

**ОСНОВЫ НАПРАВЛЕННОГО РЕГУЛИРОВАНИЯ
СТРЕПТОВИДИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ШТАММА
STREPTOMYCES AVIDINII ВИМ В-154**

**Н.А. Здор, Т.В. Романовская, Н.В. Сверчкова, Э.И. Коломиец,
И.И. Вашкевич*, Т.В.Эпштейн***

*Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
kolomiets@mbio.bas-net.by*

**Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г.Минск, Беларусь,
sviridov@iboch.bas-net.by*

Продуктивность биосинтеза стрептавидина – биотинсвязывающего белка, используемого для биоаналитических систем, обусловлена как индивидуальными особенностями микроорганизма – продуцента, так и факторами внешней среды. В связи с этим исследования по повышению стрептавидинпродуцирующей способности *S.avidinii* ВИМ В-154 проводили в двух направлениях – путем селекции исходного штамма и оптимизации состава питательной среды и условий его культивирования.

В результате спонтанного мутагенеза были выделены колонии с более высокой (на 5%) по сравнению с исходным штаммом стрептавидинпродуцирующей способностью. Однако полученные изоляты не отличались стабильностью и утрачивали свое свойство. При использовании индуцированного мутагенеза обработку споровой суспензии *S.avidinii* ВИМ В-154 мутагенами проводили в оптимизированных условиях: время экспозиции УФ-облучения – 5,7 и 12,7 мин, продолжительность обработки N- метил-N –нитро- N –нитрозогуанидин (НГ) (в конечной концентрации 100 мкг/мл) – 3,38 ч.. Было выделено около 150 морфологически измененных (по размеру и пигментации) изолятов, которые после культивирования в жидкой глюкозо-аспарагиновой среде и тестирования по уровню стрептавидинсинтезирующей активности разделили на 4 группы. К 1-ой группе относятся клоны, утратившие способность к синтезу антибиотика, клоны 2-ой группы характеризуются более низким, 3-ей – равным контролю, а 4-ой – более высоким выходом стрептавидина, по сравнению с исходным штаммом. Сравнительная оценка мутагенного действия испытанных факторов показала, что при обработке споровой суспензии актиномицета НГ частота образования активных продуцентов стрептавидина выше, чем при УФ-облучении. Однако несмотря на высокую частоту появления НГ-мутантов, более активный вариант (выход стрептавидина на 15-25 % выше, чем у исходной культуры) получен при УФ-облучении.

Исследования по разработке питательной среды для глубинного культивирования *S.avidinii* ВИМ В-154 включали подбор ингредиентов, стимулирующих образование стрептавидина и не лимитирующих процессы его выделения и очистки. В качестве потенциальных источников углеродного и азотного питания проверен широкий спектр органических и минеральных субстратов. Минеральный фон исходной питательной среды включал смесь микроэлементов и основных солей (1.7г/л): H_3BO_3 - 0.5мг; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0.04мг; KI- 0.1мг, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0.2мг; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0.4мг; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.2мг; KH_2PO_4 - 1.0г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.5г; NaCl- 0.1г; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.1г, которые в соответствии с литературными данными [1] стимулируют образование стрептавидина *S. avidinii*. При оптимизации источников углерода среда содержала также глюкозу (10 г/л), а при оптимизации источников азота – L-аспарагин (7,0 г/л).

Наиболее высокий выход стрептавидина отмечен при использовании в качестве источников углерода глюкозы, овсяной или кукурузной муки, а в качестве источников

азота – пептона и L–аспарагина. Поскольку белковые примеси в составе пептона и муки могут оказывать негативное влияние на процесс очистки стрептавида для дальнейших исследований отобрана минеральная глюкозо-аспарагиновая среда. В результате оптимизации количественного и качественного соотношения ее основных компонентов установлено, что максимальное накопление стрептавида (до 60 мг/л) достигается при концентрации глюкозы и L-аспарагина в среде 10 и 1 г/л соответственно. С целью повышения экономичности процесса культивирования *S.avidinii* БИМ В-154 изучена возможность замены дефицитных и дорогостоящих ингредиентов питательных сред более дешевыми: вместо смеси микроэлементов и K_2HPO_4 (1 г/л) предложено использовать только две соли - K_2HPO_4 (0.5 г/л) и NaCl (0.5 г/л). При этом основные показатели культивирования (титр КОЕ и выход стрептавида) практически не изменяются, тогда как стоимость модифицированной питательной среды **Б** снижается практически в 2 раза по сравнению с контрольной (таблица).

Таблица - Влияние состава питательных сред на продукцию стрептавида штаммом *S.avidinii* БИМ В-154

Состав среды, г/л	Титр, КОЕ/мл	Выход стрептавида, г/л
Контроль - среда [1]: L-аспарагин-7; глюкоза-10; смесь микроэлементов и основных солей-1,7; вода дистиллированная – 1л.	$3.2 \cdot 10^6$	59.3
Модифицированная среда А: L-аспарагин-7; глюкоза-10; K_2HPO_4 -0,5; NaCl -0,5; вода водопроводная -1 л.	$2.8 \cdot 10^7$	58.2
Модифицированная среда Б,: L-аспарагин-1; глюкоза-10; K_2HPO_4 -0,5; NaCl -0,5; вода водопроводная – 1 л.	$3.2 \cdot 10$	62.6

Исследования по оптимизации условий глубинного культивирования *S.avidinii* БИМ В-154 проводили в колбах на качалке и в лабораторном ферментере в диапазоне температур от 20 до 30⁰С, рН от 4,0 – до 8,0, интенсивности аэрации среды 0,5 - 1,5 л/л среды мин. Установлено, что максимальный выход стрептавида (60-80 мг/л) достигается при исходном значении рН питательной среды 6.0-6.5, температуре выращивания 25-27⁰С, интенсивности аэрации 1 л воздуха/л среды·мин и продолжительности культивирования актиномицета в колбах на качалке (200 об/мин) 6-7 суток, в лабораторном ферментере – 3 суток.

Таким образом, способность *S.avidinii* БИМ В-154 активно реагировать на изменения факторов внешней среды свидетельствует о возможности регулируемого синтеза стрептавида культурой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cazin J., Suter M., Butler J.E. Production of streptavidin in synthetic medium //J. of Immunological Methods.- 1988.- Vol. 113, № 1.- P.75-81