин, добавляли в среду для биосинтеза вместо сухих пекарских дрожжей в эквивалентных количествах.

Получение мицелия грибов. Грибы растили в среде следующего состава (г/л): крахмал растворимый – 45, дрожжевой экстракт – 3, кукурузный экстракт – 10, $CaCO_3$ – 3, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5, $FeSO_4$ – 0,05 (pH 6,5-6,8) в аэробных условиях при 220 об/мин и 28°C в течение 48 ч. Мицелий дважды отмывали стерильной дистиллированной водой, отжимали и высушивали до постоянного веса при 65°C. Измельченный мицелий в концентрации 15 г/л добавляли в среду биосинтеза вместо сухих пекарских дрожжей.

Выделение и очистка такролимуса. Сорбент отмывали водой от мицелия и остатков среды, взвесь мицелия удаляли вакуумным насосом. Такролимус элюировали с сорбента водно-ацетоновой смесью. Фракции, содержащие такролимус, упаривали на роторном испарителе, такролимус экстрагировали 10-кратным объемом толуола.

Предварительную очистку такролимуса осуществляли на сорбентах Диасорб-100-Диол и HP2MG; сорбент упаковывали в колонку 120×14 мм (объем 18,5 мл) и уравнивали изооктаном. Такролимус элюировали ступенчатым градиентом ацетона (от 10 до 30 % об.) в изооктане. Фракции, содержащие такролимус, упаривали под вакуумом.

Финишную очистку такролимуса проводили с использованием сорбентов Relisorb SP400/SS, Dowex 50WX8, Диасфер-АК-СП-100, Диасорб-60-СП, Диасорб-100-Сульфид; сорбент упаковывали в колонку 140×14 мм (объем 21,5 мл). В качестве подвижных фаз использовали смеси изооктан/ацетон, метанол/этилацетат, ацетон/ацетонитрил. Фракции, содержащие такролимус, после финишной очистки упаривали на роторном испарителе, кристаллизовали из ацетонитрила.

Анализ такролимуса осуществляли методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1200 («Agilent Technology», Германия) с колонкой LiChrospher®100 RP-18 (5 мкм, 125 мм × 4 мм) («Merck», США) и с предколонкой Daltosil 100, RP-18 (4 мкм, 4,6 мм × 76 мм) («Serva», Германия). Состав мобильной фазы: вода, ацетонитрил, метил-трет-бутиловый эфир, трифторуксусная кислота (58,3:34,4:7,3:0,01, об./об.); скорость потока 1,5 мл/мин; температура 60°C. Детекцию осуществляли при 200

нм. Качественное и количественное определение такролимуса на стадии предварительной и финишной очистки проводили на хроматографе Smartline («Knauer», Германия) с колонкой Диасфер-130-Нитрил (5 мкм, 4×250 мм) (ЗАО «БиоХимМак СТ», РФ). Условия хроматографии: состав мобильной фазы – изооктан/метил-трет-бутиловый эфир/ацетонитрил (6:3:1, об./об.), скорость потока 0,8 мл/мин, температура колонки 25°C. Детекцию проводили при 220 нм.

Качественный состав продукта (наличие примесей – дезметилтакролимус, С8-эпимер такролимуса и С8-пропил-аналог такролимуса) определяли согласно методике, описанной в USP 37 - NF 32 (2013). Анализ такролимуса проводили на хроматографе PlatinBlue («Knauer», Германия) с колонкой BlueShell 80-C18 (4,5 мкм, 3×150 мм) («Knauer», Германия). Условия хроматографии: изократическое элюирование А/Б = 68:32 % об., где А – 6 мМ фосфорная кислота/смесь ацетонитрил – метил-трет-бутиловый эфир (81:19 % об.), смешанные в соотношении 80:20 % об.; Б – 6 мМ фосфорная кислота/смесь ацетонитрил – метил-трет-бутиловый эфир (81:19 % об.), смешанные в соотношении 20:80 % об.; скорость элюента 0,7 мл/мин, температура колонки 60°C. Детекцию осуществляли при 220 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Морфофизиологические и филогенетические характеристики штаммов *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60

Культурально-морфологические свойства. На ISP средах, традиционно используемых для таксономического описания стрептомицетов, штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 образовывали плотные, матовые колонии с выраженной структурной дифференциацией поверхности (рис. 1а, б).

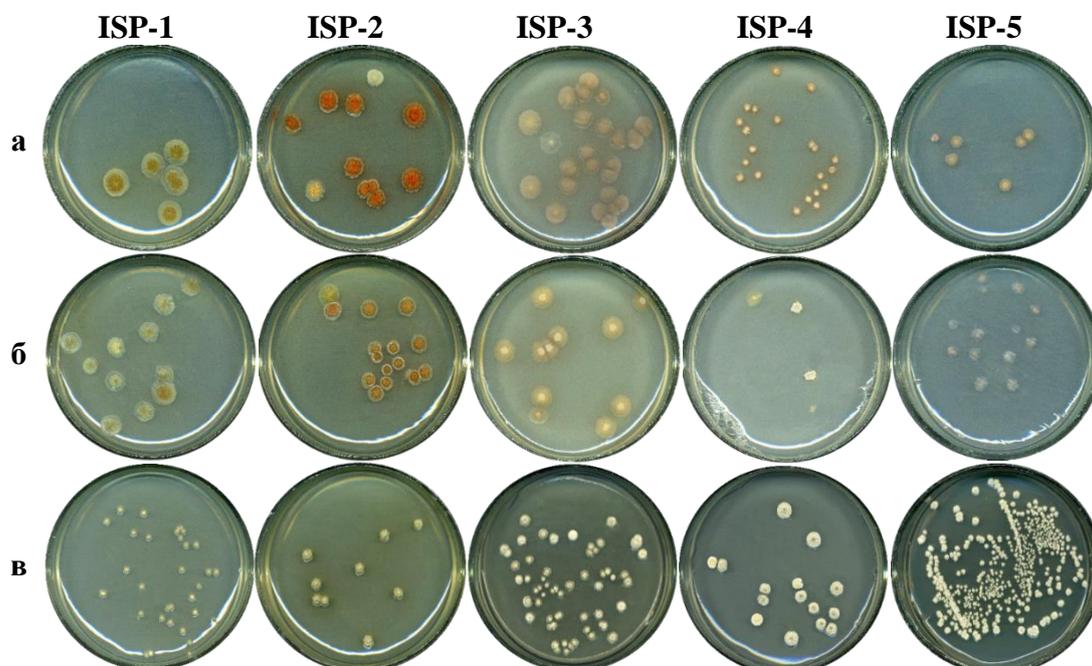


Рисунок 1 – Морфология колоний *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д (а), *Streptomyces* sp. Т60 (б) и *S. tacrolimicus* ATCC 55098^T (в) на ISP-средах

Цвет колоний варьировал от розовато-оранжевого до кирпично-оранжевого, интенсивность окрашивания зависела от состава сред, условий и длительности культивирования (рис. 1а, б). *Streptomyces* sp. Т60 на большинстве сред проявлял умеренное спорообразова-

ние (сероватый налет) (рис. 1б). Штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д являлся олигоспоровым (рис. 1а).

В отличие от вышеуказанных штаммов, *S. tacrolimicus* ATCC 55098^T образовывал мелкие колонии сходной архитектоники, тусклой буровато-желтой окраски, интенсивно спорулировал и почти не подвергался морфологической диссоциации (рис. 1в).

Для всех штаммов характерно образование разветвленного субстратного мицелия, дифференцирующегося в прямые цепочки цилиндрических спор с гладкой поверхностью (рис. 2).

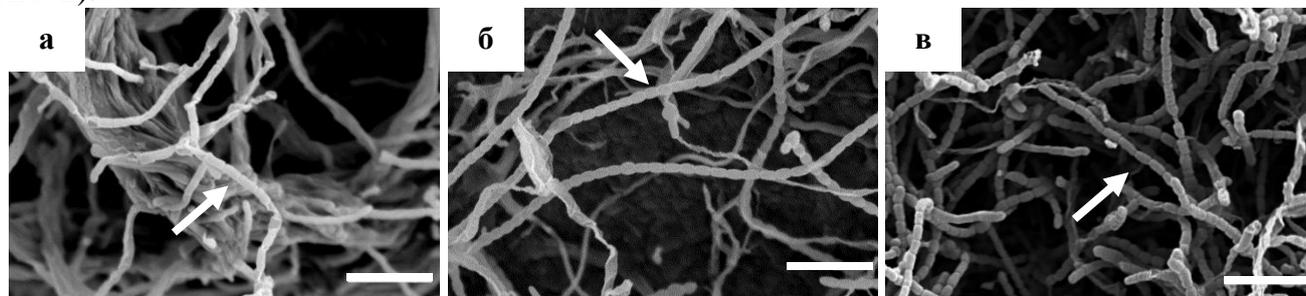


Рисунок 2 – Морфология спорных цепей при сканирующей электронной микроскопии: а – *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д, б – *Streptomyces* sp. Т60, в – *S. tacrolimicus* ATCC 55098^T (длина масштабной линейки – 5 мкм)

Физиолого-биохимические особенности. Все штаммы росли в аэробных условиях в диапазоне температур от 22 до 35°C с оптимумом при 28°C и концентрации NaCl ≤7%. Штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и Т60 в качестве единственного источника углерода и энергии утилизировали D-глюкозу, декстрин, глицерин, крахмал, D-рибозу и N-ацетилглюкозамин, слабый рост наблюдали на мальтозе и салицине. Отличия наблюдались в способности штамма *Streptomyces* sp. Т60 к слабому росту на D-маннозе и трегалозе.

Штамм *S. tacrolimicus* ATCC 55098^T обладал более широким спектром утилизируемых источников углерода и рос также на D-галактозе, D-туранозе, эскулине, глюконате калия и 5-кето-глюконате калия, слабо утилизировал глицерин, D-ксилозу, D-маннозу, D-фруктозу, L-рамнозу, амигдалин, метил-αD-глюкопиранозид и метил-αD-маннопиранозид.

Штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 проявляли высокую эстеразную, лейцин-ариламидазную, нафтол-AS-VI-фосфогидролазную и α-глюкозидазную активности. Для *Streptomyces* sp. Т60 также выявлена высокая активность щелочной фосфатазы. Для *S. tacrolimicus* ATCC 55098^T установлены высокие активности щелочной и кислой фосфатаз, нафтол-AS-VI-фосфогидролазы.

Хемотаксономические особенности. Все штаммы содержали в клеточной стенке LL-диаминопимелиновую кислоту, диагностические сахара отсутствовали. Основные жирные кислоты клеточных стенок штамма Ас-2618Д представлены *iso*-C_{14:0} (18,81%), *anteiso*-C_{15:0} (17,05%), *iso*-C_{16:0} (15,16%) и *iso*-C_{15:0} (15,11%). В составе жирных кислот клеточных стенок штамма Т60 преобладали *iso*-C_{16:0} (21,67%), *iso*-C_{15:0} (13,16%), *iso*-C_{16:1 cis}-9 (11,96%) и C_{16:0} (10,57%). Основными жирными кислотами клеточных стенок штамма ATCC 55098^T являются *iso*-C_{14:0} (16,8%), *iso*-C_{16:0} (12,5%), *iso*-C_{15:0} (12,3%) и *anteiso*-C_{15:0} (11,4%). Основными менахинонами штаммов являлись МК-9 (Н₈) и МК-9 (Н₆).

Филогенетический анализ. Филогенетическое положение изученных штаммов устанавливали на основе анализа последовательности гена 16S рРНК (около 1400 п.н.). Предварительный анализ показал, что штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 образуют одну группу с типовым штаммом *Streptomyces tsukubensis* NRRL 18488^T со степенью сходства 99,9%.

Для подтверждения таксономической принадлежности штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д было выполнено его полногеномное секвенирование и аннотация генома. Геном штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д был депонирован в DDBJ/ENA/GenBank под номером доступа SGFG00000000.

Значения средней идентичности нуклеотидов (ANI) и цифровой ДНК-ДНК гибридизации (dDDH), рассчитанные между последовательностью геномов штаммов *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *S. tsukubensis* NRRL 18488^T (CP029157.1-CP029159.1), оставили 99,99% и 99,9%, соответственно, что значительно выше пороговых значений для разграничения видов (Richter and Rossello-Mora, 2009; Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; Chun *et al.*, 2018), что явилось основанием для отнесения штамма Ас-2618Д к виду *Streptomyces tsukubensis*.

В геноме штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д выявлен кластер генов биосинтеза такролимуса с полным набором генов (26 генов). В результате сравнительного анализа установлено, что кластеры генов биосинтеза такролимуса у штаммов *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д (SGFG01000008.1:83700-166586) и *S. tsukubensis* NRRL 18488^T (CP029159.1:c7554111-7471225), а также *Streptomyces* sp. КСТС 11604ВР (HM116537.1:8712-91598) идентичны.

Уровень гомологии ДНК при ДНК-ДНК гибридизации *in vivo* между штаммами *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 составил 87,41%, что позволило заключить, что штамм *Streptomyces* sp. Т60 также принадлежит к виду *Streptomyces tsukubensis*. Содержание Г+Ц пар в ДНК штамма *S. tsukubensis* Т60 составляет 72,4%.

2. Оценка способности штаммов к биосинтезу такролимуса

Результаты сравнительного анализа биосинтетической активности изучаемых штаммов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Биосинтез такролимуса (FK-506) и аскомицина (FK-520) штаммами *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, *S. tsukubensis* Т60 и *S. tacrolimicus* ATCC 55098^T (7 суток культивирования)

Штамм	FK-506, мг/л	FK-520, мг/л
<i>S. tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д	57±5,66	9,2±0,64
<i>S. tsukubensis</i> Т60	41±1,41	6,7±0,44
<i>S. tacrolimicus</i> ATCC 55098 ^T	5,3±0,42	8,73±0,62

В последующих экспериментах был использован штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д как наиболее активный продуцент такролимуса.

3. Фенотипическая изменчивость и диссоциация *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д

При росте *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на плотной питательной среде наблюдалось образование морфологически отличающихся колоний (рис. 3а). Культуры, выращенные из отдельных диссоциантов, различались по способности продуцировать такролимус (рис. 3б). Максимальной продуктивностью обладали культуры диссоцианта Д2 (рис. 3б).

Для сохранения диссоцианта Д2 в стабильно активном состоянии использовали метод криоконсервирования культуры в вегетативной фазе роста. Культуру хранили в 50%-м глицерине при -70°С, что обеспечивало сохранение активности в течение 1 года.

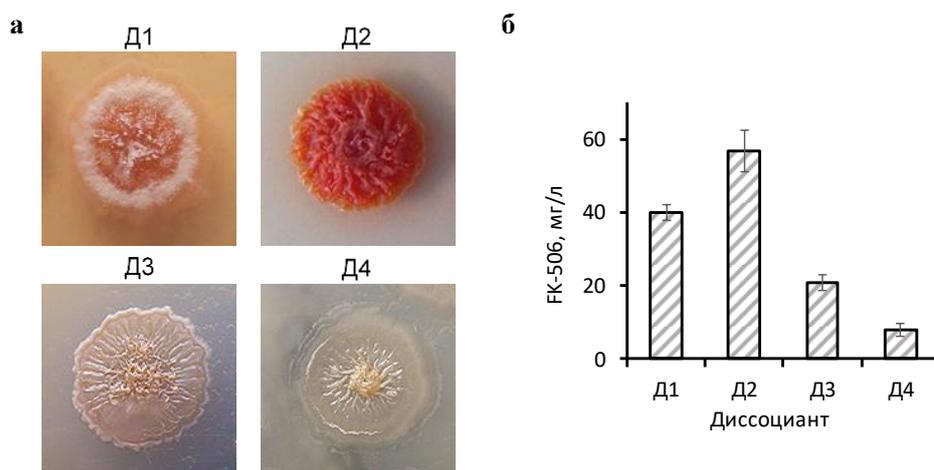


Рисунок 3 – (а) Диссоциация штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на среде МДА (Д – диссоциант). (б) Биосинтез такролимуса диссоциантами *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д (7 суток культивирования)

4. Оптимизация условий биосинтеза такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д

Температура, pH среды и аэрация. В диапазоне температур от 24 до 30°C наиболее активный синтез FK-506 отмечали при 24-26°C (рис. 4а). Максимальный уровень образования такролимуса достигался при pH 7,0-7,5 (рис. 4б). Синтез такролимуса наиболее активно протекал в условиях максимальной аэрации в колбах (рис. 4в).

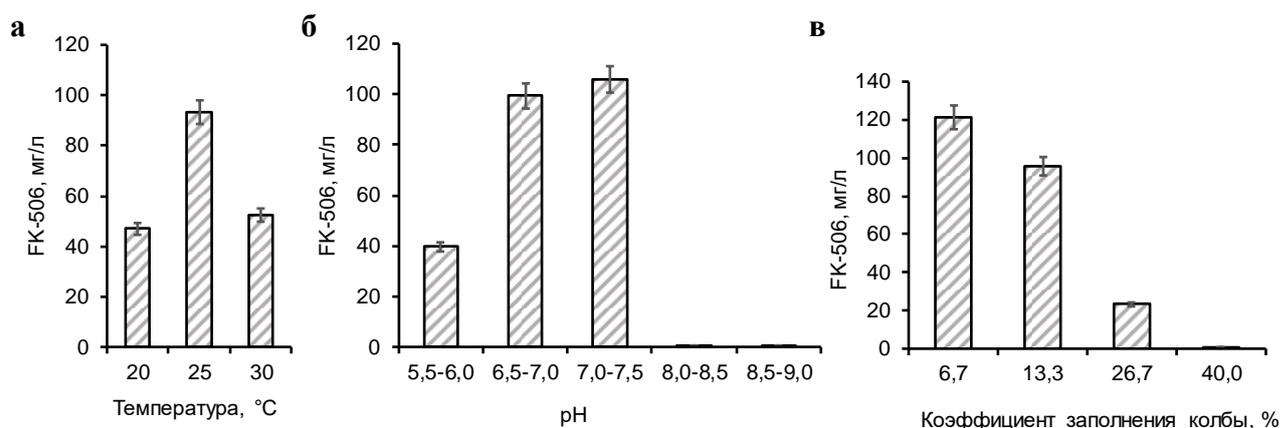


Рисунок 4 – Влияние температуры (а), pH среды (б) и аэрации (в) на биосинтез такролимуса (7 суток культивирования)

Источники углерода. Максимальное образование такролимуса достигалось при использовании моно- и дисахаридов и спиртов в концентрации 10 г/л, крахмала – 40 г/л. Наиболее активный биосинтез такролимуса наблюдали в средах с растворимым крахмалом (рис. 5а), повышение концентрации которого приводило к увеличению выхода такролимуса (рис. 5б).

Выраженный стимулирующий эффект был отмечен при добавлении рамнозы в концентрации 20 г/л: выход такролимуса увеличивался на 20% и выше (рис. 6).

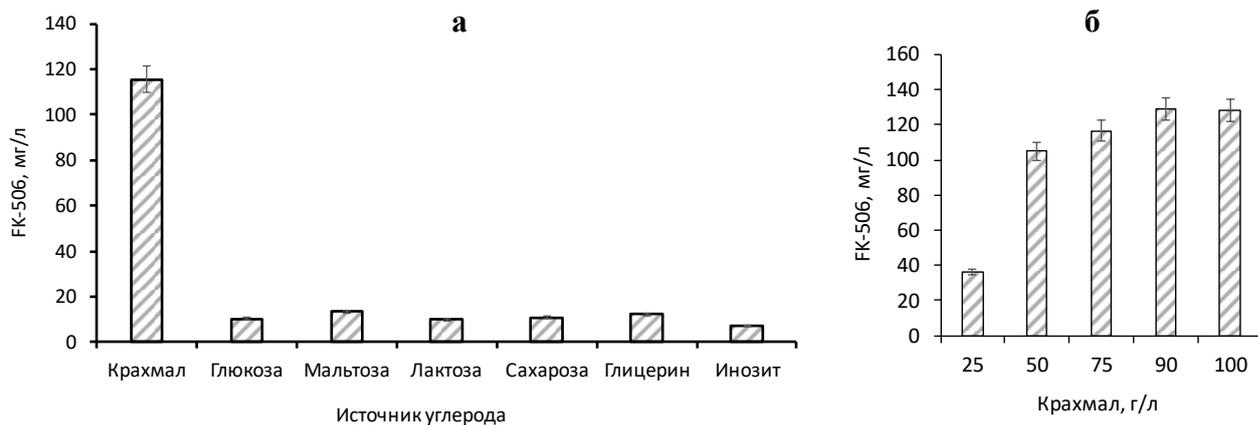


Рисунок 5 – (а) Влияние источников углерода на биосинтез такролимуса. (б) Влияние концентрации крахмала на биосинтез такролимуса

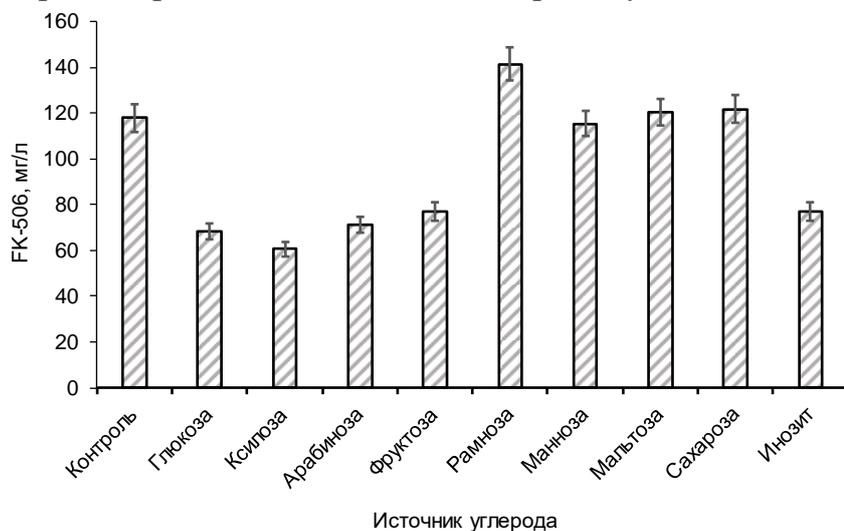


Рисунок 6 – Влияние дополнительных источников углерода (20 г/л) на биосинтез такролимуса, вносимых в среду, содержащую крахмал (75 г/л)

Влияние состава крахмалов на биосинтез такролимуса. Было показано преимущество растворимых картофельных крахмалов в сравнении с крахмалами других видов – кукурузным, тапиоковым и гороховым. Состав коммерческих крахмалов, прошедших заводскую обработку, как правило, не определен, или отсутствуют данные производителя о содержании линейных и разветвленных, высоко- и низкомолекулярных полимеров.

В данной работе изучали влияние состава 4-х картофельных крахмалов на эффективность биосинтеза FK-506 культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Процесс культивирования проводили в периодическом и периодическом режиме с подпиткой (при подаче стерильного раствора крахмала с 4 по 7 или со 2 по 7 сутки биосинтеза). Изучение основных физико-химических свойств позволило разделить 4 крахмала на 3 группы: низкомолекулярные, высокомолекулярные линейные и высокомолекулярные разветвленные (рис. 7).



Рисунок 7 – Состав картофельных крахмалов, использованных в работе

Наиболее эффективно синтез такролимуса протекал в условиях периодического культивирования с подпиткой. Использование высокомолекулярных крахмалов (1, 3, 4) обеспечивало более высокий выход такролимуса при ранней подпитке, начиная с перехода культуры в фазу замедления роста (со 2 суток культивирования). Использование низкомолекулярных крахмалов обеспечивало максимальный эффект при их более поздних добавках – при достижении культурой стационарной фазы (с 4 суток ферментации) (рис. 8).

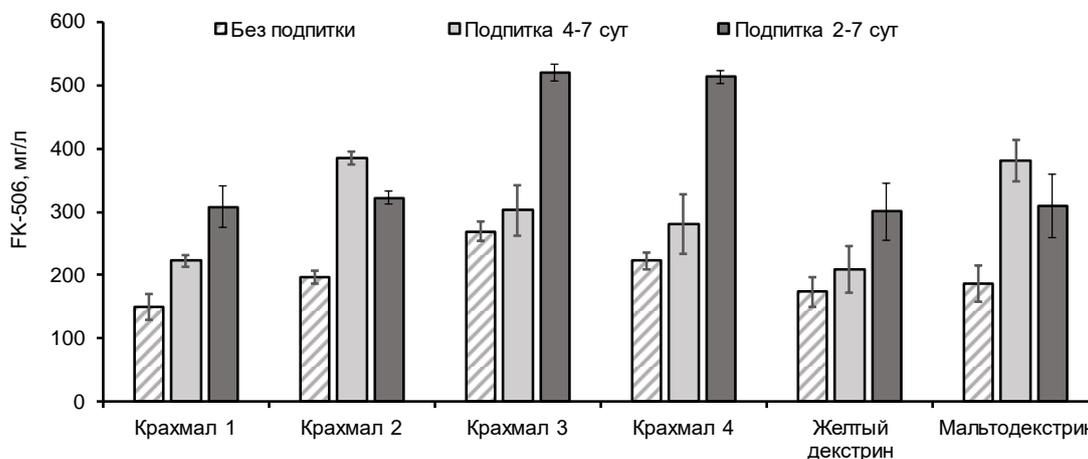


Рисунок 8 – Биосинтез такролимуса на средах с картофельными крахмалами и декстринами в режимах периодического и периодического с подпиткой культивирования (крахмала / декстрина в среде – 40 г/л; крахмала / декстрина в одной добавке – 6 г/л)

Источники азота. Изучение влияния на биосинтез такролимуса кукурузного и дрожжевого экстрактов, соевых муки и пептона, хлопковой муки, ферментативного и кислотного гидролизатов казеина показало, что наиболее активно биосинтез протекал в среде с кукурузным экстрактом (рис. 9а) при его концентрации не менее 15 г/л (рис. 9б). Использование минеральных аммонийных и нитратных солей в качестве единственного или дополнительного источника азота приводило к полному или частичному подавлению целевой биосинтетической активности, соответственно.

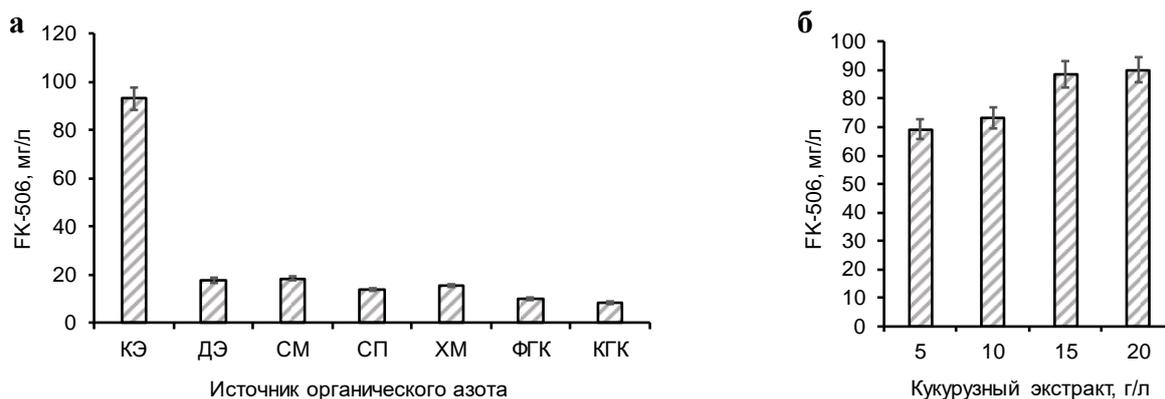


Рисунок 9 – (а) Влияние источников органического азота на биосинтез такролимуса (концентрация источника в среде – 15 г/л): КЭ – кукурузный экстракт, ДЭ – дрожжевой экстракт, СМ – соевая мука, СП – соевый пептон, ХМ – хлопковая мука, ФГК – ферментативный гидролизат казеина, КГК – кислотный гидролизат казеина. (б) Влияние концентрации кукурузного экстракта на биосинтез такролимуса

Влияние низших грибов на биосинтез такролимуса: пекарские дрожжи и компоненты их клеток. Дрожжи являются источником необходимых веществ: факторов роста (в т.ч. витаминов), пуринов и пиримидинов, катионов (Семенов, 1990). Добавление це-

лых клеток инактивированных пекарских дрожжей в среду оптимизированного состава приводило к повышению выхода такролимуса в среднем на 126% (рис. 10), что превосходит эффект комплексных питательных компонентов из дрожжей (коммерческого дрожжевого экстракта).

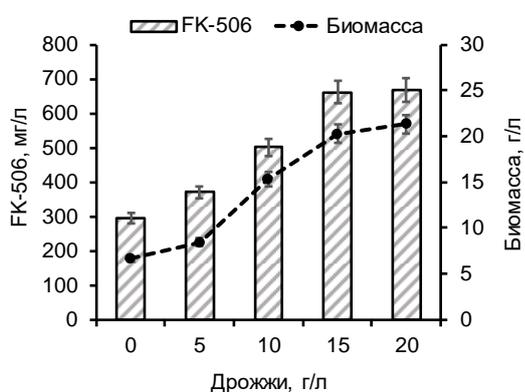


Рисунок 10 – Влияние концентрации сухих пекарских дрожжей на рост и биосинтез такролимуса культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в среде оптимизированного состава

Для выяснения влияния отдельных компонентов клеток дрожжей на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* дрожжевые клетки были разрушены и фракционированы; полученные гомогенат, фракции нерастворимых (осадок) и растворимых (супернатант) компонентов использовали для приготовления среды. Все фракции компонентов дрожжевых клеток положительно, но в разной степени влияли на биосинтез, что выражалось в 52%-ном (супернатант) и 74%-ном (осадок) увеличении выхода макролида (рис. 11).

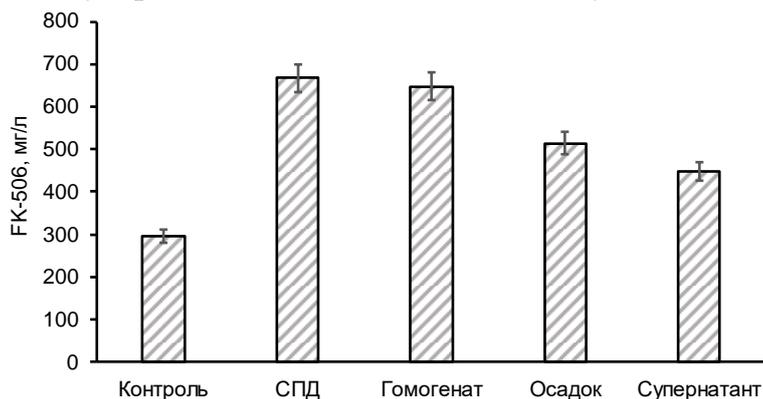


Рисунок 11 – Влияние различных фракций компонентов клеток пекарских дрожжей (СПД) на продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д среде с кукурузным экстрактом (15 г/л). Контроль – среда без добавления компонентов

Гипотеза о влиянии эргостерина как маркерного компонента мембран низших эукариотов на запуск каскада реакций синтеза такролимуса не подтвердилась: эргостерин не оказывал влияния на биосинтез такролимуса.

Влияние мицелиальных грибов на биосинтез. Исследовали влияние на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д грибов разных порядков: *Aspergillus ochraceus* (Eurotiales), *Curvularia lunata* (Pleosporales) и *Gongronella butleri* (Mucorales), инактивированный мицелий которых добавляли в среду для биосинтеза вместо пекарских дрожжей. Биомасса *A. ochraceus* обеспечивала выход такролимуса, сопоставимый с полученным при использовании пекарских дрожжей. Мицелий *C. lunata* не оказывал влияния на продукцию такролимуса. Присутствие мукорового гриба *G. butleri*, напротив, полностью подавляло рост стрептомицета и биосинтез такролимуса (рис. 12).

Наиболее вероятной причиной различного влияния биомассы грибов на биосинтез такролимуса культурой стрептомицета являются различия в составе их клеточных стенок.

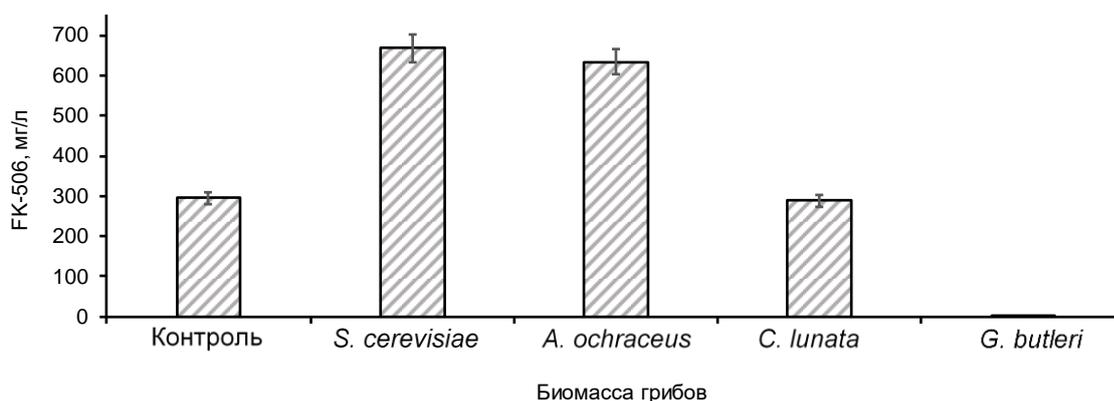


Рисунок 12 – Влияние биомассы грибов в составе среды биосинтеза на продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Контроль – среда без биомассы низших грибов

Микроэлементы и аминокислоты. Добавление солей $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$ способствовало повышению выхода такролимуса от 23 до 30%. Максимальный эффект был отмечен при добавлении $MnSO_4$. При совместном внесении в среду указанных солей содержание целевого продукта увеличивалось на 24-30%, т.е. кумулятивного эффекта не наблюдалось.

Известно, что биосинтез такролимуса более эффективно протекает в присутствии в среде лизина (Martínez-Castro *et al.*, 2013). L-лизин является предшественником пипеколиновой кислоты, включение которой происходит на завершающих этапах биосинтеза и приводит к циклизации макролидного кольца. Добавление лизина на 3 сутки культивирования в концентрации 5 г/л способствовало увеличению выхода FK-506 более чем на 20%.

Предотвращение деградации такролимуса продуцентом. Накопление такролимуса при его биосинтезе сменялось его убылью при продолжительной инкубации (рис. 13). Дополнительное внесение крахмала в период истощения источника углерода (4 сутки культивирования) приводило к незначительному увеличению выхода такролимуса, однако не влияло на его последующую деградацию культурой.

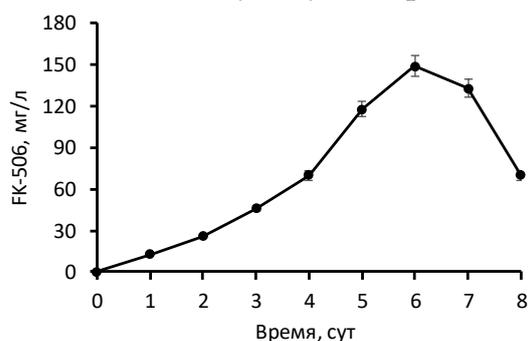


Рисунок 13 – Динамика накопления такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д (без добавок крахмала)

Решить проблему деградации такролимуса удалось путем применения полимерных сорбентов. Максимальный эффект был получен при применении амберлитов типа XAD и сорбента SP-207.

Выход такролимуса в оптимизированных условиях более чем в 10 раз превышал его содержание в среде без сорбента на 10 суток и достигал максимальных значений при применении XAD-7 HP (рис. 14).

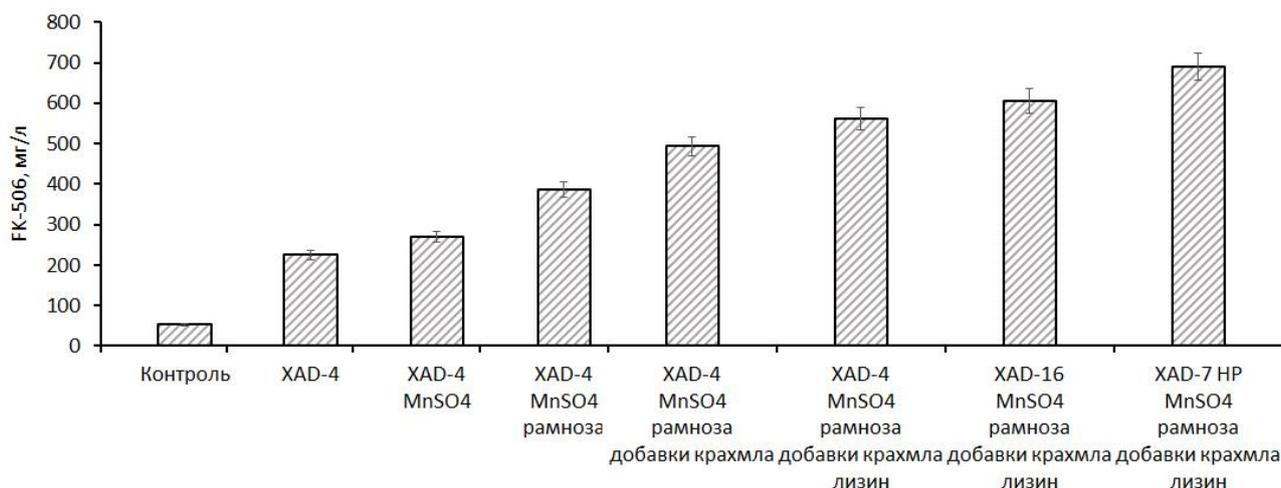


Рисунок 14 – Повышение выхода такролимуса в ходе оптимизации состава продуктивной среды

Таким образом, биосинтез такролимуса с применением штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д (диссоциант Д2) наиболее активно протекает при температуре 24-26°C, при pH 6,5-7,5, в условиях интенсивной аэрации в сложных питательных средах, содержащих растворимый крахмал, кукурузный экстракт, дрожжевые клетки, лизин, рамнозу и соли марганца, в режиме периодического культивирования с подпиткой. Повышению выхода такролимуса способствует ведение процесса в присутствии полимерных сорбентов типа XAD и SP, предотвращающих нежелательную деструкцию продукта. Кривая роста штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и его морфология представлены на рис. 15.

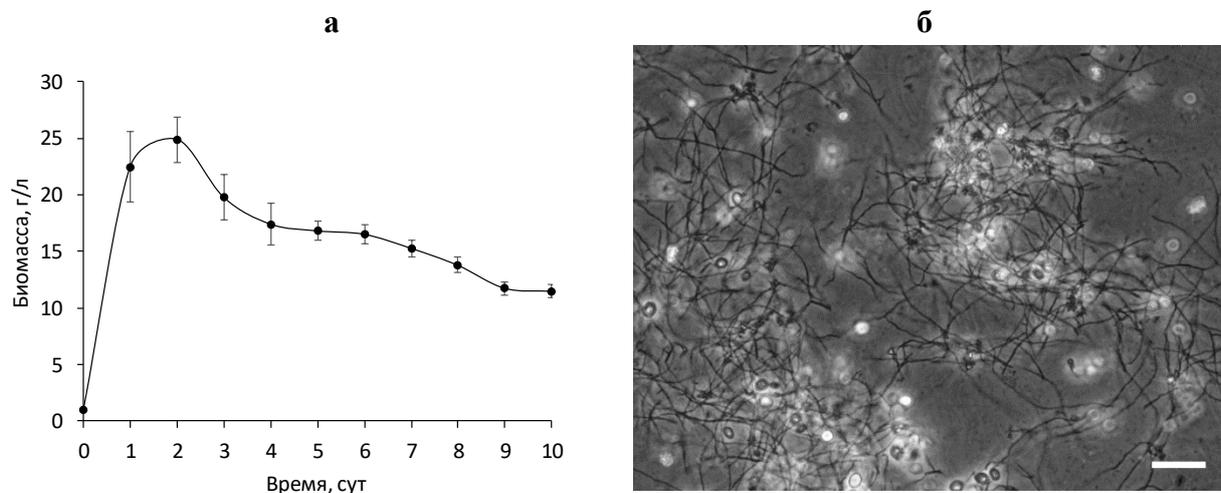


Рисунок 15 – (а) Кривая роста штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в динамике биосинтеза такролимуса в оптимизированных условиях. (б) Вид мицелиальной «3D-сети» продуцента в среде биосинтеза, содержащей автоклавированные клетки пекарских дрожжей (длина масштабной линейки – 20 мкм)

Результаты экспериментов по оптимизации состава среды и условий синтеза такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в колбах были использованы при масштабировании биопроцесса.

5. Разработка биотехнологического способа получения такролимуса

Микробиологическая стадия. Оптимизация процесса биосинтеза такролимуса в лабораторных биореакторах включала: коррекцию состава среды, выбор режимов фермен-

тации (pO₂, pH, условия перемешивания). Добавки вязких растворов крахмалов были заменены на более текучие растворы палевого декстрина. Подпитку палевым декстрином осуществляли со 2 по 7 сутки биосинтеза при его концентрации в суточной добавке 5,4 г/л. Использовали сорбент SP-207, характеризующийся более высокой насыпной плотностью, что упрощает его отделение от биомассы.

Было проведено пять стандартных ферментаций в ферментерах объемом 10 л, выход такролимуса в среднем составил ~700 мг/л (табл. 2). Динамика процесса в оптимизированных условиях ферментации приведена на рис. 16.

Таблица 2 – Биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в ферментерах 10 л АН-КУМ-2М

	№ ферментации				
	1	2	3	4	5
FK-506, мг/л	670,6	637,7	706,3	774,9	716,1
Среднее значение, мг/л	701,1±51,6				

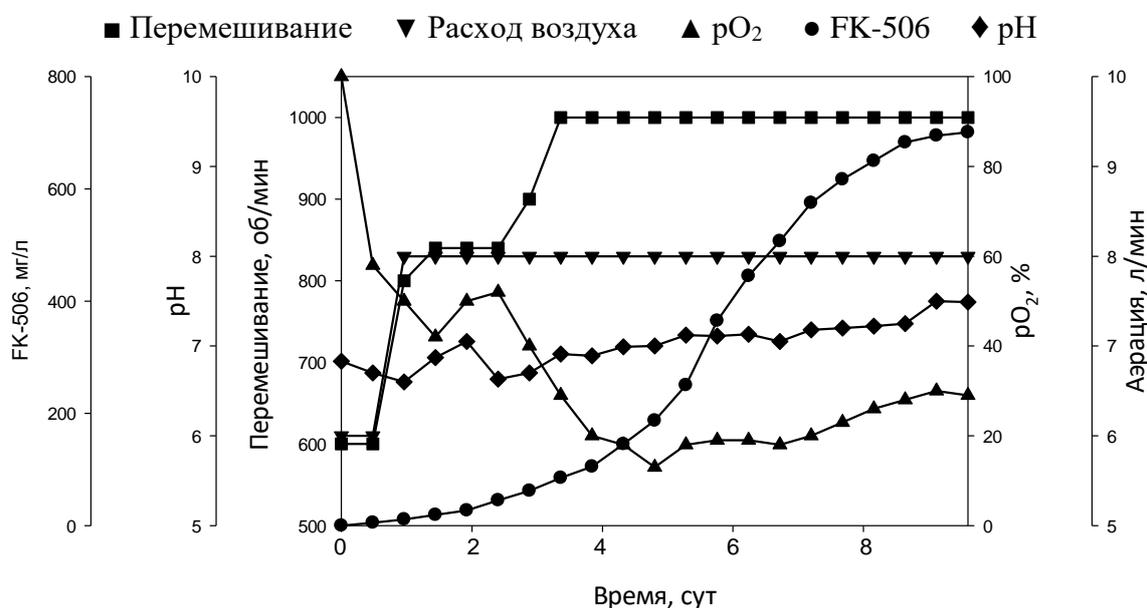


Рисунок 16 – Биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в ферментере АНКУМ-2М (объем 10 л)

Выделение и очистка такролимуса*. Применение на этапе биосинтеза полимерных сорбентов обеспечило эффективную сорбцию образующегося такролимуса и позволило упростить процедуру извлечения целевого продукта из культуральной среды. Такролимус элюировали органическими растворителями и проводили его очистку хроматографическими методами.

Предварительную очистку (удаление балластных компонентов) осуществляли с применением регенерируемых сорбентов на основе метилметакрилата (НР2МГ) и химически модифицированного силикагеля (Диасорб-100-Диол), выход целевого продукта составил 80 и 85%, соответственно. В последующей работе использовали сорбент НР2МГ.

Одной из ключевых проблем, влияющих на эффективность производства фармацевтической субстанции такролимуса, является нежелательное образование в процессе биосинтеза его близких структурных аналогов, таких как аскомицин и дигидротакролимус, значительно осложняющее очистку, и являющееся причиной значительных потерь целевого продукта. Для препаративного разделения такролимуса и его аналогов использовали

различные сульфокатиониты (рис. 17), среди которых наиболее эффективными оказались сорбенты с привитыми сульфогруппами с ионами серебра Диасорб-60-СП (рис. 17д, е) и Диасорб-100-Сульфо (рис. 17г). Для сорбента Диасорб-60-СП была показана уникальная селективность к такролимусу в чистом ацетоне, что позволяет отделять такролимус от аналогов в сорбционном режиме. Завершающей стадией очистки такролимуса являлась его кристаллизация из водно-органических смесей с получением кристаллического продукта высокой степени очистки (табл. 3, рис. 18).

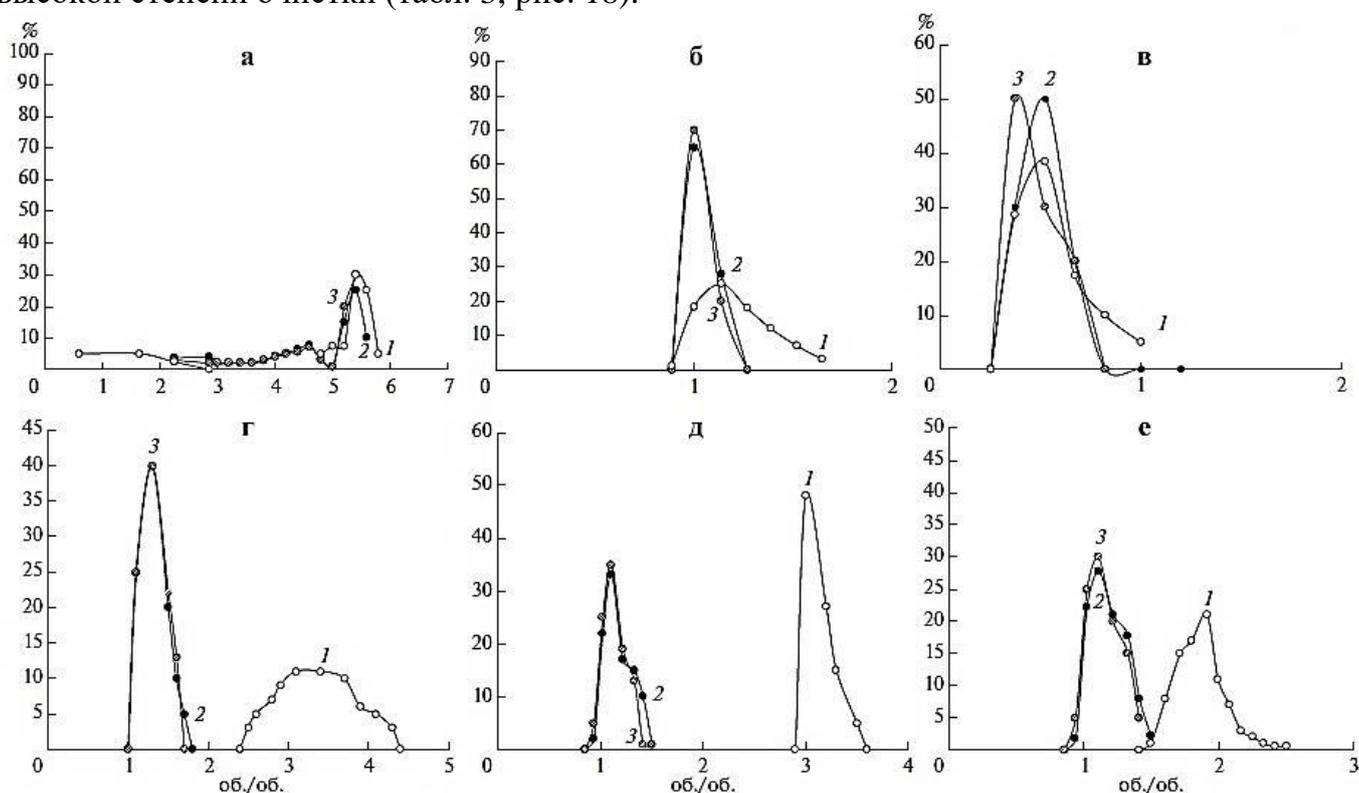


Рисунок 17 – Хроматограммы препаративного разделения такролимуса (1) и его аналогов – аскомицина (2) и С8-пропил-аналога такролимуса (3) на сорбентах Relisorb SP 400/SS (а), Диасфер-АК-СП-100 (б), Dowex 50 WX8 (в), Диасорб-100-Сульфо (г), Диасорб-60-СП (д, е) (на оси Х об./об. – объем фракций, выраженный в объемах колонки)

Таблица 3 – Качественный и количественный состав кристаллов такролимуса

Компонент	Содержание, %	Критерий приемлемости, % (USP)
Такролимус	99,3 (суммарно с С19-эпимером такролимуса 99,8)	98-102
С19-эпимер такролимуса	0,5	не нормируется
Аскомицин (+ неидентифицированное соединение)	0,2	0,5
С19-эпимер аскомицина	не обнаружен	0,1
С8-эпимер такролимуса	не обнаружен	0,15
С8-пропил-аналог такролимуса	не обнаружен	0,15
Такролимус-открытое кольцо	не обнаружен	не нормируется
Десметилтакролимус	не обнаружен	0,1
Общее количество нормируемых и неидентифицированных примесей	0,2	1,0

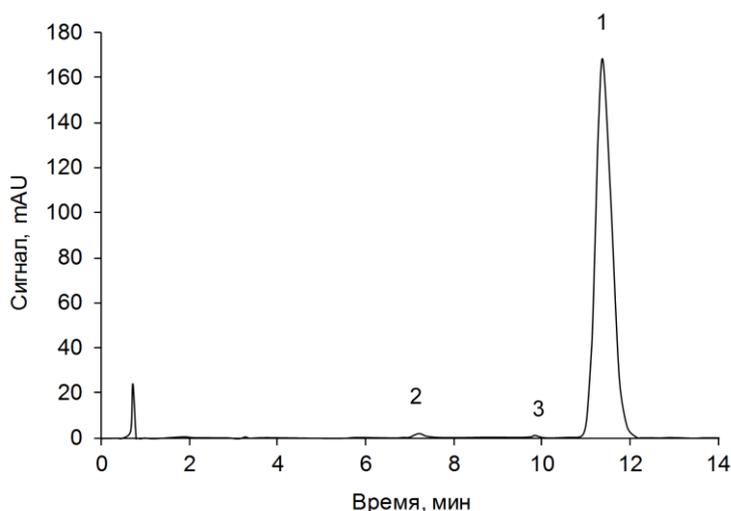


Рисунок 18 – ВЭЖХ-профиль кристаллов такролимуса: 1 – такролимус, 2 – С19-эпимер такролимуса, 3 – аскомицин

Полученный образец такролимуса соответствует требованиям фармакопеи, суммарный выход очищенного кристаллического продукта составляет более 50%, что превышает известные мировые аналоги в 1,7-2,5 раза.

* Работа выполнена в сотрудничестве с коллективом Кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством д.х.н. С.М. Староверова.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований охарактеризованы два новых такролимус-продуцирующих штамма – *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces tsukubensis* Т60. Штамм ВКМ Ас-2618Д обладает более высокой биосинтетической активностью. При изучении диссоциации штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д выявлены критерии селекции его наиболее активных диссоциантов и определены условия их поддержания в стабильно активном состоянии – хранение культуры в 50%-м глицерине при -70°C .

Установлены условия, обеспечивающие наиболее активный биосинтез такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Наиболее интенсивно синтез макролида протекал в богатой питательной среде с крахмалом, органическим источником азота и клетками дрожжей в режиме периодического культивирования с подпиткой в аэрируемых условиях при температуре $24-26^{\circ}\text{C}$ и рН среды 6,8-7,5. Добавление в ферментационную среду полимерных сорбентов обеспечивает устранение нежелательной деструкции такролимуса.

Впервые выявлена связь между составом, физико-химическими свойствами крахмалов и эффективностью биосинтеза такролимуса. Разработаны подходы к повышению эффективности биосинтеза при использовании различных типов крахмалов. Впервые исследовано влияние дрожжей и низших грибов разного таксономического положения на биосинтез такролимуса. Установлено, что основное влияние на биопроцесс оказывают поверхностные клеточные структуры. Низшие грибы, содержащие в клеточной стенке преимущественно глюканы и маннаны, а также хитин положительно влияют на биосинтез такролимуса.

Разработан и масштабирован до уровня лабораторных ферментеров способ получения такролимуса, позволяющий достигать до 775 мг/л целевого продукта (способ защищен Патентом РФ 2722699). Разработан метод выделения и очистки субстанции такролимуса до фармакопейной чистоты 99,8% с выходом целевого продукта более 50%.

Таким образом, разработан прототип технологии полного цикла для производства высококачественной фармацевтической субстанции такролимуса.

ВЫВОДЫ

1. На основании комплексного изучения морфофизиологических, биохимических и генотипических признаков штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 отнесены к виду *Streptomyces tsukubensis*. Наиболее активным продуцентом такролимуса является *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Выявлен его диссоциант, обеспечивающий максимальный уровень продукции макролида, и оптимизированы условия его поддержания в активном состоянии. Расшифрована полная геномная последовательность штамма, показано наличие в геноме кластера из 26 генов биосинтеза такролимуса;
2. Использование богатых крахмалосодержащих питательных сред, содержащих целые инактивированные клетки дрожжей, в условиях интенсивной аэрации при температуре не выше 26°C способствует повышению эффективности биосинтеза такролимуса. Добавление в среду полимерных сорбентов устраняет нежелательную деструкцию целевого поликетиды при ферментации и облегчает процедуру его последующего выделения;
3. Впервые выявлена связь между составом, физико-химическими свойствами крахмалов и эффективностью биосинтеза такролимуса. Применение высокомолекулярных крахмалов с разветвленной структурой обеспечивает достижение более высокого выхода такролимуса в сравнении с линейными низкомолекулярными полисахаридами при сходных показателях роста *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д;
4. Впервые исследовано влияние дрожжей и низших мицелиальных грибов разного таксономического положения на биосинтез такролимуса. Стимулирующий эффект низших эукариотов преимущественно связан с полисахаридным составом клеточных стенок;
5. Разработан и масштабирован до лабораторно-технологического уровня способ микробиологического синтеза такролимуса, обеспечивающий выход целевого продукта до 775 мг/л; разработан метод выделения и очистки субстанции такролимуса с получением кристаллического продукта фармакопейной чистоты (99,8%) с выходом более 50%, что значительно превосходит известные мировые аналоги.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований:

1. **Пошехонцева, В.Ю.** Влияние состава крахмала на биосинтез иммунодепрессанта такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д / **В.Ю. Пошехонцева, В.В. Фокина, Г.В. Суходольская, А.А. Шутов, М.В. Донов** // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55, № 5. – С. 481-491. (doi: 10.1134/S0555109919040147, РИНЦ, IF = 1,022)
Poshekhontseva, V.Yu. Effect of starch composition on the biosynthesis of immunosuppressant tacrolimus (FK-506) by *Streptomyces tsukubaensis* VKM Ac-2618D strain / **V.Yu. Poshekhontseva, V.V. Fokina, G.V. Sukhodolskay, A.A. Shutov, M.V. Donova** // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2019. – V. 55, № 5. – P. 534-543. (doi: 10.1134/2FS0003683819040148, SCOPUS, WoS, Q3, IF = 1,4)
2. **Poshekhontseva, V.Y.** Draft Genome Sequence of FK506-Producing *Streptomyces tsukubensis* Strain VKM Ac-2618D / **V.Yu. Poshekhontseva, E.Y. Bragin, V.V. Fokina, V.Y. Shtratnikova, I.P. Starodumova, S.V. Tarlachkov, M.V. Donova** // Microbiology Resource

- Announcements. – 2019. – V. 8, № 24. – e00510-19 (doi: 10.1128/MRA.00510-19, SCOPUS, WoS, Q4, IF = 1,7)
3. **Пошехонцева, В.Ю.** Влияние низших грибов на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, Г.В. Суходольская, А.А. Шутов, М.В. Донова // Биотехнология. – 2019. – Т. 35, № 5. – С. 42-50. (doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-42-50, РИНЦ, SCOPUS, Q4, IF = 0,56)
Poshekhontseva, V.Yu., Study of the effect of lower eukaryotes on tacrolimus (FK-506) biosynthesis by the *Streptomyces tsukubensis* strain VKM Ac-2618D / **V.Yu. Poshekhontseva**, V.V. Fokina, G.V. Sukhodolskay, A.A. Shutov, M.V. Donova // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2020. – V. 56, № 8. – P. 847-853. (doi: 10.1134/S0003683820080062, SCOPUS, WoS, Q3, IF = 1,4)
 4. Салионов, Д.С. Разработка способа выделения и очистки такролимуса, синтезированного актинобактериями *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д / Д.С. Салионов, **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, А.А. Шутов, В.М. Николаева, Г.Г. Васяров, Е.В. Титова, В.С. Карасев, С.М. Староверов, М.В. Донова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 6. – С. 602-611. (doi: 10.31857/S055510992006015X, РИНЦ, IF = 1,022)
Salionov, D.S. Biosynthesis of tacrolimus by the *Streptomyces tsukubensis* VKM Ac-2618D strain in the presence of polymeric sorbents and development of a method for its isolation and purification / D.S. Salionov, **V.Yu. Poshekhontseva**, V.V. Fokina, A.A. Shutov, V.M. Nikolaeva, G.G. Vasiarov, E.V. Titova, V.S. Karasev, S.M. Staroverov, M.V. Donova // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2020. – V. 56, № 6. – P. 699-707. (doi: 10.1134/S0003683820060150, SCOPUS, WoS, Q3, IF = 1,4)
 5. **Пошехонцева, В.Ю.** *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д – эффективный продуцент такролимуса / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, С.В. Тарлачков, А.В. Мачулин, А.А. Шутов, М.В. Донова // Биотехнология. – 2021. – Т. 37, № 1. – С. 30-40. (doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-1-30-40, РИНЦ, SCOPUS, Q4, IF = 0,56)
 6. **Пошехонцева, В.Ю.** Таксономия такролимус (FK506)-синтезирующего штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и влияние компонентов среды на активность продуцента / **В.Ю. Пошехонцева**, Г.В. Суходольская, С.А. Гулевская, В.В. Фокина, М.В. Донова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 746-748. (РИНЦ, IF = 0,67)
 7. **Пошехонцева, В.Ю.** Естественная изменчивость *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д и селекция высокоактивного продуцента такролимуса (FK506) / **В.Ю. Пошехонцева**, Г.В. Суходольская, В.В. Фокина, С.А. Гулевская, М.В. Донова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 749-750. (РИНЦ, IF = 0,67)

Публикации в других журналах и сборниках трудов и материалов научных конференций:

1. **Пошехонцева, В.Ю.** Сравнительное изучение фено- и генотипических характеристик и идентификация штаммов *Streptomyces* spp. – продуцентов такролимуса / **В.Ю. Пошехонцева**, С.А. Гулевская, М.В. Донова // Журнал научного фонда «Биолог». – 2014. – № 3. – С. 119-122.
2. **Пошехонцева, В.Ю.** Дифференциальная характеристика стрептомицетов-продуцентов такролимуса / **В.Ю. Пошехонцева**, С.А. Гулевская, Г.В. Суходольская, В.В. Фокина,

- А.А. Шутов, М.В. Донова // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». – Москва, 2014. – С. 188.
3. **Пошехонцева, В.Ю.** Влияние крахмала на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д / **В.Ю. Пошехонцева**, С.А. Гулевская, Г.В. Суходольская, В.В. Фокина // Материалы 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2015. – С. 39.
 4. **Пошехонцева, В.Ю.** Биосинтез такролимуса актинобактериями рода *Streptomyces* и селекция высокоактивного морфотипа штамма-продуцента / **В.Ю. Пошехонцева**, Г.В. Суходольская, В.В. Фокина, С.А. Гулевская, Т.Г. Лобастова, А.А. Шутов, М.В. Донова // Материалы II Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2015. – С. 85-87.
 5. **Пошехонцева, В.Ю.** Оптимизация микробиологического синтеза такролимуса актинобактериями рода *Streptomyces* // Материалы Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2016»: секция «Биология». – Москва, 2016. – С. 258-259.
 6. **Пошехонцева, В.Ю.** Оптимизация этапа получения посевной культуры при масштабировании технологии получения такролимуса (FK-506) / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, Г.В. Суходольская, А.А. Шутов, М.В. Донова // Материалы 20-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2016. – С. 237.
 7. **Пошехонцева, В.Ю.** Влияние состава крахмалосодержащего сырья на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, А.А. Шутов, М.В. Донова // Материалы XI Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва, 2016. – С. 115-118.
 8. **Пошехонцева, В.Ю.** Влияние клеток и клеточных компонентов низших эукариот на биосинтез такролимуса культурой *Streptomyces tsukubaensis* / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, А.А. Шутов, М.В. Донова // Материалы III Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2016. – С. 113-116.
 9. **Пошехонцева, В.Ю.** Создание прототипа технологии микробиологического синтеза такролимуса / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, Д.С. Салионов, А.А. Шутов, М.В. Донова // Материалы I Российского Микробиологического конгресса. – Пущино, 2017. – С. 166-167.
 10. **Пошехонцева, В.Ю.** Получение фармацевтической субстанции такролимуса: полный цикл биосинтеза и очистки / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, Д.С. Салионов, А.А. Шутов, М.В. Донова // Материалы IV Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2017. – С.88-90.

Интеллектуальная собственность:

1. Пат. 2722699 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, С12P 17/18, С12R 1/465. Штамм актиномицета *Streptomyces tsukubensis* – продуцент такролимуса и способ получения такролимуса / **В.Ю. Пошехонцева**, В.В. Фокина, А.А. Шутов, М.В. Донова. № 2019112813; заявл. 24.04.2019; опубл. 03.06.2020, Бюл. № 16.