

УДК: 575.224+577.21

**ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ ЖИВЛЕННЯ Й ТЕМПЕРАТУРИ НА РІСТ І СИНТЕЗ
МОЕНОМІЦИНІВ ШТАМАМИ АКТИНОМІЦЕТІВ *STREPTOMYCES
GHANAENSIS* ATCC14672 ТА *STREPTOMYCES ALBUS* R1 МОЕНО38-5⁺**

Р. Макітринський, Є. Думич, Б. Осташ, В. Федоренко

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua*

Вивчено вплив різних факторів на біосинтез моеноміцинів штамом дикого типу *S. ghanaensis* ATCC14672 та гетерологічним господарем *S. albus* R1, що містить гени біосинтезу моеноміцинів на косміді моено38-5. Визначено оптимальні поживні середовища, що забезпечують найвищі титри продукції антибіотика штамом дикого типу та гетерологічним господарем. Підвищені концентрації глюкози спричиняють суттєве зниження рівня біосинтезу моеноміцинів. Негативний вплив на біосинтез антибіотика має і підвищений вміст неорганічного фосфату. Максимум накопичення антибіотика у міцелії припадає на п'яту добу вирощування у рідких середовищах. Для штаму *S. ghanaensis* оптимальною температурою для синтезу моеноміцинів є 37°C, тоді як *S. albus* R1 моено38-5⁺ утворює приблизно однакові кількості моеноміцинів як при 28, так і при 37°C.

Ключові слова: *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. albus* R1 моено38-5⁺, моеноміцин, антибіотик, глюкозна репресія, джерела живлення.

Актиноміцети належать до групи міцеліальних ґрунтових мікроорганізмів, яким властива складна морфологічна диференціація. Однією з основних особливостей цих бактерій є здатність синтезувати різноманітні за своєю структурою, механізмом дії та спектром застосування антибіотичні сполуки. Антибіотики використовують як антибактерійні, протигрибкові, імуносупресорні, протипухлинні препарати та ін. [3]. Чільне місце займають представники роду *Streptomyces*, які синтезують до 80% усіх відомих антибіотичних сполук, що продукують актиноміцети [5, 12].

Проблема пошуку нових антибіотичних речовин є однією з найбільш актуальних у сучасній біотехнології. Перспективною в цьому плані є родина фосфогліколіпідних антибіотиків, зокрема тих, що належать до групи моеноміцинів [7, 9, 13, 14]. Моеноміцин А (ММА) (рис. 1) діє на пептидогліканові глікозилтрансферази, що задіяні у формуванні клітинної стінки бактерій [22]. ММА – основний продукт вторинного метаболізму штаму *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672. ММА складається з хромофора *a*, залишків цукрів і фосфоліпідного ланцюга. Він активний проти багатьох грампозитивних мікроорганізмів, включаючи ванкоміцин-резистентні штами бактерій [15, 16]. Проте використання ММА у лікарській практиці обмежене поганими фармакокінетичними властивостями, зумовленими довгим ліпідним ланцюгом. Моеноміцини широко використовують як стимулятори росту тварин [4, 17].

Хімічний синтез ММА доволі складний [20], а штамам актиноміцетів дикого типу, здебільшого, характерний низький рівень продукування антибіотиків. Це стимулює до використання підходів комбінаторного біосинтезу для створення поліпшених аналогів, а також до вивчення впливу джерел живлення на ріст штаму та синтез ним,

для створення штамів зі збільшеним рівнем синтезу антибіотика. До сьогодні у літературних джерелах не описано впливу окремих компонентів середовищ на метаболізм штамів, що синтезують Мм, зокрема, джерел карбону, нітрогену, фосфору та ін.

Мета нашої роботи полягала у дослідженні впливу різноманітних факторів, що можуть впливати на рівень синтезу вторинних метаболітів штамми *S. ghanaensis* та *S. albus* R1 моено38-5⁺. Штам *S. albus* R1 моено38-5⁺ синтезує модифіковані похідні моеноміцину **1** та **2** (рис. 1) завдяки наявності у геномі космоїди моено38-5, що містить гени біосинтезу Мм [2]. Нами вивчено вплив джерел живлення та температури, підібрано оптимальне поживне середовище, що забезпечувало найвищий рівень синтезу Мм цими штамми.

У роботі використано штамми *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. albus* R1 моено38-5⁺. Як тест-культуру для визначення антибіотичної активності екстрактів зі штамів *S. ghanaensis* ATCC14672 та *S. albus* R1 моено38-5⁺ використали *Bacillus cereus* ATCC19637. Усі вищеперелічені штамми зберігаються в Колекції культур мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків Львівського національного університету імені Івана Франка.

Штами *S. ghanaensis* ATCC14672 та *S. albus* R1 моено38-5⁺ вирощували при температурах 28°C та 37°C на таких середовищах: вівсяне середовище (для отримання спор: вівсяне толокно – 50 г, агар – 16 г, вода водопровідна – 1 л), середовище YMA (дріжджовий екстракт – 4 г, мальтозний екстракт – 10 г, глюкоза – 4 г, агар – 18 г, вода дистильована – 1 л), рідке мінімальне середовище (K₂HPO₄ – 0,5 г, MgSO₄×7 H₂O – 0,2 г, FeSO₄×7 H₂O – 0,01 г, KNO₃ – 1,4 г або аспарагін – 0,5 г, глюкоза – 10 г, вода дис-

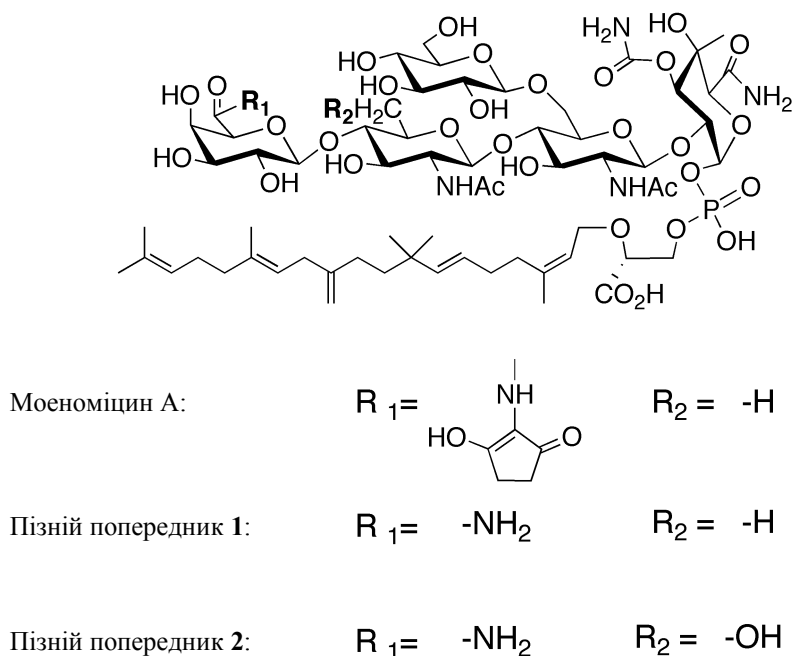


Рис. 1. Структурні формули моеноміцинів. ММА та попередник **1** накопичуються штамом *S. ghanaensis*, а сполуку **2** синтезує *S. albus* R1 моено38-5⁺.

тильована – 1 л), середовище S (глюкоза – 10 г, пептон – 4 г, дріжджовий екстракт – 4, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, KH_2PO_4 – 2 г, K_2HPO_4 – 4 г, вода дистильована – 1 л), середовище YMPG (дріжджовий екстракт – 4 г, пептон – 1 г, мальтозний екстракт – 10 г, глюкоза – 10 г, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ – 2 г, вода дистильована – 1 л), середовище SG (глюкоза – 20 г, соєвий пептон – 10 г, CaCO_3 – 2 г, вода дистильована – 1 л), середовище YEME (дріжджовий екстракт – 3 г, пептон – 5 г, мальтозний екстракт – 3 г, глюкоза – 10 г, сахароза – 340 г, вода дистильована – 1 л), середовище R5A (сахароза – 100 г, K_2SO_4 – 0,25 г, $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ – 10,12 г, глюкоза – 10 г, казамінові кислоти – 0,1 г, дріжджовий екстракт – 5 г, MOPS – 21 г, 2 мл суміші мікроелементів, вода дистильована – 1 л), середовище TSB (триптон – 17 г, гідролізат сої – 10 г, NaCl – 5 г, K_2HPO_4 – 2,5 г, глюкоза – 2,5 г, вода дистильована – 1 л). Також для вирощування актиноміцетів використовували модифікації описаних середовищ, які буде детально розглянуто далі у тексті. *B. cereus* ATCC19637 вирощували на агаризованому середовищі LB (триптон – 10 г, дріжджовий екстракт – 5 г, NaCl – 5 г, агар – 16 г, вода дистильована – 1 л) при 37°C. Штами актиноміцетів вирощували протягом 2–7 діб, *B. cereus* – 18 год.

Антибіотичну активність штамів *S. ghanaensis* та *S. albus* R1 moeno38-5⁺ знаходили методом дифузії екстрактів із паперових дисків у агар, визначаючи діаметр зони пригнічення росту тест-культури. У 100 мл колби з 15 мл середовища засівали заморожену спорову суспензію (2×10^5 к.у.о). Колби інкубували 48 год при температурі 28°C на орбітальній качалці (180 об/хв). Далі 1 мл культурального середовища засівали у 300 мл колби з 30 мл середовища. Ферментацію проводили на качалці при 180 об/хв протягом 2–7 діб, залежно від умов експерименту. Культуральне середовище центрифугували при 13 000 об/хв, супернатант зливали, біомасу двічі промивали дистильованою водою. Екстракцію проводили з 0,2 г вологого міцелію. До біомаси додавали по 300 мкл метанолу, ресуспендували протягом 3 год. Екстракти центрифугували 1 хв при 13 000 об/хв. На паперові диски наносили по 10 мкл екстракту, а також розчинника (контроль). Диски сушили 60 хв при температурі 37°C та накладали на поверхню середовища 0,7% агару зі суспензією клітин *B. cereus* (10^8 к.у.о). Чашки поміщали на 1 год при 4°C, а потім на 18 год – при 28°C. Кількість антибіотика, нанесеного на диск, визначали за діаметром зони пригнічення росту тест-культури. З цією метою нами побудовано калібрувальну криву залежності діаметра зони пригнічення росту тест-культури від кількості антибіотика, нанесеного на диск. Для побудови калібрувальної кривої використали чистий ММА, отриманий від проф. Д. Кене (відділ хімії та хімічної біології Гарвардського університету). Безхроміформні похідні ММА, що синтезує *S. albus* R1 moeno38-5⁺, приблизно у три рази менш активні за чистий ММА. Рівні синтезу моеноміцинів у таблицях, поданих у тексті, є середніми значеннями трьох незалежних експериментів. Різниця між значеннями у незалежних дослідах не перевищувала 20%.

У літературних джерелах описано багато різних умов ферментації та середовищ, які підтримують високий рівень продукування моеноміцинів природними штамми [19]. Це ускладнює виявлення тих факторів, які найбільше сприяють синтезові моеноміцинів або обмежують його. Нами було досліджено ріст штаму *S. ghanaensis* та синтез ММА у рідкому мінімальному середовищі. До сольового розчину додавали джерело нітрогену та карбону. Спочатку використано NaNO_3 як джерело нітрогену і глюкозу як джерело карбону. Проте ріст штаму у цьому середовищі був дуже слабким: на шосту добу ферментації виявлено близько 0,2 мг сухої маси на 1 мл середовища. Концентрування біомаси з 30 мл середовища з подальшою екстракцією моеноміцинів не дало змоги виявити

зони пригнічення росту тест-культури. Це навело на думку, що використання NaNO_3 як джерела азоту може бути недоцільним у зв'язку з певними фізіологічними особливостями метаболізму нітрогену цим стрептоміцетом. Однак використання інших органічних джерел нітрогену (зокрема аспарагіну) не поліпшувало ріст штаму.

З огляду на поганий ріст *S. ghanaensis* у рідких мінімальних середовищах, вирішили перевірити низку багатих повноцінних середовищ за рівнем синтезу МмА. З цією метою використано такі середовища: S, YMPG, TSB, SG, R5A, R5A (без MOPS). У середовищі S ріст штаму був дрібнодисперсним, проте накопичення біомаси виявилось найменшим порівняно з іншими середовищами (табл. 1). Середовище YMPG забезпечувало дисперсний ріст штаму, накопичення біомаси становило 4,7 мг сухої ваги на 1 мл середовища. У SG ріст штаму виявився грубодисперсним, суха біомаса з 1 мл середовища становила 5,1 мг. Проте рівень синтезу антибіотика у цьому середовищі був низьким (табл. 1).

Середовище R5A забезпечувало хороший дисперсний ріст, накопичення біомаси у ньому становило 8 мг/мл: вона була найбільшою з-поміж усіх використаних. Проте рівень синтезу антибіотика у ньому був одним з найнижчих і становив 0,06 мкг/мг сухої ваги. Слід зазначити, що буфер MOPS, який входить до складу R5A, негативно впливає на продукування МмА штамом *S. ghanaensis* (табл. 1). У середовищі TSB штам нагромаджував 3 мг біомаси на 1 мл середовища і синтезував 0,8 мкг антибіотика на 1 мг сухої ваги. Це найвищий показник серед усіх досліджених середовищ. Отже, TSB забезпечує найвищий титр продукції антибіотика.

Таблиця 1

Біосинтез моеноміцину А у різних повноцінних рідких середовищах

Середовище	Біомаса (суха вага, мг/мл)	Мм	
		мкг/мл	мкг/мг сухої ваги
TSB	3	2,3	0,8
S	2,45	0,24	0,1
R5A	8	0,5	0,06
R5A(без MOPS)	7	1	0,15
SG	5,1	0,24	0,05
YMPG	4,7	0,25	0,05

Відомо, що глюкоза й інші сполуки, які легко засвоюються, можуть впливати на ріст мікроорганізмів і синтез ними метаболітів. У літературі визначено вплив глюкози на метаболізм багатьох стрептоміцетів, також описано інгібування синтезу антибіотиків [10, 20]. Використавши середовище TSB, ми дослідили вплив різних концентрацій глюкози на біосинтез Мм штамом *S. ghanaensis*. Нами використано такі концентрації глюкози: 1, 3 і 5%. Контрольним було вихідне TSB, що містить 0,25% глюкози. Зростання концентрацій глюкози у середовищі сприяло нагромадженню біомаси штамом (табл. 2). У середовищі з 5% глюкози штам накопичував 12 мг сухої маси на 1 мл середовища, що у 4 рази більше, ніж у TSB, проте рівень синтезу МмА у цьому середовищі суттєво знижувався до 0,008 мкг/мл антибіотика (рис. 2). Цей показник у 100 разів менший за аналогічний у вихідному середовищі TSB, що свідчить про глюкозну репресію біосинтезу МмА.

Визначили вплив фосфатів на ріст і синтез моеноміцинів штамом *S. ghanaensis* у середовищі TSB. Зростання концентрації неорганічних фосфатів до 28 мМ пригнічує

біосинтез ММА штамом, порівняно з контрольним середовищем (табл. 3). Найвищий рівень синтезу простежується у середовищі, в яке не вносили додатково джерел фосфору. Очевидно, що для метаболізму штаму достатньо фосфору, який міститься у компонентах TSB, зокрема триптоні та соєвому гідролізаті. Слід зауважити, що у середовищі TSB, яке містить 14 мМ фосфатів, також, хоча й не так виразно, спостерігається пригнічення синтезу антибіотика. Отже, можна припустити, що біосинтез ММА у штамі *S. ghanaensis* підлягає фосфатній репресії. Аналізуючи дані про накопичення біомаси штамом, можна зробити висновок, що зміна концентрації фосфатів у середовищі не впливає на його ріст.

У промислових масштабах для вирощування актиноміцетів використовують середовища на основі складних компонентів рослинного походження, що часто не мають сталого хімічного складу. Ми вирішили дослідити, чи можливо на основі TSB створити простіше середовище. Спершу вилучили глюкозу із досліджуваного середовища. Без глюкози рівень синтезу моеноміцинів незначно зростає і становить 1 мкг/мг сухої ваги. Нагромадження біомаси штамом суттєво не відрізнялося від вихідного середовища. Брак соєвого гідролізату у середовищі не впливав на рівень синтезу антибіотика. Без додавання у середовище неорганічних фосфатів рівень синтезу моеноміцину зростав до 1,2 мкг/мл. За відсутності триптону штам майже не нагромаджував біомаси. Із результатів видно, що оптимальним середовищем є спрощене TSB (позначене як sTSB), яке містило лише триптон і NaCl. У ньому штам продукував близько 2 мкг антибіотика на 1 мг сухої ваги.

Важливим аспектом промислового синтезу антибіотика є температура ферментації. Ми дослідили рівні синтезу ММА штамом *S. ghanaensis* у TSB за різних температур вирощування, а саме 28°C та 37°C. За температури 37°C штам накопичував більше антибіотика, ніж за температури 28°C. При 37°C рівень синтезу ММА становив 1,1 мкг/мг, що на 0,3 мкг більше, ніж при температурі 28°C.

Важливим завданням є визначення динаміки росту штаму та синтезу ним антибіотиків. З цією метою вирощували *S. ghanaensis* у середовищі sTSB протягом шести діб.

Таблиця 2

Вплив різних концентрацій глюкози на рівень синтезу моеноміцину А

Середовище	Біомаса (суха вага, мг/мл)	ММА	
		мкг/мл	мкг/мг сухої ваги
TSB (0,25% глюкози)	3	2,3	0,8
TSB (1% глюкози)	5	1,7	0,3
TSB (3% глюкози)	9	0,5	0,05
TSB (5% глюкози)	12	0,1	0,008

Таблиця 3

Вплив різних концентрацій фосфатів на рівень синтезу моеноміцину А штамом *S. ghanaensis*

Середовище	Біомаса (суха вага, мг/мл)	ММА	
		мкг/мл	мкг/мг сухої ваги
TSB (14 мМ, 0,25% Глюкоза)	3	2,3	0,8
P 28 мМ, 1% Глюкоза	5	1	0,2
P 28 мМ, -Глюкоза	3	0,5	0,15
-P, -Глюкоза	3	6	2
-P, 1% Глюкоза	4	1,6	0,4

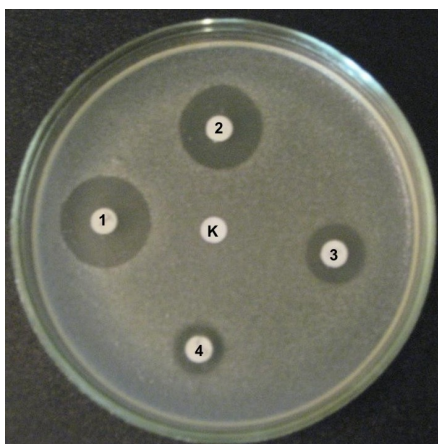


Рис. 2. Результати біотесту екстрактів із *S. ghanaensis*, що росли у середовищах із різними концентраціями глюкози: 1 – 0,25%, 2 – 1%, 3 – 3%, 4 – 5%, К – метанол.

Екстракцію антибіотика та визначення рівня нагромадження біомаси проводили, починаючи з другої доби від моменту початку ферментації. Вже на другий день росту штам нагромаджував 0,12 мкг МмА на 1 мг сухої ваги (табл. 4). До п'ятої доби вирощування кількість антибіотика збільшувалася і становила 2 мкг/мг. Після п'ятої доби ферментації збільшення концентрації МмА у біомасі не спостерігалось. Отже, оптимальним є вирощування штаму протягом п'яти діб.

Ми також дослідили вплив різних факторів на ріст і синтез моеноміцинів штамом *S. albus* R1 моено38-5⁺ – гетерологічним господарем для експресії генів біосинтезу моеноміцину. Серед досліджених середовищ (S, YMPG, TSB, SG, R5A) найвищі титри моеноміцину забезпечувало R5A. У цьому середовищі штам нагромаджував близько 0,3 мкг/мг антибіотика. При зростанні концентрації глюкози до 5% у середовищі R5A

рівень синтезу антибіотика дещо знижувався і становив 0,2 мкг/мг. Це свідчить, що глюкоза репресує біосинтез моеноміцину, проте репресія не виражена так чітко, як у випадку *S. ghanaensis*. Вивчили вплив температур на ріст і синтез Мм у штамі *S. albus* R1 моено38-5⁺. Вирощування штаму при 28°C та 37°C суттєво не впливає на біосинтез моеноміцинів.

Далі нами проведено низку спроб спростити вихідне середовище R5A для штаму *S. albus* R1 моено38-5⁺. Виявлено, що буфер MOPS негативно впливає на біосинтез моеноміцинів: без нього рівень синтезу зростав на 20–30%. До складу R5A входить 100 г/л сахарози, тому ми спробували вилучити цей компонент, але без сахарози рівень синтезу антибіотика був нижче рівня чутливості тест-культури. У середовищі без глюкози рівень синтезу моеноміцинів незначно знижувався і становив 0,25 мкг/мг. Без дріжджового екстракту ріст штаму повністю припинявся. Такі компоненти R5A, як мікроелементи та казамінові кислоти суттєво не впливали на ріст штаму *S. albus* R1 моено38-5⁺ і синтез ним моеноміцинів. Завдяки проведеним дослідом нам вдалося отримати оптимальне спрощене середовище R5A, у якому є 5% сахарози, замість 10%, без казамінових кислот, мікроелементів і буфера MOPS.

Завдяки нашим експериментам із вивчення впливу різних факторів на біосинтез моеноміцинів підібрано оптимальні поживні середовища для штамів дикого типу та

Таблиця 4

Динаміка росту та синтезу моеноміцину А штамом *S. ghanaensis*

День росту	Біомаса (суха вага, мг/мл)	Мм	
		мкг/мл	мкг/мг сухої ваги
2	1,3	0,15	0,12
3	1,7	0,35	0,2
4	2,2	3	1,4
5	3	6	2
6	3,2	6,2	1,9

гетерологічного господаря. Наші дослідження багатих середовищ виявили, що оптимальними компонентами, необхідними для росту і синтезу антибіотика цими стрептоміцетами, є триптон і дріжджовий екстракт. Так, складові компоненти триптону (набір різноманітних амінокислот, пептидів) і NaCl забезпечують потреби штаму *S. ghanaensis* ATCC14672 у всіх джерелах живлення. Також таке спрощене середовище дає найвищі титри синтезу ММА. Вилучення дріжджового екстракту зі середовища R5A спричинило повне припинення росту *S. albus* R1 моено38-5⁺, що може бути зумовлено ауксотрофністю цього мікроорганізму за валіном й ізолеїцином [6]. Хоча у середовищі без дріжджового екстракту, але з додаванням валіну й ізолеїцину, ріст штаму відновлювався, однак синтез антибіотика прямував до нуля. Це вказує на те, що для біосинтезу моеноміцину цим стрептоміцетом необхідні “будівельні блоки”, що входять до складу дріжджового екстракту (пептиди, амінокислоти, вітаміни, кофактори та ін.). Також ми виявили, що біосинтез ММА у штамі *S. ghanaensis* ATCC14672 підлягає глюкозній репресії. У штамі *S. albus* R1 моено38-5⁺ теж спостерігається пригнічення біосинтезу досліджуваної сполуки підвищеними концентраціями глюкози, однак не так сильно, як у штамі дикого типу. Схожі результати отримано для біосинтезу олеандомицину у *S. antibioticus*, еритроміцину в *Saccharopolyspora erythraea*, доксорубіцину в *S. peucetius* subspecies *caesius* та ін. [1, 8, 10, 21].

Для більшості відомих стрептоміцетів оптимальною температурою для росту і синтезу антибіотиків є 25–30°C. Після проведених нами експериментів можна констатувати, що температурним оптимумом для біосинтезу ММА штамом *S. ghanaensis* ATCC14672 є 37°C. При вирощуванні за цієї температури штам нагромаджував приблизно на 30% антибіотика більше, ніж при 28°C. Це може бути зумовлено еволюційною історією цього штаму, що був виділений із ґрунтів екваторіальної Африки. Для штаму *S. albus* R1 моено38-5⁺ температура вирощування суттєво не впливала на біосинтез моеноміцинів. Для штаму дикого типу та гетерологічного господаря оптимум накопичення антибіотика спостерігали на п’яту добу росту в рідких поживних середовищах.

1. Дубицкая Л. П., Федоренко В. А. Влияние глюкозы на антибиотическую активность и резистентность к антибиотикам у *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2 и его мутантов // Антибиот. химиотер. 2002. Т. 47. № 6. С. 7–11.
2. Макітринський Р. П., Осташ Б. О., Федоренко В. О. Конструювання штамів актиноміцетів – гетерологічних господарів для експресії генів біосинтезу моеноміцинів // Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика: IV Міжнар. наук.-практ. конф. Дніпропетровськ, 11–13 листопада 2008 р. Дніпропетровськ, 2008. С. 113–114.
3. Федоренко В. О., Осташ Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Видавн. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 277 с.
4. Adachi M., Zhang Y., Leimkuhler C. et al. Degradation and reconstruction of moenomycin A and derivatives: dissecting the function of the isoprenoid chain // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128. P. 14012–14013.
5. Champness W., Brun Y. V., Skimkets L. J. Actinomycete development, antibiotic production and phylogeny: questions and challenges // Prokaryotic development. American Society for Microbiology, Washington DC. 2000. P. 11–31.
6. Chater K. F., Wilde L. C. *Streptomyces albus* G mutants defective in the SalGI restriction-modification system // J. Gen. Microbiol. 1980. Vol. 116. P. 323–334.

7. Cheng T. J., Sung M. T., Liao H. Y. et al. Domain requirement of moenomycin binding to bifunctional transglycosylases and development of high-throughput discovery of antibiotics // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 431–436.
8. Escalante L., Lopez H., Mateos R. C. et al. Transient repression of erythromycin formation in *Streptomyces erythraeus* // J. Gen. Microbiol. 1982. Vol. 128. P. 2011–2015.
9. Goldman R. C., Gange D. Inhibition of transglycosylation involved in bacterial peptidoglycan synthesis // Curr. Med. Chem. 2000. Vol. 7. P. 801–820.
10. Hänel F., Krügel H., Fiedler G. Arsenical resistance of growth and phosphate control of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* // J. Gen. Microbiol. 1989. Vol. 135. P. 583–591.
11. Hodgson D. A. Glucose repression of carbon source uptake and metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its perturbation in mutants resistant to 2-deoxyglucose // J. Gen. Microbiol. 1982. Vol. 128. P. 2417–2430.
12. Kieser T., Bibb M., Buttner M. J. et al. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich, England: The John Innes Foundation, 2000. 634 p.
13. Lovering A. L., de Castro L. H., Lim D., Strynadka N. C. Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis // Science. 2007. Vol. 315. P. 1402–1405.
14. Ostash B., Walker S. Bacterial transglycosylase inhibitors // Curr. Opin. Chem. Biol. 2005. Vol. 9. P. 459–466.
15. Ostash B., Saghatelian A., Walker S. A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A // Chem. Biol. 2007. Vol. 14. P. 257–267.
16. Ostash B., Makitrinsky R., Walker S., Fedorenko V. Identification and characterization of *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 integration sites for three actinophage-based plasmids // Plasmid. 2009. Vol. 61. P. 171–175.
17. Ostash B., Doud E. H., Lin C. et al. Complete characterization of seventeen step moenomycin biosynthetic pathway // Biochemistry. 2009. Vol. 48. P. 8830–8841.
18. Sambrook J., Russel D. W. Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory. NY, USA: Cold Spring Harbor. 2001. P. 2344.
19. Shuricht U., Hennig L., Findeisen M., Welzel P. On the biosynthesis of moenocinol, the lipid part of the moenomycin antibiotics // Tetrahedron Lett. 2000. Vol. 41. P. 3047–3051.
20. Taylor J., Li X., Oberthür M. et al. The total synthesis of moenomycin A // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128. P. 15084–15085.
21. Vilches C., Mendez C., Hardisson C., Salas J. A. Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance // J. Gen. Microbiol. 1990. Vol. 136. P. 1447–1454.
22. Yuan Y., Fuse S., Ostash B. Structural analysis of the contacts anchoring moenomycin to peptidoglycan glycosyltransferases and implications for antibiotic design // ACS Chem. Biol. 2008. Vol. 3. P. 429–436.

THE EFFECT OF NUTRIENT FACTORS AND TEMPERATURE ON GROWTH AND MOENOMYCIN PRODUCTION LEVELS OF *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672 AND *STREPTOMYCES ALBUS* R1 MOENO38-5⁺

R. Makitrynskyy, Y. Dumych, B. Ostash, V. Fedorenko

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua*

The effect of different factors on growth and moenomycin production levels of wild type strain *S. ghanaensis* ATCC14672 and heterologous host *S. albus* R1 moeno38-5⁺ carrying moenomycin biosynthetic genes was investigated. The aim of the study was creation of optimal media providing the highest levels of moenomycin production for wild type strain and heterologous host. Increased concentrations of glucose cause considerable reduction of moenomycin production level. Increased concentrations of nonorganic phosphates have the same effect. Growth and moenomycin production dynamics of *S. ghanaensis* ATCC14672 and *S. albus* R1 moeno38-5⁺ were determined. Maximum of antibiotic accumulation in mycelium was observed on 5-th day of growth in liquid media. The optimal temperature for moenomycin biosynthesis by *S. ghanaensis* is 37°C, while *S. albus* R1 moeno38-5⁺ produces almost equal quantities of moenomycin at 28°C and at 37°C.

Key words: *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. albus* R1 moeno38-5⁺, moenomycin, antibiotic, glucose repression, nutrient factors.

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ ПИТАНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА РОСТ И СИНТЕЗ МОЕНОМИЦИНОВ ШТАММАМИ АКТИНОМИЦЕТОВ *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672 И *STREPTOMYCES ALBUS* R1 MOENO38-5⁺

Р. Макитринский, Е. Думич, Б. Осташ, В. Федоренко

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua*

Изучено влияние различных факторов на биосинтез моеномицинов штаммом дикого типа *S. ghanaensis* ATCC14672 и гетерологическим хозяином *S. albus* R1, содержащим гены биосинтеза моеномицинов в космиде моено38-5. Определены оптимальные питательные среды, обеспечивающие наивысшие титры продукции моеномицинов штаммом дикого типа и гетерологическим хозяином. Повышенные концентрации глюкозы значительно снижают уровень биосинтеза моеномицинов. Негативный эффект на биосинтез моеномицинов оказывают повышенные концентрации неорганических фосфатов. Максимум накопления антибиотика в мицелии приходился на пятые сутки выращивания в жидких средах. Для штамма *S. ghanaensis* оптимальной температурой для синтеза моеномицинов является 37°C, в то время как *S. albus* R1 моено38-5⁺ образует приблизительно одинаковые количества моеномицинов как при 28, так и при 37°C.

Ключевые слова: *S. ghanaensis* ATCC14672, *S. albus* R1 моено38-5⁺, моеномицин, антибиотик, глюкозная репрессия, источники питания.

Стаття надійшла до редколегії 05.11.09

Прийнята до друку 03.12.09