

Базилбеков Б.М., Доолоткелдиева Т.Д.

**STREPTOMYCES БАКТЕРИЯСЫНЫН НЕГИЗИНДЕ БИОПРОДУКТУНУ
ӨНДҮРҮҮҮҮҮЧҮН ИНОКУЛУМ ДАЯРДООДО АЗЫК ЧӨЙРӨЛӨРҮНҮН КУРАМЫН
ЖАНА ТЕХНИКАЛЫК КӨРСӨТКҮЧТӨРҮН ОПТИМАЛДАШТЫРУУ**

Базилбеков Б.М., Доолоткелдиева Т.Д.

**ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ТЕХНИЧЕСКИЕ
ПОКАЗАТЕЛИ ПОЛУЧЕНИЯ ИНОКУЛУМА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА
БИОПРОДУКТА НА ОСНОВЕ STREPTOMYCES БАКТЕРИЙ**

B.M. Bazilbekov, T.D. Doolotkeldieva

**OPTIMIZATION OF THE NUTRITIONAL MEDIUM COMPOSITION AND TECHNICAL
PARAMETRES OF OBTAINING AN INOCULUM FOR THE PRODUCTION
OF BIOPRODUCTS BASED ON STREPTOMYCES BACTERIA**

УДК: 541.18(076.5)/663.15

Жапайы жана маданий өсүмдүктөрдүн ризосферасынан бөлүнүп алынган *Streptomyces* штаммдары - *Streptomyces alfalfae* CI-4, *Streptomyces* sp. Pch-3 жана *Streptomyces lividans* TR-59 бул изилдөөдө инокулумду жана биопродукт алуу үчүн колдонулду. Ачытууга керек болгон инокулум РТС-1 микробиореакторунда (Reverse-Spin®, BIOSAN), андан кийин шейкерде (Инкубатор шейкер ES-20/80 (BIOSAN)) этап-этабы менен даярдалды. Ачытууга жумиалган ар кандай азык чөйрөлөрү жана техникалык параметрлери изилденди. Ири масштабда антибиотиктерди жана башка биологиялык активдүү метаболиттерди өндүрүү үчүн оптималдуу шарттарды колдонуу менен инокулят даярдалды.

Негизги сөздөр: биомасса *Streptomyces*, инокулум, условия ферментации, технические характеристики.

Штаммы *Streptomyces* выделенные из ризосферы диких и культурных растений, идентифицированные как *Streptomyces alfalfae* CI-4, *Streptomyces* sp. Pch-3 и *Streptomyces lividans* TR-59 были использованы в данном исследовании для получения инокулума и биопродукта. Инокулум для ферментации по этапно был приготовлен в микробиореакторе RTS-1 (Reverse-Spin®, BIOSAN), потом шейкере (Шейкер-инкубатор ES-20/80 (BIOSAN)). Различные питательные среды и технические параметры ферментации были изучены для увеличения выхода биомассы. Подготовлен инокулум для производства антибиотиков и других биологически активных метаболитов в больших масштабах с использованием оптимальных условий.

Ключевые слова: *Streptomyces* биомассасы, инокулум, ферментация шарттары, техникалык мүнөздөмөлөрү.

Streptomyces strains isolated from the rhizosphere of wild and cultivated plants, identified as *Streptomyces alfalfae* CI-4, *Streptomyces* sp. Pch-3 and *Streptomyces lividans* TR-59 were used in this study to obtain inoculum and bioproduct. Inoculum for fermentation was prepared step by step in an RTS-1 microbioreactor (Reverse-Spin®, BIOSAN), then a shaker (Incubator shaker ES-20/80 (BIOSAN)). Various culture media and technical parameters of fermentation were studied to increase the biomass yield. Prepared inoculum for the production of antibiotics and other biologically active metabolites on a large scale using optimal conditions.

Key words: *Streptomyces* biomass, Inoculum, fermentation conditions, technical specifications.

Введение. Почвенные актиномицеты, составляющие род *Streptomyces* наиболее известны по своим экономическим значением, как производители антибиотиков, витаминов и ферментов, и играют важную

роль в развитии биотехнологии в настоящем и будущем. Многие антибиотики и ферменты, полученные из актиномицетов коммерциализированы и продаются в биотехнологическом рынке, и проводится множество исследований в поисках новые метаболитов из этих микробов [1,2].

В процессе коммерциализации метаболита, выход и себестоимость продукции являются важными показателями, чтобы получить максимум метаболита при минимальных затратах производства. Оптимизация параметров влияющих на выработку метаболита - одна из самых старых, самых дешевых и простых методов, чтобы получить наилучшие урожаи без метаболической или генной инженерии [3].

Для оптимизации изучаются различные параметры ферментации, в том числе тип ферментационной среды, температура, pH, скорость перемешивания для аэрации, длительность ферментации, размер инокулята и влияние различных концентраций ингредиентов ферментации [4].

Это исследование было направлено на оптимизацию параметров ферментации культур *Streptomyces* обеспечивающих увеличения выхода антибиотика и других физиологически активных метаболитов путем получения инокулума в минибиореакторе и шейкере.

2. Материал и методы. 2.1.Продуценты метаболитов. Для ферментации были выбраны активные штаммы *Streptomyces*, изолированные из ризосферы растений: *Streptomyces alfalfae*, CI-4, *Streptomyces* sp. Pch-3, *Streptomyces lividans* TR-59.

Для получения биоактивных метаболитов штаммы *Streptomyces* выращивали на питательной среде крахмально-аммонийного агара (КАА) при 28°C. После 7 дней инкубации мицелий срезали и переносили в заранее подготовленные составы питательных сред.

2.2. Жидкие питательные среды для приготовления инокулума и ферментации. За основу брали КАА и овсяную среду, с добавлением к ней источника углевода и без него, с разными pH значениями и аэрации (разные показатели оборотов вращения) воздуха.

1) Крахмально-аммиачная среда (КАА):

Состав (в граммах на 1 дм³ дистиллированной воды):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0; K_2HPO_4 - 1,0;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,0; NaCl - 1,0; CaCO_3 - 3,0;

крахмал растворимый - 10,0;

Крахмал предварительно растворяют в 50 см³ дистиллированной воды и приливают к основной среде до стерилизации. Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С, давлении 101,3 кПа в течение 30 мин.

2) Овсяная среда:

Овсяные хлопья – 20 г; солевой раствор - 1,0 мл; рН 7,2, температура - 28 °С, 150 оборотов вращения/мин, 10% посевной материал; подача воздуха - 4 мг/мин.

3) Овсяная среда, с источником углеводов:

Овсяные хлопья – 20 г; солевой раствор - 1,0 мл; глюкоза - 1 г; рН 7,2, температура - 28 °С. 150 г оборотов вращения / мин, 10% посевной материал; подача воздуха - 4 мг / мин.

2.3. Научные оборудования для ферментации.

2.3.1. RTS-1 – это запатентованный биоредактор, использующий запатентованную технологию Reverse-Spin®, которая представляет собой неинвазивный, механический, низкоэнергетический, инновационный тип перемешивания. Обратное - принцип перемешивания Spin® позволяет получить до 450 кг высококачественного (ч-1), что необходимо для эффективного аэробного культивирования в 50-миллилитровых пробирках Falcon. Индивидуально управляемый биореактор ускоряет процесс оптимизации. Оптическая система, близкая к инфракрасной, позволяет нам регистрировать кинетику роста клеток.

2.3.2. Шейкер-инкубатор ES-20/80 для биотехнологических и фармацевтических лабораторий – это профессиональная категория оборудования. Агрегат оснащен тремя эксцентриковыми механизмами движения платформы, которые обеспечивают высокие характеристики балансировки, высокую надежность и бесшумную работу. Достигнутая стабильность блока при интенсивном перемешивании позволяет штабелировать до 3 единиц, что экономит место. Новый дисплей и пользовательский интерфейс обеспечивают точное и интуитивно понятное управление пользовательскими настройками, а также возможность записывать, хранить и отображать данные с течением времени.

3. Результаты. В вышеупомянутых в жидких средах культуры штаммов *Streptomyces* встряхивали в 20-миллилитровой пробирке в микрореакторе **RTS-1** (ВИОСАН) и в 100-миллилитровых колбах в шейкер-инкубаторе ES-20/80 (ВИОСАН), создавая различные степени аэрации путем увеличения или уменьшения оборотов вращения (от 150 до 220 оборотов/мин).

Ферментация культур производили в течение 96 часов.

Через каждый час брали образцы из микробиореактора измеряли рН, производили подсчет спор и клеток на 1 мл среды, взвешивали сухой вес получаемой биомассы, готовили окрашенные препараты и исследовали под микроскопом на чистоту и гомогенность роста клеток, появления спор на мицелии.

В конце ферментации был выбран самый оптимальный состав питательной среды и оптимальные технические показатели микрореактора, которые обеспечили наибольший выход биомассы инокулума. Составлены графики, отражающие динамику изменения рН среды в течение ферментации и выхода биомассы.

Изменения показателей рН среды во время ферментации. При выращивании любого микроорганизма в биореакторе следует периодически измерять рН, поскольку изменения рН с течением времени указывают на изменения жизнеспособности культуры и метаболитов, секретируемых стрептомицетами. Показатели рН 2 мл культуральной жидкости измеряли электродом измерителя и записывали числовые значения, отображаемые на дисплее. После каждого измерения электрод рН-метра промывали дистиллированной водой, чтобы получить точные значения.

Как видно из рисунков (1, 2 и 3), почти у всех штаммов в испытуемых питательных средах значения рН снизились с нейтрального до кислого уровня после того, как культура начала расти. В течение 48 часов значение рН изменилось с низкой скоростью. Значение рН резко упало с 48 часов до 72 часов времени культивирования. Это время совпадает с тем периодом, когда стрептомицеты растут в логарифмической фазе. Изменения значения рН среды в кислую сторону объясняется увеличением количества первичных и вторичных метаболитов, секретируемых развивающейся культурой стрептомицетов. Со временем культура стрептомицетов начинает синтезировать аминокислоты, которые являются мономерами ферментов и белков. Резкое снижение кислотности среды связано с наличием аминокислот и других органических кислот. Следует отметить, что в овсяной среде, имеющей в своем составе минеральной соли, у всех штаммов наблюдалось плавное снижение значения рН через 24 часа роста, через 48 часов оно составило 7,2. И такое значение сохранилось до 72 часа. Через 96 часов значение рН снизилось плавно до 6,9. Это свидетельствует о том, что состав этой среды был более оптимальным чем другие среды для физиологической потребности культур и деления клеток по логарифмической последовательности. Стационарная фаза наступила через 72 часа и накопление вторичных метаболитов и веществ обмена веществ привело к снижению значения рН в сторону кислотности.

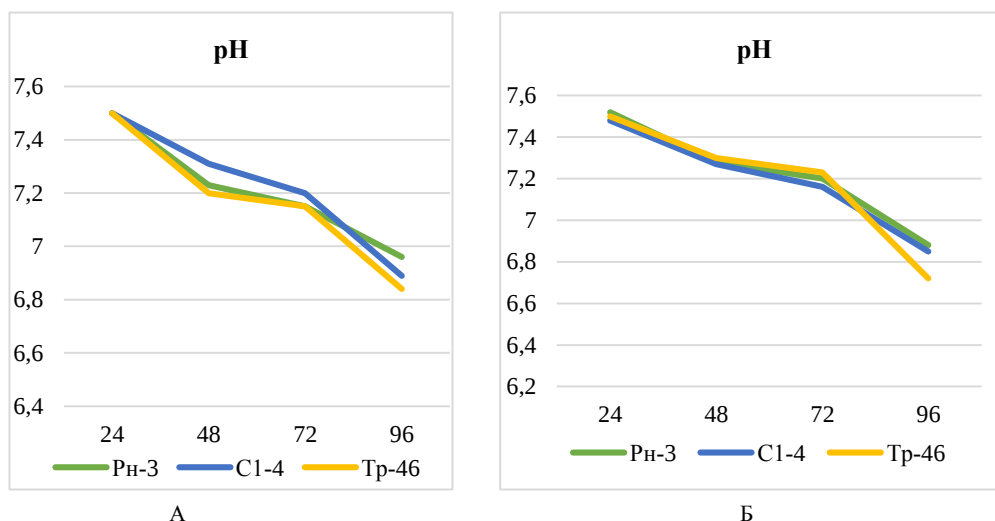


Рис. 1. А - динамика изменения значения pH при культивировании штаммов стрептомицетов в среде КАА; Б - динамика изменения значения pH при культивировании штаммов стрептомицетов в овсяной среде со минеральной солью

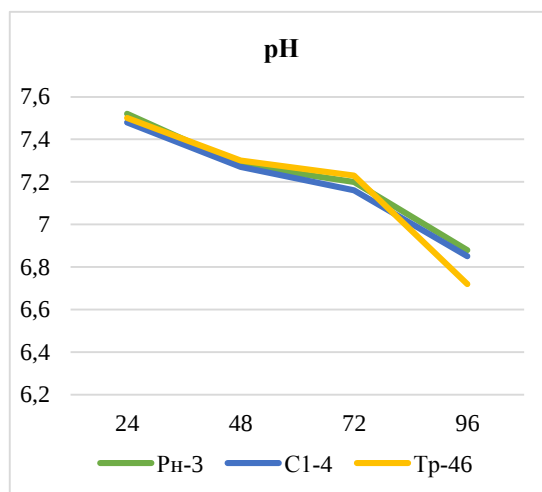


Рис. 2. Динамика изменения значения pH при культивировании штаммов стрептомицетов в овсяной среде со глюкозой.

Определение сухой массы. Подготовили фильтровальную бумагу для определения массы сухого вещества. Их разрезали по размеру в соответствии с диаметром воронки вакуумного фильтра, помещали в чашку Петри и стерилизовали в автоклаве при 120-121 °C и 0,5 атмосфер в течение 20 минут. Используемую массу бумаги предварительно взвесили, сверху на воронку поместили фильтровальную бумагу, налили 1 мл культуральной жидкости и вакуумировали. Оставшиеся на фильтре частицы биомассы помещали в сушильный шкаф при 70 °C на 30-50 минут. Фильтровальную бумагу вынули из сушильного шкафа и охладили примерно на полчаса. Фильтр повторно нагревали, когда он достигает комнатной температуры,

чтобы достичь постоянной сухой массы получаемой биопродукции.

$m (с.в. + ф.)$ - масса сухого вещества и фильтровальной бумаги

$m (ф.)$ - масса фильтровальной бумаги

$m (с.в.)$ - масса сухого вещества $m (с.в.) = m (с.в. + ф.) - m (ф.)$

$m (с.с.)$ - масса сухого вещества в среде

$m (б.)$ - масса сухого вещества биомассы $m (б.) = m (с.в.) - m (среды)$

После записи числовых значений в таблицу (табл. 1) получали графики увеличения сухой массы биомассы с течением времени (рис. 3).

Таблица 1

Значение полученной сухой биомассы штаммов через 96 часов культивирования

96 саат	Рч-3	С1-4	Тр-46
m (с.в. + f.)	0,921	0,923	0,919
m (ф.)	0,89	0,89	0,89
m (с.в)	0,031	0,033	0,029
m (cc)	0,003	0,003	0,003
m (б.)	0,028	0,03	0,026

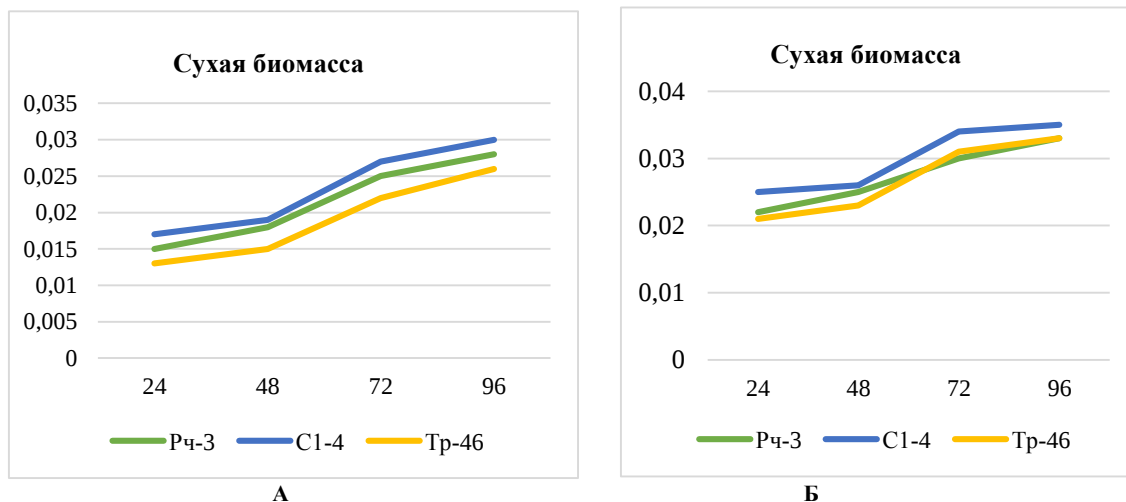


Рис. 3. А - Динамика изменения сухой биомассы штаммов стрептомицетов при культивировании в среде КАА; Б - динамика изменения сухой биомассы штаммов стрептомицетов при культивировании в овсяной среде со минеральной солью.

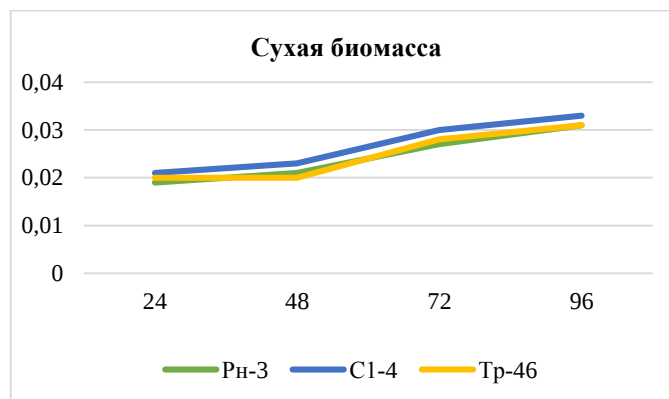


Рис. 4. Динамика изменения сухой биомассы штаммов стрептомицетов при культивировании в овсяной среде с источником углевода.

Как показывают результаты ферментации (рис. 3 и 4), во всех трех изучаемых питательных средах прирост биомассы у всех штаммов стрептомицетов начался через 24 часа с начала культивирования.

В крахмально-аммиачной среде резкое нарастание биомассы наблюдалось в период между 48-72 часами, потом плавно увеличивалось до 96 ч. Выход биомассы *Streptomyces alfalfae* CI-4 был более высоким по сравнению с остальными штаммами, он сос-

тавлял 0.03 г/мл среды. При культивировании в овсяной среде с минеральной солью прирост биомассы также начался через 24 ч. И резкий скачок увеличения биомассы произошел между 48-72 часами и оставался на таком же уровне до 96 ч. В этой среде опять же *Streptomyces alfalfae* CI-4 штамм отличался по продукции ферментации в течение 96 ч. Выход биомассы этого штамма достиг 0.035 г/мл. Остальные штаммы в этой среде дали 0.003 г/мл.

В овсяной среде со глюкозой прирост биомассы также начался через 24 ч., постепенное нарастание произошло до 72 ч. и дальше до 96 ч. Выход биомассы у штамма *Streptomyces alfalfae* CI-4 равнялся 0.03г/мл, у остальных ниже - 0,028 и 0,026г/мл.

Таким образом на основе полученных результатов можно прийти к следующим выводам:

1. Оптимальным составом для наиболее большего выхода биомассы культивируемых штаммов стрептомицетов и получение инокулума можно считать овсяную среду с минеральной солью. Это среда больше отвечает физиологическим потребностям изучаемых штаммов, чем остальные среды.

2. При глубинном культивировании штаммы стрептомицетов проходят фазы развития: до 24 часа клетки находятся в лаг-фазе, между 48-72 ч. в фазе логарифмического роста, именно в этот период происходит интенсивное нарастание биомассы, после 72 ч. клетки вступают в фазу стационарного развития и до 96 ч. эта фаза продолжается. Следовательно в этой фазе нужно собирать урожай или биомассу, в котором содержатся активные метаболиты.

3. Из всех испытуемых штаммов *Streptomyces alfalfae*, CI-4 оказался более активным и давал больше выхода биомассы чем остальные *Streptomyces sp.* Pch-3, *Streptomyces lividans* TR-59.

Литература:

1. Abbas S, Subhan M, Durrani F, Mehmood S, Khan H, Hameed: A Biosynthesis of Antibiotic through metabolism of Actinomycetes Strain Mh-9 through Shake Flask Fermentation. Sarhad J Agric. 2010; 26(1): 7-18.
2. Pusecker K., Laatsch H., Helmke E., Weyland H: Dihydrophencomycin methyl ester, a new phenazine derivative from a marine Streptomyces. J Antibiot. 1997; 50(6): 479-483. 12. Omura S: Philosophy of new drug discovery. Microbiol Review. 1986; 59(3): 259-279.
3. Wadetwar R., and Patil A.T. Production of antibiotic from actinomycetes isolated from Nagpur region and optimization of parameters to increase the yield. IJSR, 2013; Vol. 4(8): 3094-3098.
4. Palanichamy V., Hundet A., Mitra B. and Reddy N. Optimization of cultivation parameters for growth and pigment production by Streptomyces spp. isolated from marine sediment and rhizosphere soil. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences, Volume-1, Issue-3 Sept-Nov-2011, p.158-170.
5. Доолоткельдиева Т.Д., Исакова Ж., Тотубаева Н.Э., Бобушова С.Т. Способы глубинного и поверхностного культивирования штаммов микромицетов для повышения продукции фермента - амилазы. / Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. 2009. №. 3. С. 46-57.
6. Бобушова С.Т., Конурбаева М.У., Доолоткельдиева Т.Д. Использование ферментной биомассы сапротрофных микромицетов (β -глюконазы и амилаза) для улучшения качества хлеба. / Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. 2009. №. 3. С. 239-245