

Министерство Науки и Высшего Образования  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ  
им. Г.К. СКРЯБИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИБФМ РАН)

*На правах рукописи*

ПОШЕХОНЦЕВА ВЕРОНИКА ЮРЬЕВНА

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

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Донова Марина Викторовна

Пушино – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
Глава 1 Бактерии рода <i>Streptomyces</i> .....	13
1.1 Биологические особенности и экологическое значение бактерий рода <i>Streptomyces</i> .....	13
1.2 Жизненный цикл бактерий рода <i>Streptomyces</i> .....	15
1.3 Генетические особенности бактерий рода <i>Streptomyces</i> .....	19
Глава 2 Биосинтез такролимуса .....	22
2.1 История открытия такролимуса и применение в медицине .....	23
2.2 Путь биосинтеза такролимуса .....	25
2.3 Регуляция биосинтеза такролимуса .....	29
2.4 Биосинтез аналогов такролимуса .....	31
2.5 Метаболические пути, участвующие в биосинтезе такролимуса .....	32
2.6 Стратегии увеличения продукции такролимуса .....	36
Заключение по обзору литературы .....	39
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	41
Глава 3 Материалы и методы исследования .....	41
3.1 Реактивы .....	41
3.2 Микроорганизмы, использованные в работе .....	41
3.3 Среды и условия культивирования .....	42
3.4 Оптимизация условий биосинтеза такролимуса .....	44
3.5 Определение биомассы .....	45
3.6 Изучение морфофизиологических и биохимических особенностей штаммов .....	46
3.7 Определение основных хемотаксономических признаков .....	47
3.8 Электронная микроскопия .....	48
3.9 Молекулярно-генетические методы .....	48
3.9.1 Выделение и очистка ДНК .....	48
3.9.2 Амплификация генов 16S рРНК .....	49

3.9.3 Электрофорез в агарозном геле.....	50
3.9.4 Секвенирование .....	50
3.9.5 Сборка генома.....	51
3.9.6 ДНК-ДНК гибридизация.....	51
3.9.7 Определение и расчет содержания Г+Ц пар в ДНК.....	51
3.9.8 Филогенетический анализ .....	52
3.10 Определение состава крахмалов и декстринов .....	52
3.11 Изучение влияния состава крахмалов и декстринов.....	53
3.12 Фракционирование клеток пекарских дрожжей.....	53
3.13 Изучение влияния пекарских дрожжей и компонентов их клеток.....	54
3.14 Изучение влияния низших грибов .....	54
3.15 Выделение и очистка такролимуса .....	54
3.15.1 Выделение такролимуса .....	54
3.15.2 Предварительная очистка такролимуса .....	55
3.15.3 Финишная очистка такролимуса.....	55
3.15.4 Кристаллизация такролимуса.....	55
3.16 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) .....	56
Глава 4 Результаты и обсуждение .....	58
4.1 Определение таксономического положения штаммов <i>Streptomyces</i> sp. ВКМ Ас-2618Д и <i>Streptomyces</i> sp. Т60.....	58
4.1.1 Исследование морфологических и физиолого-биохимических особенностей .....	58
4.1.2 Филогенетический анализ .....	65
4.2 Оценка способности штаммов к биосинтезу такролимуса .....	67
4.3 Изучение фенотипической изменчивости и диссоциации штамма <i>S. tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д и их влияния на биосинтез такролимуса .....	69
4.4 Изучение влияния условий хранения и получения посевной культуры штамма <i>S. tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д на биосинтез такролимуса .....	70
4.5 Оптимизация условий биосинтеза такролимуса штаммом <i>S. tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д .....	73
4.5.1 Изучение влияния температуры, рН среды и аэрации.....	73

4.5.2 Изучение влияния источников углерода.....	74
4.5.3 Изучение влияния состава крахмала .....	77
4.5.3.1 Изучение влияния крахмалов.....	78
4.5.3.2 Физико-химические свойства и состав крахмалов.....	79
4.5.3.3 Влияние состава крахмала.....	81
4.5.4 Изучение влияния источников азота .....	88
4.5.5 Влияние низших грибов на биосинтез такролимуса.....	90
4.5.5.1 Изучение влияния пекарских дрожжей и компонентов их клеток.....	91
4.5.5.2 Изучение влияния низших мицелиальных грибов.....	93
4.5.5.3 Изучение влияния эргостерина .....	95
4.5.6 Изучения влияния микроэлементов и аминокислот .....	96
4.5.7 Способы предотвращения деградации такролимуса продуцентом.....	96
4.5.7.1 Дополнительное внесение источника углерода .....	97
4.5.7.2 Добавление сорбентов.....	98
4.6 Разработка биотехнологического способа получения такролимуса штаммом <i>S. tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д.....	103
4.6.1 Оптимизация состава среды .....	103
4.6.2 Оптимизация режима ферментации .....	104
4.6.3 Выделение и очистка такролимуса.....	107
4.6.3.1 Экстракция такролимуса из культуральной жидкости.....	107
4.6.3.2 Первичная очистка такролимуса.....	108
4.6.3.3 Финишная очистка такролимуса.....	108
4.6.3.4 Получение такролимуса фармакопейного качества.....	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
ВЫВОДЫ .....	115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	142

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Штамм актиномицета <i>Streptomyces tsukubensis</i> – продуцент такролимуса и способ получения такролимуса.....	145
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Акт испытаний способа микробиологического синтеза макроциклического поликетиды такролимуса (FK-506) культурой <i>Streptomyces tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д.....	146

## ВВЕДЕНИЕ

**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, такими как рапамицин (сиролимус), аскомицин (иммуномицин) 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), при лечении гемолитической болезни новорожденных, аутоиммунных болезней: ревматоидного артрита, красной волчанки и др. (Karpas *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). Недавние исследования свидетельствуют об эффективности применения такролимуса в сочетании с противовоспалительными кортикостероидными препаратами в лечении пациентов с тяжелыми осложнениями, вызванными новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) (Russel *et al.*, 2020).

Препараты на основе такролимуса демонстрируют неуклонный прирост в общем объеме фармацевтического рынка в связи с ростом числа пациентов, перенесших трансплантацию органов, а также в связи 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 & 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 *fkf*-кластером генов, включающим как минимум 19 генов – так называемый кластер с редуцированным набором генов (представлен у штаммов *S. tacrolimicus*, *S. kanamyceticus*), а так называемый кластер с полным набором генов содержит 25-26 генов (штаммы *S. tsukubaensis* NRRL 18488, *S. tsukubaensis* L19 и *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP) (Goranovič *et al.*, 2012). Выявлены основные транскрипционные регуляторы биосинтеза – *fkfN*, *fkfR* (Ordóñez-Robles *et al.*, 2018a) и оценена их роль у различных штаммов продуцентов.

В последние десятилетия исследования по увеличению продукции такролимуса, главным образом, сосредоточены на оптимизации состава питательных сред (Singh & Behera, 2009; Mishra & Verma, 2012; Turlo *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013b; Xia *et al.*, 2013; Martínez-Castro *et al.*, 2013) и генной инженерии штаммов (Mo *et al.*, 2009; 2013; 2016; Ban *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). 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; Xia *et al.*, 2013; Turlo *et al.*, 2012), таких как шикимат, хоризмат, однако их ис-

пользование 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.

**Цель и задачи исследования.** В связи с вышеизложенным целью настоящей работы являлось исследование особенностей биосинтеза такролимуса штаммами *Streptomyces* spp. и разработка эффективного биотехнологического способа его получения.

Для достижения 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 (крахмалы), 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 *Streptomyces 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 глюканы, 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-дивинилбензольного 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.** Штамм *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и разработанная на его основе биотехнология могут быть рекомендованы в качестве основы для промышленного получения высококачественной 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 высококачественных 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.

**Методология и методы исследования.** В ходе выполнения диссертационной работы использован широкий спектр подходов, включая общие микробиологические, биохимические, молекулярно-генетические методы, электронную и световую микроскопию.

**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 *fkfR*, *tcs6*, *allSOPNM*, отсутствующие в аналогичных кластерах других продуцентов такролимуса, таких как *S. tacrolimicus* АТСС 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 рН 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).

Основная часть работы выполнялась в Лаборатории микробиологической трансформации органических соединений Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН).

**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.

**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.

**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 помощь в проведении ВЭЖХ-анализа такролимуса и его производных; к.б.н. Рыжмановой Я.В. за

помощь в проведении филогенетического анализа; с.н.с., к.б.н. Аriskиной 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. 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 работе с сорбентами, по выделению и очистке такролимуса, сотрудникам ЦКП «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта за секвенирование последовательности гена 16S рРНК.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### Глава 1 Бактерии рода *Streptomyces*

#### 1.1 Биологические особенности и экологическое значение бактерий рода *Streptomyces*

Актинобактерии рода *Streptomyces* – преимущественно почвенные грамположительные бактерии, характеризующиеся сложным жизненным циклом, включающим формирование воздушного мицелия со спорами.

Стрептомицеты являются строгими аэробами с ограниченным потенциалом роста в условиях микроаэрации (Kutzner, 1981). Однако, как ведущие представители почвенной микробиоты, стрептомицеты обладают системами альтернативного дыхания. Известно о немногочисленных видах, являющихся факультативными анаэробами и способных к аммиачному дыханию, осуществляющих неполную диссимиляцию нитратов (*S. violaceoruber*, *S. nitrosporeus*, *S. thioluteus* или *S. coelicolor*) или полную денитрификацию нитратов (*S. antibioticus*) (Albrecht *et al.*, 1997; Kumon *et al.*, 2002; Shoun *et al.*, 1998). Жизнеспособность при строгом анаэробизме сохраняют только споры.

Большинство известных в настоящее время видов рода *Streptomyces* относятся к нейтрофилам, растущим при pH между 5,0 и 9,0. Они активно растут в нейтральных и щелочных почвах. Однако были выделены ацидофильные и ацидотолерантные штаммы из кислых почв с pH в диапазоне от 3,5 до 6,5 (Williams & Flowers, 1978). Описаны алкалотолерантные и алкалофильные стрептомицеты с оптимумом pH между 9,0 и 9,5, а также – ряд штаммов, способных расти при pH 11,5 (Mikami *et al.*, 1982).

Род *Streptomyces* включает в себя, в основном, мезофильные виды, растущие при температуре от 10 до 37°C, хотя встречаются и термотолерантные виды, способные расти при температуре выше 37°C. Описано небольшое число термофильных видов, растущих при температуре до 55°C и выше (Kim *et al.*, 1999). Термофильные виды были выделены из образцов почвы, навоза, компоста, сточных вод, водных сред обитания и т.д. (Cross, 1981; Ohta & Ikeda, 1978; Tendler & Burkholder, 1961).

Для стрептомицетов характерен сапрофитный тип питания, но существуют и исключения. Описан 11041 вид *Streptomyces* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>), способных паразитировать на растениях, наиболее распространенным из них является *S. scabies* (Bignell *et al.*, 2010). Некоторое число видов способно вызывать инфекционные заболевания человека: например, *S. somaliensis* и *S. sudanensis* вызывают актиномицетому (Quintana *et al.*, 2008), также известны случаи оппортунистических инфекций, вызываемых актиномицетами (Kapadia *et al.*, 2007; Pellegrini *et al.*, 2012).

Отличительной особенностью стрептомицетов является их способность синтезировать летучие ароматические метаболиты, такие как геосмин и 2-метилизоборнеол, имеющие запах влажной почвы (Bentley & Meganathan, 1981; Gerber & Lechevalier, 1965; Wang & Cane, 2008).

Род *Streptomyces* широко известен как производитель большого количества различных антибиотиков. Примерно 60% всех известных антибиотиков, продуцируемых актинобактериями, было получено из стрептомицетов. Доля новообнаруживаемых антибиотиков составляет 39%, из них свыше 80% продуцируются стрептомицетами (Bérdu, 2012; Watve *et al.*, 2001).

Стрептомицеты играют существенную роль в переработке органических веществ растительного и животного происхождения, таких как полисахариды (целлюлоза, хитин, пектин или крахмал), белки (эластин или кератин), ароматические соединения и лигноцеллюлоза.

В геномах *Streptomyces* закодировано большое количество секретируемых белков. Например, штамм *S. coelicolor* A3 (2) продуцирует приблизительно 800 внеклеточных белков, среди которых 147 гидролаз, 7 целлюлаз и 5 хитиназ (Bentley *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2007). Среди гидролаз, расщепляющих крахмал, у представителей рода *Streptomyces* первыми были охарактеризованы  $\alpha$ -амилазы из *S. limosus* (Long *et al.*, 1987). У нескольких видов *Streptomyces* были идентифицированы гены, кодирующие ксиланазы, участвующие в разрушении лигноцеллюлозы. Ксиланазы получают из мезофильного вида *S. lividans* (Mondou *et al.*, 1986) и термофильного *S. thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiho *et al.*, 1992). В различных стрептомицетах обнаружены хитинолитические ферменты (хитиназы и хитобиаза) (Berger & Reynolds, 1958) и комплекс целлюлолитических (эндо- и экзоцеллюлазы) ферментов (Crawford & McCoy, 1972; Ishaque & Kluepfel, 1980). Из продуктов жизнедеятельности травоядных были выделены несколько штаммов *Streptomyces*, способных преобразовывать целлюлозу, лигноцеллюлозные липиды и некоторые редуцирующие сахара, что представляет интерес для их использования в производстве биотоплива (Liu *et al.*, 2014). Полезными ферментами в текстильной промышленности являются лакказы, продуцируемые *S. cyaneus* СЕСТ3335, способные к детоксикации и обесцвечиванию азокрасителей (Moya *et al.*, 2010).

Другими широко распространенными среди актиномицетов ферментами являются внеклеточные протеазы и ингибиторы протеаз (Taguchi *et al.*, 1989). Часто встречающиеся у представителей *Streptomyces* кератиназы используются в биотехнологии для разложения кож и других кератинсодержащих остатков (Chao *et al.*, 2007; Syed *et al.*, 2009). В различных штаммах *Streptomyces* были изучены внеклеточные липазы и гены, кодирующие их (Cruz *et al.*, 1994).

Известны стрептомицеты, способные разлагать хлопок или каучук (Jendrossek *et al.*, 1997; Lacey & Lacey, 1987). Многие виды *Streptomyces* способны использовать каучук и ла-

текс в качестве единственного источника углерода и энергии (Jendrossek *et al.*, 1997). Стрептомицеты также продуцируют ферменты, способные модифицировать ксенобиотики (Peczynska-Czoch & Mordarski, 1988).

## 1.2 Жизненный цикл бактерий рода *Streptomyces*

Можно выделить три характерные черты бактерий рода *Streptomyces*, представляющие особый интерес: способность производить важные внеклеточные гидролитические ферменты; сложный жизненный цикл, завершающийся формированием воздушного мицелия со спорами; и способность продуцировать антибиотики и другие вторичные биоактивные метаболиты. Эти три особенности связаны с более поздними стадиями жизненного цикла.

Жизненный цикл бактерий рода *Streptomyces*: классическая модель. Жизненный цикл стрептомицетов является крайне сложным, что необычно для прокариотов (рисунок 1). Он обладает некоторым сходством с жизненным циклом мицелиальных грибов, что может быть связано с адаптацией к сходным условиям обитания, хотя механизмы дифференциации имеют различное эволюционное происхождение (Chater, 2006).

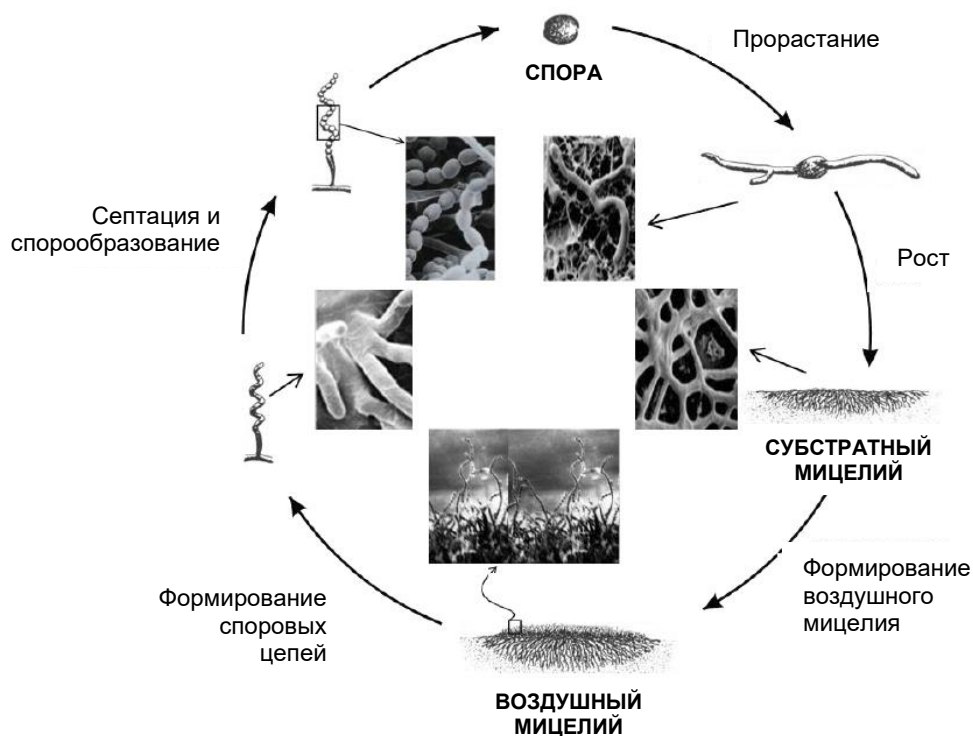


Рисунок 1 – Жизненный цикл бактерий рода *Streptomyces* (Jakimowicz, 2007)

Фазы жизненного цикла стрептомицетов были детально изучены на примере *S. coelicolor*.

На начальном этапе прорастания спор стрептомицетов образуются одна или две зародышевые трубки с апикально расположенной зоной роста; затем следует череда делений, приводящая к формированию множества нитевидных многоядерных разветвленных гиф, которые, проникая в субстрат, образуют вегетативный, или субстратный мицелий (Flårdh & Buttner, 2009). После того, как заканчиваются легкодоступные питательные вещества, появляется необходимость получения доступа к нерастворимому содержимому питательной среды. Это благоприятно сказывается на росте мицелия с боковым ветвлением, что облегчает проникновение гиф к нерастворимым органическим остаткам и способствует их адгезии, а также – производству и высвобождению гидролитических ферментов (ксиланаз, целлюлаз), которые деградируют органические нерастворимые остатки растений, и хитиназ, разрушающих клеточные стенки грибов, основных конкурентов стрептомицетов. И, наконец, при полном исчерпании питательных веществ наблюдается морфологическая дифференциация с формированием воздушного мицелия, в котором начинается процесс деления с образованием одногеномных отсеков, разделенных двухслойными перегородками. Образуются цепи обособленных преспор, которые дифференцируются в зрелые споры и, впоследствии, высвобождаются в виде индивидуальных спор. Образование спор позволяет адаптироваться к сложным средам, таким как почвы, находящиеся в постоянно изменяющихся условиях температуры, влажности и т.д. (Ensign, 1978).

Принято считать, что между морфологической дифференциацией стрептомицетов и производством ими антибиотиков существует тесная взаимосвязь, при этом оба процесса регулируются факторами окружающей среды (Chater *et al.*, 2010; Flårdh & Buttner, 2009; Martín & Liras, 2010). Важная роль в морфологической дифференциации *Streptomyces* принадлежит процессу программированной гибели клеток.

Жизненный цикл бактерий рода *Streptomyces*: современная модель. Описанная выше классическая модель жизненного цикла *Streptomyces* просуществовала более полувека, однако, более поздние исследования выявили новые фазы (рисунок 2).

Согласно новой модели дифференциации, цикл начинается с прорастания спор с образованием многоядерного субстратного и воздушного мицелия, называемого первичным мицелием (MI), после чего происходит процесс контролируемой гибели клеток, приводящий к образованию чередующихся сегментов жизнеспособного и отмершего мицелия (Manteca *et al.*, 2005).



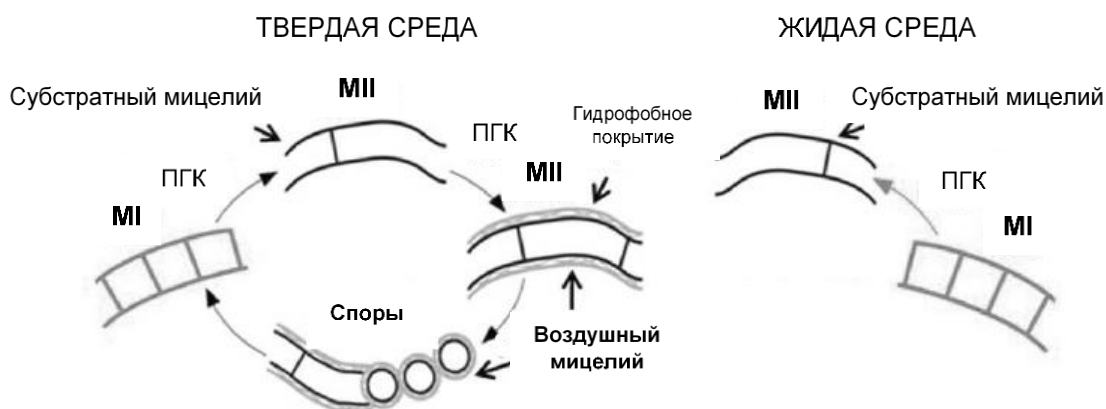


Рисунок 2 – Цикл развития *Streptomyces*. Новые фазы, описанные Manteca *et al.* (2005): MI – первичный вегетативный мицелий, MII – вторичный репродуктивный мицелий, продуцирующий вторичные метаболиты, ПКК – «программированная гибель клеток»

Процесс программированной гибели клеток (ПКК) включает в себя остановку роста первичного мицелия MI, гибель клеток и образование из оставшихся жизнеспособных сегментов MI многоядерного вторичного мицелия (MII). При культивировании на плотных средах вторичный мицелий MII в зависимости от наличия или отсутствия гидрофобного слоя у гиф воздушного мицелия делят на два типа: (1) ранний MII, у которого отсутствует гидрофобное покрытие (2) поздний MII, имеющий гидрофобное покрытие.

Согласно современной модели, вегетативная фаза представлена первичным молодым септированным мицелием (MI), в то время как репродуктивная фаза представлена как ранней, так и поздней стадиями развития вторичного мицелия (MII). Оба типа вторичного мицелия образуют споры. Корреляция с классической моделью: субстратный мицелий традиционной модели эквивалентен ранней фазе вторичного мицелия и не имеет гидрофобного покрытия, а воздушный мицелий соответствует поздней фазе развития вторичного мицелия, который обладает гидрофобной поверхностью (рисунок 3).

В конце цикла следует второй раунд программированной гибели клеток как субстратного, так и воздушного мицелия, после чего происходит сегментация многоядерных гиф с образованием спорных цепей и индивидуальных спор (Manteca *et al.*, 2005; 2010; Yagüe *et al.*, 2013).

В погруженных культурах большинство штаммов *Streptomyces*, как правило, не спорулируют. Однако, имеются сведения о том, что в жидкой среде, как и на плотной среде, имеет место начальный процесс дифференциации (Manteca *et al.*, 2005; 2008; 2010).

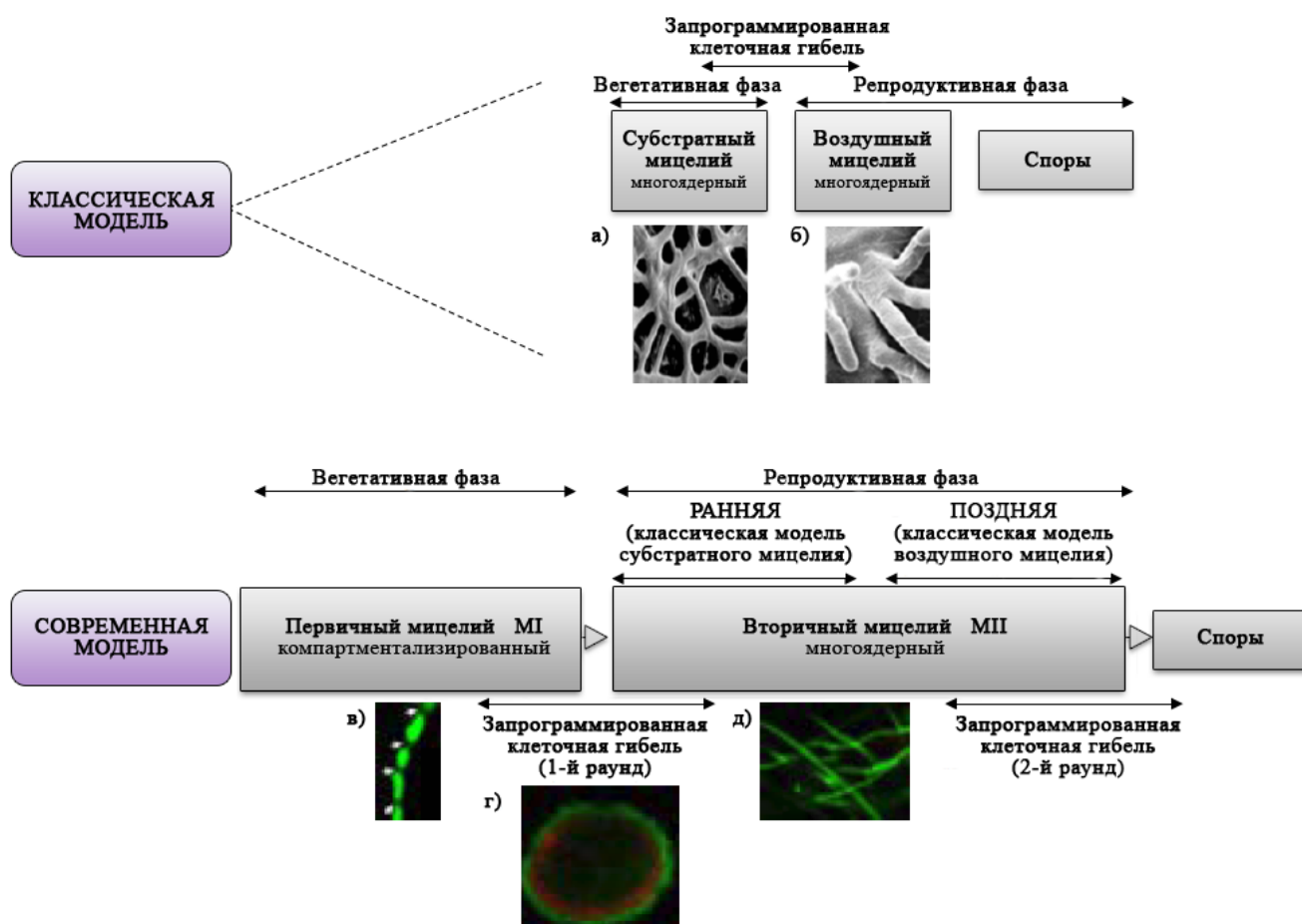


Рисунок 3 – Дифференциация *Streptomyces* на плотной среде. Жизнеспособность клеток анализировалась двумя красителями: йодидом пропидия, который связывается с нуклеиновыми кислотами отмерших клеток, и SYTO 9, который окрашивает живые клетки. Представлены: электронно-микроскопические изображения субстратного (а) и воздушного мицелия (б) и изображения конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии: первичный мицелий (в), вторичный мицелий (д) и мицелиальные агрегаты, вошедшие в первый раунд программированной гибели клеток (г) (Manteca & Sánchez, 2009; Yagüe *et al.*, 2010)

В погруженной культуре обнаружено формирование вторичного многоядерного мицелия (МII) после первого раунда программированной гибели клеток раннего компартментализованного мицелия (MI) (Manteca *et al.*, 2005; 2010). Несмотря на то, что в жидкой среде, как принято считать, гифы стрептомицетов не имеют гидрофобного покрытия (связанного с воздушной средой), а споруляция, как правило, отсутствует, описан ряд исключений, связанных с наблюдением спороподобных структур у *S. griseus* (Daza *et al.*, 1989; Kendrick & Ensign, 1983), *S. chrysomallus* (Kuimova & Soina, 1981) *S. acrimycini*, *S. antibioticus* (Novella *et al.*, 1992), *S. albidoflavus* (Rho & Lee, 1994), *S. venezuelae* (Glazebrook *et al.*, 1990) и *S. brasiliensis* (Rueda *et al.*, 2001).

Глубокое понимание процесса морфологической дифференциации имеет важное значение для промышленных ферментаций, так как было обнаружено, что вторичный метаболизм соответствует окончанию этапа дифференциации септированного первичного мицелия (МI) во вторичный многоядерный мицелий (МII) как в погруженной культуре, так и в культуре на плотных средах (Manteca *et al.*, 2008; 2010; Yagüe *et al.*, 2013).

### 1.3 Генетические особенности бактерий рода *Streptomyces*

Актинобактерии рода *Streptomyces* являются грамположительными бактериями с высоким содержанием Г+Ц пар как в хромосомной, так и плазмидной ДНК – от 70 до 74% для всех видов *Streptomyces*, для которых расшифрована полная геномная последовательность.

*S. coelicolor* A3 (2) – первый вид рода *Streptomyces*, для которого была получена полногеномная нуклеотидная последовательность, размер генома составил 8,6 м.п.н. и содержит 7825 рамок считывания (ORF), что больше, чем в геноме некоторых одноклеточных эукариотов, например, *Saccharomyces cerevisiae*, содержащего 6203 гена (Bentley *et al.*, 2002). Согласно данным базы данных GOLD (Genomes OnLine Database), выполнено 146 проектов по секвенированию геномов видов *Streptomyces*, в том числе 15 из них секвенированы полностью и 128 – с разрывами в последовательности. Размер полученных геномов значительно варьирует у видов рода, диапазон составляет от 5,18 до 11,9 м.п.н., в большинстве случаев – от 7 до 10 м.п.н., и является одним из крупнейших известных бактериальных геномов. Нижний предел представлен хромосомой патогена человека *S. somaliensis*, что является результатом адаптации патогенных бактерий (Toft & Andersson, 2010).

Считается, что бактерии имеют одну кольцевую хромосому, в отличие от эукариотических клеток, содержащих линейную хромосому (Riley & Anilionis, 1978). Тем не менее, была продемонстрирована линейность хромосомы *S. lividans* (Lin *et al.*, 1993). В дальнейшем эта особенность оказалась характерной и для других представителей рода *Streptomyces* (Leblond *et al.*, 1993; Lezhava *et al.*, 1995).

Наличие линейной хромосомы, редко встречающееся у прокариотов, не ограничивается родом *Streptomyces*, но, в основном, представлено у представителей порядка *Actinomycetales*. Это не является общей характеристикой рода, так как в родах *Nocardia*, *Rhodococcus* и *Amycolatopsis* также обнаружены виды как с линейной (*Nocardia asteroides*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus jostii* и *Amycolatopsis orientalis*) (McLeod *et al.*, 2006; Redenbach *et al.*, 2000), так и с кольцевой (*Nocardia farcinica*, *Rhodococcus erythropolis* и *Amycolatopsis mediterranei*) хромосомой (Ishikawa *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2010). Наличие линейной хромосомы не является исключительным для грамположительных бактерий: род

*Borrelia* из группы спирохет также имеет линейную, хотя и меньшую хромосому, близкую к 1 м.п.н. (Ferdows & Barbour, 1989).

Для решения проблемы репликации теломер линейная хромосома стрептомицетов имеет высоко консервативные как в последовательности, так и в размерах (примерно 185 аминокислот) терминальные белки (PTs), являющиеся праймерами для ДНК-полимеразы (Bao & Cohen, 2001; Yang *et al.*, 2002).

Другой характеристикой линейной хромосомы *Streptomyces* является наличие повторяющихся инвертированных последовательностей на обоих концах. Последовательности варьируют в размерах в зависимости от вида (от 174 п.н. у *S. avermitilis* до 550 т.п.н. у *S. rimosus*) и, будучи очень нестабильными, являются восприимчивыми к крупным амплификациям и делециям (Pandza *et al.*, 1997; Ventura *et al.*, 2007). Эти делеции могут быть разными, начиная от потери маркеров, таких, как ген устойчивости к хлорамфениколу в *S. lividans* и *S. coelicolor* A3 (2), и заканчивая потерей концов хромосом, приводящей к циклизации хромосомы (Dittrich *et al.*, 1991; Redenbach *et al.*, 1993).

Несмотря на видимость кажущейся дезорганизации генетического аппарата стрептомицетов, давление естественного отбора направлено на сохранение информации и ценных аспектов структуры хромосомы и ограничивает скорость геномных изменений (Lawrence & Hendrickson, 2005). Анализ полной последовательности генома *S. coelicolor* A3 (2) выявил строгую организацию генов хромосомы: есть центральная область (core region) в 5 м.п.н., где сгруппированы гены, связанные с первичным метаболизмом, и два плеча в 1,5 м.п.н. (левое) и 2,3 м.п.н. (правое), которые включают в себя «несущественные» гены, среди которых – гены вторичного метаболизма (Bentley *et al.*, 2002).

Выравнивание хромосом различных актиномицетов показало, что наибольшая степень синтении наблюдается в центральной области (Bentley *et al.*, 2002). Этот высокий уровень сохранности генов центральной области контрастирует с таковым для концевых участков хромосом, где сходство последовательности являлось низким (Hsiao & Kirby, 2008).

Обнаружены два региона на хромосомах актиномицетов, расположенные между высоко консервативной центральной областью и концевыми областями с низкой синтением. Область хромосомы, специфичная для представителей рода *Streptomyces*, расположена справа от центральной части. Специфическая для порядка *Actinomycetales* область находится слева от центральной области хромосомы и имеет высокую степень синтении как среди рода *Streptomyces*, так и среди *Actinomycetales* в целом. Наличие этих двух областей было использовано для определения эволюционного происхождения рода *Streptomyces*, его отделения от актиномицетного предка. Предположительно, на первом этапе происходило освоение региона, специфического для всех представителей порядка *Actinomycetales*, на втором – расшире-

ние хромосомы путем приобретения региона, специфического для представителей рода *Streptomyces* (Kirby *et al.*, 2011).

Терминальные области хромосомы представителей рода являются нестабильными, в них генные перестройки происходят в серьезных масштабах. Большие делеции и амплификации делают представителей рода *Streptomyces* генетически неустойчивыми, частота мутаций в спорах составляет более 0,1% (Volf & Altenbuchner, 1998). Линейная структура хромосомы вместе с четко определенной организацией основных генов в центральном районе и «несущественных» генов в терминальных участках позволяет увеличить размер хромосомы, не затрагивая «кор», что дает адаптивное преимущество перед кольцевой хромосомой (Kirby, 2011).

Кроме того, высокая генетическая пластичность концов хромосом является сложным адаптивным преимуществом в такой среде, как почва – естественной среде обитания *Streptomyces*. Генетическая нестабильность наряду с взаимодействием хромосомы стрептомицетов с линейными плазмидами приводит к высокому полиморфизму концевых участков хромосомы, что, в свою очередь, ведет к появлению огромного разнообразия штаммов и вторичных метаболитов; этот эволюционный механизм позволяет быстро реагировать на многочисленные физиологические и экологические изменения и предоставляет адаптивное преимущество для выживания в условиях окружающей среды (Chen *et al.*, 2010; Volf & Altenbuchner, 1998).

У стрептомицетов широко распространены внехромосомные генетические элементы, такие как плазмиды. Плазмиды стрептомицетов варьируют по форме: описаны кольцевые, линейные и интегративные плазмиды. Различные варианты могут сосуществовать в одном и том же штамме, одним из примеров является *S. coelicolor* A3 (2), у которого были охарактеризованы три типа плазмид: линейная SCP1 (350 т.п.н.), кольцевая SCP2 (31 т.п.н.) и интегрированная в хромосому SLP1.

Большинство кольцевых плазмид, найденных в *Streptomyces*, имеют размер 8-14 т.п.н. и высокую копияность. Некоторые из них были использованы для создания векторов, несущих гены устойчивости к антибиотикам, бифункциональных векторов, векторов чувствительности к температуре (Cohen, 2013; Horwood *et al.*, 1985; Muth *et al.*, 1995).

Описано небольшое количество линейных плазмид, кодирующих гены биосинтеза антибиотиков: плазида pSCP1 (350 т.п.н.) в *S. coelicolor* содержит гены, связанные с синтезом метиленомицина (Kinashi & Shimaji-Murayama, 1991); плазида pSLA-L (211 т.п.н.) в *S. rochei* содержит кластеры генов биосинтеза ланкацидина, ланкамицина, митрамицина и каротиноидов (Mochizuki *et al.*, 2003); плазида pKSL (520 т.п.н.) в *S. lasaliensis* обладает кластерами генов синтеза антибиотиков лазалоцида и эхиномицина (Kinashi, 2011); и, нако-

нец, один из наиболее ярких представителей (по размеру и содержанию) – мегаплазмида pSCL4 *S. clavuligerus*, гигантский линейный внехромосомный элемент (1,8 м.п.н.), представляющий собой огромный резервуар информации, связанной исключительно с синтезом нескольких вторичных метаболитов (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2014; Medema *et al.*, 2010).

Плазмиды играют существенную роль в производстве и горизонтальном переносе генов биосинтеза вторичных метаболитов, увеличивая пластичность генома и превращая представителей рода в крупнейших производителей известных вторичных метаболитов.

## Глава 2 Биосинтез такролимуса

Род *Streptomyces* – крупный производитель вторичных метаболитов. Первым антибиотиком, полученным из актиномицетов, стал актиномицин, выделенный в 1940 г. из культуры *Actinomyces antibioticus* (в настоящее время – *Streptomyces antibioticus*), впоследствии не нашедший клинического применения из-за своей высокой токсичности. Позже были обнаружены другие антибиотики из культур *Streptomyces*: клавоцин, фумигацин и стрептотрицин, – которые также не нашли широкого клинического применения.

Второе событие, которое отмечено в истории лечения инфекционных заболеваний, – это открытие стрептомицина Зельманом Ваксманом (Norwood, 2007). Стрептомицин из культуры *Streptomyces griseus* – первый аминогликозидный антибиотик и первый эффективный препарат для лечения туберкулеза (Schatz *et al.*, 1944). В 1952 г. за его открытие Ваксман был удостоен Нобелевской премии по медицине.

Открытие стрептомицина, а затем целого ряда антибиотиков, производимых видами рода *Streptomyces*, таких, как цефалоспорин, тетрациклин, хлорамфеникол, канамицин или неомицин, и др., пробудило интерес, в том числе, фармацевтических компаний, к данному роду микроорганизмов не только из-за его способности синтезировать антибиотики, но также противоопухолевые агенты (актиномицин, даунорубин, митрамицин), иммунодепрессанты (такролимус, рапамицин, аскомицин), противогрибковые (пимарицин, нистатин, амфотерицин В, кандицидин) и антигельминтные препараты (авермектин), гербициды (биалафос, фосфинотрицин), пестициды (полиоксин), противовирусные средства (конканамицин А, гилвокарцин), инсектициды (инданомин) и др. (Chaudhary *et al.*, 2013; Procópio *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2003).

## 2.1 История открытия такролимуса и применение в медицине

Такролимус впервые был обнаружен в культуральной жидкости *Streptomyces tsukubaensis* в 1984 г. во время скрининга, проводимого компанией «Fujisawa Pharmaceutical Co.» (в настоящее время «Astellas Pharma Inc.»). Штамм *S. tsukubaensis* был выделен из почвенного образца в регионе Цукуба (Япония), а такролимус стал первым иммунодепрессантом с макролидной структурой (Kino *et al.*, 1987a; 1987b). Штамм, запатентованный как *S. tsukubaensis* № 9993, известен как *S. tsukubaensis* NRRL 18488 и является родительским штаммом для большинства штаммов, используемых для промышленного производства такролимуса.

На сегодняшний день известно около 20 продуцентов такролимуса, все из них относятся к роду *Streptomyces*, например, *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>T</sup>, *S. clavuligerus* CKD 11193 и *S. kanamyceticus* KCC S-0433<sup>T</sup> (Barreiro & Martínez-Castro, 2014). Несмотря на ряд публикаций, связанных с описанием кластера генов биосинтеза такролимуса у некоторых штаммов, надлежащего таксономического описания вида *S. tsukubaensis* до 2013 г. сделано не было. В результате углубленного изучения морфологических и физиологических особенностей штамма 9993<sup>T</sup> (*S. tsukubaensis*), его филогенетическое положение было подтверждено, при этом было предложено уточненное название штамма *S. tsukubensis* (Muramatsu & Nagai, 2013).

Такролимус, 23-членный макролид (822 Да), первоначально названный FR900506, позже получил другие названия, такие как FK-506 или фуджимидин. Наименование такролимус было образовано от «Tsukuba Macrolide Immunosuppressant» (Wallemacq & Reding, 1993).

Такролимус является ингибитором кальциневрина и демонстрирует механизм действия, очень схожий с механизмом действия циклоспорина (рисунок 4) (Liu *et al.*, 1991).

Такролимус проникает в клетку путем диффузии и связывается с внутриклеточным белком FKBP12 (Harding *et al.*, 1989). Образующийся комплекс FKBP12/FK-506 ингибирует кальциневрин, представляющий собой кальмодулин-зависимую серин/треонин фосфатазу, что приводит к остановке пролиферации Т-клеток (Тосси *et al.*, 1989). Описанный механизм действия высоко консервативен в как Т-клетках человека, так и низших эукариотов, таких как дрожжи и мицелиальные грибы, в которых кальциневрин выполняет различные функции, включая регуляцию генов и катионный гомеостаз; это определяет противогрибковую активность такролимуса (Foor *et al.*, 1992; Kunz & Hall, 1993; Arndt *et al.*, 1999; Rusnak & Mertz, 2000).

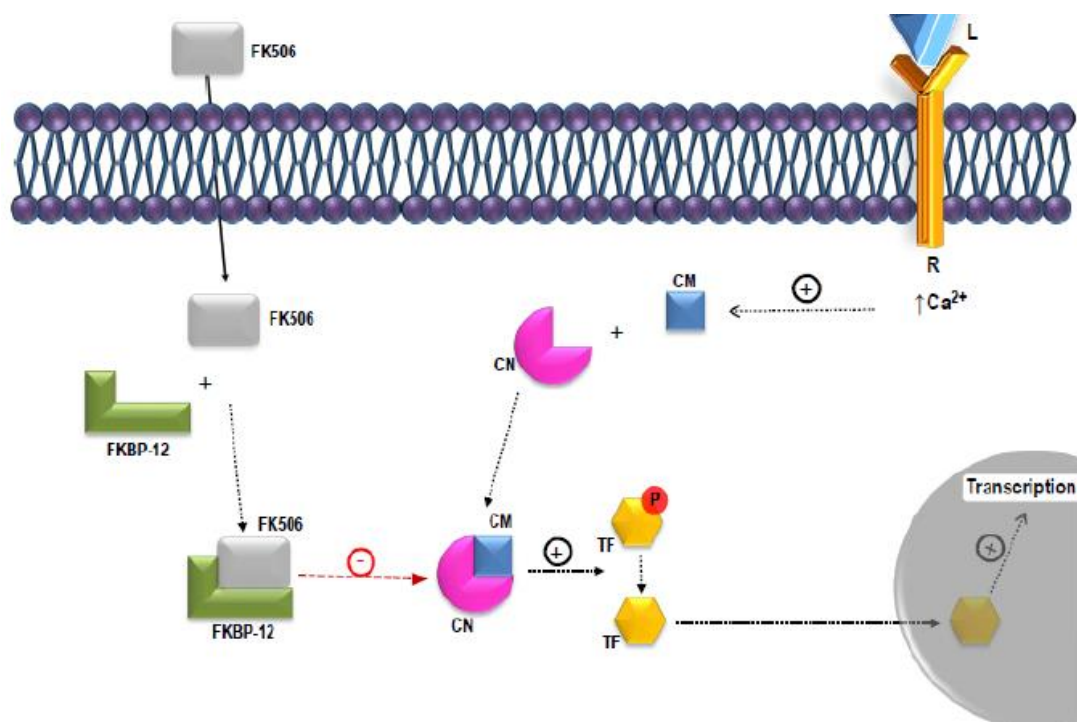


Рисунок 4 – Механизм действия такролимуса. Такролимус взаимодействует с цитозольным рецептором FKBP12. Комплекс FKBP12/FK-506 ингибирует кальмодулин-зависимую серин/треонин фосфатазную активность кальциневрина. В результате кальциневрин становится неспособным дефосфорилировать транскрипционные факторы. L – лиганд, R – рецептор, CM – кальмодулин, CN – кальциневрин, TF – фактор транскрипции, P – фосфатная группа, FKBP12 – FK-506-связывающий белок (Ordóñez-Robles *et al.*, 2018a)

С момента одобрения Федеральной инспекцией по лекарственным средствам (Federal Drug Administration, FDA) использования такролимуса для трансплантации печени в 1994 г., такролимус также стал применяться для трансплантации костного мозга, почки и сердца (Trede *et al.*, 1997; Meier-Kriesche *et al.*, 2006; McCormack & Keating, 2006). Этот макролид также используется для лечения других заболеваний, таких как атопический дерматит (Ingram *et al.*, 2009; Remitz & Reitamo, 2009), применяется при имплантации стентов в коронарных артериях (Romano *et al.*, 2010). Было опубликовано несколько работ о его успешном использовании при таких иммунных заболеваниях, как ревматоидный артрит и некоторых кишечных воспалительных заболеваниях (Akimoto *et al.*, 2008; Benson *et al.*, 2008). Такролимус проявляет противовирусную активность против ортопоксвируса, ВИЧ и вируса иммунодефицита кошек (FIV) (Karpas *et al.*, 1992; Mortola *et al.*, 1998; Briggs *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2006), обладает свойствами стимулятора роста волос (Yamamoto *et al.*, 1994). Сообщается о его нейропротекторных и нейрорегенеративных свойствах (Klettner & Herdegen, 2003; Sierra-Paredes & Sierra-Marcuño, 2008; Konofaos & Terzis, 2013), а также о его возможном применении в лечении рака (Periyasamy *et al.*, 2007). Недавно также сообщалось об его эффективно-



сти при лечении аллергических глазных заболеваний (Barot *et al.*, 2016). Последние исследования свидетельствуют об эффективности применения такролимуса в сочетании с противовоспалительными кортикостероидными препаратами в лечении пациентов с тяжелыми осложнениями, вызванными новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) (Russel *et al.*, 2020).

Эффективность такролимуса в предотвращении отторжения чужеродных органов и тканей после трансплантации, а также терапии аутоиммунных заболеваний лежит в основе его промышленной важности. Такролимус в 10-100 раз эффективнее циклоспорина (Pirsch *et al.*, 1997; Jiang & Kobayashi, 1999), имеет значительные преимущества для фармацевтического рынка: продажи такролимуса под коммерческими названиями «Prograf» и «Protopic» принесли «Astellas Pharma» в 2016 г. 1727 млн. долларов прибыли (<http://www.pharmacompass.com>).

## 2.2 Путь биосинтеза такролимуса

Первые исследования пути биосинтеза такролимуса были выполнены в 90-х гг. фармацевтической компанией «Merck» (США) (Shafiee *et al.*, 1994; Motamedi *et al.*, 1996; 1997; Motamedi & Shafiee, 1998). Синтез такролимуса осуществляется гибридной поликетидсинтазой модульного типа (I тип) и нерибосомальной пептид-синтетазой (PKSI-NRPS). Кластер генов биосинтеза такролимуса включает, по крайней мере, 19 генов (рисунок 5). В штаммах-продуцентах обнаружены два типа кластеров генов биосинтеза такролимуса (Goranovič *et al.*, 2012):

1. кластер с редуцированным набором генов, который включает гены *fkqQ*, *fkqN*, *fkqM*, *fkqD*, *fkqA*, *fkqP*, *fkqO*, *fkqB*, *fkqC*, *fkqL*, *fkqK*, *fkqJ*, *fkqI*, *fkqH*, *fkqG*, *allD*, *allR*, *allK* и *allA* (представлен в *S. tacrolimicus* и *S. kanamyceticus* KCTC 9225);
2. кластер с полным набором генов, который содержит 5 дополнительных генов в 5'-области гена *fkqG* (*allMNPOS* / *tcs12345*) и один или два дополнительных гена (в зависимости от вида) в 3'-области (*tcs6-fkqR* / *tcs67*) (представлен в *S. tsukubaensis* NRRL 18488, *S. tsukubaensis* L19 и *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP).

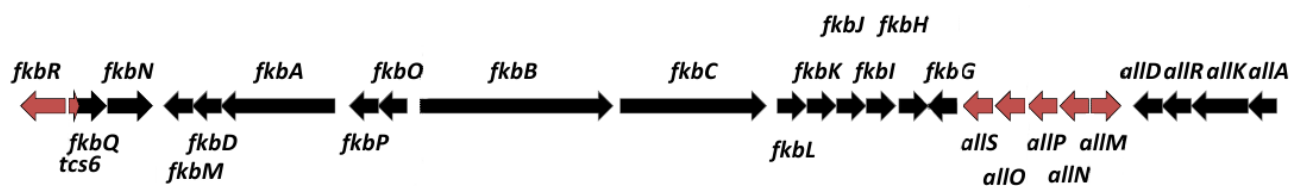


Рисунок 5 – Кластер генов биосинтеза такролимуса. Черные стрелки – гены, присутствующие в кластере как с редуцированным, так и с полным набором генов. Красные стрелки – ге-

ны, присутствующие только в кластере с полным набором генов (Ordóñez-Robles *et al.*, 2018a)

Биосинтез такролимуса начинается с образования (4R,5R)-4,5-дигидроксициклогекс-1-енкарбоновой кислоты (ДНСНС) из хоризмата за счет так называемой хоризматазной активности белка FkbO (Andexer *et al.*, 2011). ДНСНС является стартовой единицей в образовании углеродного скелета и соответствует циклогексановому кольцу в конечной структуре макролида. Поликетидсинтазы FkbA (4 модуля), FkbB (5 модулей) и FkbC (2 модуля) катализируют 10 стадий элонгации из ДНСНС с использованием в качестве единиц удлинения малонил-КоА (2 молекулы), метилмалонил-КоА (5 молекул), метоксималонил-АПБ (2 молекулы) и аллилмалонил-КоА (1 молекула). Последние две единицы удлинения являются необычными в образовании поликетидов и приводят к включению метоксильной группы в С13 и С15 положениях и аллильного радикала в С21 положении (Carroll *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2002; Mo *et al.*, 2011; Goranovič *et al.*, 2012). Биосинтез метоксималонил-АПБ зависит от ферментов, кодируемых подкластером *fbkGHJK* (Wu *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2013). Включение аллилмалонил-КоА является единственным отличием между такролимусом и аскомицином (FK-520), для биосинтеза которого вместо этого используется этилмалонил-КоА. Подкластер *all* задействован в образовании аллилмалонил-КоА и кодирует поликетидсинтазу необычной структуры (Goranovič *et al.*, 2010). Однако в некоторых этапах образования аллилмалонил-КоА могут участвовать ферменты, кодируемые вне кластера генов биосинтеза такролимуса – предположительно, в синтезе аллилмалонил-КоА участвует ряд ферментов (кеторедуктазная и дегидратазная активности), относящихся к пути синтеза жирных кислот (Mo *et al.*, 2011). Кластер генов биосинтеза такролимуса не кодирует трансацилазу АПБ-КоА, необходимую для конечной реакции, приводящей к образованию аллилмалонил-КоА (Mo *et al.*, 2011), но ацилтрансферазный домен 4-го модуля FkbB (AT4FkbB) способен переносить аллилмалонильную единицу на АПБ-домен (Jiang *et al.*, 2015).

Для циклизации макролида циклоаминаза лизина FkbL образует L-пипеконат из L-лизина (Burne *et al.*, 1993), который включается в углеродный скелет с помощью NRPS FkbP, в результате образуется промежуточное соединение пре-такролимус (9-дезоксо-31-О-десметил-FK506) (Motamedi & Shafiee, 1998; Gatto *et al.*, 2005; 2006).

Для получения конечной молекулы с биологической активностью необходимы две модификации: метилирование гидроксильной группы, расположенной в С31 положении, и окисление атома углерода в С9 положении. Метилирование катализируется S-аденозилметионин зависимой O-метилтрансферазой FkbM, окисление – цитохром-P450-

оксидоредуктазой FkbD (Motamedi *et al.*, 1996; Shafiee *et al.*, 1997). Обе активности закодированы в одном и том же опероне и могут происходить в любом порядке (Motamedi *et al.*, 1996; Van *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013). Путь биосинтеза такролимуса представлен на рисунке 6.

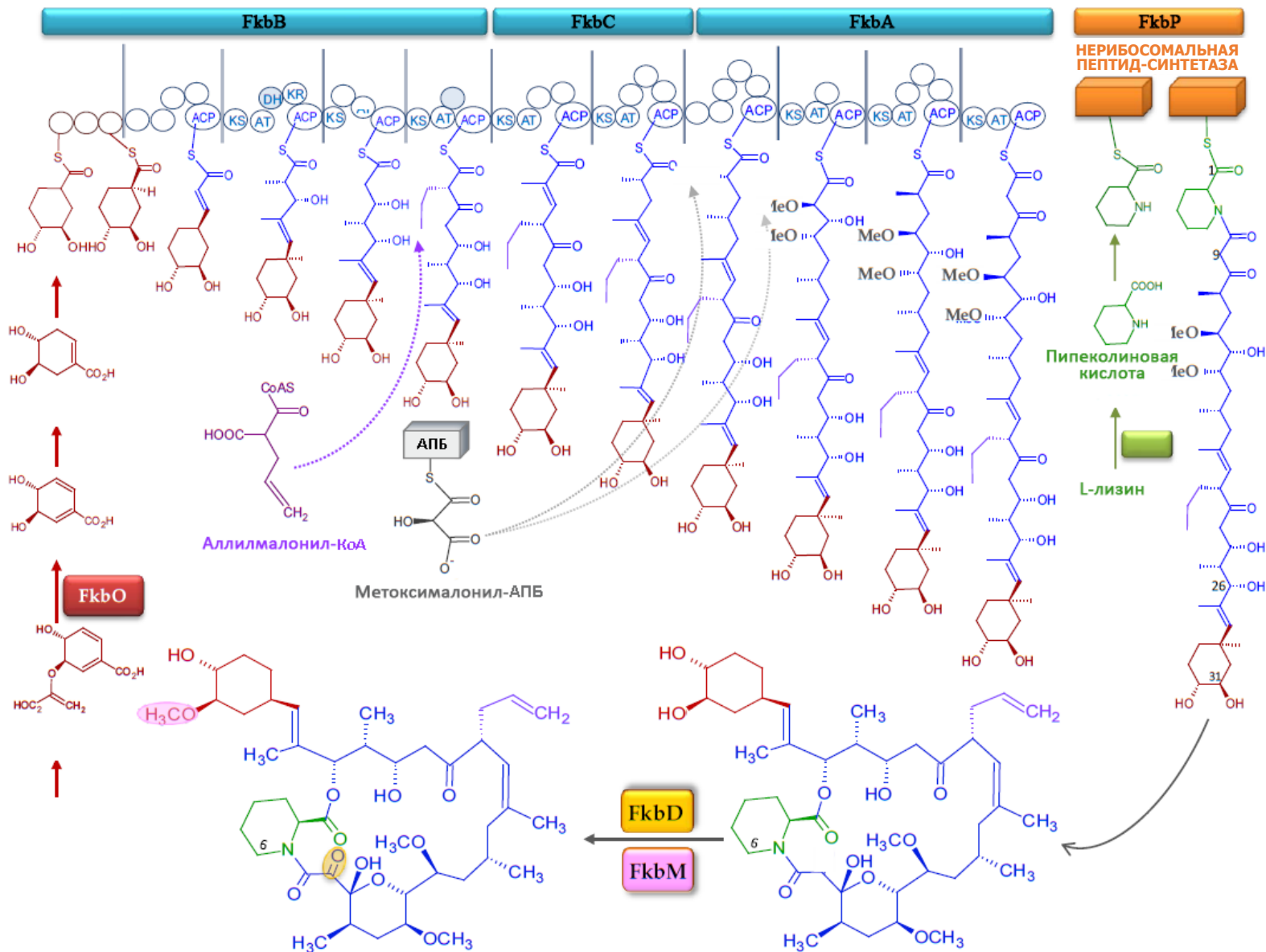


Рисунок 6 – Путь биосинтеза такролимуса (Barreiro & Martínez-Castro, 2014; Motamedi & Shafiee, 1998)

### 2.3 Регуляция биосинтеза такролимуса

Первый анализ последовательности кластера генов биосинтеза такролимуса выявил три потенциальных регулятора: *fkbN*, *fkbR* и *allN* (принадлежащих к семействам LAL, LysR и AsnC, соответственно). FkbN – крупный регуляторный белок семейства LAL (Large ATP binding regulators of the LuxR family). Регуляторы LAL – большие белки (872-1159 аминокислот), которые содержат НТН (спираль-поворот-спираль) ДНК-связывающую область LuxR-типа вблизи С-конца белка и АТФ-связывающий мотив на N-конце (Schrijver & Mot, 1999; Bibb, 2005). *fkbN*-Подобные гены были обнаружены в кластерах генов ряда других макролидов, включая *rapH* продуцента рапамицина *S. hygroscopicus* (Molnár *et al.*, 1996), *pikD* продуцента пикромицина *S. venezuelae* (Wilson *et al.*, 2001), *gdmR1* и *gdmR2* продуцента гелданамицина *S. hygroscopicus* (He *et al.*, 2008), *fkbN* продуцента аскомицина *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (Wu *et al.*, 2000), *fscR1* продуцента кандицида *S. griseus* (Chen *et al.*, 2003; Martín & Aparicio, 2009), *pimM* продуцента пимарицина *S. natalensis* (Santos-Aberturas *et al.*, 2011a; 2011b), *nysR* продуцента нистатина *S. noursei* (Brautaset *et al.*, 2000), *amphRIV* продуцента амфотерицина В *S. nodosus* (Carmody *et al.*, 2004) и *pteF* продуцента комплекса макроциклических поликетидов филипины I-IV *S. avermitilis* (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003).

Второй регуляторный белок FkbR относится к семейству транскрипционных регуляторов LysR-типа, также называемых LTTR, которые являются распространенными ауторегуляторными генами у бактерий (Song *et al.*, 2017). Они широко представлены у *Streptomyces*: так, секвенирование генома *S. coelicolor* выявило около 40 LTTR (Bentley *et al.*, 2002). FkbR, как и другие члены семейства LTTR, представляет собой относительно небольшой белок, содержащий менее 325 аминокислот, который характеризуется НТН ДНК-связывающим мотивом на С-конце и лиганд-связывающей последовательностью в N-концевой области (Schell, 1993; Maddocks & Oyston, 2008). Другие LTTR, действующие как специфичные регуляторы, включают SCLAV\_p1262 из *S. clavuligerus*, ThnI из *S. cattleya*, AbaB из *S. antibioticus* и ClaR из *S. avermitilis* (Pérez-Redondo *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2008).

*allN* – третий потенциальный регуляторный ген, располагающийся в кластере генов биосинтеза такролимуса. Этот ген находится на 5'-конце кластера с полным набором генов и кодирует белок, имеющий сходство с регуляторными белками, участвующими в метаболизме азота, особенно с регуляторами семейства AsnC (Kölling & Lother, 1985). Этот ген включен в область, которая участвует в образовании предшественника аллилмалонил-КоА (*all* гены) (Mo *et al.*, 2011; Goranovič *et al.*, 2010).

Функциональный анализ роли FkbN, FkbR и AllN в *S. tsukubaensis* показал, что инактивация *fkbN* приводит к потере способности синтезировать такролимус, тогда как наруше-

ния в *fkfR* уменьшали продукцию на 20% по сравнению с родительским штаммом, инактивация *allN* не влияла на продукцию такролимуса. Таким образом, гены *fkfN* и *fkfR* являются положительными регуляторами биосинтеза такролимуса (Goranovič *et al.*, 2012). Сверхэкспрессия *fkfN* или *fkfR* с промотора *ermE\** в диком штамме в оптимизированной по составу питательной среде приводила к увеличению выхода такролимуса на 55% и 30%, соответственно.

Между FkfN и FkfR существуют значительные различия, заключающиеся в следующем:

1. *fkfN* присутствует в кластере как с редуцированным, так и с полным набором генов биосинтеза такролимуса, тогда как *fkfR* есть только в кластере с полным набором генов (Mo *et al.*, 2011);
2. FkfN всегда оказывает положительное влияние на продукцию такролимуса, в то время как FkfR (он же Tcs2) может оказывать как положительное, так и отрицательное влияние (Goranovič *et al.*, 2012; Mo *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013);
3. полное отсутствие продукции такролимуса происходит только при инактивации *fkfN*, но не *fkfR* (Goranovič *et al.*, 2012; Ordóñez-Robles *et al.*, 2016);
4. транскрипция *fkfR* является постоянной и низкой в течение всего периода культивирования, тогда как транскрипция *fkfN* увеличивается перед началом синтеза такролимуса и сохраняется на этапе синтеза (Goranovič *et al.*, 2012; Ordóñez-Robles *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Ранние исследования показали, что инактивация *fkfR* или *fkfN* предотвращает транскрипцию определенных генов (*fkfG* и *fkfB*) в кластере генов биосинтеза такролимуса в *S. tsukubaensis*, из чего следует, что одни гены кластера регулируются FkfN, а другие нет (Goranovič *et al.*, 2012). Позже было выяснено, что FkfN контролирует экспрессию большинства генов кластера генов биосинтеза такролимуса (Ordóñez-Robles *et al.*, 2016). Впоследствии гены кластера были разделены на два типа: FkfN-зависимые (*fkfABC*, *fkfGHIJK*, *fkfL*, *allAKRD*, *fkfO*, *fkfP*, *fkfD* и *fkfM*), и FkfN-независимые (*allMNPOS* и *fkfR*).

В кластере генов биосинтеза такролимуса было идентифицировано 6 транскрипционных единиц: *fkfR*, *tcs6-fkfQ-fkfN*, *fkfOPADM*, *fkfBCLKJIH*, *fkfG* и *allAKRD*. Было показано, что *fkfR* транскрибируется как безлидерная мРНК, а *fkfN* образует оперон вместе с *tcs6* и *fkfQ*, транскрипция которых зависит от двух разных промоторов, один из которых является FkfN-зависимым, а другой – FkfN-независимым (Ordóñez-Robles *et al.*, 2016). Установлено, что FkfR связывается с промоторными областями *tcs6-fkfQ-fkfN* и *fkfR*, также были идентифицированы две новые транскрипционные единицы, соответствующие *allNPOS* и *allM*

(Zhang *et al.*, 2016). Позже было обнаружено еще 9 транскрипционных единиц, *allOS* и *allNP* транскрибировались как независимые мРНК (Bauer *et al.*, 2017).

## 2.4 Биосинтез аналогов такролимуса

Наряду с такролимусом в процессе биосинтеза такролимуса образуются его близкие структурные аналоги (Goto *et al.*, 1984; Hatanaka *et al.*, 1989; Dumont *et al.*, 1992). Наиболее близкими аналогами являются соединения FK-520 и FK-506D, отличающиеся природой радикальных групп в боковой цепи в C21 положении (рисунок 7). Такролимус содержит аллильную группировку, FK-520 – этильную, и FK-506D – пропильную.

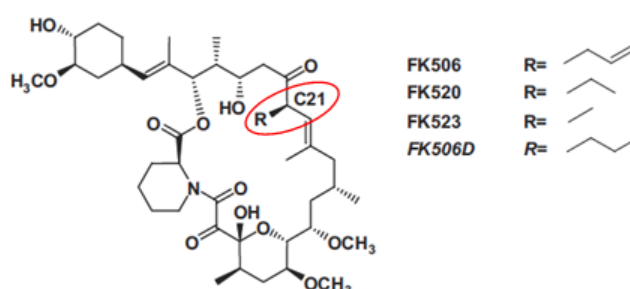


Рисунок 7 – Структурные формулы такролимуса и его аналогов (Kosec *et al.*, 2012)

FK-520, или аскомицин, был выделен в 1962 г. из культуры *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyeticus* (ATCC 14891) и охарактеризован как метаболит с противогрибковыми свойствами (Arai *et al.*, 1962). В 1988 г. фармацевтическая компания «Fujisawa» в рамках скрининга новых молекул с иммуносупрессорными свойствами получила это же соединение из культуральной жидкости штамма *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*, выделенного из почвенного образца в районе Якушима (Япония) (Hatanaka *et al.*, 1988). FK-520 использовался под названием «Eidel» в иммуносупрессивной терапии atopического дерматита с 2001 г. после утверждения FDA.

Кластер генов биосинтеза FK-520 был охарактеризован в 2000 г., при этом отмечено, что он имеет одинаковую организацию и высокую идентичность гомологичных генов, описанных для кластера генов биосинтеза такролимуса (Wu *et al.*, 2000). Это приводит к тому, что штаммы, продуцирующие такролимус, синтезируют также FK-520: для некоторых штаммов относительное содержание аскомицина превышает 20% (по отношению к такролимусу), при этом образуются некоторые количества другого побочного продукта FK-506D.

Образование структурных аналогов в процессе биосинтеза такролимуса является одной из наиболее значимых проблем при производстве такролимуса. Очистка от этих нежела-

тельных примесных продуктов сложна, приводит к потерям дорогостоящего целевого продукта (Cabri *et al.*, 2006; Cvak *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009).

Предпринятые попытки снижения или полного предотвращения образования побочных макролидов за счет генетической инженерии штаммов-продуцентов пока не привели к желаемому результату вследствие высокой идентичности путей биосинтеза структурных аналогов из одних и тех же близких предшественников (Jones *et al.*, 2013) Однако, удалось несколько сократить нежелательное образование побочных продуктов у генно-инженерных штаммов при добавлении в ферментационную среду экзогенных предшественников, таких как шикимат, хоризмат, валин, пипеколат и др., (Huang *et al.*, 2013b; Xia *et al.*, 2013). Синтез FK-520 был полностью устранен путем разрушения гена *allR* (кодирует кротонил-КоА-карбоксилазу/редуктазу) с последующим добавлением аллилмалонил-SNAC – аналога аллилмалонил-КоА, полученного химическим синтезом (Kosec *et al.*, 2012).

Однако применение в промышленном производстве такролимуса синтезированных химическим путем близких предшественников такролимуса существенно удорожает процесс. В настоящее время наиболее эффективным подходом при решении проблемы, связанной с образованием нежелательных макролидных аналогов, остается совершенствование систем очистки субстанции такролимуса за счет применения современных методов промышленной хроматографии (Cabri *et al.*, 2006; Keri *et al.*, 2006).

## 2.5 Метаболические пути, участвующие в биосинтезе такролимуса

В связи с низкой эффективностью известных способов биосинтеза такролимуса, большое количество исследований было сосредоточено на идентификации узких мест в процессе биосинтеза FK-506, опираясь на предположение, что низкое содержание внутриклеточных предшественников является одним из главных лимитирующих факторов.

Рядом исследователей увеличение производства такролимуса достигалось путем манипуляции с генами биосинтетических путей и обогащения продуктивной среды молекулами экзогенных предшественников. С использованием этой стратегии удалось повысить выход такролимуса у *S. clavuligerus* SKD1119 в 3,4 раза за счет увеличения внутриклеточной концентрации предшественника метилмалонил-КоА путем экспрессии гетерологичных генов *mutAB* *Saccharopolyspora erythraea*, кодирующих белки пути синтеза метилмалонил-мутазы (MutAB), а также добавлением метилового эфира олеиновой кислоты в культуральную среду (Mo *et al.*, 2009). Два других биосинтетических пути синтеза (пропионил-КоА-карбоксилазный, PCC; метилмалонил-КоА-лигазный, MatB) не приводили к значительному увеличению продукции такролимуса (Mo *et al.*, 2009).



В последующих работах (Mo *et al.*, 2013) были изучены три пути синтеза метилмалонил-КоА у мутантного штамма *Streptomyces* sp. RM7011. Было обнаружено, что избыточная экспрессия генов *accAI* и *rccB*, участвующих в пути синтеза пропионил-КоА-карбоксилазы (PPC), приводит к увеличению выхода такролимуса. Высокий титр был получен с добавлением в ферментационную среду предшественника в пути синтеза PPC – винилпропионата и Tween-80 (для стимулирования активности липазы). Липаза катализирует превращение пропионата в пропионил-КоА, который преобразуется в метилмалонил-КоА по PPC-пути (Mo *et al.*, 2013), ранее также было показано, что активность липазы связана с продукцией такролимуса в *S. clavuligerus* SKD1119 (Kim & Park, 2007).

За счет дублирования специфических генов метоксималонил-АПБ-пути и аллилмалонил-КоА-пути (*fkbgHIJK* и *tcsABCD*, соответственно) при одновременной оптимизации добавок глюкозы было достигнуто увеличение продукции такролимуса в *S. tsukubaensis* на 150% (Chen *et al.*, 2012).

Серия работ по метаболомике привела к расшифровке метаболических путей, участвующих в биосинтезе такролимуса, и идентификации ключевых метаболитов для его синтеза.

Для *S. tsukubaensis* D852 была разработана метаболическая модель на геномном уровне (*genome-scale metabolic model*, GSMM), включающую 865 химических реакций и 621 метаболит, с целью определения мишеней для генетических манипуляций (Huang *et al.*, 2013a; 2013b). Таким образом было предсказано, что некоторые из модификаций в путях первичного метаболизма, приводящих к накоплению эритрозо-4-фосфата,  $\alpha$ -кетоглутарата, фумарата, сукцината, пирувата, фосфоенолпирувата, НАДФН, хоризмата и малонил-КоА, оказывают положительное влияние на продукцию такролимуса. Из этого следует, что пентозофосфатный путь (ПФП) и цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) положительно коррелируют с синтезом такролимуса (рисунок 8). Сверхэкспрессия генов, участвующих в формировании стартовой единицы ДНСНС, пипекolata и различных модификационных реакциях (*fkbo*, *fkbl*, *fkbp*, *fkbm* и *fkbd*), также оказывала положительный эффект. Однако комбинация позитивных мутаций не всегда имела аддитивный эффект: например, комбинированная сверхэкспрессия *fkbl* и *fkbp* приводила к снижению биомассы и продукции такролимуса.

Позднее были описаны узловые модули и ключевые метаболиты, проявление эффекта которых при биосинтезе такролимуса зависело от стадии культивирования (Pei *et al.*, 2017).

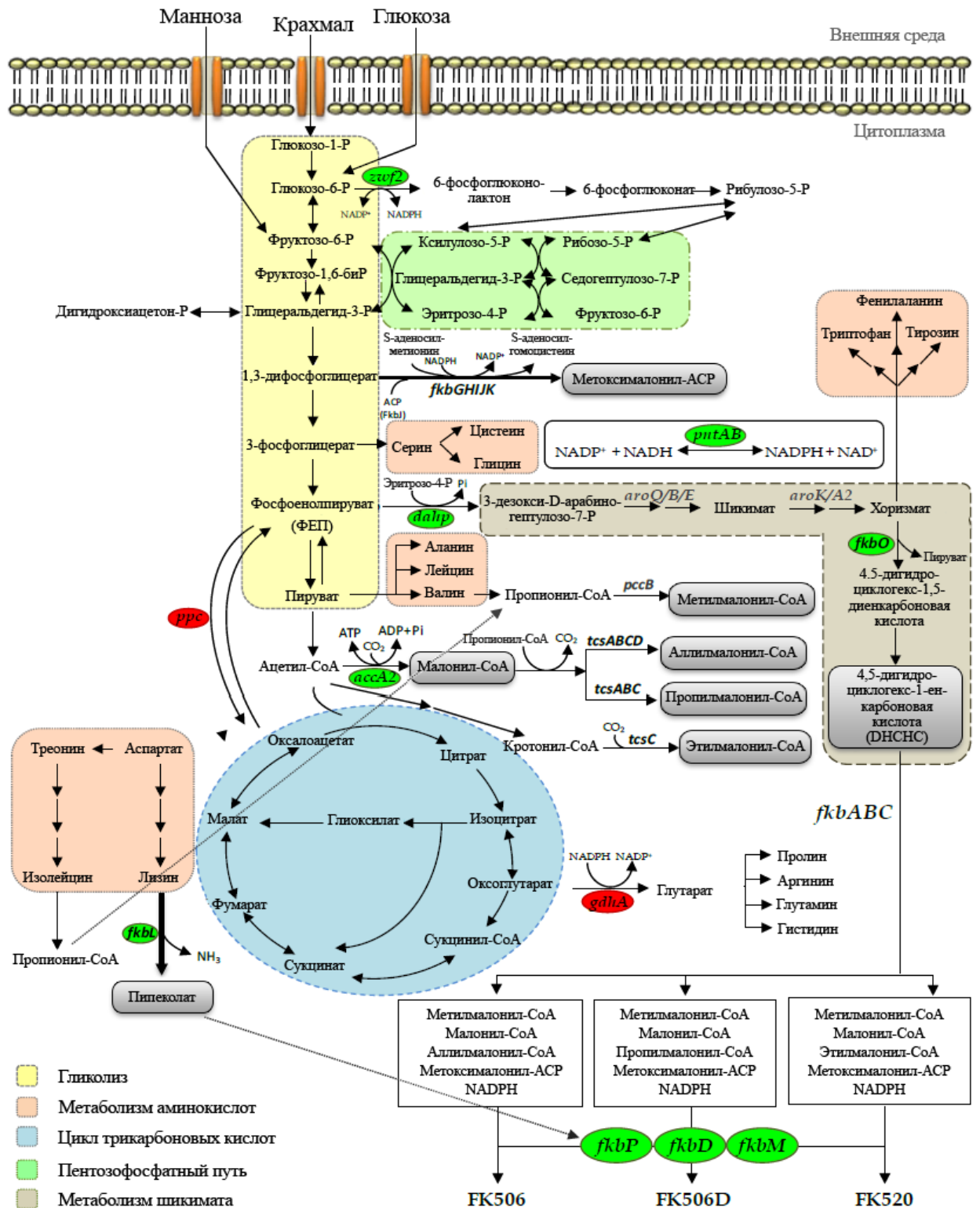


Рисунок 8 – Метаболические пути, участвующие в синтезе такролимуса и его аналогов в *S. tsukubaensis*. В овалах - гены, генетические манипуляции с которыми влияют на синтез такролимуса и его аналогов: зеленые овалы – гены с избыточной экспрессией, красные овалы – поврежденные гены (Barreiro & Martínez-Castro, 2014; Huang *et al.*, 2013a; 2013b; Xia *et al.*, 2013)

В дополнение к предыдущим результатам сообщалось о положительной корреляции с биосинтезом такролимуса шикиматного и аспартатного путей (рисунок 8). Показано, что сверхэкспрессия *aroC* и *dapA* (участвуют в шикиматном пути и биосинтезе лизина, соответственно) увеличивала продукцию макролида на 40% и 23%, соответственно. Однако модель, разработанная Huang *et al.* (2013a), является псевдостабильной метаболической моделью, то есть предполагает, что не происходит истощения или накопления внутриклеточных метаболитов. Динамический анализ баланса потоков (*dynamic flux balance analysis*, DFBA) позволяет учитывать колебания концентраций метаболитов и, таким образом, изучать взаимодействие между метаболизмом и изменениями в окружающей среде (Höffner *et al.*, 2013). В связи с этим была разработана модель DFBA на геномном уровне (GS-DFBA) для *S. tsukubaensis* NRRL 18488, которая обнаружила новые цели для генетических манипуляций (Wang *et al.*, 2017b). В результате было достигнуто увеличение продукции такролимуса за счет инактивации *gcdh* (глутарил-КоА-дегидрогеназа) и избыточной экспрессии *tktB* (транскетолаза), *msdh* (метилмалонат-полуальдегид-дегидрогеназа) и *ask* (аспартат-киназа).

Группой авторов был исследован рост *S. tsukubaensis* TJ-04 в двух средах одинакового состава, но с различной продуктивностью в отношении такролимуса (Xia *et al.*, 2013). В ходе работы были идентифицированы 98 внутриклеточных метаболитов, 13 из которых оказались непосредственно связаны с биосинтезом такролимуса (лактат, пируват, седогептулозо-7-фосфат, эритрозо-4-фосфат, шикимат, валин, пролин, лейцин, треонин, метилмалонил-КоА, сукцинил-КоА, малонил-КоА и ацетил-КоА). Эти метаболиты связаны с пятью метаболическими путями: центральным метаболизмом углерода (гликолиз, ЦТК, ПФП), шикиматным путем и метаболизмом аминокислот (рисунок 8). Результаты исследования согласуются с данными, полученными Huang *et al.* (2013a; 2013b). Положительную корреляцию с продукцией такролимуса показали оксалоацетат, цитрат,  $\alpha$ -кетоглутарат и, особенно, сукцинил-КоА и ацетил-КоА (промежуточные продукты ЦТК). Внутриклеточные уровни промежуточных продуктов ПФП были ниже в высокопродуктивных средах, что также свидетельствует о положительной корреляции данного пути с синтезом такролимуса. Среди метаболитов из пути биосинтеза такролимуса наибольший позитивный эффект проявлял метилмалонил-КоА.

Недавно был проведен сравнительный протеомный и метаболомный анализ в *S. tsukubaensis* NRRL 18488, который выращивали при добавках соевого масла (Wang *et al.*, 2017). О положительном эффекте данного источника углерода на рост и продукцию такролимуса сообщалось многократно (Singh & Behera, 2009; Mishra & Verma, 2012; Huang *et al.*, 2013b; Xia *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014). Добавление соевого масла увеличивало выход такролимуса на 89%. Соевое масло в основном влияет на первичный белковый обмен (42%), окислительно-восстановительные белки (12,5%), регуляторы транскрипции, компоненты переда-

чи сигнала и белки трансляции (11%). Ключевые метаболиты, связанные с продукцией такролимуса, коррелируют с идентифицированными ранее (Xia *et al.*, 2013). Они включают яблочную кислоту, глюконовую кислоту, лимонную кислоту,  $\alpha$ -кетоглутарат, гексадекановую кислоту, треонин, фумаровую кислоту, янтарную кислоту, пролин, валин, олеиновую кислоту, трегалозу, пируват, орнитин, 10-ундеценую кислоту, шикимовую кислоту, маннозу и лактат.

При добавлении соевого масла увеличивался синтез некоторых ферментов, вовлеченных в гликолиз и ЦТК (триозофосфатизомераза, фосфоглицерат-мутаза, пируваткиназа и цитрат-синтаза), также более высокие уровни показаны для фермента, ограничивающего скорость ПФП – глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы. Наконец, ферменты, связанные с метаболизмом жирных кислот, шикимовой кислоты, валина и изолейцина (валин и изолейцин могут быть преобразованы в метилмалонил-КоА и пропионил-КоА) также подвергались положительной регуляции. Более высокие уровни регуляторов транскрипции Cgr и AfsQ1 были обнаружены в условиях добавок соевого масла, что указывает на их возможное участие в регуляции продукции такролимуса (Xia *et al.*, 2013).

Таким образом, анализ метаболических потоков позволяет определять рациональные стратегии дизайна питательных сред и модификации вторичных путей для повышения продукции такролимуса.

## 2.6 Стратегии увеличения продукции такролимуса

В последнее десятилетие исследования по увеличению продукции такролимуса были сосредоточены, в основном, на оптимизации состава питательных сред и генной инженерии штаммов (Ban *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2016). Оптимизация питательных сред включала подбор компонентов и их концентраций, добавление близких предшественников такролимуса и стрессовых агентов.

Для биосинтеза такролимуса, как правило, используют богатые комплексные среды, включающие один или несколько источников углерода (моно-, ди- и полисахариды, соевое масло и др.) и органический источник азота (кукурузный, дрожжевой экстракты, соевую, пшеничную муку и др.). Разными группами для увеличения продукции такролимуса были использованы: соевое масло (Singh & Behera, 2009; Mishra & Verma, 2012; Huang *et al.*, 2013b; Xia *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014), L-лизин (Martínez-Castro *et al.*, 2013; Singh & Behera, 2009; Mishra & Verma, 2012; Huang *et al.*, 2013b; Du *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017a), метилолеат (Mo *et al.*, 2009; Mishra & Verma, 2012), пиперидиновая кислота (Turlo *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013b; Du *et al.*, 2014), никотинамид и никотиновая кислота (Turlo *et*

*al.*, 2012), хоризмат (Huang *et al.*, 2013b; Du *et al.*, 2014), шикимат (Huang *et al.*, 2013b; Xia *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017a), лактат (Yoon & Choi, 1997; Huang *et al.*, 2013b; Du *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017a), сукцинат (Huang *et al.*, 2013b; Xia *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017a), изолейцин (Huang *et al.*, 2013b; Du *et al.*, 2014), валин (Huang *et al.*, 2013b; Xia *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014), пролин, лейцин и треонин (Xia *et al.*, 2013), пропиленгликоль, пропанол и пропионовая кислота (Gajzlerska *et al.*, 2015), малонат и цитрат (Wang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017a).

Как отмечалось выше, добавление в среду близких предшественников способствует увеличению выхода целевых метаболитов (Reeves *et al.*, 2004). Соединения, которые были использованы для увеличения продукции такролимуса, представлены в таблице 1.

Показано, что (1) эффект предшественника зависит от его концентрации; (2) сочетание предшественников, по отдельности оказывающих положительное влияние, не всегда проявляет аддитивный положительный эффект; и (3) положительный эффект может проявляться через стимулирование роста, стимулирование продукции, а также через одновременное стимулирование и роста, и биосинтеза (Kumar *et al.*, 2008).

Таблица 1 – Предшественники, используемые для увеличения продукции такролимуса

Штамм	Предшественник	FK-506, мг/л	Увеличение продукции, %	Ссылка
<i>Streptomyces</i> spp. MA6858 B3178	соевое масло L-лизин	115,3	134	Singh & Behera, 2009
<i>Streptomyces</i> sp.	соевое масло L-лизин метилюлеат	235,5	173,7	Mishra & Verma, 2012
<i>S. tsukubaensis</i> HT- FKBLOPLMD	соевое масло L-лизин пипеколиновая к-та хоризмат шикимат лактат сукцинат изолейцин валин	457,5	29,5	Huang <i>et al.</i> , 2013b
<i>S. tsukubaensis</i> TJ-04	соевое масло шикимат сукцинат валин пролин лейцин треонин	405	161	Xia <i>et al.</i> , 2013
<i>S. tsukubaensis</i> TJP325	соевое масло L-лизин пипеколиновая к-та	514,5	28	Du <i>et al.</i> , 2014

	хоризмат шикимат лактат сукцинат изолейцин валин			
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	L-лизин	30	150	Martínez-Castro <i>et al.</i> , 2013
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	соевое масло L-лизин шикимат малонат	165,05	305	Wang <i>et al.</i> , 2017
<i>S. tsukubaensis</i> HT-aroC/dapA	L-лизин шикимат лактат сукцинат цитрат	128,19	164	Wang <i>et al.</i> , 2017a
<i>Streptomyces</i> <i>clavuligerus</i> CKD1119	метилолеат	17,8	200	Mo <i>et al.</i> , 2009
<i>S. tsukubaensis</i> FERM BP-927	пипеколиновая к-та никотинамид никотиновая к-та	33,28	700	Turlo <i>et al.</i> , 2012
<i>S. tacrolimicus</i> ATCC 55098	лактат	37	н.д.	Yoon & Choi, 1997
<i>S. tsukubaensis</i> FERM BP-927	пропиленгликоль пропанол пропионовая к-та	12,7	550	Gajzlerska <i>et al.</i> , 2015

\* н.д. – нет данных

Тем не менее, добавление предшественников в промышленных масштабах может быть неэффективно с экономической точки зрения, поскольку наиболее эффективные предшественники, как правило, весьма дорогостоящи (Zhu *et al.*, 2010). В частности, стоимость шикимовой кислоты составляет более 16000 руб./г («Sigma-Aldrich», США). Альтернативная стратегия заключается в получении высокоэффективных штаммов-продуцентов (таблица 2).

Таблица 2 – Генетические модификации, предсказанные с помощью метаболического моделирования в *S. tsukubaensis*, для улучшения продукции такролимуса (Ordóñez-Robles *et al.*, 2018a)

Ген	Модификация	Штамм	Ссылка
<i>fkbO</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013b
<i>fkbL</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013b
<i>fkbM</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013b
<i>fkbP</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013b

<i>fkbD</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013a; 2013b
<i>gdhA</i>	инактивация	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013a
<i>ppc</i>	инактивация	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013a
<i>dahp</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013a
<i>pntAB</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013a
<i>accA2</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013a
<i>zwf2</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Huang <i>et al.</i> , 2013a
<i>aroC</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Wang <i>et al.</i> , 2017a
<i>dapA</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> D852	Wang <i>et al.</i> , 2017a
<i>gcdh</i>	инактивация	<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	Wang <i>et al.</i> , 2017b
<i>tktB</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	Wang <i>et al.</i> , 2017b
<i>msdh</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	Wang <i>et al.</i> , 2017b
<i>ask</i>	сверхэкспрессия	<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	Wang <i>et al.</i> , 2017b

Добавление стрессовых агентов, таких как диметилсульфоксид (ДМСО) или тиосульфат натрия, также незначительно стимулирует продукцию поликетидов у разных бактерий (Chen *et al.*, 2000; Butler *et al.*, 2002). Добавление в среду биосинтеза ДМСО увеличивало продукцию такролимуса *S. tsukubaensis* NRRL 18488 в 2 раза (до 35-40 мг/л) (Martínez-Castro *et al.*, 2013).

Были проведены исследования влияния фосфатов и *N*-ацетилглюкозамина на биосинтез такролимуса. Хорошо известно, что высокие концентрации фосфатов в питательных средах подавляют производство антибиотиков (Martin, 2004). Отрицательная регуляция биосинтеза такролимуса в *S. tsukubaensis* фосфатами была отмечена в 2013 г. (Martínez-Castro *et al.*, 2013). Увеличение концентрации фосфатов в среде с 2,5 до 20 мМ приводило к 2-кратному снижению выхода такролимуса (до 10 мг/л) (Martínez-Castro *et al.*, 2013). *N*-ацетилглюкозамин демонстрирует двоякую роль: ускоряет клеточную дифференциацию и продукцию антибиотиков в неблагоприятных условиях питания и задерживает их в благоприятных условиях питания (Rigali *et al.*, 2006; 2008). Недавно было отмечено отрицательное влияние добавок *N*-ацетилглюкозамина на продукцию такролимуса, выразившееся в почти 2-кратном снижении титра макролида (до 8 мг/л) (Ordóñez-Robles *et al.*, 2018b).

### Заключение по обзору литературы

Клиническая значимость такролимуса в качестве эффективного супрессорного агента обуславливает большой интерес к способам его получения. Низкая производительность

штаммов-продуцентов, ее неустойчивость, опосредованная высокой генетической пластичностью хромосомы стрептомицетов, а также сопродукция близких структурных аналогов, требующая трудоемкой и дорогостоящей процедуры очистки целевого продукта, в значительной мере осложняют биотехнологическое получение фармацевтической субстанции такролимуса. Исследования по увеличению продукции такролимуса, главным образом, сосредоточены в двух направлениях: генетической инженерии штаммов-продуцентов и оптимизации условий для роста и биосинтеза.

Современные «-омные» подходы (геномика, транскриптомика, метаболомика, протеомика) дают основу для понимания физиологии микроорганизмов-продуцентов, расширяя существующие представления о клетке и ее поведении в различных условиях среды, предоставляя возможности для дальнейшего улучшения процесса биосинтеза такролимуса.

Однако, несмотря на очевидные достижения в данной области, многие аспекты биосинтеза такролимуса, связанные с транскрипционной регуляцией и регуляцией источниками питания, требуют дальнейшего изучения, определяя необходимость исследований, направленных на повышение продуктивности и снижение затрат на промышленное производство этого макролида. Следует отметить, что результаты, полученные с использованием определенных штаммов и сред, не всегда могут быть экстраполированы на другие штаммы-продуценты, поскольку существуют значительные штаммо-зависимые различия, зависящие в том числе, и от условий культивирования и биосинтеза.

Поиск новых эффективных штаммов-продуцентов такролимуса, разработка биотехнологических способов его получения, а также поиск путей интенсификации процесса биосинтеза являются приоритетными направлениями исследований.



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Глава 3 Материалы и методы исследования

#### 3.1 Реактивы

В работе использовали следующие реактивы: растворимые картофельные крахмалы от компаний «Купавнареактив», **К1** (РФ), «Difco», **К2** (США), «Индикатор», **К3** (РФ), «Лаб-комплект», **К4** (РФ); гороховый крахмал, **Г** («Cosucra Groupe Wargoscing», Бельгия), крахмал тапиоковый модифицированный, **ТМ** («Chaodee Modified Starch», Таилнд), крахмал тапиоковый нативный, **ТН** («Chaodee Modified Starch», Таилнд), кукурузный крахмал, **Ку** («Каргилл Россия», РФ); желтый декстрин, **ЖД** («Panreac», США), мальтодекстрин GLUCIDEX®19, **МН** («Roquette», Франция), палевый декстрин, **ПД** («Декстринзавод», РФ), сухие пекарские дрожжи от «Саф-Момент» (Франция), кукурузный экстракт твердый от «Sigma-Aldrich» (США), дрожжевой экстракт от «Helicon» (РФ), солодовый экстракт от «Fluka» (США), хлопковая мука от «Pharmamedia» (США), пептон от «Difco» (США), триптон от «Диа-М» (РФ), агар-агар от «Panreac» (США), L-рамноза от «Sigma-Aldrich» (США), α-аспарагин от «Диа-М» (РФ), моногидрохлорид L-лизина от «Panreac» (США), лизоцим от «Sigma-Aldrich» (США), протеиназа К, РНКаза, Таq-полимераза от «Силекс» (РФ), dNTP от «Fermentas» (Литва), α-амилаза *Aspergillus oryzae* от «Serva» (Германия), сорбенты XAD-4, XAD-7HP, XAD-16 от «Sigma-Aldrich» (США), сорбенты SP-207 и HP2MG от «Mitsubishi chemical corporation» (Япония), сорбенты HP-20, HP-21, Диасорб-100-Диол, Диасфер-АК-СП-100, Диасорб-60-СП, Диасорб-100-Сульфо были предоставлены ЗАО «БиоХимМак СТ» (РФ), силикагель от «Merck» (Германия), Relisorb SP400/SS от «Resindion» (Италия), Dowex 50WX8 от «Dow» (США), стандартный препарат такролимуса для ВЭЖХ от «Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd.» (Китай). Остальные реактивы марок «чда» и «хч» были отечественного производства.

#### 3.2 Микроорганизмы, использованные в работе

Штаммы актинобактерий *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д, *Streptomyces* sp. Т60 и *Streptomyces tacrolimicus* АТСС 55098<sup>T</sup> были предоставлены ООО «Фарминс» (г. Пущино, РФ), штаммы грибов *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-830, *Curvularia lunata* ВКМ F-644 и *Gongronella butleri* ВКМ F-1033 – получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН).

### 3.3 Среда и условия культивирования

#### *А) Культивирование в колбах*

Штаммы стрептомицетов поддерживали на **среде I** (МДА) следующего 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.

Биомассу штаммов стрептомицетов в экспоненциальной фазе роста для хемотаксономических и молекулярно-генетических исследований выращивали в **среде II**, содержащей (г/л): крахмал растворимый – 20, глюкоза – 20, пептон – 18 (рН 7,0). В колбы объемом 750 мл, содержащие по 50 мл питательной среды, переносили 2-3 колонии с чашки Петри со **средой I** и культивировали в аэробных условиях на шейкере-инкубаторе Multitron Standard («Infors HT», Швейцария) при 220 об/мин и 25°C в течение 48 ч. Выросшей культурой (10% об.) инокулировали свежую питательную **среду II** и культивировали в тех же условиях в течение 24 ч.

Биомассу грибов получали в **среде III** следующего состава (г/л): крахмал растворимый – 45, дрожжевой экстракт – 3, кукурузный экстракт – 10, CaCO<sub>3</sub> – 3, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5, FeSO<sub>4</sub> – 0,05 (рН 6,5-6,8). Суспензию спор с поверхности скошенного агара в 3-5 мл стерильной дистиллированной воды переносили в колбы объемом 750 мл, содержащие по 50 мл указанной среды, и инкубировали в аэробных условиях на шейкере-инкубаторе при 220 об/мин и 28°C в течение 48 ч.

Посевную культуру (инокулят) для биосинтеза такролимуса штаммами стрептомицетов получали в **среде IV**, содержащей (г/л): глюкоза – 1, крахмал растворимый – 10, дрожжевой экстракт – 5, хлопковая мука – 7, триптон – 2, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,05 (рН 7,0). Инокулят выращивали в две стадии. В колбы объемом 750 мл, содержащих по 50 мл питательной среды, переносили 2-3 колонии с чашки Петри со **средой I** и культивировали в аэробных условиях на шейкере-инкубаторе при 200-220 об/мин и 24-30°C в течение 48 ч (инокулят I). Полученной культурой (10% об.) инокулировали свежую **среду IV**, культивировали в тех же условиях в течение 24 ч (инокулят II).

Биосинтез такролимуса осуществляли в **среде V** следующего состава (г/л): крахмал растворимый – 45, кукурузный экстракт – 10, сухие пекарские дрожжи – 10, CaCO<sub>3</sub> – 3, (рН 6,8-7,0). В колбы объемом 750 мл, содержащие 50-300 мл питательной среды, вносили инокулят II (10% об.) и культивировали на шейкере-инкубаторе при 200-220 об/мин и 24-30°C в течение 7-15 суток. В процессе культивирования рН среды поддерживали в интервале от 6,5 до 8,0 титрованием 10%-м раствором КОН или 10%-м раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

В ряде экспериментов по биосинтезу такролимуса использовали **среду VI** следующего состава (г/л): крахмал растворимый – 75, кукурузный экстракт – 15, сухие пекарские дрожжи – 15,  $MnSO_4$  – 0,05,  $CaCO_3$  – 3 (pH 6,8-7,0). После автоклавирования в среду добавляли стерильный 25%-й раствор глюкозы до конечной концентрации 5 г/л. Инокулят выращивали в одну стадию. В колбы объемом 750 мл, содержащие по 250 мл среды, вносили криогенную культуру (5% об.) и культивировали в аэробных условиях на шейкере-инкубаторе при 220 об/мин и 25°C в течение 48 ч. Полученной культурой (10% об.) инокулировали 50 мл свежей **среды VI**, в которую дополнительно вносили стерильные 25%-й раствор глюкозы и 50%-й раствор рамнозы (в некоторых экспериментах) до конечной концентрация 5 и 20 г/л, соответственно, и 40 г/л стерильного сорбента XAD-7 HP или SP-207; на 3-и сутки биосинтеза добавляли стерильный 25%-й раствор моногидрохлорида L-лизина до конечной концентрации 5 г/л. Культивирование осуществляли на шейкере-инкубаторе при 200-220 об/мин и 25°C в течение 10 суток. В ходе ферментации вели подпитку стерильным 9%-м раствором крахмала или декстрина (концентрация одной добавки – 5,4 г/л) с 4-х по 7-е сутки или со 2-х по 7-е сутки культивирования. В процессе биосинтеза pH среды поддерживали в интервале от 6,8 до 7,2 титрованием 10%-м раствором KOH или 10%-м раствором  $H_2SO_4$ .

Оценку роста культуры стрептомицета на крахмалах и декстринах проводили в **среде VII**, содержащей (г/л): крахмал/декстрин – 20, пептон – 12, дрожжевой экстракт – 12, кислотный гидролизат казеина – 1,5,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,25,  $K_2HPO_4$  – 1 (pH 6,8-7,0). Культуру с чашки Петри (2-3 колонии) переносили в колбы объемом 750 мл, содержащие по 50 мл указанной среды, и инкубировали в аэробных условиях при 220 об/мин и 25°C в течение 48 ч.

Оценку роста культуры стрептомицета в присутствии пекарских дрожжей проводили в **среде VIII** следующего состава (г/л): крахмал – 75, кукурузный экстракт – 10, сухие пекарские дрожжи – 0, 5, 10, 15, 20 и 25,  $MnSO_4$  – 0,05 (pH 7,0). Культивирование осуществляли, как описано выше.

Среды, использованные в работе, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Среды, использованные в экспериментах

Компонент	Содержание в среде, г/л							
	I	II	III	IV	V	VI	VII*	VIII**
Крахмал растворимый	10	20	45	10	45	75	20	75
Глюкоза	-	20	-	1	-	-	-	-
Дрожжевой экстракт	4	-	3	5	-	-	12	-
Солодовый экстракт	10	-	-	-	-	-	-	-
Кукурузный экстракт	-	-	10	-	10	15	-	10

Хлопковая мука	-	-	-	7	-	-	-	-
Сухие пекарские дрожжи	-	-	-	-	10	15	-	0-25
Пептон	-	18	-	-	-	-	12	-
Триптон	-	-	-	2	-	-	-	-
Гидролизат казеина	-	-	-	-	-	-	1,5	-
CaCO <sub>3</sub>	-	-	3	-	3	3	-	-
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	-	-	0,5	0,05	-	-	0,25	-
FeSO <sub>4</sub>	-	-	0,05	-	-	-	-	-
MnSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	0,05	-	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	1	-
Агар	20	-	-	-	-	-	-	-
pH	6,8-7,0	7,0	6,5-6,8	7,0	6,8-7,0	6,8-7,0	6,8-7,0	6,8-7,0

\* в некоторых экспериментах вместо крахмала использовали декстрин;

\*\* концентрацию пекарских дрожжей варьировали от 5 до 25 г/л с шагом 5 г/л.

#### Б) Культивирование в ферментерах

Биосинтез такролимуса культурой штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д проводили в 10 л ферментерах АНКУМ-2М с коэффициентом заполнения 0,5 л в условиях периодического культивирования с подпиткой (температура 25°C, скорость перемешивания 300-1000 об/мин, концентрация растворенного кислорода (pO<sub>2</sub>) 30-60%, pH 6,5-7,5, время культивирования 10 суток). Инокулят, полученный на **среде VI**, как описано выше, вносили в количестве 5% об. Для биосинтеза такролимуса использовали **среду VI** с добавками (растворы глюкозы, рамнозы – в некоторых экспериментах, моногидрохлорида L-лизина, крахмала/декстрина, сорбент); дополнительно в среду (до стерилизации) вносили 0,4 мл/л пеногасителя «Лапрол».

### 3.4 Оптимизация условий биосинтеза такролимуса

В экспериментах по оптимизации условий процесса биосинтеза такролимуса оценивали влияние источников углерода и азота, ионов металлов, сорбентов, pH среды, температуры и аэрации.

В опытах по влиянию источников углерода на биосинтез использовали крахмал, глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, глицерин и инозит в концентрации 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-и сутки биосинтеза в концентрации 5-20 г/л.

В экспериментах по влиянию источников азота на биосинтез использовали кукурузный и дрожжевой экстракты, кислотный и ферментативный гидролизаты казеина, сухие пекарские дрожжи, соевую и хлопковую муку, соевый пептон в концентрации 5-20 г/л. Дополнительно в среде с кукурузным экстрактом исследовали влияние  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , которые вносили одновременно с посевной культурой или на 3-и сутки биосинтеза в концентрации 2-4 г/л.

Изучали влияние аминокислот L-метионина и L-лизина в концентрациях 0,01-5,0 г/л. Аминокислоты добавляли в среду одновременно с инокулятом или на 3-и сутки культивирования.

В исследованиях по влиянию ионов металлов на биосинтез такролимуса использовали  $\text{MgSO}_4$  (0,1-1,0 г/л),  $\text{MnSO}_4$  (0,05-0,2 г/л),  $\text{ZnSO}_4$  (0,01-0,04 г/л),  $\text{FeSO}_4$  (0,01-0,05 г/л), а также их комбинации. Соли металлов вносили в среду одновременно с инокулятом или на 3-и сутки культивирования.

В исследованиях 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 концентрации 20, 40 и 60 г/л. Сорбенты вносили в среду одновременно с инокулятом или через 2-3-е суток биосинтеза.

Влияние температуры на биосинтез такролимуса исследовали в диапазоне от 20 до 36°C.

Влияние pH на биосинтез изучали в интервале pH от 5,5 до 9,0.

Влияние аэрации на биосинтез такролимуса 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%).

### 3.5 Определение биомассы

#### *А) Рост культуры на крахмалах и декстринах*

Биомассу культуры стрептомицета оценивали по сухому весу. Оценку роста проводили в модифицированной **среде VI** (40 г/л крахмала или декстрина, без сорбента) и в **среде VII** (п. 3.3).

При изучении роста культуры на модифицированной **среде VI** (в динамике биосинтеза такролимуса) образцы 2 мл отбирали ежедневно в течение 10 суток. Добавляли  $\alpha$ -амилазу *A. oryzae* (с целью удаления неутилизованного крахмала) до конечной концентрации 0,5 г/л и выдерживали при 40°C в течение 2 ч. Затем биомассу осаждали центрифугированием при 13000 x g в течение 2 мин, дважды промывали дистиллированной водой и высушивали

при 80°C в течение 48 ч. При измерении биомассы учитывали разведение в колбах, возникающее вследствие внесения добавок растворов крахмалов или декстринов.

При изучении роста культуры на **среде VII** образцы культуральной жидкости (содержимое всей колбы) отбирали через 0, 12, 24, 36 и 48 ч роста. Добавляли  $\alpha$ -амилазу *A. oryzae* до конечной концентрации 0,5 г/л и инкубировали при 40°C в течение 2 ч. Затем биомассу осаждали центрифугированием при 4000 x g, дважды отмывали дистиллированной водой и высушивали при 80°C в течение 48 ч.

#### *Б) Рост культуры в присутствии пекарских дрожжей*

Биомассу культуры стрептомицета оценивали по сухому весу. Оценку роста проводили в **среде VIII** (п. 3.3). Образцы культуральной жидкости (содержимое всей колбы) отбирали через 0, 12, 24, 36 и 48 ч роста. Биомассу осаждали центрифугированием при 4000 x g, дважды отмывали дистиллированной водой и высушивали при 80°C в течение 48 ч. Измеряли общий вес осадка, содержащего как биомассу пекарских дрожжей, так и бактериальную биомассу.

#### *В) Рост на твердых средах*

Рост культуры на агаризованных средах оценивали по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ). Для получения изолированных колоний готовили ряд последовательных разведений в стерильной водопроводной воде, используя шаг разведения  $10^{-1}$ . В пробирки, содержащие 9 мл воды, стерильной пипеткой вносили 1 мл исследуемого материала, содержимое тщательно перемешивали. Стерильной пипеткой наносили 0,2 мл соответствующего разведения и растирали шпателем по поверхности агара. Чашки выдерживали при 30°C, подсчет КОЕ осуществляли на 2-3 сутки роста. Количество клеток рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{a \times 10^n}{V}$$

где M – количество клеток в 1 мл, a – среднее количество колоний при высеве из данного разведения, V – объем суспензии в мл, взятой для посева, n – порядковый номер разведения.

### **3.6 Изучение морфобиологических и биохимических особенностей штаммов**

Морфологию колоний штаммов стрептомицетов описывали согласно стандартному протоколу ISP (International *Streptomyces* Project; Shirling & Gottlieb, 1966), на средах 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). Культуры инкубировали на чашках Петри в аэробных условиях при 30°C в течение 14 суток. Окраску колоний и растворимых пигментов оценивали по шкале RAL K5 Classic gGmbH (Германия). Тип споровой цепи и орнамент споровой поверхности исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6510LV («JEOL», Япония) в препаратах культур, выращенных на среде ISP-2.

Влияние температуры на рост штаммов стрептомицетов исследовали в диапазоне от 5 до 38°C на среде ISP-2. Устойчивость к солям изучали на среде ISP-2 с 0, 1, 2, 4, 7, 10 и 15 г/л NaCl при оптимальной температуре.

Способность штаммов стрептомицетов утилизировать различные субстраты в качестве единственного источника углерода определяли с помощью набора тестов API 50 CH согласно рекомендациям производителя.

Для определения энзиматической активности штаммов стрептомицетов использовали набор ферментативных экспресс-тестов API ZYM и руководствовались инструкциями производителя.

### **3.7 Определение основных хемотаксономических признаков**

Для выделения клеточных стенок использовали метод Schleifer и Kandler (1972). Клетки стрептомицетов разрушали; осадок, полученный при центрифугировании (30 мин, 4000 об/мин), промывали дистиллированной водой и обрабатывали трипсином в фосфатном буфере при 37°C в течение 17 ч, затем смесь переносили в пробирки с равным объемом 3% додецилсульфата натрия (SDS) и прогревали на водяной бане в течение 5 мин при кипении. Осадок отмывали водой и переносили в ампулы с равным объемом 4 н HCl. Ампулы запаивали и гидролизовали при 105°C в течение 18 ч. Гидролизат отфильтровывали и доводили до pH 6,0.

Определение аминокислотного состава полученных препаратов пептидогликанов проводили на аминокислотном анализаторе фирмы «Hitachi» (Япония).

Выделение и очистку изопреноидных хинонов проводили по методике Collins и Jones (1981). Для полуколичественного определения менахинонов проводили экстракцию 1 г лиофилизированной биомассы смесью хлороформа и метанола (2:1, об./об.) в течение 2 ч. Биомассу отфильтровывали и хлороформенно-метанольный экстракт упаривали при пониженном давлении на роторном испарителе, перерастворяли в ацетоне и проводили ТСХ на пластинках Kieselgel 60 («Merk», Германия). После разделения в системе гексан : диэтиловый эфир (85:15, об./об.) менахиноны с участков пластинок ТСХ экстрагировали хлороформом.

Вид менахинонов исследуемых штаммов устанавливали в сравнении с эталонными смесями менахинонов. Состав менахинонов определяли на масс-спектрометре MAT 8430 (Германия).

Состав жирных кислот определяли по методу Evtushenko *et al.* (1989). Для этого получали метиловые эфиры жирных кислот обработкой 30 мг лиофилизированной биомассы смесью ацетилхлорид : метанол (1:5, 200 мкл) при 85°C с упариванием метилирующих реагентов и экстракцией метиловых эфиров гексаном (Евтушенко и Зеленкова, 1989). Метиловые эфиры жирных кислот анализировали на газовом хроматографе Perkin-Elmer F-17 (Германия). Идентификацию вели на основании сравнения со стандартами.

### 3.8 Электронная микроскопия

Клетки штаммов стрептомицетов фиксировали в 1,5%-ом растворе глутарового альдегида в 0,05М какодилатном буфере (рН 7,2) при 4°C в течение 1 ч. Затем трижды промывали вышеуказанным буфером и дополнительно фиксировали в 1%-ом растворе OsO<sub>4</sub> в 0,05М какодилатном буфере (рН 7,2) при 20°C в течение 3 ч. Клетки дегидратировали в ряду возрастающих концентраций спиртов (от 50% до 100%, в течение 20 мин на каждом этапе), затем дополнительно пропитывали в трет-бутиловом спирте в двух сменах по 20 мин при 26°C. Далее образцы замораживали в трет-бутиловом спирте и проводили процедуру замораживания-высушивания в установке JFD-320 (JEOL», Япония), в соответствии с рекомендациями производителя. На поверхность высушенных образцов наносили золото в напылительной установке JFC 1100 (JEOL», Япония). Электронно-микроскопический анализ проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM-6510LV (JEOL», Япония).

### 3.9 Молекулярно-генетические методы

Для генетических исследований культуры стрептомицетов выращивали в **среде II**, как описано в п. 3.3. Биомассу дважды отмывали стерильным физиологическим раствором и осаждали центрифугированием при 15000 x g и температуре 2°C в течение 45 мин.

#### 3.9.1 Выделение и очистка ДНК

Выделение и очистку хромосомной ДНК штаммов стрептомицетов осуществляли модифицированным методом Marguir (1961). Сырую биомассу (1 г) ресуспендировали в 9 мл TE-буфера (10 mM Трис-НСl рН 8,0; 1 mM ЭДТА). Добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл, тщательно перемешивали и инкубировали на роторной качалке при 37°C в



течение 60 мин. Затем добавляли протеиназу К до конечной концентрации 2 мг/мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. К суспензии добавляли 20%-й раствор SDS до конечной концентрации 1-2% и инкубировали 60 мин при 37°C. Затем лизат инкубировали 20 мин при 65°C, проводили 3 цикла замораживания при -40°C и оттаивания при 65°C. К раствору добавляли 5М NaCl и 10%-й цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) в 0,7М NaCl до конечной концентрации 1М и 1%, соответственно. Лизат выдерживали 20 мин при 65°C. Добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1, об./об.), тщательно перемешивали и центрифугировали при 13000 x g в течение 5-6 мин. Верхнюю фазу, содержащую нуклеиновые кислоты, переносили в чистую пробирку, добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1, об./об.), перемешивали и центрифугировали 5-6 мин при 13000 x g. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, экстрагировали равным объемом хлороформа и центрифугировали при 13000 x g в течение 5-6 мин. Обработку хлороформом проводили 5-7 раз, пока верхняя фаза не становилась прозрачной, и на границе водной и органической фазы не образовывался слой денатурированных белков.

Нуклеиновые кислоты из отобранной верхней фазы осаждали добавлением 3 объемов охлажденного до -20°C 70%-го этанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 5-6 минут при 13000 об/мин. Осадок ДНК промывали последовательно 80%-м и 96%-м растворами этанола (при осаждении 96%-м этанолом к смеси добавляли 3М ацетат натрия в соотношении 1:10 и охлаждали 60 мин при -20°C), центрифугировали и подсушивали на воздухе. Нуклеиновые кислоты растворяли в ТЕ-буфере. Добавляли раствор РНК-азы до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 60 мин при 37°C. Повторяли экстракцию смесью фенола и хлороформа (1:1, об./об.) и хлороформа, обработку хлороформом проводили 3-4 раза. ДНК из раствора осаждали охлажденным до -20°C этанолом или изопропанолом, как описано выше. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре «Shimadzu UV-160» (Япония) при 260 нм ДНК хранили при -20 или -70°C.

### 3.9.2 Амплификация генов 16S рРНК

Амплификацию генов 16S рРНК проводили на амплификаторе «Герцик» («ДНК-технология», РФ). Реакционная смесь (25 мкл) содержала: 10 нг ДНК-матрицы, по 50 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата («Fermentas», Литва), по 0,1-0,25 мкМ каждого праймера («Евроген/Синтол», РФ) (таблица 4), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, Таq-полимеразу, 1×буфер («Силекс», РФ).

Режим ПЦР: начальная денатурации ДНК – 94°C, 3 мин, последующие 27 циклов – 94°C, 30 с; отжиг праймеров – 55°C, 20 с; элонгация ДНК – 72°C, 2 мин. Завершали амплификацию дополнительным синтезом ДНК при 72°C в течение 4 мин (Edwards *et al.*, 1989).

Таблица 4 – Праймеры, использованные в работе

Праймер	Применение	Последовательность	Ссылка
27f	16S рРНК бактерий	AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG	Lane, 1991
1492r	16S рРНК бактерий	ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991

### 3.9.3 Электрофорез в агарозном геле

Анализ фрагментов гена 16S рРНК был проведен в 1%-м агарозном геле в горизонтальных блоках при напряженности электрического поля не более 5 В/см. После электрофоретического разделения ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в проходящем УФ-свете.

### 3.9.4 Секвенирование

#### А) Последовательность гена 16S рРНК

Секвенирование нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 согласно рекомендациям производителя. Анализ продуктов реакции осуществляли на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730.

#### Б) Последовательность геномной ДНК

Фрагментацию геномной ДНК проводили ультразвуком с помощью Covaris S220. Библиотеку из фрагментов ДНК длиной 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).

### 3.9.5 Сборка генома

Обработку чтений, сборку и анализ генома проводили следующим образом. Удаление фрагментов адаптеров из исходных ридов, а также фильтрацию ридов, содержащих последовательности артефактов и PhiX проводили с использованием BBDuk 38.35. Далее проводили очистку прочтений от возможной контаминации человеческой ДНК. Для этого риды картировали с помощью BBMap 38.35 на геном человека и отбрасывали, если их идентичность с геномом человека превышала 95%. Затем проводили удаление фрагментов ридов низкого качества с использованием BBDuk 38.35. Сборку очищенных прочтений осуществляли с помощью SPAdes v3.13.0 (Bankevich *et al.*, 2012), полученные контиги отбрасывали, если их длина составляла <200 п.н. Аннотацию генома выполняли с помощью сервиса NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP).

### 3.9.6 ДНК-ДНК гибридизация

#### А) ДНК-ДНК гибридизация *in vitro*

ДНК диализовали против 1000-кратно превосходящего объема 0,1×SSC буфера (0,15M NaCl; 0,015M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>×5,5H<sub>2</sub>O, pH 7,0) при 4°C в течение суток при медленном перемешивании на магнитной мешалке и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE на льду до получения фрагментов длиной 500-700 п.н. Реакцию гибридизации проводили в соответствии с протоколом Rossello-Mora *et al.* (2011).

#### Б) ДНК-ДНК гибридизация *in silico*

Среднюю нуклеотидную идентичность, основанную на значениях BLAST (ANIb), и цифровую ДНК-ДНК гибридизацию (dDDH) рассчитывали, используя программу JSpecies 1.2.1 (Richter & Rossello-Mora, 2009) и сервис GGDC 2.1 (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013), соответственно.

### 3.9.7 Определение и расчет содержания Г+Ц пар в ДНК

Содержание Г+Ц пар в ДНК определяли по температуре плавления ДНК (Mesbah *et al.*, 2011; Owen *et al.*, 1985). ДНК диализовали, как описано в п. 3.9.6. Температуру плавления ДНК определяли на спектрофотометре DU800 фирмы «Beckman Coulter» в термостатируемой ячейке при температурах от 78 до 100°C со скоростью нагрева 0,5°C в мин. Измерения проводили в трех повторностях. В качестве контроля использовали ДНК штамма

*Streptomyces tsukubensis* с известным составом Г+Ц, равным 72,4% (Muramatsu & Nagai, 2013).

### 3.9.8 Филогенетический анализ

Для поиска в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК использовали программу BLAST NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательности выравнивали в программе CLUSTAL X. Построение филогенетического дерева производили с помощью пакета программ MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) с использованием метода «neighbour-joining» (Saitou & Nei, 1987). Статистическую достоверность оценивали с помощью «bootstrap»-анализа (Felsenstein, 1985) 100 альтернативных деревьев. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с использованием программы Vector NTI 11.0.

### 3.10 Определение состава крахмалов и декстринов

Предварительную качественную оценку полисахаридов в заводских крахмалах и декстринах оценивали с помощью йодной пробы согласно ГОСТ 10163-76.

Количественное определение содержания амилозы в крахмалах осуществляли по методу Закировой *с соавт.* (2010), основанному на образовании нерастворимых клатратных комплексов амилозы с бутанолом. Осадки высушивали до постоянного веса при 45°C. Долю амилозы в составе крахмалов рассчитывали как отношение сухого веса бутанолового комплекса к весу исходно внесенного крахмала.

Качественное и количественное определение содержания других полисахаридов проводили по методике, описанной Рихтером *с соавт.* (1975), основанной на осаждении сахаров различной молекулярной массы этиловым спиртом. К аликвотам 2%-х растворов крахмалов (2 мл) добавляли 10-кратный объем 40, 70 и 96%-го этанола (осаждение амило-, эритро- и ахродекстринов, соответственно). Образцы перемешивали, инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре, центрифугировали и высушивали до постоянного веса при 45°C. Поскольку растворимость полисахаридов возрастала в смесях, содержащих моно-, ди- и олигомеры глюкозы, проводили повторную экстракцию 96%-м этанолом полисахаридов из супернатантов, оставшихся после осаждения 40 и 70%-м этанолом. Содержание каждой из фракций сахаров оценивали по сухому весу.

Определение редуцирующих веществ (РВ) проводили в 1,5%-х растворах крахмалов и декстринов по методу Gusakov *et al.* (2011). Оптическую плотность измеряли на 2-лучевом

спектрофотометре «Shimadzu» (Япония) при 610 нм. Концентрацию редуцирующих сахаров определяли по калибровочному графику, построенному для глюкозы.

Для определения содержания связанной глюкозы проводили гидролиз проб культуральной жидкости 3М трифторуксусной кислотой при температуре 100°C в течение 3 ч. Количественное определение связанной глюкозы осуществляли по методу Sinner & Puls (1978), основанному на восстановлении углеводов и их производными, содержащими свободные гидроксильные группы, ионов двухвалентных металлов до одновалентных, которые реагируют с 4,4'-2,2'-дикарбоксибихинолином с образованием комплекса фиолетового окрашивания. Концентрацию сахаров определяли на анализаторе углеводов («Биотроник, Германия») при 570 нм.

### 3.11 Изучение влияния состава крахмалов и декстринов

Для изучения влияния состава крахмалов и декстринов на биосинтез такролимуса использовали модифицированную **среду VI** (40 г/л крахмала или декстрина). Посевную культуру получали, как описано в п. 3.3. Биосинтез такролимуса проводили, как указано в п. 3.3, в периодическом режиме: с подпиткой или без подпитки. При периодическом режиме с подпиткой в ферментационную среду вносили стерильный 5%-й раствор крахмала или декстрина (концентрация одной добавки – 6 г/л) с 4-х по 7-е сутки или со 2-х по 7-е сутки культивирования.

### 3.12 Фракционирование клеток пекарских дрожжей

Сухие пекарские дрожжи (200 г) растворяли в 400 мл стерильного физиологического раствора и выдерживали при 4°C в течение 24 ч. Полученную пасту замораживали при -70°C и разрушали на френч-прессе и получали гомогенат. Часть гомогената добавляли в **среду V** вместо сухих пекарских дрожжей в эквивалентной концентрации с учетом разведения – 30 г/л. Оставшуюся часть гомогената разбавляли в 8 раз стерильным физиологическим раствором и центрифугировали при 800 x g и температуре 4°C в течение 15 мин. Осадок и супернатант добавляли в **среду V** вместо сухих пекарских дрожжей в концентрациях, эквивалентных их содержанию в клетках дрожжей с учетом разведения, составивших 21 г/л и 243 мл/л, соответственно. Биосинтез такролимуса проводили, как описано в п. 3.3.

### 3.13 Изучение влияния пекарских дрожжей и компонентов их клеток

В исследованиях по влиянию пекарских дрожжей на биосинтез такролимуса использовали **среду V** с концентрацией пекарских дрожжей 0, 5, 10, 15 и 20 г/л (п. 3.3).

Влияние эргостерина изучали в **среде V**, содержащую и не содержащую пекарские дрожжи, с концентрацией эргостерина 0, 2 и 4 г/л (в соответствии его физиологическим содержанием в плазматической мембране дрожжей, составляющим в среднем 1,6 г/л). Биосинтез такролимуса проводили, как описано в п. 3.3.

### 3.14 Изучение влияния низших грибов

Биомассу грибов выращивали в **среде III**, как описано в п. 3.3. 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 VI** с добавками, указанными в п. 3.3. Биосинтез такролимуса проводили, как описано в п. 3.3.

### 3.15 Выделение и очистка такролимуса

#### 3.15.1 Выделение такролимуса

Для отмывки сорбента от остатков среды биосинтеза и мицелия культуральную жидкость порциями по ~500 мл помещали в стакан объемом 3 л, добавляли 2-2,5 л воды и интенсивно перемешивали. Взвесь мицелия из верхних слоев культуральной жидкости удаляли вакуумным насосом. Операцию повторяли до полного удаления мицелия и получали промытый сорбент.

Элюирование такролимуса с сорбента проводили водно-ацетоновой смесью. Для этого сорбент помещали на фильтр Шотта, промывали 500 мл смеси вода/ацетон (45:55, % об.) и элюировали целевое вещество 500 мл смеси вода/ацетон (25:75, % об.). Процедуру элюции целевого вещества повторяли до полной экстракции такролимуса с сорбента. Фракции, содержащие такролимус, объединяли и упаривали на роторном испарителе до маслообразного состояния. К маслянистой субстанции добавляли толуол в соотношении 1:10 по объему для экстракции целевого компонента и получившуюся двухфазную смесь разделяли на делительной воронке. Данную операцию повторяли 3 раза. Верхние слои, содержавшие раствор такролимуса в толуоле, объединяли. Количество такролимуса определяли методом ВЭЖХ (п. 3.16Б).

### 3.15.2 Предварительная очистка такролимуса

Предварительную очистку осуществляли на силикагеле, модифицированном диольными группами, Диасорб-100-Диол или метакрилатном сорбенте HP2MG. Для этого 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 целевое вещество, объединяли и упаривали под вакуумом. Количество такролимуса во фракциях определяли методом ВЭЖХ (п. 3.16Б).

### 3.15.3 Финишная очистка такролимуса

Конечную очистку такролимуса проводили с использованием сульфокатионитов, содержащих ионы серебра. Использовали пять различных катионообменных смол, модифицированных серебром: Relisorb SP400/SS, Dowex 50WX8, Диасфер-АК-СП-100, Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо. Сульфокатиониты загружали в колонку (140×14 мм, объем 21,5 мл), промывали 3 объемами дистиллированной воды, затем дополнительно последовательно промывали 2 объемами 1М раствора нитрата серебра и 3 объемами дистиллированной водой для удаления не связавшихся ионов серебра и 3 объемами ацетона для удаления из сорбентов воды. Смесь такролимуса и его близкородственных аналогов, полученную на стадии предварительной очистки, растворяли в подвижной фазе до достижения концентрации такролимуса 10 мг/мл в случае использования сорбентов Диасфер-АК-СП-100 и Dowex 50 WX8, 30 мг/мл при использовании сорбента Relisorb SP 400/SS, а также 100 мг/мл – сорбентов Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо.

В качестве подвижных фаз для разделения такролимуса на серебросодержащих сорбентах использовали следующие смеси: изооктан/ацетон, метанол/этилацетат, ацетон/ацетонитрил. Скорость потока составляла 0,1-2 мл/мин. Качественный и количественный состав полученных фракций определяли методом ВЭЖХ (п. 3.16Б).

### 3.15.4 Кристаллизация такролимуса

Фракции, содержащие такролимус, объединяли, определяли содержание макролида и упаривали на роторном испарителе досуха. К полученной маслянистой субстанции добавляли ацетонитрил из расчета 10 мл ацетонитрила на 1 мг такролимуса. Затем при перемешивании медленно добавляли дистиллированную воду в количестве, в 1,7 раза превышающем ко-

личество ацетонитрила. Раствор оставляли на 12-14 ч при 5°C для кристаллизации продукта. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывали и взвешивали.

### 3.16 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

#### *А) Метод 1*

Пробы культуральной жидкости (50 мл) центрифугировали для отделения осадка, содержащего сорбент, при 15300 x g и температуре 4°C в течение 40 мин. Проводили двукратную экстракцию такролимуса с сорбента 96%-м этанолом (100 и 50 мл, соответственно) на роторной качалке при 180 об/мин, 30°C в течение 30 мин с последующим центрифугированием при 15300 x g и 4°C в течение 40 мин. Для анализа использовали объединенный этанольный экстракт.

Количественное определение такролимуса проводили 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. Расчет концентрации такролимуса проводили по калибровке с внешним стандартом на основании значений площадей пиков.

#### *Б) Метод 2*

Количественный ВЭЖХ-анализ такролимуса на стадии десорбции целевого вещества с сорбента после ферментации осуществляли на хроматографе Smartline («Knauer», Германия) с колонкой Диасфер С-18 (5 мкм, 4×250 мм) (ЗАО «БиоХимМак СТ», РФ). Условия хроматографии: состав мобильной фазы – ацетон/0,1% фосфорная кислота (60:40, % об.), скорость потока 1 мл/мин, температура колонки 25°C. Детекцию осуществляли при 220 нм.

Качественный и количественный ВЭЖХ-анализ такролимуса на стадии предварительной и финишной очистки осуществляли 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 осуществляли при 220 нм.

Качественный состав продукта (включающий наличие таких примесей, как аскомицин, дезметилтакролимус, С8-эпимер такролимуса и С8-пропил-аналог такролимуса) опре-



деляли согласно методике, описанной в USP 37 - NF 32 (2013). Анализ 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.

## Глава 4 Результаты и обсуждение

### 4.1 Определение таксономического положения штаммов

#### *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60

В настоящем разделе представлены данные по определению видовой принадлежности синтезирующих такролимус штаммов *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60.

#### 4.1.1 Исследование морфологических и физиолого-биохимических особенностей

На ISP средах, традиционно используемых для таксономического описания стрептомицетов (Shirling & Gottlieb, 1966), штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д (рисунок 9а) и *Streptomyces* sp. Т60 (рисунок 9б) образовывали плотные, матовые колонии с выраженной структурной дифференциацией поверхности. Цвет колоний варьировал от розовато-оранжевого до кирпично-оранжевого. Вариативность окраски колоний отражала высокую степень диссоциации, более характерную для штамма *Streptomyces* sp. Т60 (рисунок 9б). Оба штамма продуцировали розовато-оранжевый пигмент, интенсивность окрашивания зависела от состава сред, условий и длительности культивирования. Для штамма *Streptomyces* sp. Т60 характерна более выраженная способность к спорогенезу, на большинстве сред он проявлял умеренное спорообразование (сероватый налет) (рисунок 9б). Штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д являлся олигоспоровым (рисунок 9а).

Штамм *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>T</sup>, известный продуцент такролимуса, обладал принципиальными макроморфологическими отличиями от двух вышеописанных штаммов. На плотных средах он образовывал мелкие колонии, обладающие схожей архитектурой, тусклой буровато-желтой окраски, интенсивно спорулировал и почти не подвергался морфологической диссоциации (рисунок 9в).

Результаты исследования макроморфологических особенностей штаммов *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д, *Streptomyces* sp. Т60 и *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>T</sup> суммированы в таблице 5.

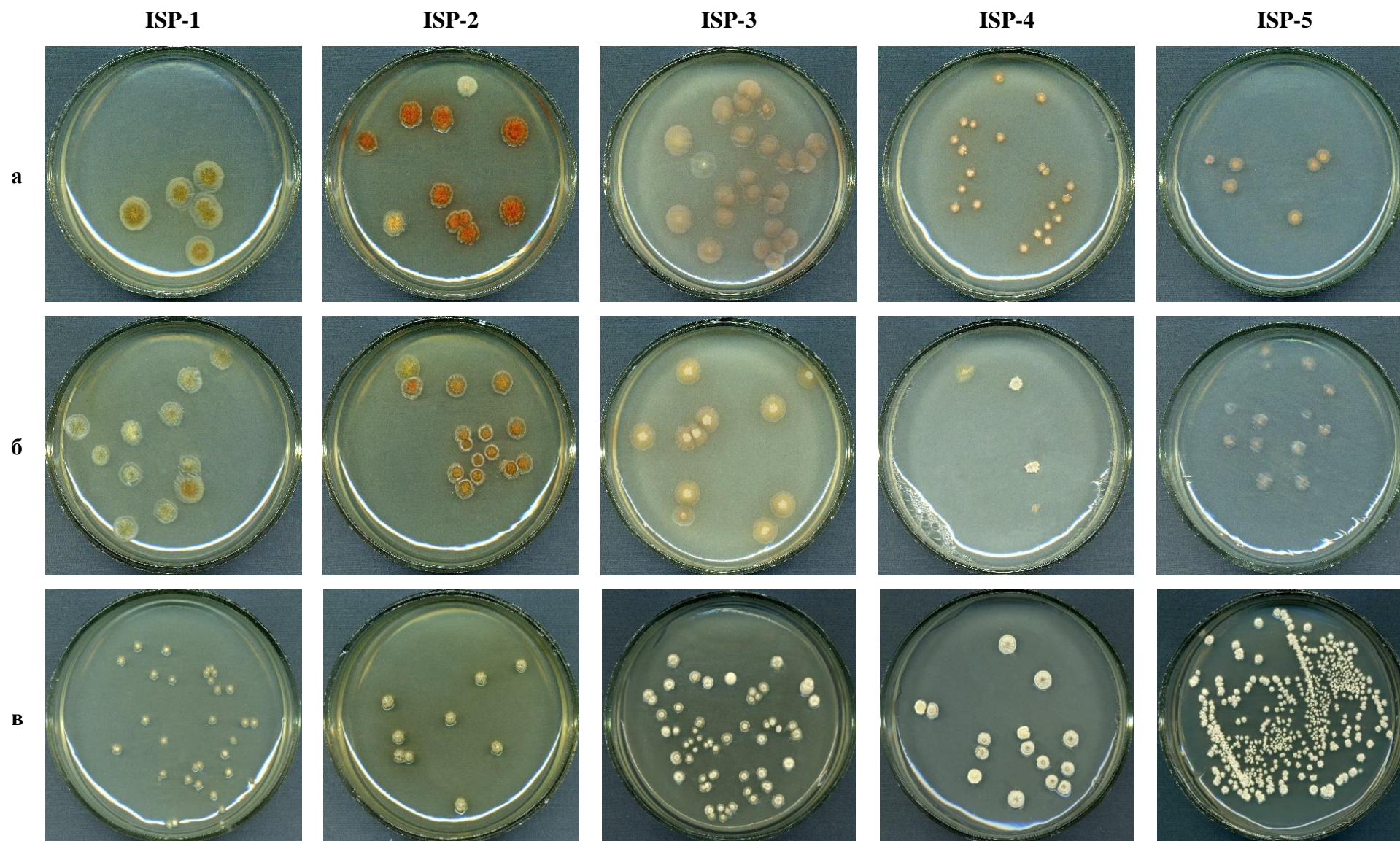


Рисунок 9 – Морфология колоний *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д (а), *Streptomyces* sp. Т60 (б)  
и *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>T</sup> (в) на средах ISP

Таблица 5 – Макроморфологические характеристики штаммов *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д, *Streptomyces* sp. Т60 и *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>Т</sup>

Характеристики	Штаммы		
	ВКМ Ас-2618Д	Т60	ATCC 55098 <sup>Т</sup>
<b>Окрашивание аверса:</b>			
ISP-1	яркое желто-оранжевое в центре, бледное желто-оранжевое на периферии	песочно-желтое или желто-оранжевое (редко) в центре, бледно-желтое на периферии	бледно-желтое
ISP-2	яркое кирпично-оранжевое, гиалиновый слой – грязно-желтого цвета; оранжевато-желтое (редко); желтовато-белое (редко)	кирпично-оранжевое или темно-желтое (редко) в центре, бледно-оранжевое на периферии	желтое с серым налетом
ISP-3	оранжевато-розовое или беловатое (редко)	бежево-оранжевое	белое в центре и на периферии, грязно-желтое в промежутке
ISP-4	серовато-белое в центре, розовато-оранжевое на периферии	серовато-белое или грязно-желтое	желтовато-белое с серым налетом
ISP-5	оранжево-желтое в центре, розово-оранжевое на периферии; красновато-розовое (редко)	бледное красновато-розовое	белое с серым налетом
<b>Окрашивание реверса:</b>			
ISP-1	желто-оранжевое в центре, грязно-желтое на периферии	песочно-желтое или желто-оранжевое	бледно-желтое
ISP-2	ярко-оранжевое, бежево-желтое или светлое розово-оранжевое	ярко-оранжевое или золотисто-желтое	коричнево-желтое
ISP-3	яркое розовато-оранжевое в центре, темное розовато-оранжевое на периферии	светлое розовато-оранжевое	коричневатое в центре, желтое на периферии
ISP-4	яркое розово-оранжевое	светлое розовато-оранжевое	грязно-коричневое в центре, желтое на периферии
ISP-5	оранжево-желтое в центре, оранжевато-розовое или красновато-розовое	светлое розовато-оранжевое	оранжево-желтое

	на периферии		
<b>Структура колоний:</b>			
ISP-1	округлой формы, слабо возвышающиеся, с плотным центром с отходящими к периферии радиально закрученными гребнями, прозрачным мезослоем и гладким гиалиновым слоем, более плотным, чем мезослой, но менее, чем центральный	округлой формы, слабо возвышающиеся, с плотным центральным слоем с отходящими к периферии радиально закрученными тонкими гребнями, углублением в центре, прозрачным мезослоем и гладким гиалиновым слоем, более плотным, чем мезослой, но менее, чем центральный	округлой формы, с фестончатым краем, слабо возвышающиеся и тонко-морщинистой структурой
ISP-2	округлой формы, с фестончатым краем, слабо возвышающиеся и грубой гребневидно-морщинистой структурой или уплощенные и слабо морщинистой структурой, с углублением в центре неправильной формы	округлой формы, уплощенные и тонко-морщинистой структурой или слабо возвышающиеся с центром грубо-морщинистой структуры и более плоским и тонкоструктурированным гиалиновым слоем	округлой формы, фестончатым краем, возвышающиеся и грубо-морщинистой структурой
ISP-3	округлой формы, уплощенные, с незначительно возвышающимся центром	округлой формы, уплощенные	округлой формы, уплощенные, с выраженной зональностью
ISP-4	округлой формы, с ризоидным краем, слабо возвышающиеся, с обширным центральным углублением	неправильной формы, уплощенные, с ризоидным краем, глыбчатой поверхностью, с незначительно возвышающимся центром или углублением, окруженным валиком неправильной формы	округлой формы, с выраженной зональностью, слабо возвышающиеся в центре
ISP-5	округлой или неправильной формы, уплощенные, с ризоидным или фестончатым	округлой формы, уплощенные, с фестончатым краем	округлой формы, с ризоидным краем, возвышающиеся в центре
<b>Спорообразование:</b>			
ISP-1	отсутствует	отсутствует	отсутствует
ISP-2	отсутствует	умеренное	умеренное
ISP-3	отсутствует	умеренное	интенсивное
ISP-4	умеренное	интенсивное	интенсивное
ISP-5	слабое	отсутствует	интенсивное

<b>Размер колоний, мм:</b>			
ISP-1	до 14	до 14	до 4
ISP-2	до 13	до 10	до 5
ISP-3	до 12	до 11	до 7
ISP-4	до 5	до 9	до 7
ISP-5	до 6	до 7	до 4

Микроскопические исследования показали, что для всех штаммов характерно образование разветвленного субстратного мицелия, дифференцирующегося в прямые цепочки цилиндрических спор с гладкой поверхностью (рисунок 10).

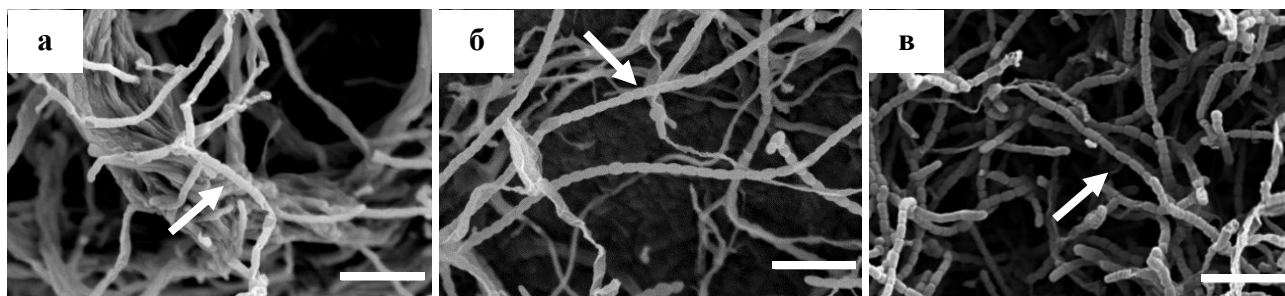


Рисунок 10 – Морфология споровых цепей при сканирующей электронной микроскопии: а – *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д, б – *Streptomyces* sp. Т60, в – *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>T</sup> (длина масштабной линейки – 5 мкм)

Изучаемые штаммы являются аэробными грамположительными бактериями. Температурный диапазон роста – от 22 до 35°C. Температурный оптимум – 28°C. Растут при  $\leq 7\%$  NaCl.

Анализ состава клеточной стенки выявил присутствие LL-диаминопимелиновой кислоты и отсутствие диагностических сахаров, что соответствует I типу клеточных стенок.

Основные жирные кислоты клеточных стенок штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д представлены *iso*-C<sub>14:0</sub> (18,81%), *anteiso*-C<sub>15:0</sub> (17,05%), *iso*-C<sub>16:0</sub> (15,16%) и *iso*-C<sub>15:0</sub> (15,11%). Основные жирные кислоты клеточных стенок штамма *Streptomyces* sp. Т60 были представлены *iso*-C<sub>16:0</sub> (21,67%), *iso*-C<sub>15:0</sub> (13,16%), *iso*-C<sub>16:1 cis-9</sub> (11,96%) и C<sub>16:0</sub> (10,57%). Основными жирными кислотами клеточных стенок штамма *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>T</sup> являются *iso*-C<sub>14:0</sub> (16,8%), *iso*-C<sub>16:0</sub> (12,5%), *iso*-C<sub>15:0</sub> (12,3%) и *anteiso*-C<sub>15:0</sub> (11,4%). Основными менахинонами штаммов являлись МК-9 (H<sub>8</sub>) и МК-9 (H<sub>6</sub>).

В качестве источников углерода и энергии для роста штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д активно использовал D-глюкозу, декстрин, глицерин, крахмал, D-рибозу и N-ацетилглюкозамин, слабый рост наблюдался на мальтозе и салицине. Штамм *Streptomyces* sp. Т60 утилизировал D-глюкозу, декстрин, глицерин, крахмал, D-рибозу и N-ацетилглюкозамин, а также мальтозу, слабо рос на D-маннозе, салицине и трегалозе. Штамм *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>T</sup> активно утилизировал D-глюкозу, декстрин, крахмал, D-рибозу, N-ацетилглюкозамин, D-галактозу, D-туранозу, эскулин, глюконат калия и 5-кето-глюконат калия, слабо рос на глицерине, D-ксилозе, D-маннозе, D-фруктозе, L-рамнозе, амигдалине, метил- $\alpha$ D-глюкопиранозиде и метил- $\alpha$ D-маннопиранозиде.

Эксперименты по изучению ферментной активности показали, что штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 проявляют высокую эстеразную, лейцин-ариламидазную, нафтол-АС-ВІ-фосфогидролазную и  $\alpha$ -глюкозидазную активность. Для *Streptomyces* sp. Т60 также выявлена высокая активность щелочной фосфатазы. Штамм *S. tacrolimicus* АТСС 55098<sup>Т</sup> проявлял высокую активность щелочной фосфатазы, кислой фосфатазы и нафтол-АС-ВІ-фосфогидролазы (таблица 6).

Таблица 6 – Сравнение ферментных активностей штаммов *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д, *Streptomyces* sp. Т60 и *S. tacrolimicus* АТСС 55098<sup>Т</sup>, определенных с помощью тестов api®ZYM (BioMe'rieux)

Ферментная активность	ВКМ Ас-2618Д	Т60	АТСС 55098 <sup>Т</sup>
щелочная фосфатаза	± (2)	+ (3-4)	+ (5)
эстераза (C <sub>4</sub> )	+ (5)	+ (4)	-
эстераза липаза (C <sub>8</sub> )	± (2)	± (2)	-
липаза (C <sub>14</sub> )	± (2)	± (1)	-
лейцин-ариламидаза	+ (5)	+ (5)	± (1)
валин-ариламидаза	± (3)	± (2)	± (1)
цистеин-ариламидаза	-	-	-
трипсин	-	-	-
$\beta$ -химотрипсин	± (1)	± (1)	-
кислая фосфатаза	± (2)	± (1)	+ (5)
нафтол-АС-ВІ-фосфогидролаза	+ (4)	+ (4)	+ (4)
$\alpha$ -галактозидаза	-	-	-
$\beta$ -галактозидаза	-	-	-
$\beta$ -глюкуронидаза	-	-	-
$\alpha$ -глюкозидаза	+ (5)	+ (5)	-
$\beta$ -глюкозидаза	-	-	± (1)
N-ацетил- $\beta$ -глюкозамидаза	-	-	-
$\alpha$ -маннозидаза	-	-	-
$\alpha$ -фукозидаза	-	-	-



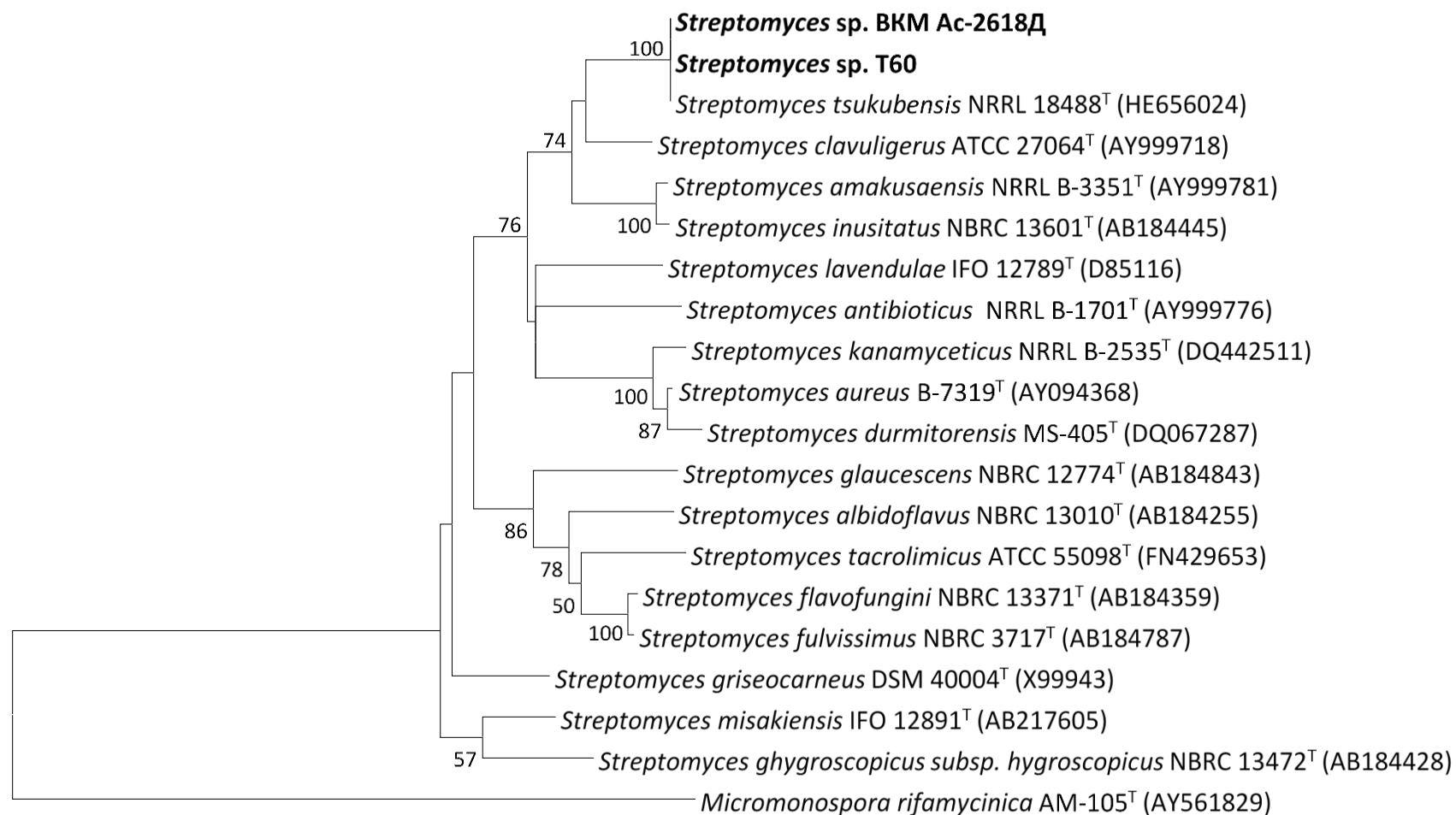
#### 4.1.2 Филогенетический анализ

Для определения филогенетического положения штаммов были изучены последовательности гена 16S рРНК (около 1400 п.н.). Предварительный анализ полученных последовательностей 16S рРНК показал, что штаммы *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 образуют одну группу с типовым штаммом *Streptomyces tsukubensis* NRRL 18488<sup>T</sup> со степенью сходства 99,9%. Результаты филогенетического анализа представлены на рисунке 11.

Для подтверждения таксономической принадлежности штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д было выполнено его полногеномное секвенирование и проведена аннотация генома. Полученные после предварительной обработки парноконцевые чтения были собраны в 79 контигов с 202-кратным покрытием. Средний размер контига N<sub>50</sub> составил 971 906 п.н., а длина самого длинного контига – 1 270 971 п.н. Размер генома штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д составил 7,93 м.п.н. со средним содержанием Г+Ц пар 71,9%. Всего было предсказано 6 265 кандидатных белок-кодирующих генов (1 227 из которых являются гипотетическими белками), 66 тРНК, 23 полных или частичных рРНК, 3 нкРНК

Сравнительный анализ геномов штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и типового штамма *S. tsukubensis* NRRL 18488<sup>T</sup> (CP029157.1-CP029159.1) показал, что значения средней идентичности нуклеотидов (ANI) и цифровой ДНК-ДНК гибридизации (dDDH), рассчитанные между последовательностью их геномов, составляют 99,99% и 99,9%, соответственно, что значительно выше пороговых значений (95-96% ANI и 70% dDDH) для разграничения видов (Richter & Rossello-Mora, 2009; Meier-Kolthoff *et al.*, 2013; Chun *et al.*, 2018). Это позволило заключить, что штамм *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д относится к виду *Streptomyces tsukubensis*.

Высокая степень сходства (99,9%) между последовательностями генов 16S рРНК штамма *Streptomyces* sp. Т60 и типового штамма *S. tsukubensis* NRRL 18488<sup>T</sup> (рисунок 11), а также уровень гомологии ДНК при ДНК-ДНК гибридизации *in vivo* (87,41±6,63) между штаммами *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces* sp. Т60 позволяют заключить, что штамм *Streptomyces* Т60 принадлежит к виду *Streptomyces tsukubensis*. Содержание Г+Ц пар в ДНК штамма *S. tsukubensis* Т60 составляет 72,4%.



0.005

Рисунок 11 – Филогенетическое положение видов рода *Streptomyces* на основе анализа последовательностей фрагмента гена 16S рРНК; группировка по методу «ближайших соседей» («neighbour-joining»). Масштаб – одна замена на каждые 100 нуклеотидов. Указаны значения статистической достоверности порядка ветвления для 1000 альтернативных деревьев (выше 50%). В качестве внешней группы использована нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК *Micromonospora rifamycinica* AM 105<sup>T</sup> (AY561829)

В геноме штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д был выявлен кластер генов биосинтеза такролимуса с полным набором генов – 26 генов (рисунок 12).

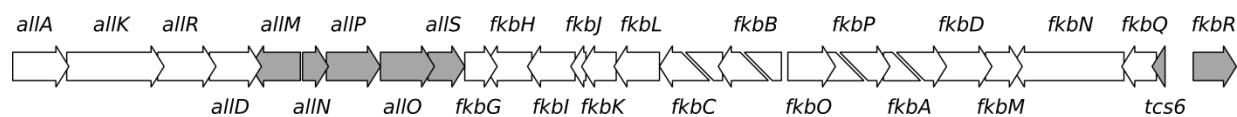


Рисунок 12 – Кластер генов биосинтеза такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Номера генов в базе данных NCBI GenBank: EW131\_25195-EW131\_25390. Серым цветом отмечены гены, отсутствующие в кластере генов биосинтеза такролимуса у штаммов с редуцированным набором генов.

Ранее нами отмечались различия между кластером генов у штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *S. tsukubensis* NRRL 18488<sup>T</sup> (Poshekhontseva *et al.*, 2019). Однако позднее был опубликован полный геном для штамма *S. tsukubensis* NRRL 18488<sup>T</sup> (CP029157.1-CP029159.1), и в результате сравнительного анализа геномных данных установлено, что кластеры генов биосинтеза такролимуса у штаммов *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д (SGFG01000008.1:83700-166586) и *S. tsukubensis* NRRL 18488<sup>T</sup> (CP029159.1:c7554111-7471225), а также *Streptomyces* sp. КСТС 11604ВР (HM116537.1:8712-91598) полностью идентичны. Способность штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д проводить эффективный биосинтез такролимуса, предположительно, обеспечивается наличием полного набора генов в кластере.

Последовательность генома штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д была депонирована в DDBJ/ENA/GenBank под номером SGFG00000000.

#### 4.2 Оценка способности штаммов к биосинтезу такролимуса

Как отмечалось выше, такролимус синтезируется ограниченным числом видов стрептомицетов (Barreiro & Martínez-Castro, 2014). В настоящее время одним из важнейших продуцентов FK-506 в промышленности является *Streptomyces tsukubensis* (Ordóñez-Robles *et al.*, 2017).

Как видно из таблицы 7, биосинтетическая активность штаммов *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *S. tsukubensis* Т60 была сопоставима и значительно превышала активность *S. tacrolimicus* ATCC 55098<sup>T</sup>. Максимальный выход такролимуса при использовании штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д варьировал от 53 до 61 мг/л, при использовании штамма

*S. tsukubensis* Т60 достигал 40-42 мг/л. Штамм *S. tacrolimicus* АТСС 55098<sup>Т</sup> продуцировал такролимус с низким выходом – 5,0-5,6 мг/л (таблица 7).

Следует отметить, что все три штамма одновременно с такролимусом производили его близкий аналог аскомицин (FK-520). При этом в случае со штаммом *S. tacrolimicus* АТСС 55098<sup>Т</sup> аскомицин был основным продуктом (таблица 7).

Таблица 7 – Биосинтез такролимуса (FK-506) и аскомицина (FK-520) штаммами *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, *S. tsukubensis* Т60 и *S. tacrolimicus* АТСС 55098<sup>Т</sup> в среде V на 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> АТСС 55098 <sup>Т</sup>	5,3±0,42	8,73±0,62

На рисунке 13 представлены хроматографические профили указанных соединений в стандартном препарате такролимуса и в экстракте культуральной жидкости штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д.

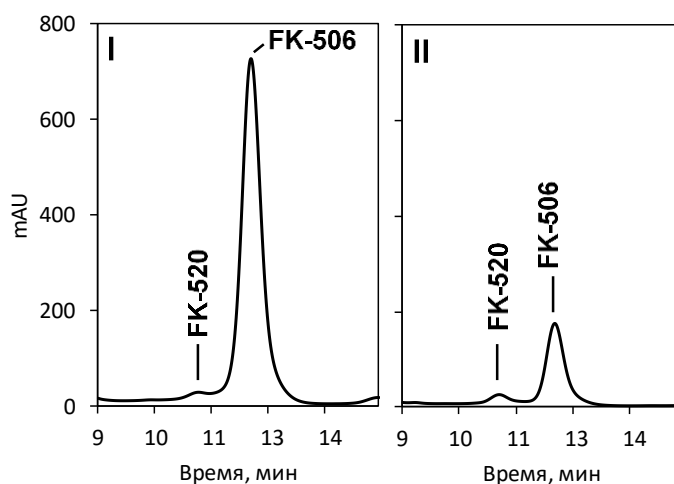


Рисунок 13 – хроматографический профиль такролимуса (FK-506) с примесью аскомицина (FK-520): I – стандарт препарата такролимуса («Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd.», Китай), II – экстракт культуральной жидкости штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на 7 суток культивирования

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

### 4.3 Изучение фенотипической изменчивости и диссоциации штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и их влияния на биосинтез такролимуса

Характерным признаком культур стрептомицетов является высокая степень морфобиологической гетерогенности популяции, или диссоциация, выражающаяся в образовании на одной среде морфологически отличных друг от друга колоний – диссоциантов.

Диссоциацию штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д исследовали на **среде I**, на которой наблюдалось наибольшее количество морфологически отличающихся колоний – диссоциантов (обозначены как Д1, Д2, Д3 и Д4) (рисунок 14а).

Культуры, выращенные из одиночных колоний разных диссоциантов, анализировали на способность к продукции такролимуса. Результаты представлены на рисунке 14б.

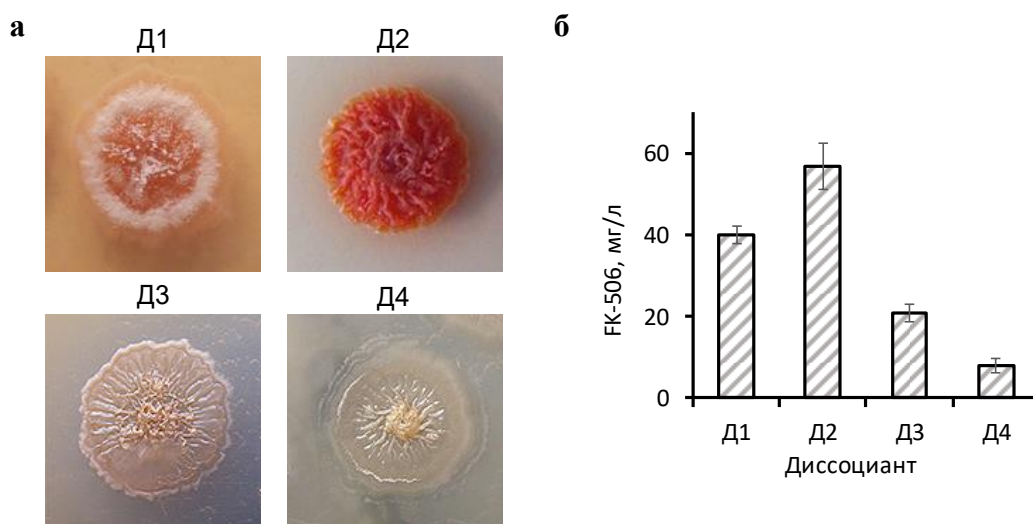


Рисунок 14 – (а) Диссоциация штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на среде I (Д – диссоциант). (б) Биосинтез такролимуса диссоциантами *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на среде V (7 суток культивирования)

Следует отметить, что значимых отличий в скорости роста бактерий различных диссоциантов не выявлено (данные не представлены).

Как следует из рисунка 14б, максимальной продуктивностью обладал яркоокрашенный диссоциант Д2. На агаризованной питательной **среде I** данный диссоциант был представлен округлыми колониями диаметром от 7 до 13 мм, ярко-кирпичного цвета, с сухой матовой поверхностью, слабо врастающими в агар, но значительно возвышающимися над его поверхностью, с округлым или неравномерно оформленным центральным углублением, ограниченным валиком. Боковые склоны колоний имели гребневидно-морщинистой структуру. Колонии окружены тонким уплощенным гиалиновым слоем тускло-желтого или па-

стельно-оранжевого цвета. Спорообразование скудное, либо отсутствует. Диссоциант Д2 был выбран для дальнейших исследований.

При исследовании строения колоний с использованием СЭМ было выявлено, что поверхностная зона колонии диссоцианта Д2 представлена скоплением густо переплетенных ветвящихся гиф (рисунок 15).

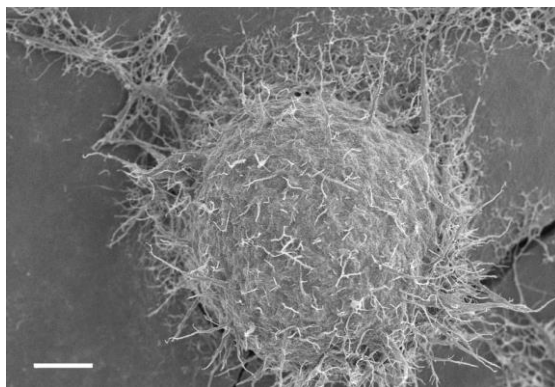


Рисунок 15 – Колония диссоцианта Д2 на среде I (сканирующая электронная микроскопия, длина масштабной линейки – 50 мкм)

#### 4.4 Изучение влияния условий хранения и получения посевной культуры штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на биосинтез такролимуса

Фенотипическая изменчивость штамма и его диссоциация влияют на эффективность биосинтеза, осложняя получение стабильных высоких показателей. В связи с этим задачей являлось поддержание диссоцианта Д2 в стабильном активном состоянии при хранении. Известно, что в результате продолжительного хранения культуры микроорганизмов способны терять свою биокаталитическую активность. Традиционный способ хранения культур стрептомицетов в виде спорового материала был в данном случае непригоден, так как диссоциант Д2 отличается низкой способностью к спорообразованию на **среде I**, позволяющей разделять высоко- и низкопродуктивные диссоцианты. В настоящее время, для культур стрептомицетов, представляющих интерес с точки зрения продукции вторичных метаболитов, используют способ хранения продуцентов в виде криогенной культуры (Wu *et al.*, 2016). Данный подход был использован для хранения активного диссоцианта штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д.

В качестве криопротектора использовали 5, 20 и 50%-й водные растворы глицерина. Растворы глицерина и культуральную жидкость, представленную вегетативной культурой в фазе активного роста, смешивали в объемном соотношении 1:1. Образцы хранили при температурах  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-70^{\circ}\text{C}$ . Сохранность биосинтетической активности и фенотипических свойств оценивали через 1 сутки, 1 мес. и 6 мес. на **средах V** и **I**, соответственно (п. 3.3). Оп-

тимальным является хранение культуры активного диссоцианта в 50%-м глицерине при  $-70^{\circ}\text{C}$  (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние условий получения криогенной культуры на биосинтез такролимуса

Глицерин, %	Температура хранения, $^{\circ}\text{C}$	Срок хранения, сут	КОЕ, кл/мл	FK506, мг/л
5	20	1	$0,82 \times 10^9$	$25,0 \pm 3,8$
5	20	30	$0,68 \times 10^9$	$24,1 \pm 6,2$
5	20	180	$0,69 \times 10^9$	$21,0 \pm 4,5$
5	70	1	$0,65 \times 10^9$	$25,0 \pm 9,2$
5	70	30	$0,59 \times 10^9$	$20,2 \pm 2,5$
5	70	180	$0,60 \times 10^9$	$20,6 \pm 5,3$
20	20	1	$0,93 \times 10^9$	$41,1 \pm 7,3$
20	20	30	$1,0 \times 10^9$	$44,9 \pm 1,8$
20	20	180	$0,88 \times 10^9$	$42,1 \pm 2,5$
20	70	1	$0,88 \times 10^9$	$43,6 \pm 5,3$
20	70	30	$0,90 \times 10^9$	$44,1 \pm 8,2$
20	70	180	$0,84 \times 10^9$	$45,0 \pm 3,8$
50	20	1	$1,45 \times 10^9$	$66,7 \pm 4,5$
50	20	30	$1,44 \times 10^9$	$60,6 \pm 6,3$
50	20	180	$1,09 \times 10^9$	$63,6 \pm 6,3$
50	70	1	$1,35 \times 10^9$	$67,8 \pm 5,7$
50	70	30	$1,64 \times 10^9$	$65,8 \pm 3,4$
50	70	180	$1,59 \times 10^9$	$66,4 \pm 3,9$
Контроль – культура на твердой среде, температура хранения $4^{\circ}\text{C}$ , периодичность пересевов 1 мес.			$1,78 \times 10^9$	$65,1 \pm 4,1$

Сравнительный анализ биосинтетической активности криокультур, полученных в различных условиях, проводили в одинаковых условиях. Для этого из криогенной культуры (5% об.) в колбах объемом 750 мл, содержащих по 250 мл **среды IV**, получали инокулят 48 ч роста, который затем вносили (10% об.) в 50 мл **среды V**. Как следует из данных, представленных в таблице 8, как 5%-й, так и 20%-й глицерин в качестве криопротектора не обеспечивал проявление культурой исходной или близкой к ней биосинтетической активности при хранении при  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-70^{\circ}\text{C}$  при всех вариантах срока хранения. Предполагаемой причиной полученных результатов является гибель части клеток популяции при замораживании-оттаивании, поскольку сравнительный анализ КОЕ показал снижение жизнеспособных клеток в 2 и более раза при использовании 5%-го глицерина и до 2-х раз – 20%-го глицерина. При использовании 50%-го глицерина наилучший результат был получен при хранении при

температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Прямой зависимости между ростом и выходом такролимуса не наблюдали.

Для получения криогенной культуры *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д использовали культуральную жидкость с вегетативной культурой, находящейся в фазе замедления роста (48 ч). При высеве культуры на агаризованную **среду I** наблюдали расщепление активного диссоцианта Д2 в динамике биосинтеза на малопродуктивные формы с измененной архитектурой и слабовыраженной пигментацией, что, вероятно, связано с истощением питательных компонентов среды (рисунок 16).

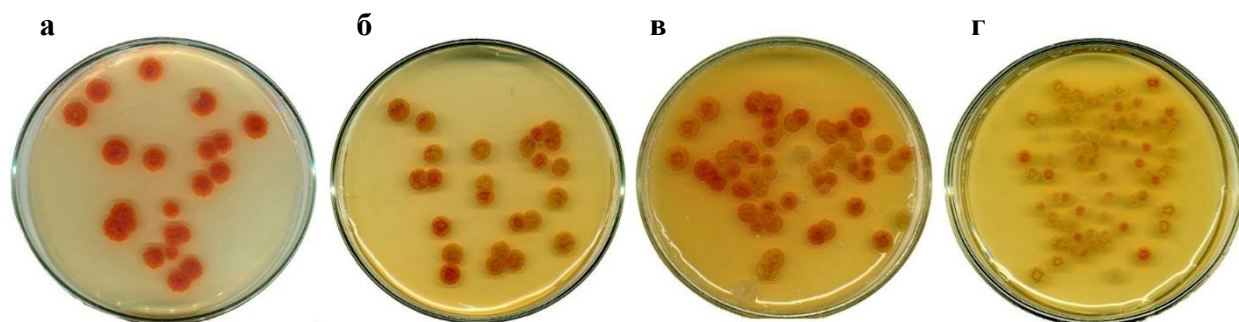


Рисунок 16 – Диссоциация *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в динамике биосинтеза такролимуса: а – 1 суток, б – 3 суток, в – 6 суток, г – 10 суток

Преимущества криогенной культуры:

1. для получения посевного материала используется стандартизированная культура с известной активностью;
2. укорачивается технологическая цепочка;
3. снижается риск контаминации;
4. сохранение морфологии и высокой биосинтетической активности культуры, по крайней мере, в течение 1 года.

Оптимизацию условий выращивания посевной культуры штамма-продуцента из криогенной культуры проводили следующим образом: культуру размораживали и переносили в колбы объемом 750 мл, содержащие по 50, 100 или 250 мл **среды V**, в количестве 5% об., инкубировали в течение 48 ч, при 220 об/мин и  $28^{\circ}\text{C}$ . Максимальный выход такролимуса достигался при росте культуры в 250 мл среды (таблица 9).



Таблица 9 – Влияние условий выращивания инокулята из криогенной культуры на биосинтез такролимуса

В среды, мл	КОЕ, клеток/мл	FK506, мг/л
50	$1,78 \times 10^9$	$65,0 \pm 3,8$
100	$1,48 \times 10^9$	$66,2 \pm 2,5$
250	$1,32 \times 10^9$	$68,6 \pm 5,3$

#### 4.5 Оптимизация условий биосинтеза такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д

Переход от ростовой фазы к синтезу вторичных метаболитов зависит от лимитирующих рост концентраций питательных веществ (Sircar *et al.*, 1998). В данном разделе изучали влияние на биосинтез такролимуса источников углерода, азота, ионов металлов и других компонентов среды, оптимизировали по композиционному составу питательные среды и условия биосинтеза культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, а также разрабатывали способ устранения деградации целевого продукта продуцентом.

##### 4.5.1 Изучение влияния температуры, рН среды и аэрации

Исследование влияния температуры на биосинтез такролимуса проводили в диапазоне температур от 24 до 30°C. Культура *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д наиболее активно синтезировала такролимус при 24-26°C. За 7 суток биосинтеза в среде V накапливалось 85-102 мг/л такролимуса. При 20 и 30°C отмечали почти двукратное снижение количества такролимуса – содержание FK-506 в среде на 7 суток культивирования не превышало 41-53 мг/л и 45-60 мг/л, соответственно (рисунок 17а).

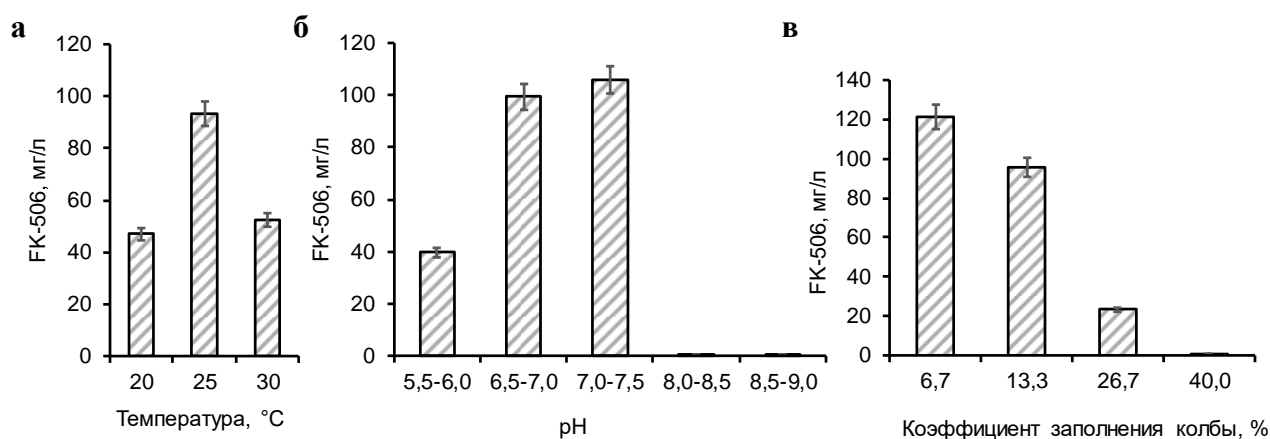


Рисунок 17 – Влияние температуры (а), рН среды (б) и аэрации (в) на биосинтез такролимуса

Таким образом, некоторое снижение температуры относительно оптимальной для роста штамма (28-30°C, см. п. 4.1.1) способствовало повышению выхода такролимуса. Результаты отличаются от известных литературных данных, согласно которым биосинтез такролимуса, как правило, проводят при 28°C (Mo *et al.*, 2009; Mishra & Sharad Verma, 2012; Du *et al.*, 2014 и др.).

Исследование влияния pH среды на биосинтез такролимуса показало, что максимальный уровень макролида достигается при pH 7,0-7,5. За 7 суток культивирования в **среде V** выход такролимуса составил 100-110 мг/л. Защелачивание среды до pH 9,0 приводило к подавлению биосинтетической активности. При проведении биосинтеза в среде с кислым pH 5,5-6,0 также наблюдалось значительное снижение выхода такролимуса (рисунок 17б).

В динамике биосинтеза такролимуса на **среде V** на первых этапах (с 3-х по 7-е сутки) наблюдали закисление среды, вероятно, связанное с активным потреблением источника углерода. На завершающих этапах (после 7 суток) отмечали защелачивание среды, предположительно, опосредованное нарушением исходного баланса углерод/азот и переходом от углеродного к азотистому обмену, который, как правило, характеризуется смещением pH в щелочную область. В последующих экспериментах pH среды поддерживали в области нейтральных значений титрованием стерильными 10%-ми растворами KOH или H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Аэрация – один из главных факторов в промышленном производстве антибиотиков, поскольку рост и биосинтез могут существенно зависеть от концентрации растворенного кислорода (Elibol, 2002). При низкой растворимости кислорода в водной среде, недостаточном массообмене, высокой вязкости используемых крахмалосодержащих сред и мицелиального роста культур может наблюдаться значительное замедление метаболизма, или, в некоторых случаях, его полное изменение (Berry, 1975; Tolosa *et al.*, 2002, Vucs, 2001).

Изучение влияния аэрации на биосинтез такролимуса в колбах проводили при различных соотношениях объема среды к объему колбы (коэффициентах заполнения колбы средой). Наиболее активно синтез такролимуса протекал при низком коэффициенте заполнения колбы (6,7%). Увеличение коэффициента заполнения до 13,3% приводило к снижению выхода макролида, при его увеличении до 40% наблюдали подавление биосинтеза (рисунок 17в).

Полученные результаты согласуются с известными данными о необходимости высокой степени аэрации для биосинтеза такролимуса и других макролидов (Kumar *et al.*, 2008).

#### 4.5.2 Изучение влияния источников углерода

Для биосинтеза такролимуса используется широкий спектр источников углерода. В качестве источников углерода могут быть использованы такие быстро утилизируемые источ-

ники, как глюкоза, мальтоза и глицерин (Kim & Park, 2008; Wu *et al.*, 2016), однако предпочтительно используются сложные и медленноутилизируемые источники углерода (нередко совместно с легкоутилизируемыми) такие, как крахмал, декстрины, соевое масло (Kumar *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2009; Singh & Behera, 2009; Mishra & Verma, 2012; Глаголев *с соавт.*, 2017 и др.).

Эффективность биосинтеза такролимуса культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д изучали в средах с различными источниками углерода: глюкозой, мальтозой, лактозой, сахарозой, крахмалом, глицерином и инозитом, – в интервале концентраций от 5 до 90 г/л (п. 3.4). Концентрации указанных источников углерода, при которых были получены наиболее высокие результаты по содержанию FK-506, составили для моно- и дисахаридов, спиртов 10 г/л, для крахмала – 40 г/л. Во всех вариантах, за исключением крахмала, был получен низкий уровень биосинтетической активности – на 7 суток культивирования содержание макролида колебалось от 5 до 10 мг/л (рисунок 18а).

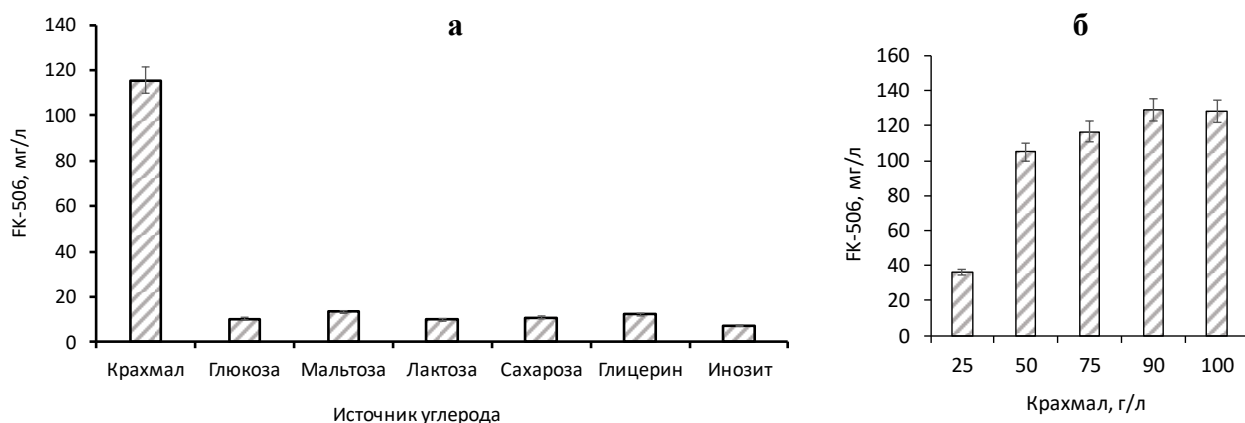


Рисунок 18 – (а) Влияние источников углерода на биосинтез такролимуса при их минимальных концентрациях. (б) Влияние концентрации крахмала на биосинтез такролимуса

Наиболее активный биосинтез такролимуса наблюдали в средах с растворимым картофельным крахмалом. Повышение содержания крахмала в среде от 25 до 90 г/л обеспечивало увеличение выхода такролимуса от 36,2 мг/л до 129 мг/л на 7 суток биосинтеза (рисунок 18б).

Положительное влияние медленноутилизируемого углеродного субстрата по сравнению с быстроутилизируемыми источниками отмечалось также другими исследователями (Kumar *et al.*, 2008; Martínez-Castro *et al.*, 2013 и др.).

Как было упомянуто выше, использование питательных сред, содержащих несколько источников углерода – широко распространенный прием в производстве антибиотиков (в т.ч. макролидных). В данной работе в качестве дополнительных источников углерода были ис-

пользованы сахара, отличающиеся между собой по строению и химическим свойствам: моно- (глюкоза, ксилоза, арабиноза, манноза, рамноза, фруктоза) и дисахариды (мальтоза, сахароза), пентозы (ксилоза, арабиноза, фруктоза) и гексозы (глюкоза, рамноза, манноза), кетозы (фруктоза) и альдозы (остальные моносахариды), редуцирующие (мальтоза и моносахариды) и нередуцирующие (сахароза).

При изучении влияния дополнительного внесения источников углерода в продуктивную среду с крахмалом было показано снижение выхода такролимуса при добавках ксилозы, глюкозы, арабинозы, фруктозы, инозита (рисунок 19). Отсутствие какого-либо эффекта на выход такролимуса отмечали при внесении маннозы, мальтозы, сахарозы, а также глюкозы в низких концентрациях (до 5 г/л) (рисунок 19). Глюкоза – легкоутилизируемый моносахарид, и ее введение в состав продуктивной среды на момент засева в низких концентрациях приводит к росту с укороченным (или отсутствующим) лаг-периодом, вероятно, связанным с адаптацией культуры к медленноутилизируемому субстрату (крахмал), при этом не наблюдается негативного эффекта на процесс вторичного метаболизма. Выраженный стимулирующий эффект на биосинтез такролимуса отмечен при добавлении L-рамнозы в концентрации 20 г/л: выход такролимуса увеличивался на 20% и выше (рисунок 19).

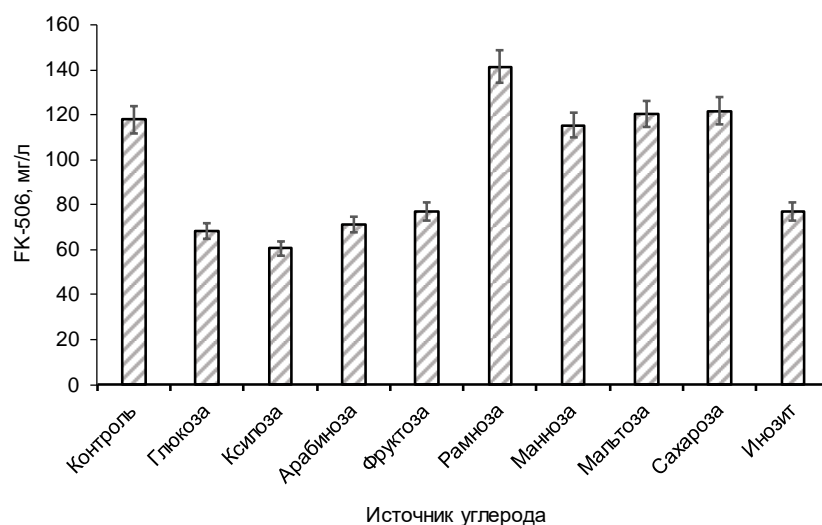


Рисунок 19 – Влияние дополнительных источников углерода (20 г/л) на биосинтез такролимуса, вносимых в среду, содержащую крахмал (75 г/л)

Механизм положительного влияния рамнозы на продукцию такролимуса остается невыясненным. Рамноза выполняет различные функции в живой клетке. Производные рамнозы найдены в составе некоторых бактериальных гликозидов и полисахаридов (геллановая камедь, гемицеллюлозы), антибиотиков (эллорамицин, спинозин, эритромицин, стрептомицин, пикромицин) (Madduri *et al.*, 2001). Рамноза обнаружена в клеточной стенке *Mycobacterium tuberculosis* (Grzegorzewicz *et al.*, 2016) и *Saccharopolyspora spinosa* (Madduri *et al.*, 2001).

Бактерии рода *Pseudomonas* продуцируют рамнолипиды, являющиеся фактором вирулентности псевдомонад в клетках человека (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Однако, как было показано, *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д не способен использовать рамнозу в качестве единственного источника углерода (п. 4.1.1). Исключено участие экзогенной рамнозы в формировании клеточной стенки *S. tsukubensis* (Martinez-Castro *et al.*, 2013; Muramatsu & Nagai, 2013). Также рамноза не включается в молекулу такролимуса. Следует отметить, что стимулирующее влияние рамнозы на биосинтез такролимуса было выявлено нами впервые.

### 4.5.3 Изучение влияния состава крахмала\*

Как было показано выше (п. 4.5.2), штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д наиболее активно продуцирует такролимус в крахмалсодержащей среде. Сложности биотехнологического применения крахмалов в качестве компонентов питательных сред связаны с гелеобразованием и высокой вязкостью их растворов, которые вызывают проблемы при стерилизации, обеспечении эффективности массопереноса при перемешивании (Рихтер *с соавт.*, 1975; Kumar *et al.*, 2008) и др., что существенно ограничивает применение крахмалов в высоких концентрациях. Гелеобразование и вязкость растворов крахмалов во многом зависят от соотношения коротких и длинных, а также линейных и разветвленных полисахаридов. Низкомолекулярные полисахариды, как правило, являются более эффективными с точки зрения реологии и технологичности использования по сравнению с высокомолекулярными. Состав и физико-химические характеристики крахмалов зависят от их природных источников и способов получения и могут оказывать влияние на биосинтез такролимуса. В частности, Martinez-Castro *et al.* (2013) было показано неодинаковое влияние на продукцию FK-506 крахмалов от различных поставщиков. Глаголевым *с соавт.* (2017) было продемонстрировано положительное влияние пшеничного декстрина в сравнении с другими видами декстринов (рисовым, кукурузным, картофельным). Как правило, промышленно произведенные крахмалы являются продуктами частичного гидролиза нативного крахмала и представляют собой декстрины, что обуславливает их повышенную растворимость по сравнению с исходным полисахаридом. Как правило, состав коммерческих крахмалов, прошедших заводскую обработку, не определен, или отсутствуют данные производителя о содержании линейных и разветвленных, высоко- и низкомолекулярных полимеров. Исследования влияния крахмалов на биосинтез такролимуса носят единичный характер и не дают полного представления о преимущественном влиянии каких-либо компонентов на этот процесс.

Данный подраздел работы посвящен изучению состава крахмалов и его влияния на биосинтез такролимуса.

\* Исследования проводили в оптимизированной среде.

#### 4.5.3.1 Изучение влияния крахмалов

В предварительных экспериментах нами было показано, что использование растворимого картофельного крахмала (**К1**) является наиболее перспективным в сравнении с крахмалами других видов – кукурузным (**Ку**), тапиоковым модифицированным (**ТМ**), тапиоковым нативным (**ТН**) и гороховым (**Г**) (рисунок 20).

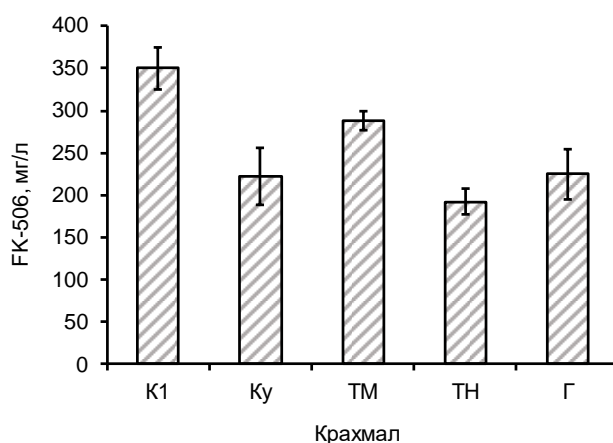


Рисунок 20 – Биосинтез такролимуса на средах с крахмалами (40 г/л), полученными из различных природных источников, в режиме культивирования с подпиткой со 2 по 7 сутки биосинтеза (единичная добавка – 6 г/л). К1 – картофельный, Ку – кукурузный, ТМ – тапиоковый модифицированный, ТН – тапиоковый нативный, Г – гороховый

В дальнейших экспериментах были использованы картофельные крахмалы.

В исследовании по влиянию картофельных крахмалов на эффективность биосинтеза такролимуса использовали 4 коммерчески доступных картофельных крахмала (обозначены как **К1**, **К2**, **К3** и **К4**, см. п. 3.1); в качестве референсных соединений были взяты 2 декстрина разной степени гидролиза полисахаридной цепи – желтый декстрин (**ЖД**) и мальтодекстрин (**МД**). Биосинтез такролимуса проводили в периодическом режиме в оптимизированной среде с концентрацией крахмала или декстрина 40 г/л, соответствующей пределу растворимости наиболее труднорастворимых крахмалов **К3** и **К4**. Указанные крахмалы проявляли неодинаковую эффективность на биосинтезе (рисунок 21), что согласуется с полученными ранее результатами Martinez-Castro *et al.* (2013).

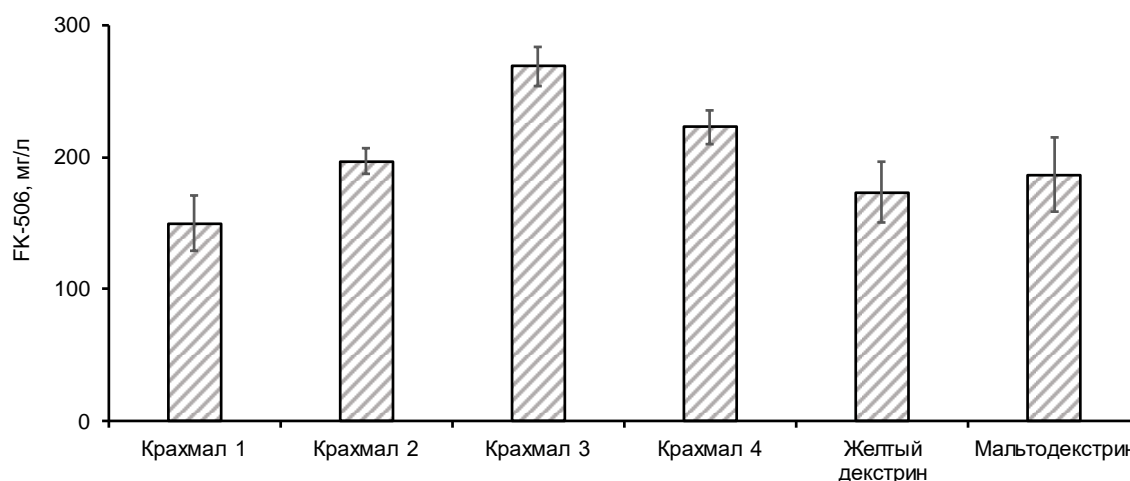


Рисунок 21 – Биосинтез такролимуса на средах с картофельными крахмалами и декстринами в периодическом режиме культивирования

#### 4.5.3.2 Физико-химические свойства и состав крахмалов

Принимая во внимание данные, изложенные в п. 4.5.3.1, проводили определение характеристик крахмала, наиболее существенных для биосинтеза такролимуса. Анализ основных физико-химических свойств исследованных крахмалов и декстринов представлен в таблице 10.

В ходе исследования было установлено следующее.

Крахмал **К1** преимущественно содержал высокомолекулярные полисахариды, на что указывали очень низкий уровень РВ (0,123 г/л) и интенсивное синее окрашивание йодом. Синее окрашивание характеризовало присутствие в нем линейных полисахаридов, из которых 20% были представлены амилозой. Повторное осаждение 96%-м этанолом приводило к выпадению осадков, что также указывало на доминирование высокомолекулярных полисахаридов. Эти осадки впоследствии растворялись в воде, а полученные растворы окрашивались йодом в интенсивно-синий цвет, что свидетельствовало о линейной структуре входящих в состав крахмала полисахаридов (Дроздов и Матеранская, 1970; Рихтер *с соавт.*, 1975; Яковишин, 2006).

Таблица 10 – Физико-химические свойства крахмалов и декстринов

Сахар	Содержание амилозы, %	РВ, г/л	Окрашивание йодного комплекса	Содержание фракций (%), осажденных этанолом			Содержание фракций (%), повторно осажденных 96% этанолом	
				40%	70%	96%	40% - 96%	70% - 96%
К1	20±0,5	0,123±0,25×10 <sup>-3</sup>	сине-фиолетовое	10±1,2	10±1,4	10±0,4	30±5,5	76±5,8
К2	0	1,334±3,34×10 <sup>-3</sup>	отсутствует*	0	0	20±1,3	0	0
К3	96±0,3	0,031±1,41×10 <sup>-3</sup>	синее	34±1,7	34±2,5	66±2,5	54±4,2	60±2,2
К4	92±0,3	0,034±1,44×10 <sup>-3</sup>	синее	33±3,3	32±1,5	66±3,4	51±2,2	57±2,9
ЖД	0	0,697±0,27×10 <sup>-3</sup>	отсутствует*	3±0,1	3±0,1	53±3,1	н.о.	н.о.
МД	0	1,56±4,67×10 <sup>-3</sup>	отсутствует	0	0	100	н.о.	н.о.

\* окрашивание раствором йода концентрированных растворов крахмалов и декстринов – 20 г/л. Соотношение объема йодного раствора к раствору испытуемого полисахарида 1:1000. К – крахмал, ЖД – желтый декстрин, МД – мальтодекстрин, н.о. – не определяли



Основными компонентами крахмала **К2** являлись не окрашиваемые йодом низкомолекулярные полисахариды – ахродекстрины и мальтодекстрины, что обуславливало относительно высокий уровень РВ (1,334 г/л). Окрашивание йодом концентрированных растворов этого крахмала позволило обнаружить минорные количества эритродекстринов (красновато-охровое окрашивание при двукратном увеличении объема йода). При повторном осаждении 96%-м этанолом выпадение осадков не наблюдали, что свидетельствовало о низкой степени полимеризации полисахаридов в составе крахмала **К2** (Дроздов и Матеранская, 1970; Яковичин, 2006).

Крахмалы **К3** и **К4** были представлены, главным образом, амилозой – на 96% и 92%, соответственно, что следовало из преобладающего количества образовавшихся бутаноловых комплексов с амилозой, интенсивно-синего окрашивания йодом и крайне низкого содержания РВ (0,031 и 0,034 г/л, соответственно). При повторном осаждении 96%-м этанолом были получены осадки, указывающие на преобладание в составе указанных крахмалов высокомолекулярных полисахаридов. Эти осадки не растворялись в воде, при ресуспендировании образовывали взвесь, частицы которой при взаимодействии с йодом давали интенсивное синее окрашивание.

Доминирующая фракция полисахаридов желтого декстрина была представлена ахро- и мальтодекстринами, что следовало из отсутствия окрашивания йодом, среднего уровня РВ (0,697 г/л) и выпадения осадка при осаждении 96%-м этанолом. Эритродекстрины обнаруживались в следовых количествах при окрашивании йодом концентрированного раствора декстрина с получением красно-бурого цвета.

Согласно паспорту производителя («Roquette», Франция), мальтодекстрин содержал 91% олиго- и полисахаридов, состоящих, в основном, из 19 остатков глюкозы, а также 2% глюкозы и 7% мальтозы. Компоненты мальтодекстрина при осаждении 96% этанолом выпадали в осадок практически количественно. Окрашивание йодом было отрицательным, а уровень РВ – высоким (1,56 г/л).

#### 4.5.3.3 Влияние состава крахмала

Согласно данным о составе и физико-химических свойствах, приведенных в таблице 10, использованные в работе 4 крахмала можно разделить на низкомолекулярные (**К2**) и высокомолекулярные линейные (**К1, К3, К4**).

Последующее культивирование проводили в периодическом режиме с подачей в ферментационную смесь стерильного раствора крахмала или декстрина на разных этапах биосинтеза (рисунки 22).

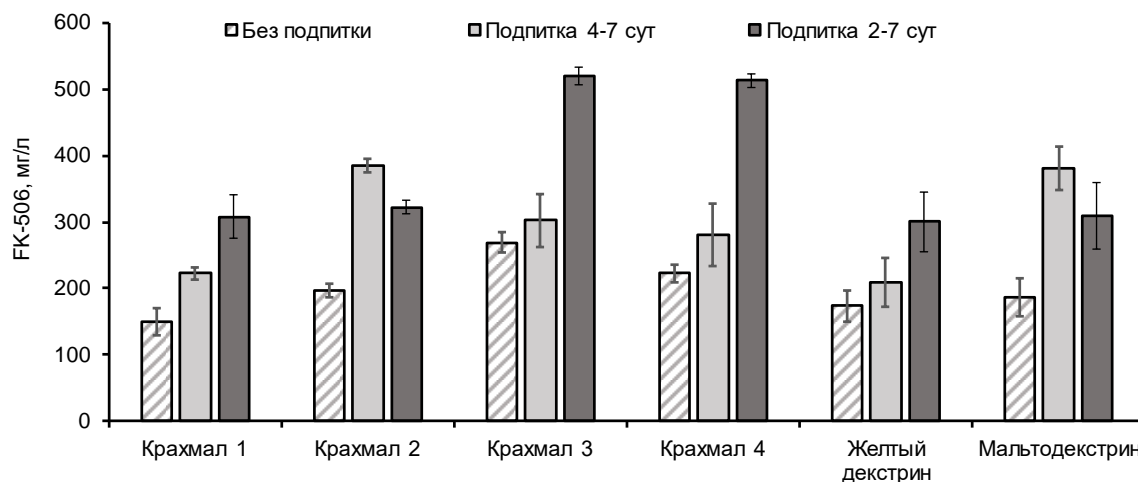


Рисунок 22 – Биосинтез такролимуса на средах с картофельными крахмалами и декстринами в режиме периодического культивирования без добавок и с добавками с 4-х по 7-е и со 2-х по 7-е сутки биосинтеза

Как видно из рисунка 22, в режиме культивирования без добавок во всех случаях наблюдали низкие ( $> 270$  мг/л) выходы такролимуса. Режим ежесуточной подпитки приводил к существенному повышению выхода такролимуса также при использовании всех изученных источников углерода. Наиболее значительный эффект отмечался при использовании **К2** и **МД** (почти двукратное увеличение выхода –  $385,5 \pm 10,0$  и  $380,5 \pm 32,5$  мг/л, соответственно). При использовании крахмалов **К1**, **К3** и **К4**, а также **ЖД** эффект был менее заметным.

Применение высокомолекулярных крахмалов **К1**, **К3** и **К4** не способствовало высокому выходу в условиях периодического культивирования с подпиткой на более поздних сроках биосинтеза (4-7-е сутки) (рисунок 22). Предположительно, гидролиз полимерной цепи таких крахмалов затруднен вследствие недостаточного количества в молекуле субстрата мест связывания с концевыми амилолитическими ферментами. Согласно результатам анализа геномов штаммов *S. tsukubensis*, у них отсутствуют гены, кодирующие расщепляющие крахмал эндогидролазы ( $\alpha$ -амилазы), но обнаружены гены соответствующих экзогидролаз (глюкоамилазы,  $\beta$ -амилазы и  $\alpha$ -глюкозидазы).

При отсутствии  $\alpha$ -амилаз высокомолекулярные крахмалы **К1**, **К3** и **К4** не могли быть гидролизованы на более короткие фрагменты, что приводило к ограничению действия экзогидролаз, для которых необходимо достаточное количество нередуцирующих концов в молекуле полисахарида (рисунок 23).

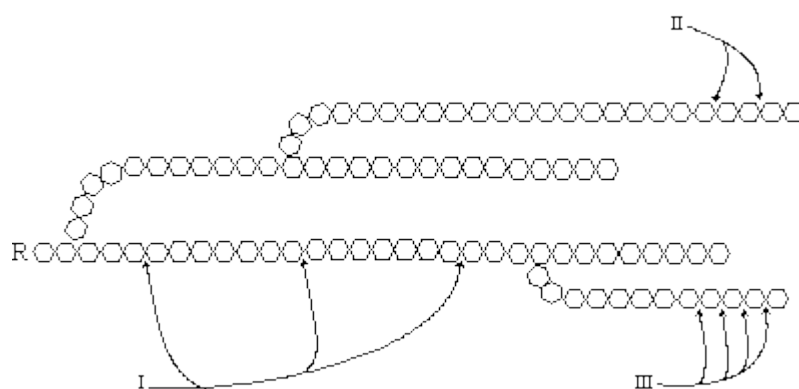


Рисунок 23 – Схема действия  $\alpha$ -амилазы (I),  $\beta$ -амилазы (II), глюкоамилазы и  $\alpha$ -глюкозидазы (III) на крахмал

Если допустить, что количество нередуцирующих остатков, необходимых для проявления действия концевых амилолитических ферментов, равно числу редуцирующих, то у крахмала **К2** в полимерной цепи мест связывания с экзогидролазами от 11 до 43 раз больше, чем у других изученных крахмалов (таблица 11), что может определять его более эффективное потребление штаммом-продуцентом.

Таблица 11 – Расчетные данные по количеству ангидроглюкозных единиц (АГЕ) в полимерной цепи крахмалов (согласно содержанию РВ)

Крахмал	РВ, г/л	Количество АГЕ (С/РВ)*	АГЕ крахмал (2) / АГЕ крахмал (n)	М.м., кДа
1	$0,123 \pm 0,25 \times 10^{-3}$	122	11	~19,8
2	$1,334 \pm 3,34 \times 10^{-3}$	11	1	~1,8
3	$0,031 \pm 1,41 \times 10^{-3}$	484	43	~78,4
4	$0,034 \pm 1,44 \times 10^{-3}$	441	39	~71,4

\* С – концентрация крахмала в растворе, равная 15 г/л

Исходя из полученных данных, было сделано предположение, что раннее введение подпитки будет способствовать повышению выхода такролимуса. При предварительном изучении влияния различных режимов введения подпитки (со 2-х по 7-е и с 3-х по 7-е сутки) наблюдали стабильное повышение выхода такролимуса в случае внесения добавки высокомолекулярных крахмалов в период со 2-х по 7-е сутки культивирования.

При раннем начале подпитки (2-7-е сутки) наблюдали увеличение выхода такролимуса при использовании высокомолекулярных крахмалов **К1**, **К3** и **К4** и желтого декстрина на 38,6, 72, 83,4 и 44,3%, соответственно, по сравнению с выходом при более позднем старте подпитки (с 4-х суток). В то же время при выращивании на средах, содержащих низкомоле-

кулярный крахмал **К2** и мальтодекстрин, более раннее начало подпитки приводило к снижению выхода такролимуса на 19,6 и 22,6%, соответственно. Таким образом, несмотря на незначительное различие по количеству суммарно добавленного раствора крахмала или декстрина в результате подпитки с 4-х по 7-е и со 2-х по 7-е сутки, наблюдались существенные различия в достигаемых уровнях выхода такролимуса при изменении времени начала подпиток.

Можно предположить, что высокий выход такролимуса, достигаемый при использовании крахмалов **К3** и **К4**, опосредован наличием в их молекулах бóльшего количества нередуцирующих концов (до 4-х раз) по сравнению с молекулами крахмала **К1** (таблица 11). Совокупность характеристик крахмалов **К3** и **К4** (таблицы 10 и 11), включающих молекулярный вес (по расчетам 78,4 и 71,4 кДа, соответственно), низкий уровень РВ (0,031 и 0,034 мг/л, соответственно), образование нерастворимых частиц при растворении в воде осадков, полученного при осаждении этанолом, и вязких нетекучих растворов, характерных для амилопектина, а также присущее амилозе интенсивное синее окрашивание при взаимодействии с йодом, позволяет предположить, что данные крахмалы представлены частично разветвленной амилозой (Mukerjea & Robyt, 2010).

В свою очередь, возможной причиной снижения выхода такролимуса при выращивании на средах, содержащих крахмал **К2** и мальтодекстрин, при подпитке со 2-х по 7-е сутки был предполагаемый избыток по сравнению с добавками с 4-х по 7-х сутки низкомолекулярных сахаров, в частности, глюкозы. Для вторичного биосинтеза, как правило, характерно использование штаммом-продуцентом полимеризованной глюкозы, в то время как свободная экзогенная глюкоза может подавлять процесс биосинтеза такролимуса (Ordóñez-Robles *et al.*, 2017).

Во всех вариантах сред, использованных для выращивания, наиболее низкий выход такролимуса наблюдался при использовании желтого декстрина, который получают путем химического гидролиза крахмала при повышенной температуре, сопровождающегося частичной карамелизацией. Как следует из таблицы 10, желтый декстрин содержал низкомолекулярные соединения с показателем РВ, вдвое уступающим этой величине продуктам ферментативного гидролиза крахмала – **К2** и мальтодекстрину. При этом отсутствие при анализе желтого декстрина окрашивания йодом, характерного для крахмала **К2** и мальтодекстрина, могло свидетельствовать о наличии в его составе низкомолекулярных нелинейных сахаров, образующихся при карамелизации путем внутри- и межмолекулярной конденсации. Можно предположить, что особенности строения желтого декстрина обуславливают его ограниченную доступность для амилолитических ферментов штамма-продуцента.

На рисунке 24 представлена зависимость роста *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д от используемых в средах крахмалов. В целом различия по биомассе, достигаемой при росте на низко- и высокомолекулярных крахмалах, были незначительны ( $15,4 \pm 1,2$  г/л), а снижение показателей роста наблюдали только на среде, содержащей желтый декстрин.

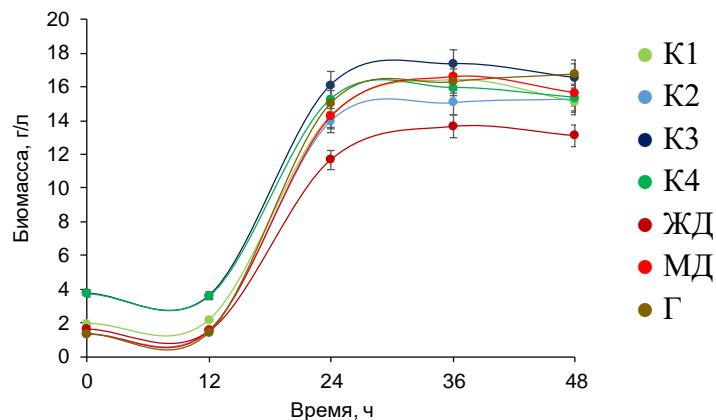


Рисунок 24 – Рост *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на среде VII, содержащей крахмалы (К1-К4), желтый декстрин (ЖД), мальтодекстрин (МД) и глюкозу (Г)

Определение биомассы в динамике при биосинтезе такролимуса в **среде VI**, не содержащей сорбента, осложнялось, помимо высоких концентраций крахмалов, превышающих предел их растворимости, содержанием в ней ряда таких нерастворимых компонентов, как сухие дрожжи и карбонат кальция. Результаты оценки накопления биомассы в процессе биосинтеза FK-506 на указанной среде приведены на рисунке 25.

Биомасса в **среде VI**, содержащей крахмал **К2**, представленный низкомолекулярными растворимыми полисахаридами, а также мальтодекстрин, обладающий сходным составом, достигала через 2-е суток культивирования максимального уровня  $21,7 \pm 0,7$  г/л. Впоследствии наблюдали снижение биомассы до  $6,7 \pm 0,1$  г/л в условиях периодического культивирования и до  $12,9 \pm 1,2$  г/л при культивировании с подпиткой (более плавное для **К2** и резкое для **МД**) (рисунок 25б, е).

Динамика изменения биомассы *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д на **среде VI**, содержащей высокомолекулярные крахмалы **К1**, **К3** и **К4**, имела сходный вид (рисунок 25а, в, г). Максимальный уровень биомассы отмечался также через 2-е суток от засева и составил  $24,2 \pm 0,6$  (**К1**) и  $26,4 \pm 0,7$  г/л (**К3** и **К4**). Следует отметить, что, несмотря на использование для обеспечения возможности измерения биомассы в использованных средах  $\alpha$ -амилазы, расщепляющей крахмалы, нельзя полностью исключить погрешности, связанные с наличием остаточного крахмала, что могло привести к некоторому завышению значений в течение начальных этапов культивирования (первые 2-е суток). Тем не менее, проведенные исследования позволяли оценить общие закономерности изменения биомассы в процессе биосинтеза

такролимуса. После 2-х суток культивирования также наблюдалось снижение биомассы до  $11,2 \pm 3,2$  г/л к 10-м суткам, в режиме как периодического культивирования, так и культивирования с подпиткой как со 2-х, так и с 4-х суток культивирования (рисунок 25а, в, г).

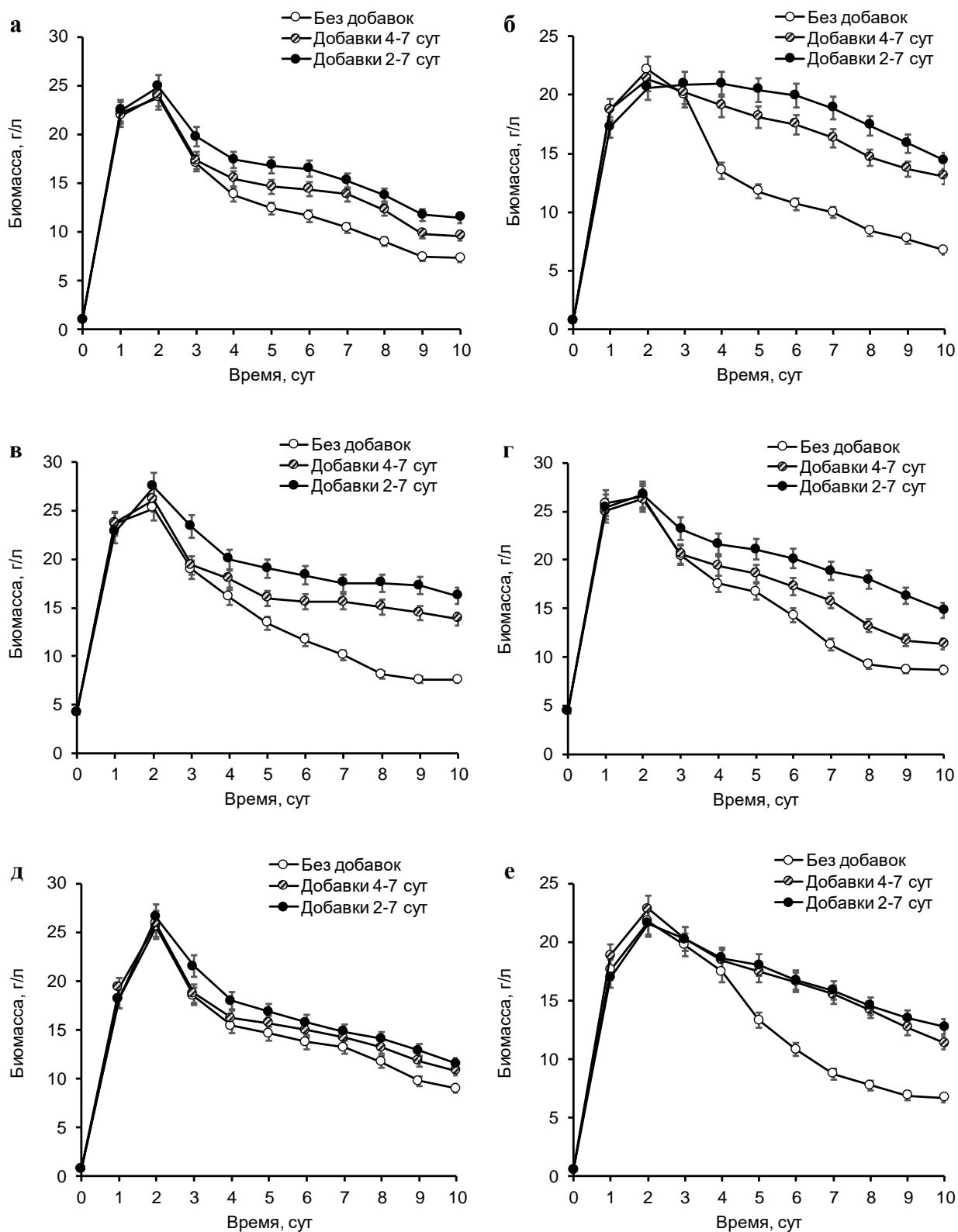


Рисунок 25 – Рост *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в среде VI без сорбента в присутствии: а – К1, б – К2, в – К3, г – К4, д – ЖД, е – МД

Динамика изменения биомассы при биосинтезе такролимуса на среде, содержащей желтый декстрин, отличалась от динамик, полученных при использовании других изученных полимеризованных источников углерода: не наблюдалось существенной разницы по биомассе при различных режимах культивирования (рисунок 25д).

Однако из данных по убыли РВ (рисунок 26) следовало, что, несмотря на то, что состав изучаемых полисахаридов, добавленных в среду VII, не влиял значительным образом на биомассу (рисунок 24), скорость их утилизации продукцентом зависела от их состава.

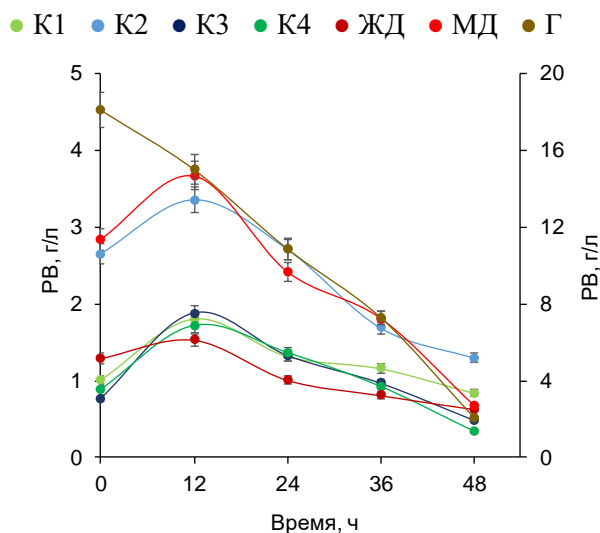


Рисунок 26 – Динамика потребления *S. tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д крахмалов (K1-K4), желтого декстрина (ЖД), мальтодекстрина (МД) и глюкозы (Г)

Как видно на рисунке 26, низкомолекулярные субстраты (глюкоза и компоненты K2 и МД) утилизируются с наибольшей скоростью, а медленнее потребляются высокомолекулярные (K1, K3 и K4) и трудноусваиваемые (ЖД) субстраты. Однако характер кривых во всех случаях был близок. Так, в первые 12 ч наблюдали рост РВ, что свидетельствовало о преобладании процесса гидролиза высокомолекулярного субстрата над потреблением образовавшихся низкомолекулярных продуктов – глюкозы и мальтозы, в последующие сутки превалировали процессы потребления продуктов гидролиза крахмала (рисунок 26). К концу 4-5-х суток культивирования во всех случаях скорости образования и потребления продуктов гидролиза крахмалов и декстринов были уравновешены, и при этом достигались близкие значения РВ ( $0,66 \pm 0,19$  г/л).

Таким образом, культура эффективно росла на средах, содержавших все изученные полисахариды. Активный гидролиз полисахаридных субстратов в логарифмической фазе роста обеспечивал значительный прирост биомассы с достижением ее максимального уровня к 2-м суткам культивирования. При этом более высокий уровень биомассы отмечался при выращивании на высокомолекулярных крахмалах (25-26 г/л), однако, в целом, различия макси-

мальных значений не превышали 15%. Последующий рост сопровождался значительным снижением уровня биомассы. К 10-м суткам культивирования при отсутствии подпиток содержание биомассы снижалось до сопоставимых уровней (6-8 г/л), при этом отсутствовала корреляция различий количества биомассы, выращенной на средах, содержащих различные полисахариды, и выхода синтезируемого такролимуса. Результаты отличаются от литературных данных, описывающих корреляцию между достигаемой биомассой и продукцией вторичных метаболитов (например, при биосинтезе неомидина культурой *Streptomyces marinesis* NUV 5) (Ellaiah *et al.*, 2004).

Ежесуточное внесение дополнительных порций крахмалов способствовало поддержанию биомассы на более высоком уровне, что наиболее отчетливо проявлялось в средах с низкомолекулярными полисахаридами (**К2** и **МД**). Для них же наблюдали максимальный выход такролимуса (380-385 мг/л) при начале внесения дополнительных порций соответствующих полисахаридов (**К2** и **МД**) в стационарной фазе (4-е сутки культивирования) (рисунок 22). В то же время, когда дополнительные порции низкомолекулярных полисахаридов вносили при переходе культуры в фазу замедления роста (со 2-х суток культивирования), наблюдалось снижение выхода такролимуса (рисунок 22), хотя более раннее внесение подпиток способствовало поддержанию биомассы на более высоком уровне (рисунок 25).

На средах, содержащих высокомолекулярные крахмалы (**К1**, **К3** и **К4**), достигались более высокие значения биомассы (25-27 г/л). Внесение дополнительных порций крахмалов **К3** и **К4** в фазе замедления роста (со 2-х суток культивирования) способствовало повышению выхода такролимуса до 500-520 мг/л, в то время как при более позднем внесении подпиток эффект был менее значительным (рисунок 22).

На основании полученных данных можно заключить, что при использовании высокомолекулярных крахмалов (показатель РВ – менее 1,0 г/л) наиболее целесообразно проведение процесса в режиме периодического культивирования с началом дополнительного дробного внесения добавок крахмалов при переходе культуры в фазу замедления роста (со 2-х суток культивирования). Для достижения высокого выхода такролимуса на средах, содержащих низкомолекулярные крахмалы (показатель РВ – более 1,0 г/л), следует осуществлять добавки крахмалов позднее при достижении культурой стационарной фазы (с 4-х суток ферментации).

#### 4.5.4 Изучение влияния источников азота

Как и в случае с источниками углерода, диапазон источников азота, используемых для приготовления сред для биосинтеза такролимуса, достаточно обширен. В качестве источника



азота, как правило, используют источники органического происхождения: соевую (Vaid & Narula, 2006; Kim & Park, 2008; Jung *et al.*, 2009), перьевую (Глаголев *с соавт.*, 2017), хлопковую (Kumar *et al.*, 2008), гороховую муку (Глаголев *с соавт.*, 2017), пептон (Kumar *et al.*, 2008; Singh & Behera, 2009), дрожжевой (Vaid & Narula, 2006; Singh & Behera, 2009) и кукурузный (Kim & Park, 2007; Глаголев *с соавт.*, 2017) экстракты. Из литературы известны примеры использования источников неорганического азота для продукции FK-506. В частности, Martínez-Castro *et al.* (2013) было показано положительное влияние на биосинтез такролимуса сульфата аммония, пептон и дрожжевой экстракт стимулировали рост продуцента, но при этом подавляли биосинтез.

Нами было изучено влияние на биосинтез такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д кукурузного и дрожжевого экстрактов, соевых муки и пептона, хлопковой муки, ферментативного и кислотного гидролизатов казеина. Как видно из рисунка 27а, наиболее активно биосинтез такролимуса культурой протекал в средах с кукурузным экстрактом.

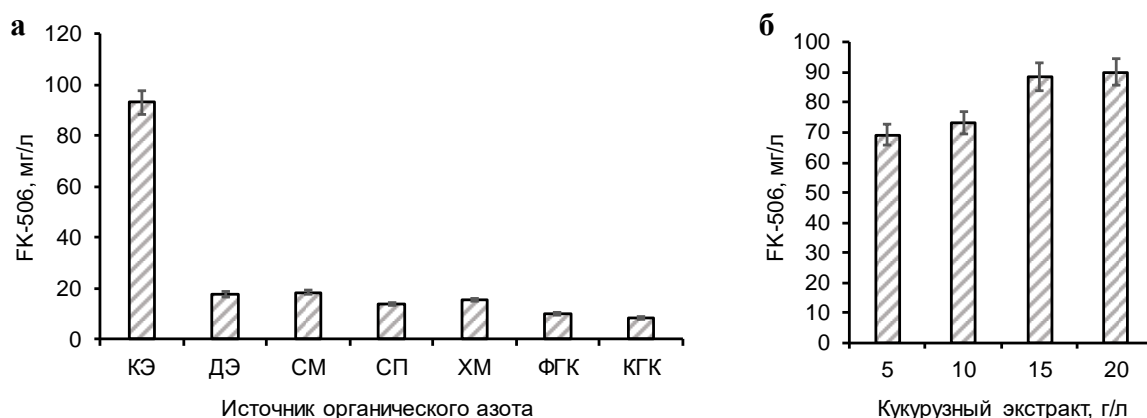


Рисунок 27 – (а) Влияние источников органического азота на биосинтез такролимуса (концентрация источника в среде – 15 г/л): КЭ – кукурузный экстракт, ДЭ – дрожжевой экстракт, СМ – соевая мука, СП – соевый пептон, ХМ – хлопковая мука, ФГК – ферментативный гидролизат казеина, КГК – кислотный гидролизат казеина. (б) Влияние концентрации кукурузного экстракта на биосинтез такролимуса

Оптимальная концентрация кукурузного экстракта в среде составляла не менее 15 г/л (рисунок 27б). Замена кукурузного экстракта гидролизатами казеина приводила к падению активности на 90-92%. В средах с дрожжевым экстрактом, соевым пептоном, соевой и хлопковой мукой выход такролимуса снижался на 80-85%.

Полученные результаты, предположительно, объясняются тем, что кукурузный экстракт, по сравнению с другими изученными источниками азота, содержит до 6 раз больше растворимых легкоутилизуемых компонентов: негидролизованного глобулярного белка,

аминокислот, витаминов, а также редуцирующих сахаров (декстроза), органических кислот (молочная кислота), минеральных солей и др.

В последующих экспериментах в качестве источника азота использовали кукурузный экстракт в концентрации 15 г/л.

Использование минеральных аммонийных и нитратных солей в качестве источника азота приводило к полному подавлению ферментативной активности (данные не приводятся). При внесении минеральных источников азота в качестве дополнительного источника азота в среду с кукурузным экстрактом отмечали снижение выхода такролимуса на 25-40% (рисунок 28).

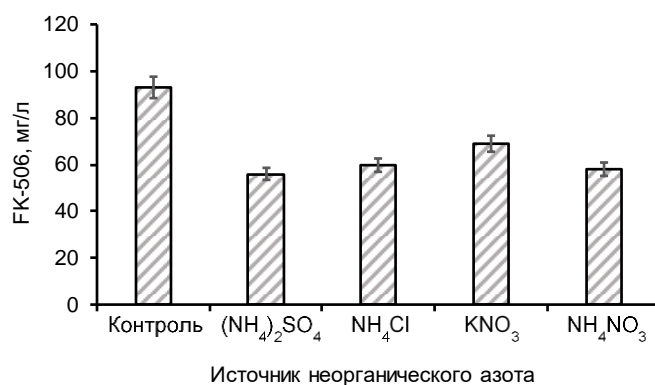


Рисунок 28 – Влияние минеральных источников азота при их внесении в среду, содержащую кукурузный экстракт (контроль), на выход такролимуса (концентрация минеральных источников азота в среде – 4 г/л)

#### 4.5.5 Влияние низших грибов на биосинтез такролимуса\*

В естественной среде обитания стрептомицеты продуцируют вторичные метаболиты, такие как антибиотики (в т.ч. такролимус), как правило, для обеспечения защиты питательных субстратов от их использования другими конкурирующими микроорганизмами, включая грибы. Противогрибковая активность такролимуса показана в отношении одноклеточных эукариотов – дрожжей, таких как *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, и мицелиальных грибов *Aspergillus fumigatus* (Onyewu *et al.*, 2003; Steinbach *et al.*, 2004; Singh & Heitman, 2004). Однако влияние низших грибов на особенности роста и вторичный метаболизм стрептомицетов, продуцирующих такролимус, практически не изучено.

В данной части работы было изучено влияние микроскопических грибов разного таксономического положения на биосинтез такролимуса.

\* Исследования проводили в оптимизированных условиях.

#### 4.5.5.1 Изучение влияния пекарских дрожжей и компонентов их клеток

Дрожжи являются источником многих веществ, необходимых для развития микроорганизмов: факторов роста (в т.ч. витаминов), пуринов и пиримидинов, катионов (Семенов, 1990).

Влияние автоклавированной биомассы целых клеток пекарских дрожжей на рост и биосинтез такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д исследовали в интервале концентраций от 0 до 25 г/л. Оценка роста бактериальной культуры в процессе биосинтеза осложнялась невозможностью отделения мицелия продуцента от клеток дрожжей, поэтому проводили измерение общей массы.

Как видно из рисунка 29а, биомасса достигала максимального значения на 48 ч культивирования и составляла 20 г/л в среде, содержащей 15 г/л сухих пекарских дрожжей (СПД); увеличение их концентрации до 20 г/л не приводило к значительному приросту биомассы.

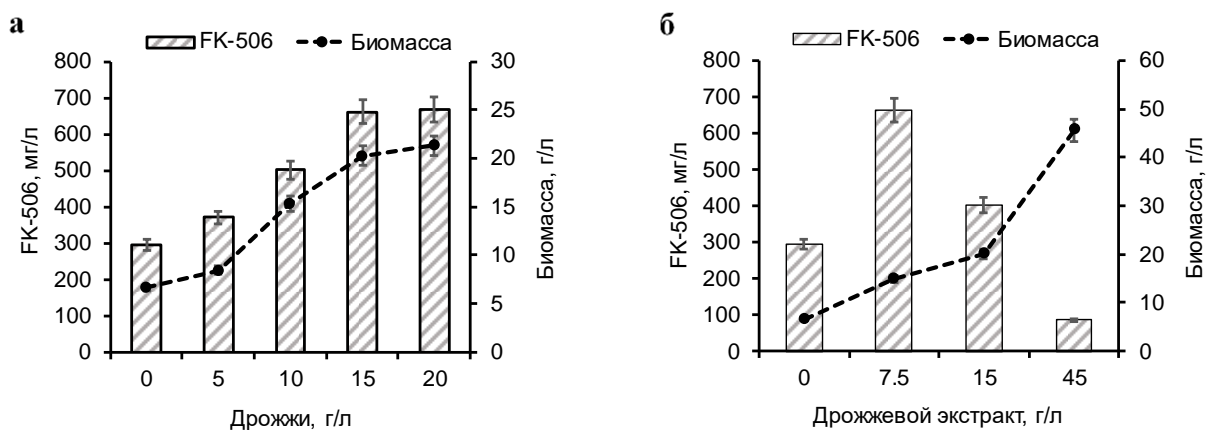


Рисунок 29 – Влияние концентрации сухих пекарских дрожжей (а) и дрожжевого экстракта (б) на рост и биосинтез такролимуса культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в среде с кукурузным экстрактом

Добавление дрожжей стимулировало биосинтез такролимуса и приводило к достижению выхода  $667,5 \pm 33,4$  мг/л, что было на 126% выше по сравнению со средой, не содержащей дрожжи ( $295,0 \pm 14,8$  мг/л) (рисунок 29а). Выход такролимуса коррелировал биомассой в средах с разными концентрациями СПД, при этом увеличение концентрации дрожжей свыше 15 г/л не приводило к достоверному повышению содержания FK-506 (рисунок 29а).

В питательных средах для культивирования бактериальных штаммов качестве источника органического азота и витаминов часто используют дрожжевой экстракт и дрожжевой автолизат, получаемые из дрожжевых клеток (Семенов, 1990). Было показано, что сходный

выход такролимуса ( $662,7 \pm 33,1$  мг/л) достигался в среде, содержащей в половину меньшую концентрацию дрожжевого экстракта (7,5 г/л) по сравнению с целыми клетками дрожжей (рисунок 29б). При этом наблюдали обратную зависимость между ростом и биосинтезом такролимуса продуцирующей культурой (рисунок 29б).

В отличие от целых клеток сахаромисетов, представляющей собой комплекс сложных компонентов, как растворимых, так и нерастворимых, дрожжевой экстракт является высококонцентрированной фракцией водорастворимых компонентов клеток дрожжей. Таким образом, полученные результаты свидетельствовали, что компоненты дрожжевых клеток, в частности, их клеточной стенки, могут оказывать различный эффект на биосинтез такролимуса.

Для выяснения роли отдельных компонентов клеток дрожжей в биосинтезе такролимуса дрожжевые клетки были разрушены и фракционированы; полученные гомогенат, фракции нерастворимых (осадок) и растворимых (супернатант) компонентов использовали для приготовления среды биосинтеза (п. 3.3, п. 3.12).

Как следует из рисунка 30, все фракции компонентов дрожжевых клеток положительно, но в разной степени влияли на биосинтез такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, что выражалось в 52%-ном (супернатант) и 74%-ном (осадок) увеличении его выхода.

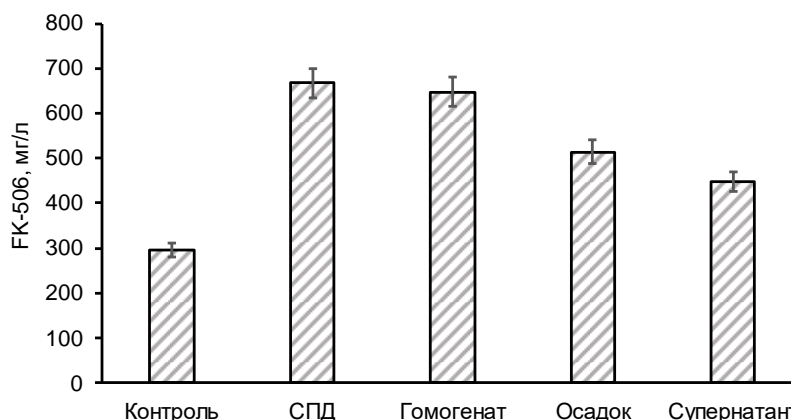


Рисунок 30 – Влияние различных фракций компонентов дрожжевых клеток *S. cerevisiae* (СПД) на продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д среде с кукурузным экстрактом (15 г/л). Контроль – среда без добавления компонентов дрожжей

Титр такролимуса в среде, содержавшей супернатант, составил  $447,1 \pm 22,4$  мг/л и был до 23% ниже по сравнению с выходом в среде с фракцией нерастворимых компонентов дрожжевых клеток ( $514,3 \pm 25,7$  мг/л), но на 52% выше, чем в контроле – среде без добавления компонентов дрожжей ( $295,0 \pm 14,8$ ) (рисунок 30). Полученные результаты подтверждают предположение о том, что поверхностные структуры дрожжей, включающие клеточные стенки и цитоплазматические мембраны, а также ряд других нерастворимых компонентов дрожжевых клеток, стимулируют биосинтез такролимуса *S. tsukubensis*. При этом не исклю-

чено, что возможную сигнальную роль в активации каскада реакций биосинтеза такролимуса могут выполнять поверхностные компоненты клеток дрожжей наряду с тем, что дрожжи являются признанным источником витаминов и белкового азота в составе питательных сред.

#### 4.5.5.2 Изучение влияния низших мицелиальных грибов

Исследовали влияние на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д грибов разных порядков: *A. ochraceus* (Eurotiales), *C. lunata* (Pleosporales) и *G. butleri* (Mucorales), инактивированный мицелий которых добавляли в среду VI вместо пекарских дрожжей.

Как видно на рисунке 31, присутствие биомассы *A. ochraceus* стимулировало биосинтез такролимуса, при этом достигнутый выход был сопоставим с полученным при использовании дрожжей ( $633,5 \pm 31,7$  и  $667,5 \pm 33,4$  мг/л FK-506, соответственно), что на 115% выше, чем в контроле. Биомасса *C. lunata* не оказывала влияния на продукцию такролимуса (рисунок 31). Присутствие биомассы мукорового гриба *G. butleri*, напротив, полностью подавляло рост стрептомицета и биосинтез такролимуса (рисунок 31).

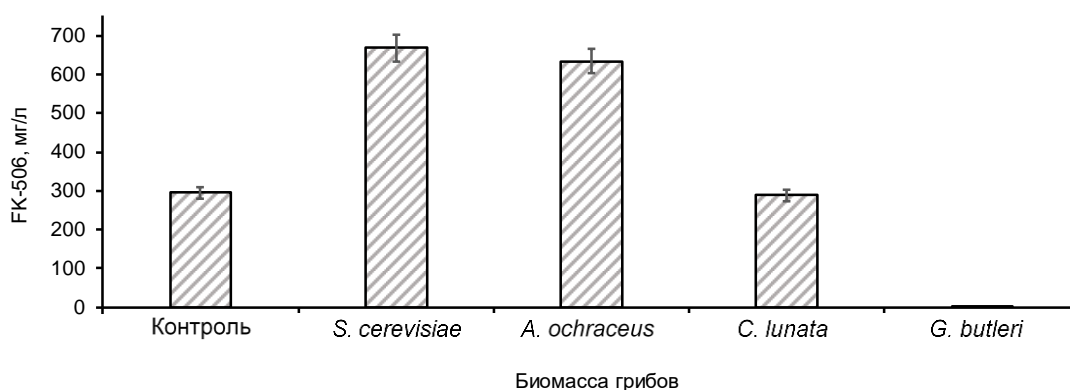


Рисунок 31 – Влияние биомассы грибов в составе среды биосинтеза на продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. Контроль – среда без биомассы низших грибов

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

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

глюкан трансгликозилирован хитином и гликозилфосфатидилинозитол-связанными белками (Xie & Lipke, 2010).

В клеточной стенке дрожжей *S. cerevisiae* преобладают глюканы и маннаны, тогда как содержание хитина незначительно (не превышает 3-4%). Напротив, в клеточной стенке грибов рода *Aspergillus* содержится до 20-22% хитина. Клеточная стенка *G. butleri* содержит полярный положительно заряженный хитозан (Унрод и Солодовник, 2001). Предположительно, различия в составе клеточных стенок изучаемых низших грибов являются наиболее вероятной причиной их неодинакового влияния на биосинтез такролимуса культурой стрептомицета.

Поиск в геномной последовательности штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д выявил наличие генов, кодирующих гликозил-гидролазы (ЕС 3.2.1), осуществляющие гидролиз глюканов и хитина, тогда как гены ферментов, способных расщеплять хитозан, в геноме не обнаружены.

Отсутствие роста штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в среде, содержащей инактивированную биомассу *G. butleri*, может свидетельствовать об антагонистической активности мицелия этого мукового гриба. Культура *G. butleri*, принадлежащая к филуму *Zygomycetes*, является важным промышленным продуцентом хитозана (другим источником хитозана является панцирь креветок, но, несмотря на доступность, хитозан из панциря ракообразных практически всегда содержит аллергенный белок, и его клиническое применение поэтому ограничено). Штаммы *G. butleri* способны производить свыше 730 мг/л хитозана (Babu *et al.*, 2015). Было показано, что гидроглутамат хитозана проявляет антагонистический эффект против бактерий *Escherichia coli* V517, *Staphylococcus aureus* MF-31 и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, полностью инактивируя вышеуказанные микроорганизмы уже при 2-минутной экспозиции (Parineau *et al.*, 1991). Антибактериальный эффект растворимого хитозана был описан для оральных патогенов *Streptococcus mutans* и *Lactobacilli brevis* (Chen & Chung, 2012). Хитозан (1 г/л) из *Aspergillus niger* и *Mucor rouxii* ингибировал рост *Salmonella typhimurium* (Wu *et al.*, 2005). Чувствительность различных организмов к хитозану снижается в следующем порядке: дрожжи и грибы > грамположительные бактерии > грамотрицательные бактерии (Badawy & Rabea, 2011). Вероятно, содержащийся в клеточной стенке *G. butleri* хитозан мог ингибировать рост и, соответственно, биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д.

### 4.5.5.3 Изучение влияния эргостерина

Эргостерин – один из основных компонентов в цитоплазматической мембране различных низших эукариотов. Его весовое содержание варьирует от 0,2-0,5% до 11% (Lippert Hirsch, 2011). Структура всех стероидов, включая эргостерин, основана на насыщенном тетрациклическом предшественнике – углеводороде стеране. Стеран найден в осадочных породах, возраст которых составляет более 1,8 млрд. лет; благодаря этому биомаркеру, характерному только для эукариотических клеток, стало возможным определение времени возникновения эпохи эукариотов (Rasmussen *et al.*, 2008).

Эргостерин низших эукариотов, как известно, служит сигнальной молекулой, запускающей каскад реакций биосинтеза ряда антибиотиков и фунгицидов (Mendes *et al.*, 2007). Нами было изучено влияние эргостерина на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* отдельно и в комбинации с клетками дрожжей (для оценки возможного синергетического эффекта). Во всех случаях наблюдали отсутствие влияния или слабый отрицательный эффект эргостерина на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, что свидетельствовало о том, что выявленный стимулирующий эффект присутствия эукариотических клеток на биосинтез такролимуса не связан с эргостерином (рисунок 32). Влияние эргостерина на рост культуры также не было выявлено.

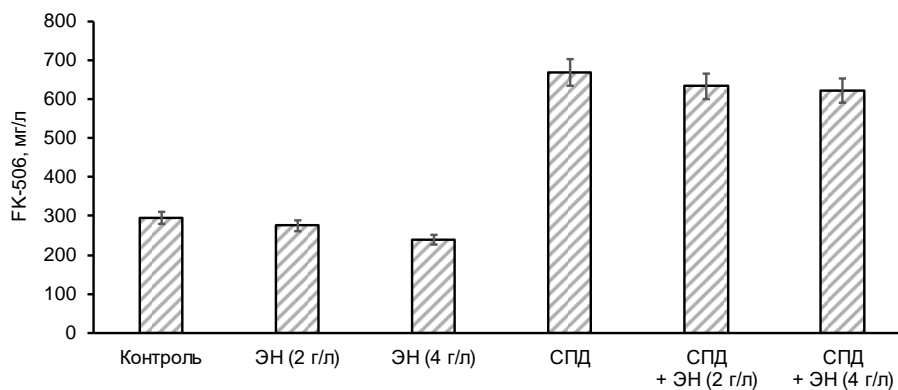


Рисунок 32 – Влияние эргостерина на продукцию такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д: СПД – сухие пекарские дрожжи, ЭН – эргостерин. Контроль – среда без СПД

Таким образом, результаты данной части исследования свидетельствуют о том, что присутствие клеток низших грибов или их компонентов в среде культивирования оказывает влияние на биосинтез такролимуса. Эффект зависит от вида низших грибов и опосредован, главным образом, составом их клеточных стенок, но не зависит от эргостерина.

#### 4.5.6 Изучения влияния микроэлементов и аминокислот

Необходимыми компонентами питательных сред для обеспечения эффективного биосинтеза многих антибиотиков и других вторичных метаболитов являются магний, фосфор, калий, сера, кальций, медь, железо, марганец и цинк, выполняющие в клетке разнообразные функции (Bader, 1986).

Внесение в среду ионов металлов осуществляли в виде солей:  $MgSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $FeSO_4$  (п. 3.4). В предварительных экспериментах нами были определены их оптимальные концентрации (г/л):  $MgSO_4$  – 0,5,  $MnSO_4$  – 0,05,  $ZnSO_4$  – 0,03,  $FeSO_4$  – 0,05. Добавление этих солей способствовало повышению выхода такролимуса от 23 до 30% (рисунок 33). Максимальный эффект был отмечен при добавлении  $MnSO_4$ .

При совместном внесении в среду указанных солей содержание целевого продукта увеличивалось на 24-30%, таким образом, кумулятивный эффект не был выявлен.

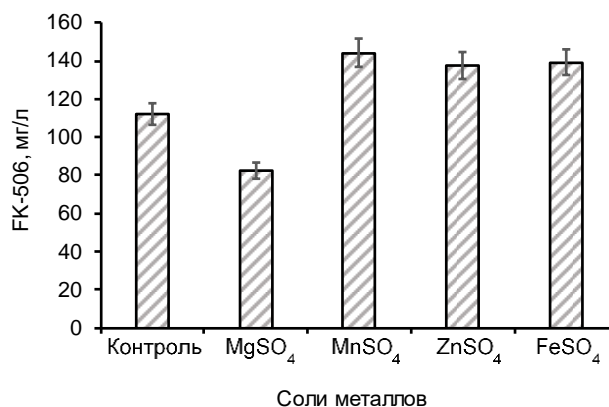


Рисунок 33 – Биосинтез такролимуса в присутствии солей металлов в оптимальных концентрациях

Ранее было показано, 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 с образованием промежуточного соединения – пре-такролимуса. Добавление лизина на 3-и сутки культивирования в концентрации 5 г/л способствовало увеличению выхода FK-506 более чем на 20% (от 63,8 до 75,3 мг/л).

#### 4.5.7 Способы предотвращения деградации такролимуса продуцентом

В ходе предварительных экспериментов было установлено, что накопление такролимуса при его биосинтезе культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д сменялось его убылью при



продолжительном культивировании, что согласуется с данными, полученными Kim *et al.* (2009).

В среде, содержащей крахмал, кукурузный экстракт и клетки дрожжей, в течение первых 2-х суток накапливалось до 25 мг/л такролимуса. В последующие 2-е суток содержание макролида достигало 70 мг/л. Наиболее активно биосинтез такролимуса протекал в период от 4-х до 6-х суток, выход FK-506 достигал 150 мг/л. В последующий период отмечали активную деструкцию макролида (рисунок 34).

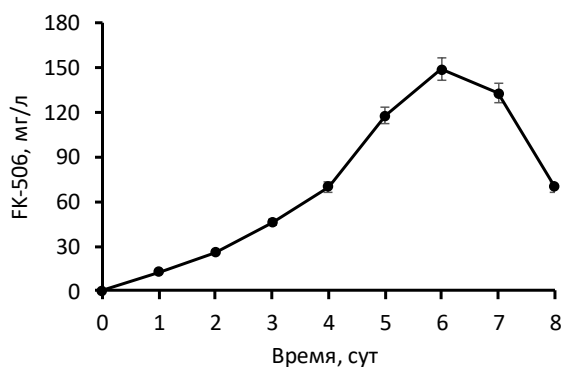


Рисунок 34 – Динамика накопления такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д

В связи с этим для увеличения выхода такролимуса необходимо решение проблемы деградации макролида продуцентом.

#### 4.5.7.1 Дополнительное внесение источника углерода

При изучении динамики потребления крахмала продуцентом было показано, что его активное использование растущей культурой происходит уже в 1-е сутки культивирования и продолжается до 5-х суток (период активного синтеза такролимуса). Синтез макролида на 6-7-е сутки культивирования прекращался в связи с истощением в среде крахмала, и начинался процесс его активной деградации. Данные по убыли крахмала в динамике биосинтеза такролимуса представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Содержание связанной и свободной глюкозы в среде в динамике биосинтеза такролимуса культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д

Время, сут	Глюкоза из гидролизованного крахмала,	Глюкоза свободная,
0	63,71	5,95
2	37,53	0,22
4	8,96	0,24

5	1,26	след. кол-ва
6	0,81	след. кол-ва

Время истощения источника углерода в среде биосинтеза коррелировало с началом активной деструкции такролимуса. Таким образом, было сделано предположение, что вероятной причиной деструкции FK-506 является исчерпание источника углерода в среде.

В среду биосинтеза, содержащую 75 г/л крахмала, в период истощения источника углерода (4-е сутки культивирования) дробно вносили стерильный раствор крахмала до его конечной концентрации 5,4 г/л. Однако порционное добавление раствора крахмала в среду приводило к незначительному увеличению выхода такролимуса, но не повлияло на его последующую деградацию культурой (рисунок 35).

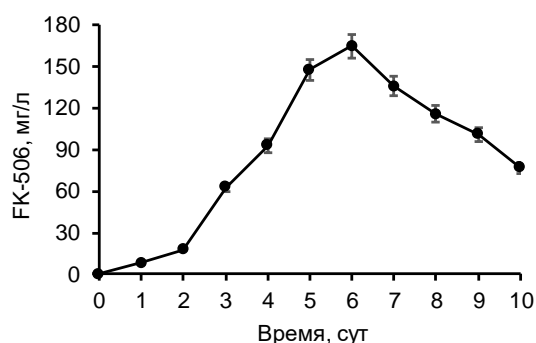
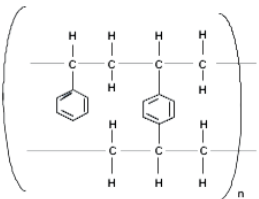
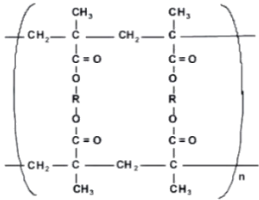
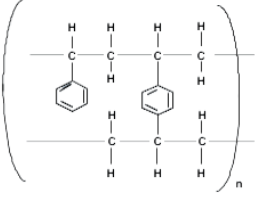
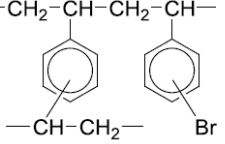
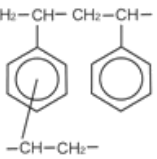


Рисунок 35 – Накопление такролимуса в среде при дробном добавлении раствора крахмала

#### 4.5.7.2 Добавление сорбентов

Другой способ устранения деструкции такролимуса был основан на применении сорбентов. В работе были использованы 7 сверхсшитых макропористых сорбентов: XAD-4, XAD-7HP, XAD-16, SP-207, HP-20, HP-21 и HP2MG (п. 3.4), отличающиеся химической структурой и размером пор, предназначенные для сорбции гидрофобных соединений (белков, антибиотиков, поллютантов, ароматических соединений и др.). Некоторые свойства указанных сорбентов представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Характеристики сорбентов, использованных для устранения деградации такролимуса

Сорбент	Матрица	Структурная формула	Размер пор, Å	Применение
XAD-4	Стирол, дивинилбензол		50	Небольшие гидрофобные соединения, сурфактанты, гербициды, пестициды
XAD-7 HP	Метилметакрилат-дивинилбензол		90	Соединения с мол. весом до 60000, белки, антибиотики
XAD-16	Стирол, дивинилбензол		100	Гидрофобные соединения, органические молекулы с мол. весом до 40000; белки, антибиотики, стероиды
SP-207	Полистирол с включением остатков брома в ароматические кольца		110	Высоко гидрофильные органические соединения
HP-20	Стирол, дивинилбензол		290	Полипептиды, белки, полифенолы

HP-21	Стирол, дивинилбензол		110	Полипептиды, белки, полифенолы
HP2MG	Метакриловый эфир		250	Сильно гидрофобные органические соединения и белки

Таблица 14 – Влияние концентрации сорбента на выход такролимуса (10 суток культивирования)

Концентрация, г/л Сорбент	FK-506, мг/л			
	XAD-4	XAD-7 HP	XAD-16	SP-207
20	135,2±9,1	172,8±10,5	147,8±10,3	172,1±8,8
40	225,3±11,3	276,4±13,6	242,3±9,9	273,3±12,5
60	233,8±10,9	279,8±13,2	240,5±12,2	274,5±10,0
Контроль (без сорбента)	53,1±2,7			

В результате предварительных экспериментов были отобраны следующие сорбенты: XAD-4, XAD-7 HP, XAD-16 и SP-207. Использование указанных сорбентов приводило к достижению выхода такролимуса в **среде V** выше 200 мг/л. Сорбенты типа XAD входят в группу неионных макропористых сорбентов, включающих два разных сополимера, характеризующихся значительным свободным пространством внутри гранул сополимера, не заполненного полимерной массой, и развитой внутренней удельной поверхностью (Лубенцова, 2016). Сорбент SP-207 синтезируется на основе полистирола с включением остатков брома в ароматические кольца (каталог «Mitsubishi chemical corporation», Япония). Данные сорбенты обладают сродством к гидрофобным соединениям, в т.ч. такролимусу.

Влияние указанной группы сорбентов изучали в ряду концентраций: 20, 40 и 60 г/л. Было показано, что они обеспечивают сорбцию такролимуса (а также его близкого аналога – аскомицина) с полным устранением его деструкции в концентрации 40 г/л (таблица 14).

В отсутствие сорбента после 7 суток биосинтеза наблюдали активную деструкцию такролимуса. Добавление сорбента XAD-4 нивелировало проблему деградации макролида, при этом его содержание увеличилось в 4,2 раза за 10 суток культивирования по сравнению с контролем (без сорбента) (рисунок 36).

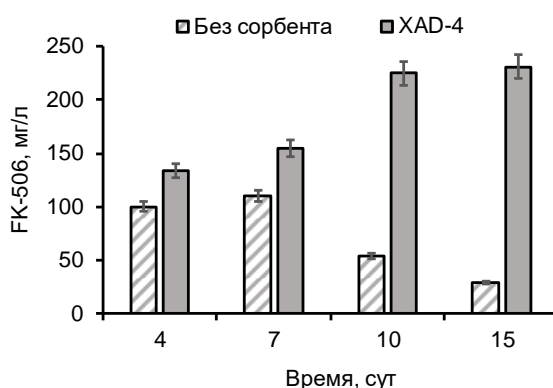


Рисунок 36 – Биосинтез такролимуса в присутствии сорбента XAD-4

В **среде VI** выход такролимуса более чем в 10 раз превышал его содержание в среде без сорбента и в 2,5 раза – в контроле с сорбентом XAD-4 (рисунок 37). Активное накопление макролида продолжалось в течение 10 суток. Выход такролимуса достигал 560 мг/л. Проведение процесса биосинтеза такролимуса в **среде VI** в присутствии сорбентов XAD-16 и XAD-7 HP позволило увеличить выход до 580-630 мг/л и 680-700 мг/л, соответственно; сорбент SP-207 увеличивал выход такролимуса до количеств, близких с таковыми для сорбента XAD-7 HP. Таким образом, суммарным итогом оптимизации продуктивной среды явилось увеличение выхода такролимуса с 53,1 до 690 мг/л (рисунок 37).

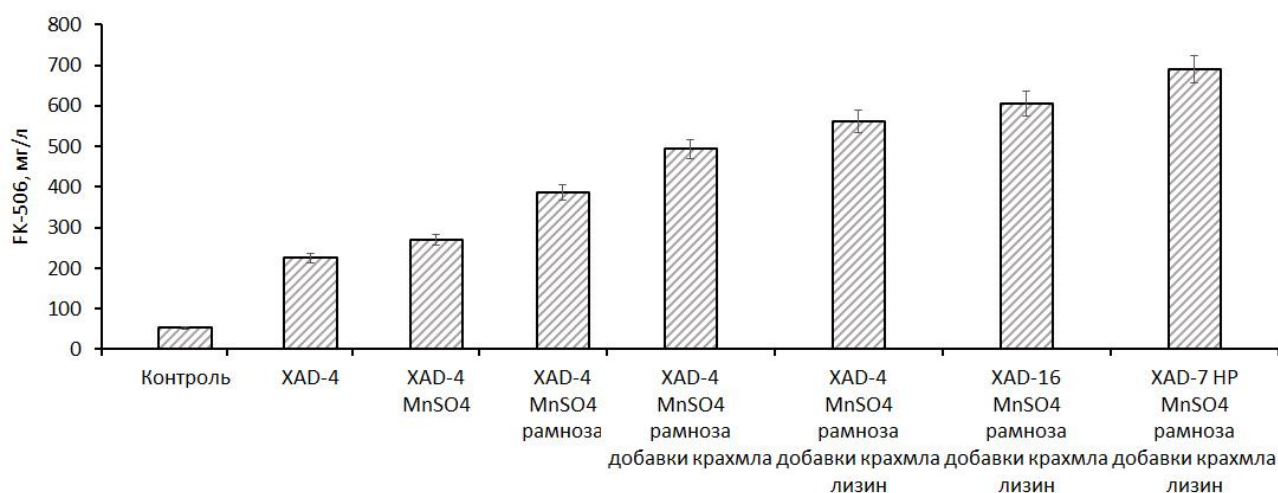


Рисунок 37 – Повышение выхода такролимуса в ходе оптимизации состава продуктивной среды

Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что 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 (при коэффициенте заполнения колбы средой 6,7%) в сложных питательных средах, содержащих растворимый крахмал, кукурузный экстракт, дрожжевые клетки, соли марганца, лизин и рамнозу, в режиме периодического культивирования с подпиткой. Повышению выхода такролимуса способствует ведение процесса в присутствии полимерных сорбентов XAD и SP, предотвращающих нежелательную деструкцию продукта. На рисунке 38 представлена кривая роста штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в оптимизированных условиях биосинтеза.

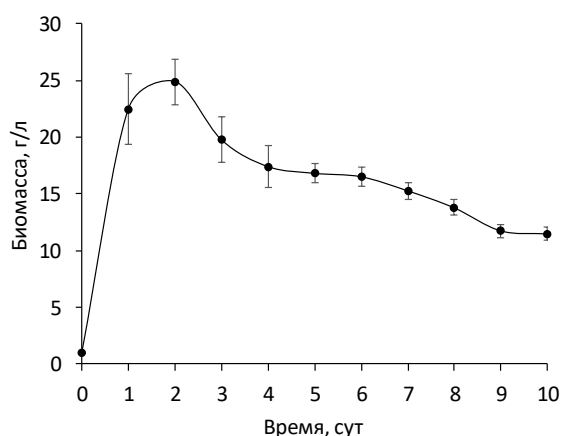


Рисунок 38 – Кривая роста штамма *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в динамике биосинтеза такролимуса в оптимизированных условиях

## 4.6 Разработка биотехнологического способа получения такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д

Изложенные выше результаты экспериментов по оптимизации состава среды и условий синтеза такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в колбах были использованы при масштабировании биопроцесса. Оптимизация процесса биосинтеза такролимуса в лабораторных биореакторах включала коррекцию состава среды, выбор режимов ферментации (рО<sub>2</sub>, рН, условия перемешивания). Была разработана схема выделения и очистки целевого продукта.

Как следует из результатов, приведенных в разделе 4.5, способ получения такролимуса в оптимизированных условиях культивирования с использованием штамма *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д позволяет достигать в колбах 700 мг/л целевого продукта (максимально – 980 мг/л).

Проведено масштабирование процесса биосинтеза такролимуса от уровня колб до лабораторных биореакторов (использовали биореактор АНКУМ-2М объемом 10 л). В процессе масштабирования столкнулись со сложностями, обусловленными высокой концентрированными растворами крахмала, применяемых в качестве добавок, при использовании стандартного ферментационного оборудования. При этом наблюдали снижение количеств синтезируемого такролимуса до 549,8 мг/л. С целью решения данных проблем была проведена дальнейшая оптимизация способа получения такролимуса. Разработанный микробиологический способ получения такролимуса защищен патентом РФ 2722699 (2020).

### 4.6.1 Оптимизация состава среды

Как показали предварительные результаты, использование вязких растворов крахмала в качестве добавок приводит к трудностям в работе с технологическим оборудованием.

Использование растворов декстринов, обладающих в сравнении с крахмалами более высокой текучестью, позволяет решить эту проблему.

Изучали влияние добавок мальтодекстрина, палевого и желтого декстрина на биосинтез такролимуса в среде **VI**, содержащей высокомолекулярный крахмал **K1**. Подпитку стерильными 9%-ми растворами соответствующих декстринов осуществляли до конечной концентрации 5,4 г/л ежедневно со 2-х по 7-е сутки культивирования. Было показано, что наиболее интенсивно биосинтез протекает в среде с добавками палевого декстрина. Содержание такролимуса в среде (без относительно дорогостоящей рамнозы) достигало 801,5±15,0 мг/л (рисунок 39).

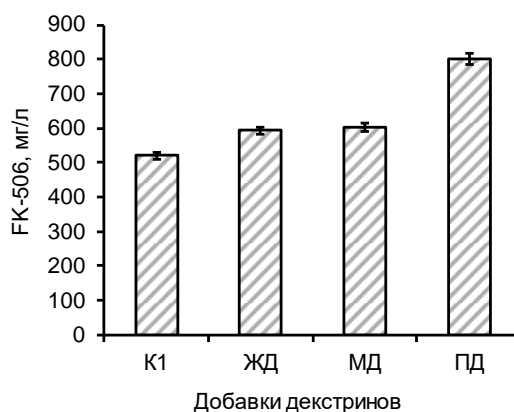


Рисунок 39 – Влияние подпитки растворами декстринов на биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в колбах: К1 – крахмал (контроль), ЖД – желтый декстрин, МД – мальтодекстрин, ПД – палевый декстрин

В экспериментах по проведению процесса биосинтеза такролимуса в ферментерах был использован сорбент SP-207. При одинаковой эффективности в отношении сорбции FK-506, сорбент SP-207, по сравнению с XAD-7 HP, характеризуется повышенной насыпной плотностью ~1,12 раза, что приводит к его более быстрому осаждению и, тем самым, значительно упрощает последующую процедуру его отделения от биомассы продуцента.

Используя в качестве основы полученные данные, была проведена оптимизация биосинтеза такролимуса в биореакторах.

#### 4.6.2 Оптимизация режима ферментации

Оптимизация режима ферментации включала оптимизацию концентрации растворенного кислорода, перемешивания, поддержания pH, скорости подачи воздуха. На начальных этапах (до 10-12 ч) с целью обеспечения максимальной сохранности мицелиальной структуры продуцента ферментацию осуществляли при 450 об/мин, концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне не менее 60%, путем подачи воздуха в биореактор. Далее постепенно увеличивали скорость перемешивания (до 1000 об/мин) и скорость подачи воздуха (от 1 до 10 л/мин). Уровень pH поддерживали в диапазоне 6,8-7,2. После снижения дыхательной активности культуры (после 48 ч) подачу воздуха постепенно снижали (от 10 до 2 л/мин); с 8 по 10 сутки снижали скорость вращения мешалки до 400-450 об/мин. В таблице 15 представлены результаты по выходу такролимуса в биореакторах, полученные с использованием описанного выше режима ферментации (обозначен как режим I).



Таблица 15 – Биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в ферментерах АНКУМ-2М в режиме культивирования I

	№ ферментации				
	1	2	3	4	5
FK-506, мг/л	608,6	633,2	636,4	595,0	626,4
Среднее значение, мг/л	620,0±17,6				

Используя полученные результаты, процесс оптимизировали и режим ферментации упростили для его последующей реализации в аппаратах большего объема: скорость перемешивания – 600 об/мин первые 12 ч, 800 об/мин в промежутке 12-24 ч, 1000 об/мин после 24 ч и до окончания биосинтеза; аэрация – 6 л/мин первые 12 ч, 8 л/мин после 12 ч и до окончания биосинтеза; длительность биосинтеза – 10 суток; при этом концентрация растворенного кислорода составляла около 60% в течение 48 ч, с последующим снижением до 30% и ниже. В таблице 16 представлены результаты по содержанию такролимуса в ферментерах, полученные с использованием описанного выше режима культивирования (обозначен как режим II).

Таблица 16 – Биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д в ферментерах АНКУМ-2М в режиме культивирования II

	№ 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				

Процесс биосинтеза в описанном режиме (II) представлен на рисунке 40.

Морфологические изменения в структуре клеток *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и компонента питательной среды – инактивированных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в динамике биосинтеза такролимуса показаны на рисунке 41.

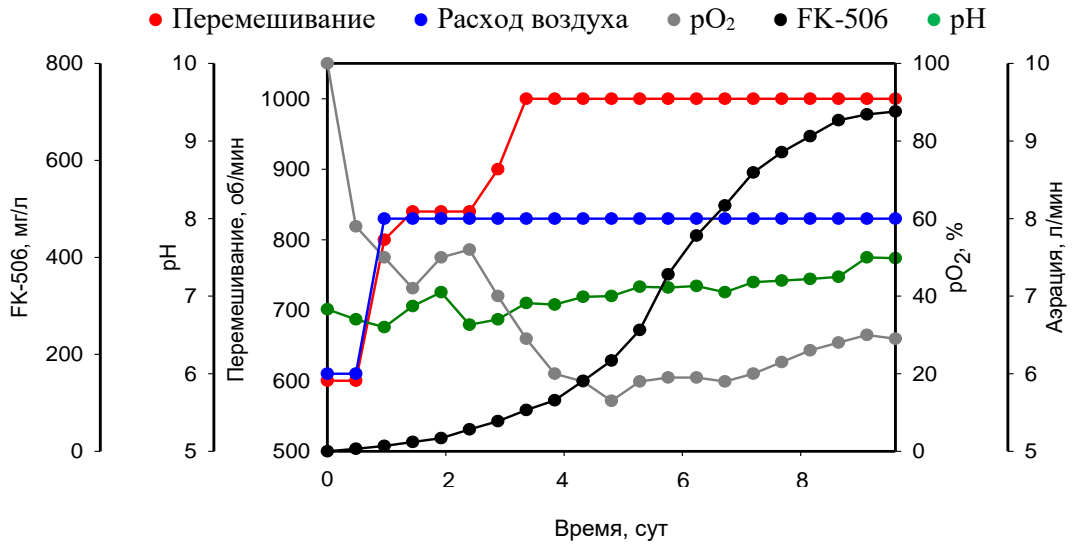


Рисунок 40 – Биосинтез такролимуса *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д  
в 10 л ферментере АНКУМ-2М

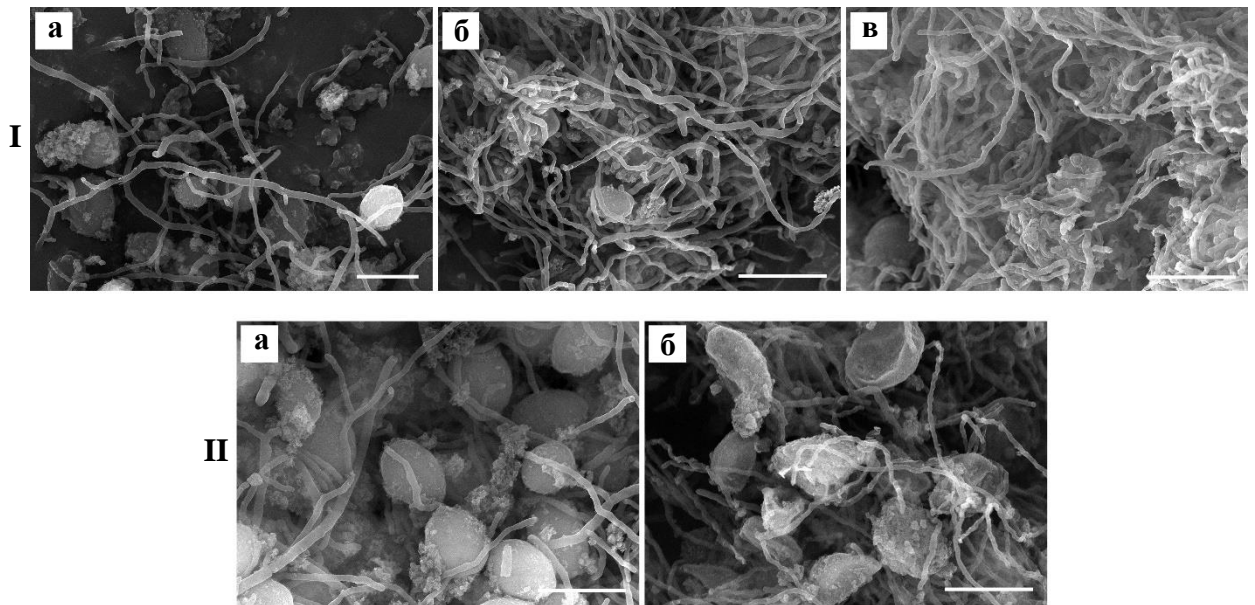


Рисунок 41 – (I) Морфологические изменения в мицелии *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д при биосинтезе такролимуса в режиме периодического культивирования с подпиткой: а – 1 сутки (гифы с ровным профилем контура без значимых признаков деструкции), б – 6 суток (смена гидами цилиндрической конфигурации на извилистую, утрата четкости их границ и плотности цитоплазмы, пустые оболочки гиф); в – 10 суток (искривление профиля гиф, утрата жизнеспособности большей части мицелия). (II) Деструкция клеток дрожжей при биосинтезе такролимуса культурой *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д: а – 1 сутки, б – 10 суток (сканирующая электронная микроскопия, длина масштабной линейки – 5 мкм)

Полученные результаты по достигаемому выходу такролимуса на микробиологической стадии являются сопоставимыми с российским аналогом и превышают некоторые известные мировые аналоги (таблица 17).

Таблица 17 – Сравнение достигнутого титра такролимуса на микробиологической стадии с известными мировыми аналогами

Штамм	Такролимус,	Ссылка
<i>S. clavuligerus</i> CKD1119	350	Kang <i>et al.</i> , 2005
<i>S. tacrolimicus</i> ATCC 55098	330	Vaid & Narula, 2006
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	310	Kumar <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces</i> sp. 4908CGMCCNo.1288	385	Zhu & Mo, 2016
<i>S. tsukubaensis</i> T 44-7	750	Глаголев <i>с соавт.</i> , 2017
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	324	Wen <i>et al.</i> , 2018
<i>S. tsukubaensis</i> CGMCC No. 0083	1082,81	Hu <i>et al.</i> , 2018
<i>S. tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д	<b>701,1±51,6</b>	<b>Данная работа</b>

#### 4.6.3 Выделение и очистка такролимуса

Как было указано ранее, процесс биосинтеза такролимуса сопровождается нежелательным образованием его близких структурных аналогов, в связи с чем актуальной проблемой являлись выделение и очистка такролимуса до показателей, соответствующих требованиям действующей фармакопеи.

Нами был разработан новый метод выделения и очистки такролимуса, включающий оптимизацию всех стадий процесса. Нижеописанный метод защищен патентом РФ 2694354 (2019).

Эта часть работы была выполнена в сотрудничестве с коллективом Кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством д.х.н. С.М. Староверова.

##### 4.6.3.1 Экстракция такролимуса из культуральной жидкости

Первый этап очистки представляет собой экстракцию такролимуса и его аналогов из культуральной среды органическими растворителями с последующей сорбцией целевого вещества на неионогенном сорбенте (Cabri *et al.*, 2006; Cvak *et al.*, 2006; Keri *et al.*, 2006).

В данной работе для биосинтеза такролимуса использовали среду, содержащую гидрофобный полимерный сорбент SP-207 в концентрации 40 г/л, в связи с чем сорбция целевого вещества происходит во время культивирования. Это позволило упростить процесс извлечения такролимуса из среды по завершении биосинтеза.

Сорбент SP-207 может быть возвращен в цикл в результате регенерации. Установлено, что потери такролимуса при использовании сорбента, прошедшего 3 цикла регенерации, составляют не более 1%.

#### 4.6.3.2 Первичная очистка такролимуса

На второй стадии происходит удаление балластных компонентов, в частности, сильно окрашенных соединений. Как правило, данный этап выполняют в режиме нормально-фазовой жидкостной хроматографии (НФ ЖХ) на сорбентах на основе силикагеля или оксида алюминия с использованием в качестве подвижной фазы смеси гексан/этилацетат или гексан/ацетон (Cabri *et al.*, 2006; Cvak *et al.*, 2006; 2007; Keri *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2009). Однако для данных сорбентов показана невозможность регенерации и, как следствие, повторного использования.

В настоящей работе предварительную очистку такролимуса проводили на регенерируемых сорбентах на основе полиметилметакрилата (HP2MG) и модифицированного диольной фазой кремнезема (Диасорб-100-Диол). Данные сорбенты были выбраны исходя из их близкого к силикагелю и оксиду алюминия сорбционно-хроматографического поведения.

Были оптимизированы концентрации и объемы промывочного и элюирующего растворов изооктан/ацетон для сорбентов HP2MG и Диасорб-100-Диол. Предложена следующая схема предварительной очистки: такролимус в толуоле наносили на сорбент, затем последовательно промывали изооктаном (2 объема колонки), 10 % об. ацетоном в изооктане (2 объема колонки) и элюировали 30 % об. ацетоном в изооктане (2 объема колонки). Нагрузка по такролимусу для обоих сорбентов составляла 5 мг/мл. Выход целевого продукта составил 80 и 85% для сорбентов Диасорб-100-Диол и HP2MG, соответственно.

Для последующей работы был выбран сорбент HP2MG.

#### 4.6.3.3 Финишная очистка такролимуса

Третий этап необходим для отделения близкородственных аналогов такролимуса, основными из которых являются аскомицин и дигидротакролимус. Данная стадия является ключевой, так как ее производительность и затраты на очистку единицы продукции вносят

наибольший вклад в эффективность всей схемы выделения и получения конечного продукта. Как правило, разделение близкородственных примесей реализуется в режиме НФ ВЭЖХ с использованием силикагелей, импрегнированных ионами серебра (Cabri *et al.*, 2006; Keri *et al.*, 2006; Cvak *et al.*, 2006; 2007; Kumar & Mitra, 2007), либо ионов серебра, которые добавляются непосредственно в элюент (Cabri *et al.*, 2006). Данный вариант очистки является наиболее эффективным с точки зрения селективности и обеспечивает большую нагрузку и выход целевого компонента. Однако такие сорбенты имеют существенный недостаток – смывание серебра в процессе проведения разделения, что приводит к потере сорбентом сорбционно-хроматографических свойств (Cvak *et al.*, 2007; Kumar & Mitra, 2007).

В работе были использованы сульфокатиониты на основе полиметилметакрилата (Relisorb SP 400/SS, Диасфер-АК-СП-100), стирола-дивинилбензола (DOWEX 50WX8) и силикагеля (Диасорб-60-СП, Диасорб-100-Сульфо). Результаты препаративного разделения такролимуса и его аналогов на указанных сорбентах представлены на рисунке 42.

Наиболее высокую селективность в разделение такролимуса и его аналогов показали сорбенты Диасорб-60-СП (рисунок 42г, д) и Диасорб-100-Сульфо (рисунок 42е).

Для сорбента Диасорб-100-Сульфо высокая селективность была достигнута при использовании в качестве элюента ацетона. При нагрузке 8 мг/мл и скорости потока 2,35 объема колонки в 1 ч выход целевого вещества составил 70%, степень очистки продукта – 96,7%, производительность – 2,95 мг такролимуса/(мл сорбента × ч) (рисунок 42е).

Для сорбента Диасорб-60-СП выявлены следующие оптимальные условия разделения такролимуса от примесей. При использовании в качестве элюента 100% ацетона (нагрузка 10,5 мг/мл, поток 3,5 объема колонки в час) в двух объемах колонки элюировались только аналоги такролимуса. Для элюирования такролимуса необходима добавка ацетонитрила в ацетон (не менее 5 % об.). При 30 % об. ацетонитрила такролимус элюировался в следующих двух объемах колонки (рисунок 42г). Таким образом, отделение такролимуса от аналогов можно провести даже в сорбционном режиме. Производительность данного метода составила 8,35 мг такролимуса/(мл сорбента × ч), что в 28 раз эффективнее процесса разделения на цианосеребряных сорбентах (Cvak *et al.*, 2007), которые считаются наиболее эффективными из импрегнированных сорбентов.

Процесс очистки такролимуса на сорбенте Диасорб-60-СП реализован также и в режиме проточной хроматографии (рисунок 42д). При изократическом элюировании в системе 5 % об. ацетонитрила в ацетоне, нагрузке 8,8 мг/мл и скорости потока 2,55 объема колонки в 1 ч выход целевого вещества составил 80%. Производительность метода составила 7,04 мг такролимуса/(мл сорбента × ч), чистота целевой фракции – 96,2% (сумма площадей пиков такролимуса, С19-эпимера такролимуса и такролимуса-открытое кольцо).

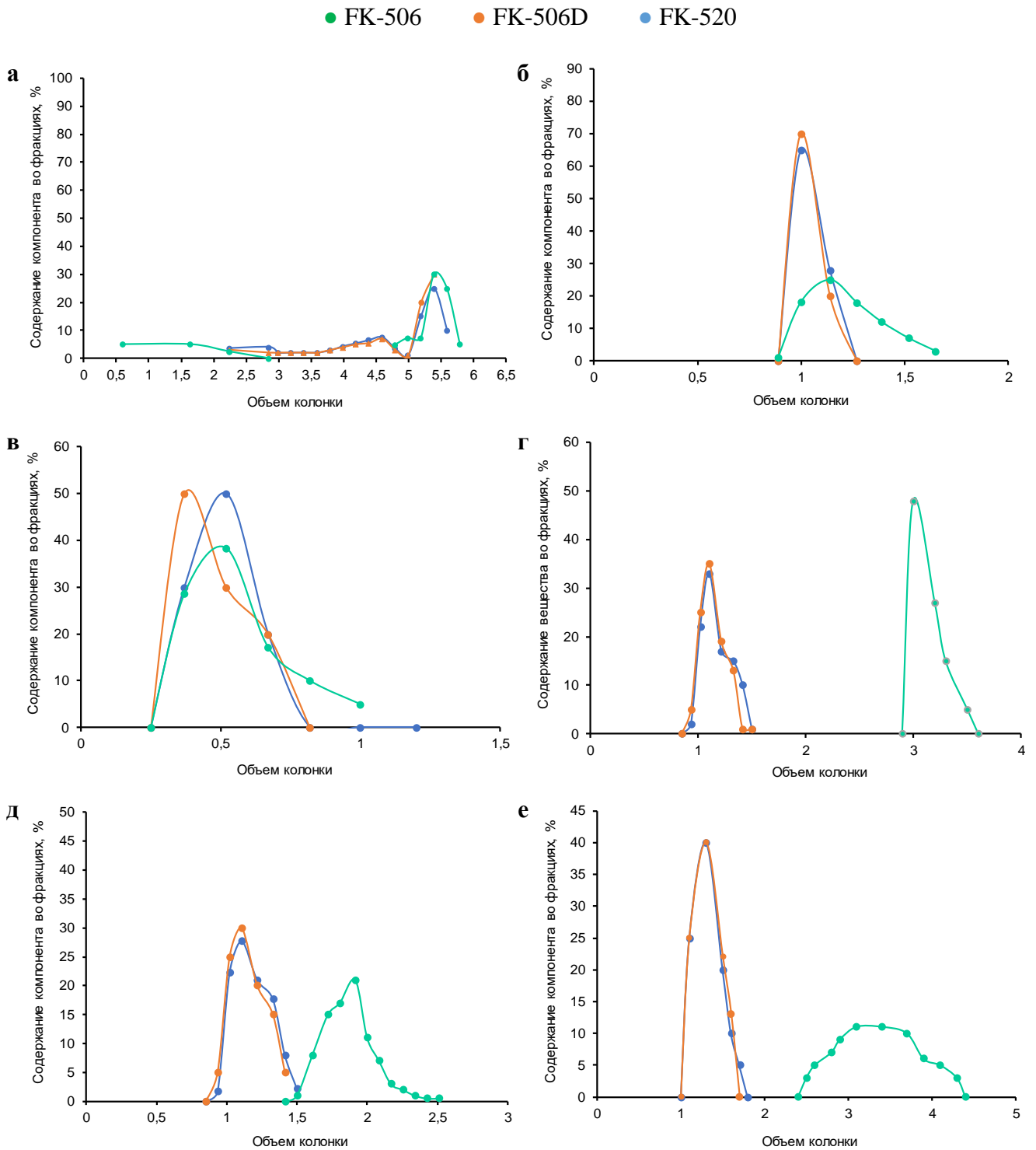


Рисунок 42 – Хроматограммы препаративного разделения такролимуса и его аналогов на сорбентах Relisorb SP 400/SS (а), Диасфер АК-СП-100 (б), DOWEX 50 WX8 (в), Диасорб-60-СП (г), Диасорб-60-СП в хроматографическом режиме (д), Диасорб-100-Сульфо (е); FK-506 – такролимус, FK-506D – дигидротакролимус, FK-520 – аскомицин

Таким образом, при разделении такролимуса и его аналогов сорбенты Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо проявляли одинаково высокую селективность по отношению к такро-

лимусу, несмотря на различия в химическом строении лиганда. Меньшая эффективность процесса разделения на сорбенте Диасорб-100-Сульфо, по сравнению с сорбентом Диасорб-60-СП, предположительно, объясняется большим размером частиц данного сорбента (63-200 и 50-70 мкм, соответственно). Однако только для сорбента с сульфопропильными группами была обнаружена уникальная селективность к такролимусу в чистом ацетоне, что позволяет отделять его от аналогов в сорбционном режиме.

#### 4.6.3.4 Получение такролимуса фармакопейного качества

Четвертой, завершающей стадией очистки такролимуса, является его кристаллизация из водно-органических смесей, что приводит к получению целевого продукта в правильной конформации.

После кристаллизации такролимус соответствовал требованиям фармакопеи по хроматографической чистоте продукта – 99,3% (таблица 18, рисунок 43).

Таблица 18 – Качественный и количественный состав кристаллов такролимуса

Компонент	Содержание, %	Критерий приемлемости (ИФР)
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

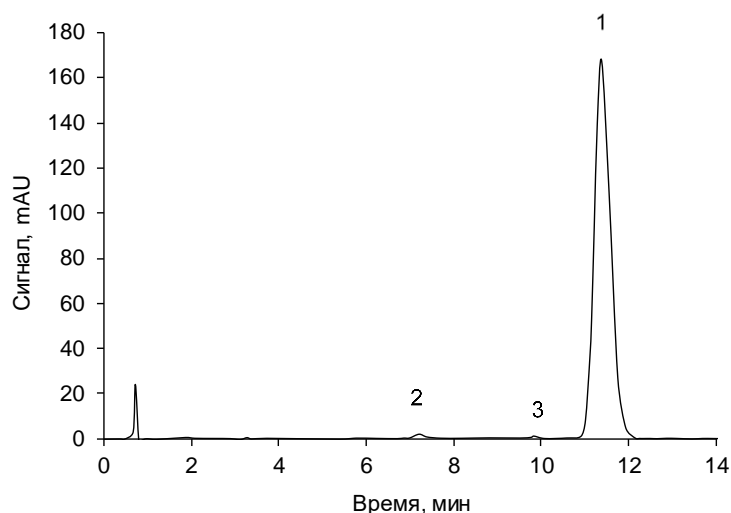


Рисунок 43 – ВЭЖХ-профиль кристаллов такролимуса: 1 – такролимус, 2 – C19-эпимер такролимуса, 3 – аскомицин

Суммарный выход очищенного кристаллического продукта составил более 50%, что превышает известные мировые аналоги в 1,7-2,5 раза.

Таким образом, разработана схема выделения и очистки такролимуса со значительно возросшей производительностью на ключевой стадии процесса при соблюдении требований по чистоте, предъявляемых к субстанции такролимуса. Использование бромированного стирол-дивинилбензольного сорбента SP-207 с повышенной плотностью на стадии биосинтеза позволило упростить стадию выделения такролимуса из культуральной среды и перевести ее в технологический режим за счет возможности многократной регенерации сорбента и возврата его в производственный цикл. На стадии первичной очистки показана возможность использования регенерируемых сорбентов на основе метилметакрилата (HP2MG) и химически модифицированного силикагеля. Применение на стадии финишной очистки сорбентов с силикагелевой матрицей с привитыми сульфопропильными группами, модифицированными ионами серебра – Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо, приводит к достижению высокой селективности и производительности процесса.

Таким образом, разработана технология полного цикла производства такролимуса с использованием культуры *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д. На этапе микробиологического синтеза достигается титр такролимуса  $701 \pm 52$  мг/л с использованием типового ферментационного оборудования (RU 2722699, 2020). Помимо этого, технология предусматривает многократное повторное использование сорбентов как на микробиологическом этапе, так и на стадии химической очистки (замкнутый цикл). В результате использования сорбентов с уникальными свойствами (RU 2694354, 2019) на стадии химической очистки достига-



ется высокий выход (50%) такролимуса фармакопейной чистоты (99,8%). Созданная технология полного цикла получения такролимуса является конкурентоспособной и может быть использована для организации производства фармацевтической субстанции такролимуса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований охарактеризованы два новых такролимус-продуцирующих штамма – *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и *Streptomyces tsukubensis* Т60. Штамм *S. tsukubensis* 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  $-70^{\circ}\text{C}$ .

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, содержащиеся 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 высокопотребованной 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 поликетерида 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 СОКРАЩЕНИЙ**

АГЕ – ангидроглюкозная единица

АПБ – ацил-переносающий белок

АТФ – аденозинтрифосфат

ВКМ – Всероссийская Коллекция Микроорганизмов

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография (НФ ВЭЖХ – нормально-фазовая ВЭЖХ)

Да – дальтон

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КоА – коэнзим А

КОЕ – колониеобразующие единицы

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПГК – программированная гибель клеток

п.н. – пары нуклеотидов (т.п.н. – тысяча п.н.; м.п.н. – миллион п.н.)

ПФП – пентозофосфатный путь

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РВ – редуцирующие вещества

РНК – рибонуклеиновая кислота (мРНК – матричная РНК; нкРНК – некодирующая РНК; рРНК – рибосомальная РНК)

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолет

ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ANI – average nucleotide identity (средняя идентичность нуклеотидов)

dDDH – digital DNA-DNA hybridization (цифровая ДНК-ДНК гибридизация)

DFBA – dynamic flux balance analysis (динамический анализ баланса потоков)

DHCHC – (4R,5R)-4,5-дигидроксициклогекс-1-енкарбоновая кислота

FDA – US Food and Drug Administration

FK-506, FR900506 – такролимус

FK-506D – дигидротакролимус

FK-520 – аскомицин

FKBP12 – FK506 binding protein (FK-506 связывающий белок)  
GSMM – genome-scale metabolic model  
HTH – Helix-Turn-Helix  
ISP – International *Streptomyces* Project  
LAL – Large ATP binding regulators of the LuxR family  
LTTR – LysR-type transcriptional regulator  
MI – первичный мицелий  
MII – вторичный мицелий  
NRPS – нерибосомальная пептид-синтетаза  
ORF – рамка считывания  
PGAAP – Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline  
PKS – поликетидсинтаза  
PTs – терминальные белки  
SDS – додецилсульфат натрия  
SSC – цитратно-натриевый буфер  
STE – NaCl-Tris-этилендиаминтетрауксусная кислота  
TE – Tris-этилендиаминтетрауксусная кислота

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глаголев В.И., Джавахия В.В., Попова Е.Д., Воинова Т.М. Разработка высокопродуктивного штамма продуцента иммуносупрессанта такролимус и оптимизация ферментационной среды его культивирования // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. – № 11 (65). – Ч. 3. – С. 64-70.
2. Дроздов Н.С., Матеранская Н.П. Практикум по биологической химии. – М.: Высшая школа, 1970. – 256 с.
3. Евтушенко Л.И., Зеленкова Н.Ф. Таксономическое положение *Proactinomyces farineus* // Микробиология. – 1989. – Т. 58. – С. 498-500.
4. Закирова А.Ш., Ягофаров Д.Ш., Канарский А.В., Сидоров Ю.Д. Сравнительная оценка эффективности разделения картофельного крахмала на амилозу и амилопектин химическими методами // Вестник Казанского технологического университета. – 2010. – № 9. – С. 621-625.
5. Лубенцова К.И. Получение и исследование физико-химических свойств композитных сорбентов на основе полистирольных матриц с нанодисперсными оксидами железа. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. Москва, 2016.
6. Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум Ф. Избранные методы исследования крахмала. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 180 с.
7. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. М.: Агропромиздат, 1990. – С. 103-116.
8. Унрод В.И., Солодовник Т.В. Хитин- и хитозансодержащие комплексы из мицелиальных грибов: получение, свойства, применение // Biopolymers and Cell. – 2001. – Т. 17. – № 6. – С. 526-533.
9. Яковишин Л.А. Избранные главы биоорганической химии. – Севастополь: Стрижак-пресс, 2006. – 196 с.
10. Akimoto K., Kusunoki Y., Nishio S., Takagi K., Kawai S. Safety profile of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis // Clinical Rheumatology. – 2008. – V. 27. – № 11. – P. 1393-1397.
11. Albrecht A., Ottow J.C.G., Benckiser G. Incomplete Denitrification (NO and N<sub>2</sub>O) from Nitrate by *Streptomyces violaceoruber* and *S. nitrosporeus* Revealed by Acetylene Inhibition and 15N Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry Analyses // Die Naturwissenschaften. – 1997. – V. 84. – № 4. – P. 145-147.
12. Álvarez-Álvarez R., Rodríguez-García A., Martínez-Burgo Y., Robles-Reglero V., Santamarta I., Pérez-Redondo R., Martín J.F., Liras P. A 18-Mb-reduced *Streptomyces clavuligerus* ge-

- nome: relevance for secondary metabolism and differentiation // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – V. 98. – № 5. – P. 2183-2195.
13. Andexer J.N., Kendrew S.G., Nur-e-Alam M., Lazos O., Foster T.A., Zimmermann A.S., Warneck T.D., Suthar D., Coates N.J., Koehn F.E., Skotnicki J.S., Carter G.T., Gregory M.A., Martin C.J., Moss S.J., Leadlay P.F., Wilkinson B. Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520, and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – V. 108. – № 12. – P. 4776-4781.
  14. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. – 2010. Available: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
  15. Arai T., Kouama Y., Suenaga T., Honda H. Ascomycin, an antifungal antibiotic // Journal of Antibiotics (Tokyo). – 1962. – V. 15. – P. 231-232.
  16. Arndt C., Cruz M.C., Cardenas M.E., Heitman J. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans* // Microbiology. – 1999. – V. 145 – № 8. – P. 1989-2000.
  17. Babu A.G., Kim S.W., Adhikari M., Yadav D.R., Um Y.H., Kim C, Lee H.B., Lee Y.S. A new record of *Gongronella butleri* isolated in Korea // Mycobiology. – 2015. – V. 43. – № 2. – P. 166-169.
  18. Badawy M.E.I., Rabea E.I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection // Journal of Carbohydrate Chemistry. – 2011. – V. 2011. – P. 29.
  19. Bader F. Physiology and Fermentation Development. In: The Bacteria: A Treatise on Structure and Function. Academic Press, London, 1986.
  20. Ban Y.H., Park S.R., Yoon Y.J. The biosynthetic pathway of FK506 and its engineering: From past achievements to future prospects // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 43. – № 2-3. – P. 389-400.
  21. Ban Y.H., Shinde P.B., Hwang J.Y., Song M.C., Kim D.H., Lim S.K., Sohng J.K., Yoon Y.J. Characterization of FK506 biosynthetic intermediates involved in post-PKS elaboration // Journal of Natural Products. – 2013. – V. 76. – № 6. – P. 1091-1098.
  22. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // Journal of Computational Biology. – 2012. – V. 19. – № 5. – P. 455-477.

23. Bao K., Cohen S.N. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces* // *Genes and Development*. – 2001. – V. 15. – № 12. – P. 1518-1527.
24. Barot R.K., Shitole S.C., Bhagat N., Patil D., Sawant P., Patil K. Therapeutic effect of 0.1% Tacrolimus Eye Ointment in Allergic Ocular Diseases // *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. – 2016. – V. 10. – № 6. – NC05-NC09.
25. Barreiro C., Martínez-Castro M. Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506) // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 98. – № 2. – P. 497-507.
26. Barreiro C., Prieto C., Sola-Landa A., Solera E., Martínez-Castro M., Pérez-Redondo R., García-Estrada C., Aparicio J.F., Fernández-Martínez L.T., Santos-Aberturas J., Salehi-Najafabadi Z., Rodríguez-García A., Tauch A., Martín J.F. Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506) // *Journal of Bacteriology*. – 2012. – V. 194. – № 14. – P. 3756-3757.
27. Bauer J.S., Fillinger S., Förstner K., Herbig A., Jones A.C., Flinspach K., Sharma C., Gross H., Nieselt, K., Apel A.K. dRNA-seq transcriptional profiling of the FK506 biosynthetic gene cluster in *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 and general analysis of the transcriptome // *RNA Biology*. – 2017. – V. 14. – № 11. – P. 1617-1626.
28. Benson A., Barrett T., Sparberg M., Buchman A.L. Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience // *Inflammatory Bowel Disease*. – 2008. – V. 14. – № 1. – P. 7-12.
29. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeño-Tárraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.A., Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J., Hopwood D.A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Nature*. – 2002. – V. 417. – № 6885. – P. 141-147.
30. Bentley R., Meganathan R. Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in streptomycetes. Evidence for an isoprenoid pathway and its absence in non-differentiating isolates // *FEBS Letters*. – 1981. – V. 125. – № 2. – P. 220-222.
31. Bérday J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading // *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. – 2012. – V. 65. – № 8. – P. 385-395.
32. Berger L.R., Reynolds D.M. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus* // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1958. – V. 29. – № 3. – P. 522-534.



33. Berry D. The Environmental Control of the Physiology of Filamentous Fungi. In: The Filamentous Fungi, Volume 1: Industrial Mycology. Edward Arnold, London, 1975.
34. Bibb M.J. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* // Current Opinion in Microbiology. – 2005. – V. 8. – №2. – P. 208-215.
35. Bignell D.R., Huguet-Tapia J.C., Joshi M.V., Pettis G.S., Loria R. What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2010. – V. 98. – № 2. – P. 179-194.
36. Brautaset T., Sekurova O.N., Sletta H., Ellingsen T.E., Strøm A.R., Valla S., Zotchev S.B. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: Analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway // Chemistry and Biology. – 2000. – V. 7. – № 6. – P. 395-403.
37. Briggs C.J., Ott D.E., Coren L.V., Oroszlan S., Tözsér J. Comparison of the effect of FK506 and cyclosporine A on virus production in H9 cells chronically and newly infected by HIV-1 // Archives of Virology. – 1999. – V. 144. – № 11. – P. 2151-2160.
38. Bucs J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures // Biochemical Engineering Journal. – 2001. – V. 7. – № 2. – P. 91-98.
39. Butler M., Bruheim P., Jovetic S., Marinelli F., Postma P., Bibb, M. Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans* // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – V. 68. – № 10. – P. 4731-4739.
40. Byrne K., Shafiee A., Nielsen J., Arison B., Monaghan R., Kaplan L. The biosynthesis and enzymology of an immunosuppressant, immunomycin, produced by *Streptomyces hygroscopicus* var. *asco myceticus* // Developments in Industrial Microbiology. – 1993. – V. 32. – P. 29-45.
41. Cabri W., Morra L., Paisonni P., Roletto J. Process for the purification of tacrolimus. Patent application WO 2006/048145 A1, 2006.
42. Carmody M., Byrne B., Murphy B., Breen C., Lynch S., Flood E., Finnan S., Caffrey P. Analysis and manipulation of amphotericin biosynthetic genes by means of modified phage KC515 transduction techniques // Gene. – 2004. – V. 343. – № 1. – P. 107-115.
43. Carroll B.J., Moss S.J., Bai L., Kato Y., Toelzer S., Yu T.-W., Floss H.G. Identification of a set of genes involved in the formation of the substrate for the incorporation of the unusual “glycolate” chain extension unit in ansamitocin biosynthesis // Journal of the American Chemical Society. – 2002. – V. 124. – № 16. – P. 4176-4177.
44. Chao Y.P., Xie F.H., Yang J., Lu J.H., Qian S.J. Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation // Journal of Environmental Sciences (China). – 2007. – V. 19. – № 9. – P. 1125-1128.

45. Chater K.F. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics // *Philosophical Transactions of the Royal Society*. – 2006. – V. 361. – № 1469. – P. 761-768.
46. Chater K.F., Biró S., Lee K.J., Palmer T., Schrepf H. The complex extracellular biology of *Streptomyces* // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2010. – V. 34. – № 2. – P. 171-198.
47. Chaudhary A.K., Dhakal D., Sohng J.K. An insight into the “-omics” based engineering of streptomycetes for secondary metabolite overproduction // *BioMed Research International*. – 2013. – V. 2013. – P. 15.
48. Chen C.Y., Chung Y.C. Antibacterial effect of water-soluble chitosan on representative dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli brevis* // *Journal of Applied Oral Science*. – 2012. – V. 20. – № 6. – P. 620-627.
49. Chen W., He F., Zhang X., Chen Z., Wen Y., Li J. Chromosomal instability in *Streptomyces avermitilis*: major deletion in the central region and stable circularized chromosome // *BMC Microbiology*. – 2010. – V. 10. – P. 198.
50. Chen S., Huang X., Zhou X., Bai L., He J., Jeong K.J., Lee S.Y., Deng Z. Organizational and Mutational Analysis of a Complete FR-008/Candicidin Gene Cluster Encoding a Structurally Related Polyene Complex // *Chemistry and Biology*. – 2003. – V. 10. – № 11. – P. 1065-1076.
51. Chen G., Wang G.Y., Li X., Waters B., Davies J. Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide // *Journal of Antibiotics*. – 2000. – V. 53. – № 10. – P. 1145-1153.
52. Chen D., Zhang L., Pang B., Chen J., Xu Z., Abe I., Liu W. FK506 maturation involves a cytochrome p450 protein-catalyzed four-electron C-9 oxidation in parallel with a C-31 o-methylation // *Journal of Bacteriology*. – 2013. – V. 195. – № 9. – P. 1931-1939.
53. Chen D., Zhang Q., Zhang Q., Cen P., Xu Z., Liu W. Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 78. – № 15. – P. 5093-5103.
54. Choi B., Ham Y., Yu S., Jeong K., Kim B. Method for refining of high purity of tacrolimus. Patent application WO 2009/116729 A2, 2009.
55. Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – V. 68. – № 1. – P. 461-466.
56. Cohen S.N. DNA cloning: A personal view after 40 years // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – V. 110. – № 39. – P. 15521-15529.

57. Collins M.D., Jones D. The distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication // *Microbiological Reviews*. – 1981. – V. 45. – № 2. – P. 316-354.
58. Crawford D.L., McCoy E. Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermotacticus* // *Applied Microbiology*. – 1972. – V. 24. – № 1. – P. 150-152.
59. Cross T. Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats // *Journal of Applied Microbiology*. – 1981. – V. 50. – № 3. – P. 397-423.
60. Cruz H., Pérez C., Wellington E., Castro C., Servín-González L. Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family // *Gene*. – 1994. – V. 144. – № 1. – P. 141-142.
61. Cvak L., Buchta M., Jegorov A., Blatny P., Keri V., Csorvasi A., Simon A., Mako G. Process for purifying tacrolimus. Patent application WO 2007/106587 A2, 2007.
62. Cvak, L., Jegorov A., Buchta M., Blantny P., Satke J. Process for isolation of crystalline tacrolimus. Patent application WO 2006/031664 A1, 2006.
63. Daza A., Martín J.F., Dominguez A., Gil J.A. Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift // *Journal of General Microbiology*. – 1989. – V. 135. – № 9. – P. 2483-2491.
64. Dittrich W., Betzler M., Schrempf H. An amplifiable and deletable chloramphenicol-resistance determinant of *Streptomyces lividans* 1326 encodes a putative transmembrane protein // *Molecular Microbiology*. – 1991. – V. 15. – № 11. – P. 2789-2797.
65. Du W., Huang D., Xia M., Wen J., Huang M. Improved FK506 production by the precursors and product-tolerant mutant of *Streptomyces tsukubaensis* based on genome shuffling and dynamic fed-batch strategies // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – V. 41. – № 7. – P. 1131-1143.
66. Dumont F., Garrity G.M., Fernandez I.M., Matas T.D. Process for producing FK-506. US Patent 5,116,756, 1992.
67. Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Böttger E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA // *Nucleic Acids Research*. – 1989. – V. 17. – № 19. – P. 7843-7853.
68. Elibol M. Response surface methodological approach for inclusion of perfluorocarbon in actinorhodin fermentation medium // *Process Biochemistry*. – 2002. – V. 38. – № 5. – P. 667-673.
69. Ellaiah P., Srinivasulu B., Adinarayana K. Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinensis* in solid state fermentation // *Process Biochemistry*. – 2004. – V. 39. – № 5. – P. 529-534.

70. Ensign J.C. Formation, properties, and germination of actinomycete spores // *Annual Review of Microbiology*. – 1978. – V. 32. – P. 185-219.
71. Evtushenko L.I., Tapytkova S.D., Akimov V.N., Dobritsa S.V. A new species of actinomycete, *Amycolata alni* // *International journal of systematic bacteriology*. – 1989. – V. 39. – № 1. – P. 72-77.
72. Felsenstein J. Phylogenies and the Comparative Method // *The American Naturalist*. – 1985. – V. 125. – № 1. – P. 1-15.
73. Ferdows M.S., Barbour A.G. Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1989. – V. 86. – № 15. – P. 5969-5973.
74. Flärdh K., Buttner M.J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium // *Nature Reviews Microbiology*. – 2009. – V. 7. – № 1. – P. 36-49.
75. Foor F., Parent S.A., Morin N., Dahl A.M., Ramadan N., Chrebet G., Bostian K.A., Nielsen J.B. Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast // *Nature*. – 1992. – V. 360. – № 6405. – P. 682-684.
76. Fu L.F., Tao Y., Jin M.Y., Jiang H. Improvement of FK506 production by synthetic biology approaches // *Biotechnology Letters*. – 2016. – V. 38. – № 12. – P. 2015-2021.
77. Gajzlerska W., Kurkowiak J., Turlo J. Use of three-carbon chain compounds as biosynthesis precursors to enhance tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* // *New Biotechnology*. – 2015. – V. 32. – № 1. – P. 32-39.
78. Gatto G.J., Jr., Boyne M.T., 2nd, Kelleher N.L., Walsh C.T. Biosynthesis of pipercolic acid by RapL, a lysine cyclodeaminase encoded in the rapamycin gene cluster // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – V. 128. – № 11. – P. 3838-3847.
79. Gatto G.J., Jr., McLoughlin S.M., Kelleher N.L., Walsh C.T. Elucidating the substrate specificity and condensation domain activity of FkbP, the FK520 pipercolate-incorporating enzyme // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44. – № 16. – P. 5993-6002.
80. Gerber N.N., Lechevalier H.A. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes // *Applied Microbiology*. – 1965. – V. 13. – № 6. – P. 935-938.
81. Glazebrook M.A., Doull J.L., Stuttard C., Vining L.C. Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures // *Journal of General Microbiology*. – 1990. – V. 136. – № 3. – P. 581-588.
82. Goranovič D., Blažič M., Magdevska V., Horvat J., Kuščer E., Polak T., Santos-Aberturas J., Martínez-Castro M., Barreiro C., Mrak P., Kopitar G., Kosec G., Fujs S., Martín J.F., Petković H. FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis* // *BMC Microbiology*. – 2012. – V. 12. – № 1. – P. 238.

83. Goranovic D., Koscec G., Mrak P., Fujs S., Horvat J., Kuscer E., Kopitar G., Petkovic H. Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285. – № 19. – P. 14292-14300.
84. Goto T., Hatanaka H., Kino T., Okuhara M., Tanaka H. Tricyclo compounds, a process for their production and a pharmaceutical composition containing the same. US Patent 4,894,366, 1984.
85. Grzegorzewicz A.E, de Sousa-d'Auria C., McNeil M.R., Huc-Claustre E., Jones V., Petit C., Angala S.K., Zemanová J., Wang Q., Belardinelli J.M., Gao Q., Ishizaki Y., Mikušová K., Brennan P.J., Ronning D.R., Chami M., Houssin C., Jackson M. Assembling of the *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall Core // *Journal of Biological Chemistry*. – 2016. – V. 291. – № 36. – P. 18867-18879.
86. Gusakov A.V., Kondratyeva E.G., Sinitsyn A.P. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities // *International Journal of Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 2011. – P. 4.
87. Harding M.W., Galat A., Uehling D.E., Schreiber S.L. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase // *Nature*. – 1989. – V. 341. – № 6244. – P. 758-760.
88. Hatanaka H., Iwami M., Kino T., Goto T., Okuhara M. FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a *Streptomyces* I Taxonomy of the producing strain // *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. – 1988. – V. 41. – № 11. – P. 1586-1591.
89. Hatanaka H., Kino T., Asano M., Goto T., Tanaka H., Okuhara M. FK-506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No 9993 // *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. – 1989. – V. 42. – № 4. – P. 620-622.
90. He W., Lei J., Liu Y., Wang Y. The LuxR family members GdmRI and GdmRII are positive regulators of geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997 // *Archives of Microbiology*. – 2008. – V. 189. – № 5. – P. 501-510.
91. Höffner K., Harwood S., Barton P. A reliable simulator for dynamic flux balance analysis // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2013. – V. 110. – № 3. – P. 792-802.
92. Hopwood D.A. *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. New York, Oxford University Press, 2007.
93. Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M., Schrepf H. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory Manual. John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985.
94. Hsiao N.H., Kirby R. Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus* and *Kitasatospora aureofaciens* using a *Streptomyces coelicolor* microarray system // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2008. – V. 93. – № 1-2. – P. 1-25.

95. Hu H., Bian J., Chen C., Min T. Culture medium for fermenting tacrolimus and fermentation method of tacrolimus. Patent application CN 108384819 A, 2018.
96. Huang D., Li S., Xia M., Wen J., Jia X. Genome-scale metabolic network guided engineering of *Streptomyces tsukubaensis* for FK506 production improvement // *Microbial Cell Factories*. – 2013a. – V. 12. – № 1. – P. 52.
97. Huang D., Xia M., Li S., Wen J., Jia X. Enhancement of FK506 production by engineering secondary pathways of *Streptomyces tsukubaensis* and exogenous feeding strategies // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2013b. – V. 40. – № 9. – P. 1023-1037.
98. Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* // *Nature Biotechnology*. – 2003. – V. 21. – № 5. – P. 526-531.
99. Ingram J.R., Martin J.A., Finlay A.Y. Impact of topical calcineurin inhibitors on quality of life in patients with atopic dermatitis // *American Journal of Clinical Dermatology*. – 2009. – V. 10. – № 4. – P. 229-237.
100. Ishaque M., Kluepfel D. Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1980. – V. 26. – № 2. – P. 183-189.
101. Ishikawa J., Yamashita A., Mikami Y., Hoshino Y., Kurita H., Hotta K., Shiba T., Hattori M. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – V. 101. – № 41. – P. 14925-14930.
102. Jakimowicz D. Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces* // *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. – 2007. – V. 61. – P. 565-575.
103. Jendrossek D., Tomasi G., Kroppenstedt R.M. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? // *FEMS Microbiology Letters*. – 1997. – V. 150. – № 2. – P. 179-188.
104. Jiang H., Kobayashi M. Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation // *Transplantation Proceedings*. – 1999. – V. 31. – № 5. – P. 1978-1980.
105. Jiang H., Wang Y.Y., Guo Y.Y., Shen J.J., Zhang X.S., Luo H.D., Ren N.N., Jiang X.H., Li Y.Q. An acyltransferase domain of FK506 polyketide synthase recognizing both an acyl carrier protein and coenzyme A as acyl donors to transfer allylmalonyl and ethylmalonyl units // *FEBS Journal*. – 2015. – V. 282. – № 13. – P. 2527-2539.
106. Jones A.C., Gust B., Kulik A., Heide L., Buttner M.J., Bibb M.J. Phage p1-derived artificial chromosomes facilitate heterologous expression of the FK506 gene cluster // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – № 7. – e69319.

107. Jung S., Moon S., Lee K., Park Y.-J., Yoon S., Yoo Y.J. Strain development of *Streptomyces* sp. for tacrolimus production using sequential adaptation // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2009. – V. 36. – № 12. – P. 1467-1471.
108. Kang T.-W., Choi B.-T., Kim H.-S., Yu S.-S. Microorganism producing tacrolimus and mass-productive method tacrolimus using the same. WO Patent 2005/063963, 2005.
109. Kapadia M., Rolston K.V., Han X.Y. Invasive *Streptomyces* infections: six cases and literature review // American Journal of Clinical Pathology. – 2007. – V. 127. – № 4. – P. 619-624.
110. Karpas A., Lowdell M., Jacobson S.K., Hill F. Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506 // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1992. – V. 89. – № 17. – P. 8351-8355.
111. Kato Y., Bai L., Xue Q., Revill W.P., Yu T.-W., Floss H.G. Functional expression of genes involved in the biosynthesis of the novel polyketide chain extension unit, methoxymalonyl-acyl carrier protein, and engineered biosynthesis of 2-desmethyl-2-methoxy-6-deoxyerythronolide B // Journal of the American Chemical Society. – 2002. – V. 124. – № 19. – P. 5268-5269.
112. Kendrick K.E., Ensign J.C. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture // Journal of Bacteriology. – 1983. – V. 155. – № 1. – P. 357-366.
113. Keri V., Csorvasi A., Melczer I., Simon A. Method of purifying tacrolimus. US Patent 2006/069386 A1, 2006.
114. Kim J.J., Lim S.K., Lee M.O., Lim S.M., Lee B.M., Kim D.H., Ryu J.H., Lee K.S. Method of extraction and yield-up of tricycle compounds by adding a solid adsorbent resin as their carrier in fermentation medium. Patent application WO 2009/025439 A1, 2009.
115. Kim H.S., Park Y.I. Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 17. – № 10. – P. 1638-1644.
116. Kim H.S., Park Y.I. Isolation and identification of a novel microorganism producing the immuno-suppressant tacrolimus // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2008. – V. 105. – № 4. – P. 418-421.
117. Kim B., Sahin N., Minnikin D.E., Zakrzewska-Czerwinska J., Mordarski M., Goodfellow M. Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp nov. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1999. – V. 49. – № 1. – P. 7-17.
118. Kinashi H. Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters // Journal of Antibiotics (Tokyo). – 2011. – V. 64. – № 1. – P. 19-25.

119. Kinashi H., Shimaji-Murayama M. Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor* // *Journal of Bacteriology*. – 1991. – V. 173. – № 4. – P. 1523-1529.
120. Kino T., Hatanaka H., Hashimoto M., Nishiyama M., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces* I Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics // *Journal of Antibiotics* (Tokyo). – 1987a. – V. 40. – № 9. – P. 1249-1255.
121. Kino T., Hatanaka H., Miyata S., Inamura N., Nishiyama M., Yajima T., Goto T., Okuhara M., Kohsaka M., Aoki H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces* II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro // *Journal of Antibiotics* (Tokyo). – 1987b. – V. 40. – № 9. – P. 1256-1265.
122. Kirby R. Chromosome diversity and similarity within the Actinomycetales // *FEMS Microbiology Letters*. – 2011. – V. 319. – № 1. – P. 1-10.
123. Klettner A., Herdegen T. FK506 and its analogs - Therapeutic potential for neurological disorders // *Current Drug Targets - CNS and Neurological Disorders*. – 2003. – V. 2. – № 3. – P. 153-162.
124. Kölling R., Lothar H. AsnC: An autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. – 1985. – V. 164. – № 1. – P. 310-315.
125. Konofaos P., Terzis J.K. FK506 and nerve regeneration: Past, present, and future // *Journal of Reconstructive Microsurgery*. – 2013. – V. 29. – № 3. – P. 141-148.
126. Kosec G., Goranovič D., Mrak P., Fujs S., Kuščer E., Horvat J., Kopitar G., Petković H. Novel chemobiosynthetic approach for exclusive production of FK506 // *Metabolic Engineering*. – 2012. – V. 14. – № 1. – P. 39-46.
127. Kuimova T.F., Soina V.S. A submerged sporulation and ultrastructural changes in the mycelium of *Streptomyces chrysomallus* // *Hindustan Antibiotics Bulletin*. – 1981. – V. 23. – P. 1-5.
128. Kumar P., Malviya H.K., Maurya R.K., Sharma S., Shukla A. Fermentation processes for the preparation of tacrolimus. Patent application US 2008/0318289 A1, 2008.
129. Kumar P., Mitra A. A process for purification of macrolides. Patent application WO 2007/013017 A1, 2007.
130. Kumon Y., Sasaki Y., Kato I., Takaya N., Shoun H., Beppu T. Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus* // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – V. 184. – № 11. – P. 2963-2968.
131. Kunz J., Hall M.N. Cyclosporin A. FK506 and rapamycin: More than just immunosuppression // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1993. – V. 18. – № 9. – P. 334-338.



132. Kutzner H.J. The family *Streptomycetaceae*. In: The Prokaryotes - A Handbook of Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Springer Verlag, Berlin, 1981.
133. Lacey J., Lacey M.E. Micro-organisms in the air of cotton mills // *Annals of Occupational Hygiene*. – 1987. – V. 31. – № 1. – P. 1-19.
134. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York, 1991. pp. 125-175.
135. Lawrence J.G., Hendrickson H. Genome evolution in bacteria: order beneath chaos // *Current Opinion in Microbiology*. – 2005. – V. 8. – № 5. – P. 572-578.
136. Leblond P., Redenbach M., Cullum J. Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Journal of Bacteriology*. – 1993. – V. 175. – № 11. – P. 3422-3429.
137. Lezhava A., Mizukami T., Kajitani T., Kameoka D., Redenbach M., Shinkawa H., Nimi O., Kinashi H. Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus* // *Journal of Bacteriology*. – 1995. – V. 177. – № 22. – P. 6492-6498.
138. Lin Y.S., Kieser H.M., Hopwood D.A., Chen C.W. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear // *Molecular Microbiology*. – 1993. – V. 10. – № 5. – P. 923-933.
139. Lippert Hirsch A. Industrial aspects of Vitamin D. In: *Vitamin D*, 3rd edn. Academic Press, Boston, 2011, pp 73-93.
140. Liu Y., Deng Z., Tan H., Deng Q., Cao L. Characterization of cattle fecal *Streptomyces* strains converting cellulose and hemicelluloses into reducing sugars // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – V. 21. – № 9. – P. 6069-6075.
141. Liu J., Farmer J., Jr., Lane W.S., Friedman J., Weissman I., Schreiber S.L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes // *Cell*. – 1991. – V. 66. – № 4. – P. 807-815.
142. Long C.M., Virolle M.J., Chang S.Y., Chang S., Bibb M.J. alpha-Amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate alpha-amylases // *Journal of Bacteriology*. – 1987. – V. 169. – № 12. – P. 5745-5754.
143. Maddocks S.E., Oyston P.C. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins // *Microbiology*. – 2008. – V. 154. – № 12. – P. 3609-3623.
144. Madduri K., Waldron C., Merlo D.J. Rhamnose Biosynthesis Pathway Supplies Precursors for Primary and Secondary Metabolism in *Saccharopolyspora spinosa* // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183. – № 19. – P. 5632-5638.

145. Manteca A., Alvarez R., Salazar N., Yagüe P., Sanchez J. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor* // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – V. 74. – № 12. – P. 3877-3886.
146. Manteca A., Fernández M., Sánchez J. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus* // Microbiology. – 2005. – V. 151. – № 11. – P. 3689-3697.
147. Manteca A., Sanchez J. *Streptomyces* development in colonies and soils // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – V. 75. – № 9. – P. 2920-2924.
148. Manteca A., Sanchez J., Jung H.R., Schwämmle V., Jensen O.N. Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation // Molecular and Cellular Proteomics. – 2010. – V. 9. – № 7. – P. 1423-1436.
149. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms // Molecular Biology. – 1961. – V. 3. – № 2. – P. 208-216.
150. Martín J.F. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story // Journal of Bacteriology. – 2004. – V. 186. – № 16. – P. 5197-5201.
151. Martín J.F., Aparicio J.F. Enzymology of the Polyenes Pimaricin and Candicidin Biosynthesis // Methods in Enzymology. – 2009. – V. 459. – P. 215-242.
152. Martín J.F., Liras P. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* // Current Opinion in Microbiology. – 2010. – V. 13. – № 3. – P. 263-273.
153. Martínez-Castro M., Salehi-Najafabadi Z., Romero F., Pérez-Sanchiz R., Fernández-Chimeno R.I., Martín J.F., Barreiro C. Taxonomy and chemically semi-defined media for the analysis of the tacrolimus producer *Streptomyces tsukubaensis* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 97. – № 5. – P. 2139-2152.
154. McCormack P.L., Keating G.M. Tacrolimus: In heart transplant recipients // Drugs. – 2006. – V. 66. № 17. – P. 2269-2279.
155. McLeod M.P., Warren R.L., Hsiao W.W., Araki N., Myhre M., Fernandes C., Miyazawa D., Wong W., Lillquist A.L., Wang D., Dosanjh M., Hara H., Petrescu A., Morin R.D., Yang G., Stott J.M., Schein J.E., Shin H., Smailus D., Siddiqui A.S., Marra M.A., Jones S.J., Holt R., Brinkman F.S., Miyauchi K., Fukuda M., Davies J.E., Mohn W.W., Eltis L.D. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – V. 103. – № 42. – P. 15582-15587.

156. Medema M.H., Trefzer A., Kovalchuk A., van den Berg M., Müller U., Heijne W., Wu L., Alam M.T., Ronning C.M., Nierman W.C., Bovenberg R.A., Breitling R., Takano E. The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways // *Genome Biology and Evolution*. – 2010. – V. 2. – P. 212-224.
157. Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC Bioinformatics*. – 2013. – V. 14. – № 1. – P. 60.
158. Meier-Kriesche H.-U., Li S., Gruessner R.W.G., Fung J.J., Bustami R.T., Barr M.L., Leichtman A.B. Immunosuppression: Evolution in practice and trends, 1994–2004 // *American Journal of Transplantation*. – 2006. – V. 6. – № 5. – P. 1111-1131.
159. Mendes M.V., Recio E., Antyn N., Guerra S.M., Santos-Aberturas J., Martin J.F., Aparicio J.F. Cholesterol oxidases act as signaling proteins for the biosynthesis of the polyene macrolide pimarinin // *Chemistry and Biology*. – 2007. – V. 14. – № 3. – P. 279-290.
160. Mesbah N.M., Whitman W.B., Mesbah M. Determination of the G+C Content of Prokaryotes. In: *Methods in Microbiology, Volume 38*. Academic Press, 2011, pp. 299-324.
161. Mikami Y., Miyashita K., Arai T. Diaminopimelic acid profiles of alkaliphilic and alkaline-resistant strains of Actinomycetes // *Journal of General Microbiology*. – 1982. – V. 128. – № 8. – P. 1709-1712.
162. Mishra A., Verma S. Optimization of process parameters for tacrolimus (FK 506) production by new isolate of *Streptomyces* sp. using response surface methodology // *Journal of Biochemical Technology*. – 2012. – V. 3. – № 4. – P. 419-425.
163. Mo S., Ban Y.H., Park J.W., Yoo Y.J., Yoon Y.J. Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – V. 36. – № 12. – P. 1473-1482.
164. Mo S., Kim D.H., Lee J.H., Park J.W., Basnet D.B., Ban Y.H., Yoo Y.J., Chen S.W., Park S.R., Choi E.A., Kim E., Jin Y.Y., Lee S.K., Park J.Y., Liu Y., Lee M.O., Lee K.S., Kim S.J., Kim D., Park B.C., Lee S.G., Kwon H.J., Suh J.W., Moore B.S., Lim S.K., Yoon Y.J. Biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit for the FK506 polyketide synthase proceeds through a dedicated polyketide synthase and facilitates the mutasynthesis of analogues // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – V. 133. – № 4. – P. 976-985.
165. Mo S., Lee S.K., Jin Y.Y., Oh C.H., Suh J.W. Application of a combined approach involving classical random mutagenesis and metabolic engineering to enhance FK506 production in *Streptomyces* sp RM7011 // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2013. – V. 97. – № 7. – P. 3053-3062.

166. Mo S., Lee S.K., Jin Y.Y., Suh J.W. Improvement of FK506 production in the high-yielding strain *Streptomyces* sp. RM7011 by engineering the supply of allylmalonyl-CoA through a combination of genetic and chemical approach // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – V. 26. – № 2. – P. 233-240.
167. Mo S., Yoo Y.J., Ban Y.H., Lee S.K., Kim E., Suh J.W., Yoon Y.J. Roles of *fbkN* in positive regulation and *tcx7* in negative regulation of FK506 biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain KCTC 11604BP // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – V. 78. – № 7. – P. 2249-2255.
168. Mochizuki S., Hiratsu K., Suwa M., Ishii T., Sugino F., Yamada K., Kinashi H. The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism // *Molecular Microbiology*. – 2003. – V. 48. – № 6. – P. 1501-1510.
169. Molnár I., Aparicio J.F., Haydock S.F., Khaw L.E., Schwecke T., König A., Staunton J., Leadlay P.F. Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: Analysis of genes flanking the polyketide synthase // *Gene*. – 1996. – V. 169. – № 1. – P. 117.
170. Mondou F., Shareck F., Morosoli R., Kluepfel D. Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans* // *Gene*. – 1986. – V. 49. – № 3. – P. 323-329.
171. Mortola E., Endo Y., Ohno K., Watari T., Tsujimoto H., Hasegawa A. The use of two immunosuppressive drugs, cyclosporin A and tacrolimus, to inhibit virus replication and apoptosis in cells infected with feline immunodeficiency virus // *Veterinary Research Communications*. – 1998. – V. 22. – № 8. – P. 553-563.
172. Motamedi H., Cai S.J., Shafiee A., Elliston K.O. Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506 // *European Journal of Biochemistry*. – 1997. – V. 244. – № 1. – P. 74-80.
173. Motamedi H., Shafiee A. The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506 // *European Journal of Biochemistry*. – 1998. – V. 256. – № 3. – P. 528-534.
174. Motamedi H., Shafiee A., Cai S.J., Streicher S.L., Arison B.H., Miller R.R. Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520 // *Journal of Bacteriology*. – 1996. – V. 178. – № 17. – P. 5243-5248.
175. Moya R., Hernández M., García-Martín A.B., Ball A.S., Arias M.E. Contributions to a better comprehension of redox-mediated decolouration and detoxification of azo dyes by a laccase produced by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 // *Bioresource Technology*. – 2010. – V. 101. – № 7. – P. 2224-2229.

176. Mukerjea R., Robyt J.F. Isolation, structure, and characterization of the putative soluble amyloses from potato, wheat, and rice starches // *Carbohydrate Research*. – 2010. – V. 345. – № 3. – P. 449-451.
177. Muramatsu H., Nagai K. *Streptomyces tsukubensis* sp. nov., a producer of the immunosuppressant tacrolimus // *Journal of Antibiotics (Tokyo)*. – 2013. – V. 66. – № 4. – P. 251-254.
178. Muth G., Farr M., Hartmann V., Wohlleben W. *Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5: nucleotide sequence analysis of the self-transmissible minimal replicon and characterization of the replication mode // *Plasmid*. – 1995. – V. 33. – № 2. – P. 113-126.
179. Novella I.S., Barbés C., Sánchez J. Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1992. – V. 38. – № 8. – P. 769-773.
180. Ohta Y., Ikeda M. Deodorization of pig feces by actinomycetes // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1978. – V. 36. – № 3. – P. 487-491.
181. Omura S., Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Takahashi C., Shinose M., Hattori M. Genome Sequence of an Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the Ability of Producing Secondary Metabolites // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – V. 98. – № 21. – P. 12215-12220.
182. Onyewu C., Blankenship J.R., Del Poeta M., Heitma J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2003. – V. 47. – № 3. – P. 956-964.
183. Ordóñez-Robles M., Rodríguez-García A., Martín J.F. Target genes of the *Streptomyces tsukubaensis* FkbN regulator include most of the tacrolimus biosynthesis genes, a phosphopantetheinyl transferase and other PKS genes // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – V. 100. – № 18. – P. 8091-8103.
184. Ordóñez-Robles M., Rodríguez-García A., Martín J.F. Genome-wide transcriptome response of *Streptomyces tsukubaensis* to N-acetylglucosamine: effect on tacrolimus biosynthesis // *Microbiological Research*. – 2018b. – V. 217. – P. 14-22.
185. Ordóñez-Robles M., Santos-Beneit F., Albillos S.M., Liras P., Martín J.F., Rodríguez-García A. *Streptomyces tsukubensis* as a new model for carbon repression: transcriptomic response to tacrolimus repressing carbon sources // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 101. – № 22. – P. 8181-8195.
186. Ordóñez-Robles M., Santos-Beneit F., Martín J.F. Unraveling Nutritional Regulation of Tacrolimus Biosynthesis in *Streptomyces tsukubaensis* through omic Approaches // *Antibiotics (Basel)*. – 2018a. – V. 7. – № 2. – E39.

187. Owen R.J., Pitcher D. Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. In: Chemical Methods in Bacterial Systematics. Academic Press, London, 1985, pp. 67-93.
188. Pandza K., Pfalzer G., Cullum J., Hranueli D. Physical mapping shows that the unstable ox-tetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome // Microbiology. – 1997. – V. 143. – № 5. – P. 1493-1501.
189. Papineau A.M., Hoover D.G., Knorr D., Farkas D.F. Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with hydrostatic pressure // Food Biotechnology. – 1991. – V. 5. – № 1. – P. 45-57.
190. Park J.W., Mo S.J., Park S.R., Ban Y.H., Yoo Y.J., Yoon Y.J. Liquid chromatography-mass spectrometry characterization of FK506 biosynthetic intermediates in *Streptomyces clavuligerus* KCTC 10561BP // Analytical Biochemistry. – 2009. – V. 393. – № 1. – P. 1-7.
191. Peczynska-Czoch W., Mordarski M. Actinomycete enzymes In: Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, London, 1988, pp. 220-283.
192. Pei G., Chen L., Zhang W. Chapter nine-WGCNA application to proteomic and metabolomic data analysis // Methods in Enzymology. – 2017. – V. 585. – P. 135-158.
193. Pellegrini G.J., Graziano J.C., Ragunathan L., Bhat M.A., Hemashettar B.M., Brown J.M. Scalp abscess due to *Streptomyces cacaoi* subsp *cacaoi*, first report in a human infection // Journal of Clinical Microbiology. – 2012. – V. 50. – № 4. – P. 1484-1486.
194. Pérez-Redondo R., Rodríguez-García A., Martín J.F., Liras P. The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene // Gene. – 1998. – V. 211. – № 2. – P. 311-321.
195. Periyasamy S., Warriar M., Tillekeratne M.P.M., Shou W., Sanchez E.R. The immunophilin ligands cyclosporin A and FK506 suppress prostate cancer cell growth by androgen receptor-dependent and -independent mechanisms // Endocrinology. – 2007. – V. 148. – № 10. – P. 4716-4726.
196. Pirsch J.D., Miller J., Deierhoi M.H., Vincenti F., Filo R.S. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group // Transplantation. – 1997. – V. 63. – № 7. – P. 977-983.
197. Poshekhontseva V.Y., Bragin E.Y., Fokina V.V., Shtratnikova V.Y., Starodumova I.P., Tarlachkov S.V., Donova M.V. Draft Genome Sequence of FK506-Producing *Streptomyces tsukubensis* Strain VKM Ac-2618D // Microbiology Resource Announcements. – 2019. – V. 8. – № 24. – e00510-19.
198. Procópio R.E., Silva I.R., Martins M.K., Azevedo J.L., Araújo J.M. Antibiotics produced by *Streptomyces* // Brazilian Journal of Infectious Diseases. – 2012. – V. 16. – № 5. – P. 466-471.

199. Quintana E.T., Wierzbicka K., Mackiewicz P., Osman A., Fahal A.H., Hamid M.E., Zakrzewska-Czerwinska J., Maldonado L.A., Goodfellow M. *Streptomyces sudanensis* sp nov, a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2008. – V. 93. – № 3. – P. 305-313.
200. Rasmussen B., Fletcher I.R., Brocks J.J., Kilburn M.R. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria // *Nature*. – 2008. – V. 455. – № 7216. – P. 1101-1104.
201. Rath T. Tacrolimus in transplant rejection // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. – 2013. – V. 14. – № 1. – P. 115-122.
202. Redenbach M., Flett F., Piendl W., Glocker I., Rauland U., Wafzig O., Kliem R., Leblond P., Cullum J. The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions // *Molecular Genetics and Genomics*. – 1993. – V. 241. – № 3-4. – P. 255-262.
203. Redenbach M., Scheel J., Schmidt U. Chromosome topology and genome size of selected *actinomycetes* species // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2000. – V. 78. – № 3-4. – P. 227-235.
204. Reeves A.R., Cernota W.H., Brikun I.A., Wesley R.K., Weber J.M. Engineering precursor flow for increased erythromycin production in *Aeromicrobium erythreum* // *Metabolic Engineering*. – 2004. – V. 6. – № 4. – P. 300-312.
205. Reis S.A., Moussatché N., Damaso C.R.A. FK506, a secondary metabolite produced by *Streptomyces*, presents a novel antiviral activity against Orthopoxvirus infection in cell culture // *Journal of Applied Microbiology*. – 2006. – V. 100. – № 6. – P. 1373-1380.
206. Remitz A., Reitamo S. Long-term safety of tacrolimus ointment in atopic dermatitis // *Expert Opin. Drug Safety*. – 2009. – V. 8. – № 4. – P. 501-506.
207. Rho Y.T., Lee K.J. Kinetic characterization of sporulation in *Streptomyces albidoflavus* SMF301 during submerged culture // *Microbiology*. – 1994. – V. 140. – P. 2061-2065.
208. Richter M., Rossello-Mora R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – V. 106. – № 45. – P. 19126-19131.
209. Rigali S., Nothhaft H., Noens E.E., Schlicht M., Colson S., Müller M., Joris B., Koerten H.K., Hopwood D.A., Titgemeyer F., van Wezel G.P. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development // *Molecular Microbiology*. – 2006. – V. 61. – № 5. – P. 1237-1251.
210. Rigali S., Titgemeyer F., Barends S., Mulder S., Thomae A.W., Hopwood D.A., van Wezel G.P. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces* // *EMBO Reports*. – 2008. – V. 9. – № 7. – P. 670-675.

211. Riley M., Anilionis A. Evolution of the bacterial genome // *Annual Review of Microbiology*. – 1978. – V. 32. – P. 519-560.
212. Rodríguez M., Nuñez L.E., Brana A.F., Meñdez C., Salas J.A., Blanco G. Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya* // *Molecular Microbiology*. – 2008. – V. 69. – № 3. – P. 633-645.
213. Romano A., Jensen M.R., McAlpine J. Toward the optimization of stent-based treatment for coronary artery disease // *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. – 2010. – V. 13. – № 2. – P. 157-158.
214. Rosselló-Móra R, Urdiain M., López-López A. DNA–DNA Hybridization. In: *Methods in Microbiology*, Volume 38. Academic Press, 2011, pp. 325-347.
215. Rueda B., Miguélez E.M., Hardisson C., Manzanal M.B. Mycelial differentiation and spore formation by *Streptomyces brasiliensis* in submerged culture // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2001. – V. 47. – № 11. – P. 1042-1047.
216. Rusnak F., Mertz P. Calcineurin: form and function // *Physiological Reviews*. – 2000. – V. 80. – № 4. – P. 1483-1521.
217. Russell B., Moss C., George G., Santaolalla A., Cope A., Papa S., Van Hemelrijck M. Associations between immune-suppressive and stimulating drugs and novel COVID-19 – a systematic review of current evidence // *Ecancermedicalsecience*. – 2020. – V. 14. – P. 1022.
218. Saitou N., Nei M. The neighbour-joining method: new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – V. 4. – № 4. – P. 406-425.
219. Santos-Aberturas J., Payero T.D., Vicente C.M., Guerra S.M., Canibano C., Martín J.F., Aparicio J.F. Functional conservation of PAS-LuxR transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis // *Metabolic Engineering*. – 2011a. – V. 13. – № 6. – P. 756-757.
220. Santos-Aberturas J., Vicente C.M., Guerra S.M., Payero T.D., Martín J.F., Aparicio J.F. Molecular control of polyene macrolide biosynthesis: Direct binding of the regulator PimM to eight promoters of pimaricin genes and identification of binding boxes // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011b. – V. 286. – № 11. – P. 9150-9161.
221. Schrijver A.D., Mot R.D. A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family // *Microbiology*. – 1999. – V. 145. – № 6. – P. 1287-1288.
222. Schatz A., Bugie E., Waksman S.A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram positive and Gram negative bacteria // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1944. – V. 55. – № 437. – P. 66.
223. Schell M.A. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators // *Annual Review of Microbiology*. – 1993. – V. 47. – P. 597-626.



224. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan type of bacterial cell walls and their taxonomic implications // *Bacteriological Reviews*. – 1972. – V. 36. – № 4. – P. 407-477.
225. Shafiee A., Motamedi H., Chen T. Enzymology of FK-506 biosynthesis Purification and characterization of 31-O-desmethylFK-506 O: methyltransferase from *Streptomyces* sp. MA6858 // *European Journal of Biochemistry*. – 1994. – V. 225. – № 2. – P. 755-764.
226. Shafiee A., Motamedi H., Dumont F.J., Arison B.H., Miller R.R. Chemical and biological characterization of two FK506 analogs produced by targeted gene disruption in *Streptomyces* sp. MA6548 // *Journal of Antibiotics*. – 1997. – V. 50. – № 5. – P. 418-423.
227. Shirling E.B., Gottlieb D. Method for characterization of *Streptomyces* species // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1966. – V. 16. – № 3. – P. 313-340.
228. Shoun H., Kano M., Baba I., Takaya N., Matsuo M. Denitrification by *actinomycetes* and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus* // *Journal of Bacteriology*. – 1998. – V. 180. – № 17. – P. 4413-4415.
229. Sierra-Paredes G., Sierra-Marcuño G. Ascomycin and FK506: pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectants // *CNS Neuroscience and Therapeutics*. – 2008. – V. 14. – № 1. – P. 36-46.
230. Singh B.P., Behera B.K. Regulation of tacrolimus production by altering primary source of carbons and amino acids // *Letters in Applied Microbiology*. – 2009. – V. 49. – № 2. – P. 254-259.
231. Singh N., Heitman J. Antifungal attributes of immunosuppressive agents: new paradigms in management and elucidating the pathophysiologic basis of opportunistic mycoses in organ transplant recipients // *Transplantation*. – 2004. – V. 77. – № 6. – P. 795-800.
232. Sinner M., Puls J. Non-Corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate complex ion-exchange chromatography // *Journal of Chromatography A*. – 1978. – V. 156. – № 1. – P. 197-204.
233. Sircar A., Sridhar P., Das P. Optimization of solid state medium for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* // *Process Biochemistry*. – 1998. – V. 33. – № 3. – P. 283-289.
234. Soberón-Chávez G., Lépine F., Déziel E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – V. 68. – № 6. – P. 718-725.
235. Song K., Wei L., Liu J., Wang J., Qi H., Wen J. Engineering of the LysR family transcriptional regulator FkbR1 and its target gene to improve ascomycin production // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 101. – № 11. – P. 4581-4592.

236. Steinbach W.J., Schell W.A., Blankenship J.R., Onyewu C., Heitman J., Perfect J.R. In vitro interactions between antifungals and immunosuppressants against *Aspergillus fumigatus* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. – V. 48. – № 5. – P. 1664-1669.
237. Syed D.G., Lee J.C., Li W.J., Kim C.J., Agasar D. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis* // Bioresource Technology. – 2009. – V. 100. – № 5. – P. 1868-1871.
238. Taguchi S., Nishiyama K., Kumagai I., Miura K. Analysis of transcriptional control regions in the *Streptomyces* subtilisin-inhibitor-encoding gene // Gene. – 1989. – V. 84. – № 2. – P. 279-286.
239. Tamura K., Didley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – V. 24. – № 8. – P. 1596-1599.
240. Tendler M.D., Burkholder P.R. Studies on the thermophilic actinomycetes I Methods of cultivation // Applied Microbiology. – 1961. – V. 9. – № 5. – P. 394-399.
241. The United States Pharmacopeial Convention // USP 37 - NF 32 The United States Pharmacopeia and National Formulary 18: Main Edition Plus Supplements 1 and 2, 2013.
242. Tocci M.J., Matkovich D.A., Collier K.A., Kwok P., Dumont F., Lin S., Degudicibus S., Siekierka J.J., Chin J., Hutchinson N.I. The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes // Journal of Immunology. – 1989. – V. 143. – № 2. – P. 718-726.
243. Toft C., Andersson S.G. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation // Nature Reviews Genetics. – 2010. – V. 11. – № 7. – P. 465-475.
244. Tolosa L., Kostov Y., Harms P., Rao G. Noninvasive measurement of dissolved oxygen in shake flasks // Biotechnology and Bioengineering. – 2002. – V. 80. – № 5. – P. 594-597.
245. Trede N.S., Warwick A.B., Rosoff P.M., Rohrer R., Bierer B.E., Guinan E. Tacrolimus (FK506) in allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anemia following orthotopic liver transplantation // Bone Marrow Transplantation. – 1997. – V. 20. – № 3. – P. 257-260.
246. Tsujibo H., Miyamoto K., Kuda T., Minami K., Sakamoto T., Hasegawa T., Inamori Y. Purification, properties, and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – V. 58. – № 1. – P. 371-375.
247. Turlo J., Gajzlerska W., Klimaszewska M., Król M., Dawidowski M., Gutkowska B. Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precu-

- sors for biosynthesis // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2012. – V. 51. – № 6-7. – P. 32-39.
248. Vaid S., Narula P. Novel process for producing Tacrolimus (FK-506) using vegetable oil as sole source of carbon. Patent application WO 2006/011156 A2, 2006.
249. Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2007. – V. 71. – № 3. – P. 495-548.
250. Volff J.N., Altenbuchner J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome // *Molecular Microbiology*. – 1998. – V. 27. – № 2. – P. 239-246.
251. Wallemacq P.E., Reding R. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: Clinical, biomedical, and analytical aspects // *Clinical Chemistry*. – 1993. – V. 39. – № 11. – P. 2219-2228.
252. Wang C.M., Cane D.E. Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces coelicolor* // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – V. 130. – № 28. – P. 8908-8909.
253. Wang J., Liu H., Huang D., Jin L., Wang C., Wen J. Comparative proteomic and metabolomic analysis of *Streptomyces tsukubaensis* reveals the metabolic mechanism of FK506 overproduction by feeding soybean oil // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2017. – V. 101. – № 6. – P. 2447-2465.
254. Wang C., Liu J., Liu H., Liang S., Wen J. Combining metabolomics and network analysis to improve tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* using different exogenous feedings // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2017a. – V. 44. – № 11. – P. 1527-1540.
255. Wang C., Liu J., Liu H., Wang J., Wen J. A genome-scale dynamic flux balance analysis model of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 to predict the targets for increasing FK506 production // *Biochemical Engineering Journal*. – 2017b. – V. 123. – P. 45-56.
256. Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? // *Archives of Microbiology*. – 2001. – V. 176. – № 5. – P. 386-390.
257. Weber T., Welzel K., Pelzer S., Vente A., Wohlleben W. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes // *Journal of Biotechnology*. – 2003. – V. 106. – № 2-3. – P. 221-232.
258. Wen J., Ma D., Cui J. Method for increasing fermentation yield of FK506 (tacrolimus) by use of *Streptomyces tsukubaensis*. Patent application CN 108192908 A, 2018.
259. Williams S.T., Flowers T.H. The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomycetes // *Microbios*. – 1978. – V. 20. – № 80. – P. 99-106.

260. Wilson D.J., Xue Y., Reynolds K.A., Sherman D.H. Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae* // Journal of Bacteriology. – 2001. – V. 183. – № 11. – P. 3468-3475.
261. Wu K., Chung L., Revill W.P., Katz L., Reeves C.D. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units // Gene. – 2000. – V. 251. – № 1. – P. 81-90.
262. Wu P., Yang Y., Yan R., Fang Y., Zhang W. *Streptomyces tsukubaensis* and application thereof in preparation of tacrolimus. Patent application CN 105624068 A, 2016.
263. Wu T., Zivanovic S., Draughon F.A., Conway W.S., Sams C.E. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2005. – V. 53. – № 10. – P. 3888-3894.
264. Xia M., Huang D., Li S., Wen J., Jia X., Chen Y. Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis // Biotechnology and Bioengineering. – 2013. – V. 110. – № 10. – P. 2717-2730.
265. Xie X., Lipke P.N. On the evolution of fungal and yeast cell walls // Yeast. – 2010. – V. 27. – № 8. – P. 479-488.
266. Yagüe P., López-García M.T., Rioseras B., Sánchez J., Manteca A. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives // FEMS Microbiology Letters. – 2013. – V. 342. – № 2. – P. 79-88.
267. Yagüe P., Manteca A., Simon A., Diaz-Garcia M.E., Sanchez J. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerge *Streptomyces* cultures // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – V. 76. – № 10. – P. 3401-3404.
268. Yamamoto S., Jiang H., Kato R. Stimulation of hair growth by topical application of FK506, a potent immunosuppressive agent // Journal of Investigative Dermatology. – 1994. – V. 102. – № 2. – P. 160-164.
269. Yang C.C., Huang C.H., Li C.Y., Tsay Y.G., Lee S.C., Chen C.W. The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins // Molecular Microbiology. – 2002. – V. 43. – № 2. – P. 297-305.
270. Yoon Y.J., Choi C.Y. Nutrient Effects on FK-506, a New Immunosuppressant, Production by *Streptomyces* sp. in a Defined Medium // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1997. – V. 83. – № 6. – P. 599-603.
271. Zhang X.S., Luo H.D., Tao Y., Wang Y.Y., Jiang X.H., Jiang H., Li Y.Q. FkbN and Tcs7 are pathway-specific regulators of the FK506 biosynthetic gene cluster in *Streptomyces tsukubaensis* L19 // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 43. – № 12. – P. 1693-1703.

272. Zhao W., Zhong Y., Yuan H., Wang J., Zheng H., Wang Y., Cen X., Xu F., Bai J., Han X., Lu G., Zhu Y., Shao Z., Yan H., Li C., Peng N., Zhang Z., Zhang Y., Lin W., Fan Y., Qin Z., Hu Y., Zhu B., Wang S., Ding X., Zhao G.P. Complete genome sequence of the rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32 revealed its genetic characteristics in phylogeny and metabolism // *Cell Research*. – 2010. – V. 20. – № 10. – P. 1096-1108.
273. Zhu X., Zhang W., Chen X., Wu H., Duan Y., Xu Z. Generation of high rapamycin producing strain via rational metabolic pathway-based mutagenesis and further titer improvement with fed-batch bioprocess optimization // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2010. – V. 107. – № 3. – P. 506-515.
274. Zhu H., Mo H. Method for producing tacrolimus by fermentation. Patent CN 103695496 B, 2016.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. **Пошехонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В. Влияние состава крахмала на биосинтез иммунодепрессанта такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. – № 5. – с. 481-491. (doi: 10.1134/S0555109919040147, РИНЦ, IF = 1,022)  
**Poshekhontseva V.Yu.**, Fokina V.V., Sukhodolskay G.V., Shutov A.A., Donova M.V. Effect of starch composition on the biosynthesis of immunosuppressant tacrolimus (FK-506) by *Streptomyces tsukubaensis* VKM Ac-2618D strain // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2019. – V. 55. – № 5. – P. 534-543. (doi: 10.1134/2FS0003683819040148, SCOPUS, WoS, Q3, IF = 1,4)
2. **Poshekhontseva V.Yu.**, Bragin E.Y., Fokina V.V., Shtratnikova V.Y., Starodumova I.P., Tarlachkov S.V., Donova M.V. Draft Genome Sequence of FK506-Producing *Streptomyces tsukubensis* Strain VKM Ac-2618D // 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.**, Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В. Влияние низших грибов на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д // 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.**, Fokina V.V., Sukhodolskay G.V., Shutov A.A., Donova M.V. Study of the effect of lower eukaryotes on tacrolimus (FK-506) biosynthesis by the *Streptomyces tsukubensis* strain VKM Ac-2618D // 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., **Пошехонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Шутов А.А., Николаева В.М., Васяи-ров Г.Г., Титова Е.В., Карасев В.С., Староверов С.М., Донова М.В. Разработка способа выделения и очистки такролимуса, синтезированного актинобактериями *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – № 6. – 602-611. (doi: 10.31857/S055510992006015X, РИНЦ, IF = 1,022)  
Salionov D.S., Poshekhontseva V.Yu., Fokina V.V., Shutov A.A., Nikolaeva V.M., Vasiarov G.G., Titova E.V., Karasev V.S., Staroverov S.M., Donova M.V. 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 // Applied Biochemistry and Micro-

- biology. – 2020. – V. 56. – № 6. – P. 699-707. (doi: 10.1134/S0003683820060150, SCOPUS, WoS, Q3, IF = 1,4)
5. **Пошихонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Тарлачков С.В., Мачулин А.В., Шутов А.А., Донова М.В. *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д – эффективный продуцент такролимуса // 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. **Пошихонцева В.Ю.**, Суходольская Г.В., Гулевская С.А., Фокина В.В., Донова М.В. Таксономия такролимус (FK506)-синтезирующего штамма *Streptomyces* sp. ВКМ Ас-2618Д и влияние компонентов среды на активность продуцента // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18). – № 2 (1). – С. 746-748. (РИНЦ, IF = 0,67)
  7. **Пошихонцева В.Ю.**, Суходольская Г.В., Фокина В.В., Гулевская С.А., Донова М.В. Естественная изменчивость *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д и селекция высокоактивного продуцента такролимуса (FK506) // 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. **Пошихонцева В.Ю.**, Гулевская С.А., Донова М.В. Сравнительное изучение фенотипических характеристик и идентификация штаммов *Streptomyces* spp. – продуцентов такролимуса // Журнал научного фонда «Биолог». – 2014. – № 3. – С. 119-122.
2. **Пошихонцева В.Ю.**, Гулевская С.А., Суходольская Г.В., Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В. Дифференциальная характеристика стрептомицетов-продуцентов такролимуса // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». – Москва, 2014. – С. 188.
3. **Пошихонцева В.Ю.**, Гулевская С.А., Суходольская Г.В., Фокина В.В. Влияние крахмала на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д // Материалы 19-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2015. – С. 39.
4. **Пошихонцева В.Ю.**, Суходольская Г.В., Фокина В.В., Гулевская С.А., Лобастова Т.Г., Шутов А.А., Донова М.В. Биосинтез такролимуса актинобактериями рода *Streptomyces* и селекция высокоактивного морфотипа штамма-продуцента // Материалы II Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2015. – С. 85-87.

5. **Пошихонцева 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. **Пошихонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донова М.В. Оптимизация этапа получения посевной культуры при масштабировании технологии получения такролимуса (FK-506) // Материалы 20-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2016. – С. 237.
7. **Пошихонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В. Влияние состава крахмало-содержащего сырья на биосинтез такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас-2618Д // Материалы XI Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва, 2016. – С. 115-118.
8. **Пошихонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В. Влияние клеток и клеточных компонентов низших эукариот на биосинтез такролимуса культурой *Streptomyces tsukubaensis* // Материалы III Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2016. – С. 113-116.
9. **Пошихонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Салионов Д.С., Шутов А.А., Донова М.В. Создание прототипа технологии микробиологического синтеза такролимуса // Материалы I Российского Микробиологического конгресса. – Пущино, 2017. – С. 166-167.
10. **Пошихонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Салионов Д.С., Шутов А.А., Донова М.В. Получение фармацевтической субстанции такролимуса: полный цикл биосинтеза и очистки // Материалы IV Пущинской школы-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». – Пущино, 2017. – С.88-90.

#### **Интеллектуальная собственность:**

1. **Пошихонцева В.Ю.**, Фокина В.В., Шутов А.А., Донова М.В. Штамм актиномицета *Streptomyces tsukubensis* – продуцент такролимуса и способ получения такролимуса. Патент РФ 2722699 С1, 2020.



## ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Штамм актиномицета *Streptomyces tsukubensis* – продуцент такролимуса  
и способ получения такролимуса

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2722699

Штамм актиномицета *Streptomyces tsukubensis* -продуцент  
такролимуса и способ получения такролимуса

Патентообладатель: *Пошехонцева Вероника Юрьевна (RU)*

Авторы: *Пошехонцева Вероника Юрьевна (RU), Фокина  
Виктория Валерьевна (RU), Шутов Андрей Анатольевич  
(RU), Донова Марина Викторовна (RU)*

Заявка № 2019112813

Приоритет изобретения 26 апреля 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 03 июня 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 26 апреля 2039 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Ивлиев* Г.П. Ивлиев

**МИНОБРНАУКИ РОССИИ**  
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**  
**«Федеральный исследовательский центр**  
**«Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»**  
**(ФИЦ ПНЦБИ РАН)**  
**Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской**  
**академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН**  
**(ИБФМ РАН)**

**УТВЕРЖДАЮ**  
**Зам. директора ИБФМ РАН**  
**Канд. биол. наук А.В. Лисов**

\_\_\_\_\_ 2020 г.  
«    »

**Акт**

**испытаний способа микробиологического синтеза макроциклического поликетиды такролимуса (FK-506) культурой *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, представленного сотрудниками лаборатории микробиологической трансформации органических соединений м.н.с. Пошехонцевой В.Ю., ст.н.с. к.б.н. Фокиной В.В., м.н.с. Шутовым А.А. и гл.н.с д.б.н. Доновой М.В.**

В период с сентября 2018 г. по декабрь 2019 г. в аппаратном зале Установки лабораторных ферментеров были проведены испытания способа микробиологического синтеза такролимуса (FK-506) культурой *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д с целью выяснения его соответствия лабораторно-техническому уровню.

Для определения соответствия данного способа лабораторно-техническому уровню было проведено пять стандартных ферментаций в аппаратах АНКУМ-2М с общим объемом 10 литров.

Оценивали конечное содержание целевого продукта – такролимуса в среде биосинтеза.

Использовали следующие реактивы: крахмал картофельный растворимый от «Купавнареактив» (РФ), декстрин палевый от «Декстринзавод» (РФ), дрожжи пекарские лиофилизированные от «Саф-Момент» (Франция), кукурузный экстракт лиофилизированный от «Sigma-Aldrich» (США), моногидрохлорид L-лизина от «Panreac» (США), сорбент SP-207 от «Mitsubishi chemical corporation» (Япония). Остальные реактивы марок «чда» и «хч» были отечественного производства.

Штамм *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д был предоставлен ООО «Фарминс» (г. Пушкино, РФ).

Посевную культуру *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д выращивали в колбах объемом 750 мл, содержащих по 250 мл среды следующего состава (г/л): крахмал картофельный растворимый – 75, дрожжи пекарские лиофилизированные – 16,6, кукурузный экстракт лиофилизированный – 12,5,  $MnSO_4$  – 0,05,  $CaCO_3$  – 3, вода дистиллированная до 1 литра, рН 7,0. Отдельно готовили раствор глюкозы, который вносили в среду до его концентрации 5 г/л. Среду инокулировали 5% об. криогенной культуры *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и культивировали на шейкере-инкубаторе при 220 об/мин и 25°C в течение 48 часов.

Культуру (250 мл) 48 часов роста вносили в ферментер АНКУМ-2М с коэффициентом заполнения 0,5 со средой биосинтеза следующего состава (г/л): крахмал картофельный растворимый – 75, дрожжи пекарские лиофилизированные – 16,6, кукурузный экстракт лиофилизированный – 12,5,  $MnSO_4$  – 0,05,  $CaCO_3$  – 3, пеногаситель «Лапрол» – 2 мл, сорбент SP-207 – 40, вода дистиллированная до 5 литров, рН 7,0. Отдельно готовили и вносили в среду на момент засева стерильный раствор глюкозы (25 г в 100 мл воды). Отдельно готовили и вносили в среду на третьи сутки биосинтеза раствор моногидрохлорида L-лизина (25 г в 100 мл воды). На протяжении ферментации вели подпитку 9%-ным раствором палевого декстрина (разовая добавка 5,4 г/л), начиная со вторых суток и заканчивая на восьмые сутки. Культивирование штамма осуществляли при температуре 25°C в течение 10 суток. Концентрацию растворенного кислорода ( $pO_2$ ) поддерживали на уровне 60% в течение первых двух суток, затем – 30% и ниже; скорость вращения мешалки варьировали от 600 об/мин (первые 12 часов) до 800 об/мин (12-24 часа) и 1000 об/мин (после 24 часов и до окончания биосинтеза), аэрацию – от 6 л/мин (первые 12 часов) до 8 л/мин (после 12 часов и до окончания процесса), рН – от 6,5 до 7,5.

Анализ продуктов биосинтеза проводили методом ВЭЖХ.

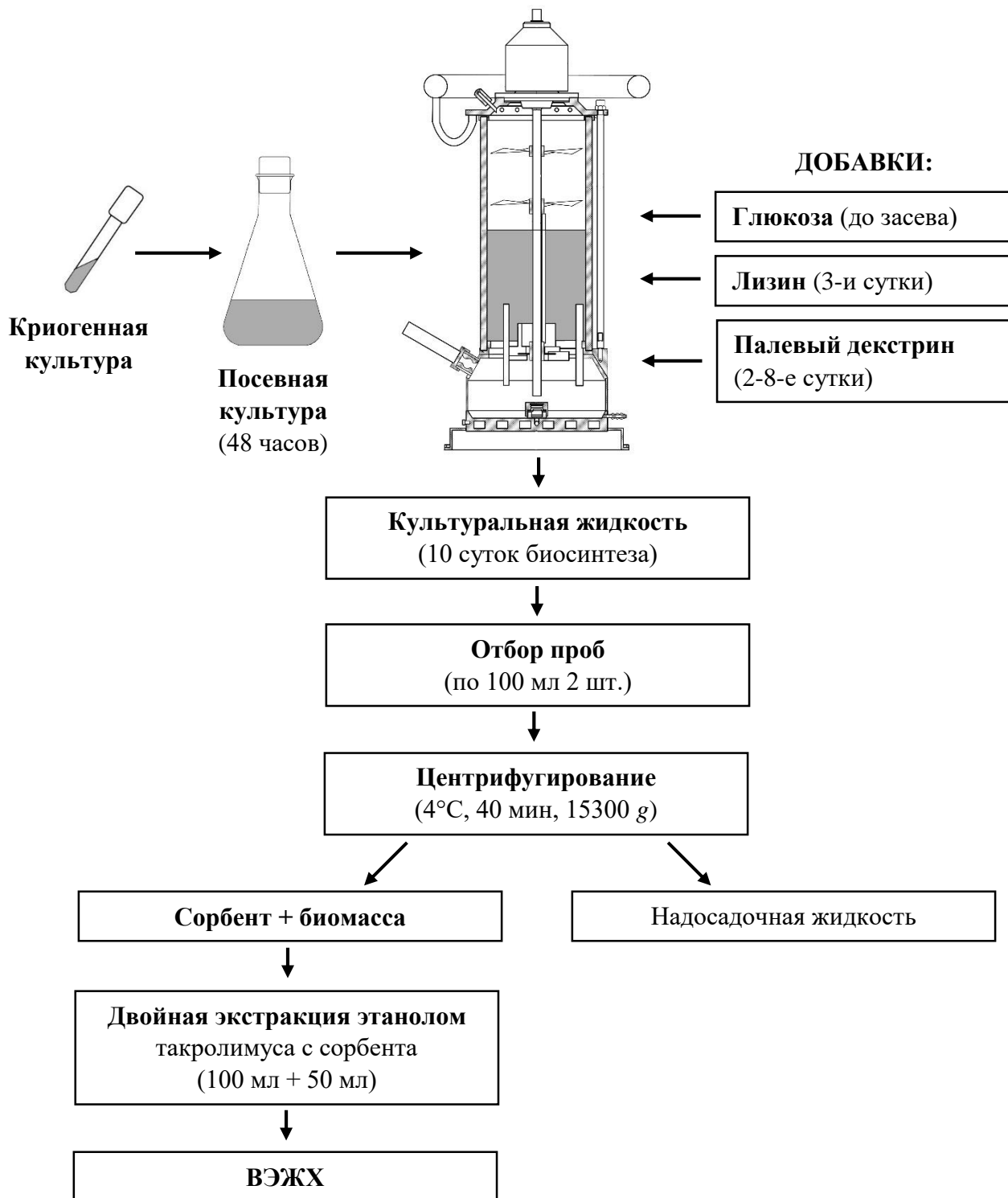
Отбирали пробы культуральной жидкости объемом 100 мл и центрифугировали для отделения осадка, затем проводили двукратную экстракцию (100 и 50 мл, соответственно) такролимуса с сорбента этанолом. Для анализа использовали объединенный этанольный экстракт.

Количественное определение такролимуса проводили 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. Расчет концентрации такролимуса проводили по калибровке с внешним стандартом на основании значений площадей пиков.

Испытания способа микробиологического синтеза такролимуса культурой *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д показали, что за 10 суток культивирования в среде накапливается 637,5-774,9 мг/л такролимуса. В результате цикла операций по отделению сорбента, содержащего такролимус, от культуральной жидкости, и элюированию такролимуса с сорбента

была предложена схема проведения процесса в ферментере и выделения целевого продукта после проведения биосинтеза в ферментере АНКУМ-2М, изложенная ниже.

**Схема проведения процесса в ферментере и выделения целевого продукта после проведения биосинтеза в ферментере АНКУМ-2М**



**Таблица сравнения операций по пяти ферментациям в аппаратах АНКУМ-2М  
с рабочим объемом 5 литров**

	№ 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				

**Сравнение достигнутого титра такролимуса на микробиологической стадии  
с известными мировыми аналогами**

Штамм	Такролимус, мг/л	Ссылка
<i>S. clavuligerus</i> CKD1119	350	Kang <i>et al.</i> , 2005
<i>S. tacrolimicus</i> ATCC 55098	330	Vaid & Narula, 2006
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	310	Kumar <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces</i> sp. 4908CGMCCNo.1288	385	Zhu & Mo, 2016
<i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488	324	Wen <i>et al.</i> , 2018
<i>S. tsukubaensis</i> CGMCC No. 0083	1082,81	Hu <i>et al.</i> , 2018
<i>S. tsukubaensis</i> T 44-7	750	Глаголев <i>с соавт.</i> , 2017
<b><i>S. tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д</b>	<b>701,1±51,6</b>	<b>данная работа</b>

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате испытаний способа микробиологического синтеза такролимуса (FK-506) штаммом *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, описанном в Лабораторном регламенте «Получение такролимуса микробиологическим способом», была продемонстрирована его эффективность на лабораторно-техническом уровне с достижением заявленных показателей биосинтеза: содержание такролимуса в среде составило 701,1±51,6 мг/л за 10 суток культивирования. Полученные показатели биосинтеза такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д являются сопоставимыми или превышают некоторые известные мировые аналоги. Способ микробиологического синтеза такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д может быть рекомендован для создания технологии получения такролимуса.

Авторы: В.Ю. Пошехонцева \_\_\_\_\_  
 В.В. Фокина \_\_\_\_\_  
 А.А. Шутов \_\_\_\_\_  
 М.В. Донова \_\_\_\_\_

Зав. УЛФ А.В. Кошелев \_\_\_\_\_