

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОАКТИВНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ВИРДЖИНИАМИЦИНА И ПОВЫШЕНИЕ ЕГО ПРОДУКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ АДСОРБИРУЮЩИХ СМОЛ

В.А. Савушкин¹, В.В. Джавахия¹, Е.В. Глаголева¹, В.В. Савельева¹, Е.Д. Попова¹, А.И. Овчинников¹, В.И. Глаголев¹, Н.В. Новак¹, Д.А. Дурникин²

¹Москва, пр. 60-летия Октября, 7/1, ООО «ИнжБио», E-mail: vanzan113@rambler.ru, engbio@rambler.ru, glagolevaev@mail.ru, veronika.savelieva32@yandex.ru, julia92@mail.ru, centr-biotech@mail.ru, dvait2812@gmail.com, Nikita.Art@live.ru

²Барнаул, пр. Ленина, 61, Алтайский государственный университет, Email: Durnikin@list.ru

Кормовой антибиотик вирджиниамицин, продуцируемый некоторыми представителями рода *Streptomyces*, представляет собой природную смесь макроциклических компонентов, основными из которых являются синергически взаимодействующие факторы M1 и S1. Максимальная активность вирджиниамицина наблюдается в присутствии 25-40% S1, при котором активность M1 увеличивается в 3,5-4 раза. В связи с большим количеством генов, вовлеченных в биосинтез вирджиниамицина, проблема получения высокопродуктивных штаммов, способных синтезировать M1 и S1 в синергическом соотношении при общей продуктивности более 3-4 г/л, остается актуальной. Методом многоступенчатого УФ-мутагенеза коллекционного штамма *Streptomyces* sp. DSM 40559 был получен высокоактивный штамм S 15-30, производительность которого на базовой среде существенно превышала таковую родительского штамма (2,6 и 0,35 г/л вирджиниамицина, соответственно), а отношение M1:S1 находилось в синергическом диапазоне (72:28). Был подобран состав ферментационной среды и тип адсорбирующей смолы (Amberlite XAD-16, 20 г/л), обеспечивающие конечный выход вирджиниамицина на уровне $5,03 \pm 0,12$ г/л с сохранением оптимального соотношения его компонентов M1 и S1 (72:28) и высокую степень сорбции антибиотика из культуральной жидкости (92-95%). Впервые показана вариабельность соотношения M1:S1 в общем содержании антибиотика в зависимости от различных компонентов среды. Полученные результаты будут использованы для дальнейшей селекционной работы, а также масштабирования технологии ферментации, и могут представлять определенный интерес для других исследователей, занимающихся производством данного антибиотика.

Ключевые слова: вирджиниамицин, *Streptomyces*, штамм-суперпродуцент, индуцированный мутагенез, синтетические смолы

Citation:

Savushkin, V.A., Dzhavakhiya, V.V., Glagoleva, E.V., Savel'eva, V.V., Popova, E.D., Ovchinnikov, A.I., Glagolev, V.I., Novak, N.V., Durnikin, D.A. (2016). Development of highly active Virginiamycin-producing strain and improvement of its productivity using synthetic adsorbing resins.

Biological Bulletin of Bogdan Chmelnytskyi Melitopol State Pedagogical University, 6 (3), 195–208.

Поступило в редакцию / Submitted: 16.09.2016

Принято к публикации / Accepted: 22.11.2016

crossref <http://dx.doi.org/10.15421/201687>

© Savushkin, Dzhavakhiya, Glagoleva, Savel'eva, Popova, Ovchinnikov, Glagolev, Novak, Durnikin, 2016

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0. License

DEVELOPMENT OF HIGHLY ACTIVE VIRGINIAMYCIN-PRODUCING STRAIN AND IMPROVEMENT OF ITS PRODUCTIVITY USING SYNTHETIC ADSORBING RESINS

V.A. Savushkin¹, V.V. Dzhavakhiya¹, E.V. Glagoleva¹, V.V. Savel'eva¹, E.D. Popova¹, A.I. Ovchinnikov¹, V.I. Glagolev¹, N.V. Novak¹, D.A. Durnikin²

¹Moscow, 60 Let Oktyabrya Pr. 7/1, 'InzhBio' Ltd, E-mail: vanzan113@rambler.ru, engbio@rambler.ru, glagolevaev@mail.ru, veronika.savelieva32@yandex.ru, julia92@mail.ru, centr-biotech@mail.ru, dvait2812@gmail.com, Nikita.Art@live.ru

²Barnaul, Lenina Pr., 61, Altai State University, Email: Durnikin@list.ru

Virginiamycin, an antibiotic produced by some *Streptomyces* species, is widely used in veterinary and bioethanol production. It represents a natural mix of two different macrocyclic components, among which M1 and S1 factors are the main acting components. M1 and S1 act synergistically when present in the optimum ratio of 60-75% of M1 and 25-40% of S1. Due to a large number of genes involved into the virginiamycin biosynthesis, the development of overproducing strains able to synthesize M1 and S1 at a synergistic ratio with the total productivity exceeding 3-4 g/L still remains a relevant problem. Using a multi-step random UV mutagenesis of the *Streptomyces* sp. strain DSM 40559, a highly active strain S 15-30 was obtained, which virginiamycin titer on a basic medium significantly increased that of the parental strain (2.6 and 0.35 g/L, respectively), and the M1:S1 ratio remained synergistic (72:28). Various sources of carbon, nitrogen, and macroelements were evaluated for medium improvement, and several different types of synthetic macroporous resins were tested to provide the highest virginiamycin titer in culture broth of the developed strain. The resulting improved fermentation medium supplemented with 20 g/L of Amberlite XAD-16 resin increased strain productivity up to 5.03 ± 0.12 g/L with the simultaneous maintenance of the M1:S1 ratio within the synergistic range (72:28) and highly selective level of adsorption of the antibiotic from culture broth (92-95%). The variability of the M1:S1 ratio in the total antibiotic titer depending on various medium composition and resin type was first demonstrated. The obtained strain is promising for the industrial use due to its high productivity and the optimal M1:S1 ratio. Results of the study will be used for the further selection of overproducing strains and the scaling up of the virginiamycin production. The obtained data can be interesting for other researchers working in the field of production of macrolide antibiotics.

Key words: virginiamycin, *Streptomyces*, strain improvement, induced mutagenesis, synthetic resin

ВВЕДЕНИЕ

В современных условиях поддержание высокого уровня производства мясной и молочной продукции связано с активным использованием ветеринарных антибиотиков, мировой объем производства которых достигает почти 2/3 от общего производства антибиотиков в мире и оценивается приблизительно в 4 млрд. долларов США (van Boeckel et al., 2014). Наиболее распространенными антибиотическими препаратами в ветеринарии являются антибиотики тетрациклиновой, цефалоспориновой, аминогликозидной, дестомидиновой и стрептограминовой групп. Особое значение имеет последняя группа, что обусловлено биологическими свойствами данных соединений, которые не являются токсичными или мутагенными, способны к биодegradации, не накапливаются в тканях животных, и характеризуются узким спектром действия в отношении стафилококков (Cocito, 1979).

Антибиотик вирджиниамицин, относящийся к стрептограммам и являющийся метаболитом некоторых микроорганизмов рода *Streptomyces*, таких как *S. virginiae* и *S. graminofaciens* (Pietra, 2002), представляет собой природную смесь двух макроциклических компонентов поликетидной (М) и пептидной (S) природы. Основными компонентами антибиотика являются факторы М1 и S1. Одной из уникальных особенностей биосинтеза вирджиниамицина является тот факт, что микроорганизм продуцирует одновременно оба фактора М1 и S1, причем в соотношении, обеспечивающем максимальную синергическую активность в подавлении синтеза белка в клетках чувствительных микроорганизмов (di Giambattista et al., 1989). Максимум синергического действия вирджиниамицина наблюдается в присутствии 25-40% S1, при котором активность М1 увеличивается в 3,5–4 раза (Mast and Wohlleben, 2014). Эта уникальная особенность объясняет отсутствие существенной резистентности микроорганизмов к вирджиниамицину после многих лет интенсивного его использования в животноводстве.

Взятые по отдельности, М1 и S1 обладают бактериостатическим действием, в то время как их синергическая комбинация оказывает бактерицидный эффект в отношении большинства грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий (Грозина и др., 2014). Помимо выраженного антимикробного действия, вирджиниамицин обладает свойствами стимулятора роста, оптимизируя абсорбцию и метаболизм питательных веществ, улучшая состояние эпителия тонкого кишечника и подавляя синтез кишечной микрофлорой токсинов и вредных метаболитов (Feighner and Dashkevich, 1987; Cervantes et al., 2002; Хойцман и др., 2011).

В настоящее время вирджиниамицин используется в промышленном производстве биоэтанола (Arshad et al., 2011), а также в сельском хозяйстве в качестве антибиотической кормовой добавки для сельскохозяйственных животных и птиц, способствующей выживаемости молодняка, снижению заболеваемости, повышению ежедневной прибавки в весе и улучшению эффективности питания (Ives et al., 2002; Singh et al., 2008; Shojadoost et al., 2013).

Вирджиниамицин зарегистрирован и активно используется в 32 странах, включая США, Россию, Бразилию и Китай. Так, в первом полугодии 2014 г. доля импорта вирджиниамицин-содержащих препаратов в Россию составила 8.32% от общего объема поставок антибактериальных ветеринарных препаратов и 40.6% от общего объема поставок антибиотиков группы макролидов (Lavrenova, 2016). Следует отметить, что к 2020 г. прогнозируемое увеличение потребления данного антибиотика в Северной Америке, Европе и Азии составит 6% (Virginiamycin global market, 2015).

Для обеспечения достаточного объема производства вирджиниамицина необходимы не только эффективные технологии его промышленного производства, выделения и очистки, но и высокопродуктивные штаммы-продуценты, способные обеспечивать высокий выход данного метаболита. Продуктивность диких штаммов, как правило, недостаточна для их использования в промышленном производстве; так, например, выход вирджиниамицина у оригинального штамма ATCC 13161, впервые описанного в качестве его продуцента, составляет всего лишь около 50 µg/mL (de Somer and van Dijck, 1955). В целом, согласно опубликованным данным, продуктивность разработанных штаммов-продуцентов *S. virginiae* в лабораторных условиях остается относительно невысокой, варьируя от ~0.3 г/л до ~1.9 г/л (Biot, 1984; Prikrylova et al., 1987; Zvenigorodskii et al., 2001; Zhang et al., 2011). Одно из возможных объяснений сложности получения высокоактивных продуцентов вирджиниамицина – это зависимость его антибиотической эффективности от правильного соотношения M1 и S1 и то, что биосинтез этих двух компонентов контролируется большим количеством регуляторов (Pulsawat et al., 2009). Подбор оптимального состава ферментационной среды и ее дополнительных компонентов, а также условий ферментации позволяет дополнительно повысить продуктивность штамма, однако даже в этом случае производительность существующих в настоящее время промышленных штаммов остается в основном в пределах 3–4 г/л (Biot, 1984; Zhang et al., 2011; Han et al., 2013). Таким образом, проблема получения высокоактивных продуцентов вирджиниамицина остается актуальной.

Целью данного исследования было получение нового штамма-продуцента вирджиниамицина, отличающегося повышенной продуктивностью при сохранении синергического соотношения M1 и S1, методом индуцированного мутагенеза, а также подбор для него оптимального состава среды и условий культивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм-продуцент микроорганизма и среды культивирования.

В качестве исходного штамма использовали штамм *Streptomyces* sp. DSM 40559, полученный из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Leibniz Institute, Braunschweig, Germany). Продуктивность данного штамма составляла 0.35 г/л вирджиниамицина, соотношение M1:S1 составляло 80:20. Для выращивания, поддержания и хранения культуры использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): агар-агар – 20, мальтэкстракт – 10, дрожжевой экстракт – 4, глюкоза – 4, CaCO₃ – 2, дистиллированная вода – до 1 л (рН 6,8–7,0). Для ферментации использовали вегетативную и ферментационную жидкие среды.

Вегетативная среда. Состав исходной посевной среды (г/л): глюкоза – 1,0; мясной экстракт – 3,0; крахмал растворимый – 10,0; дрожжевой автолизат – 5,0; гидролизат казеина – 5,0; мел – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,08; дистиллированная вода – до 1 л (рН 7,0–7,2).

Ферментационная среда. В качестве исходной ферментационной среды использовали среду следующего состава (г/л): кукурузный глютен – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; мясной пептон – 2,5; мальт экстракт – 10,0; мел – 5,0; глюкоза – 5,0; вода дистиллированная – до 1 л (рН 7,0–7,2).

УФ-мутагенез.

Смыв с поверхности агаризованной среды фильтровали через стерильный ватный фильтр или через фильтровальную воронку Шотта (размер пор 100 мкм). В полученной суспензии при помощи камеры Горяева-Тома подсчитывали концентрацию спор. При необходимости суспензию разводили до концентрации (1,5–2)·10⁶ спор/мл, после чего подвергали облучению в открытой чашке Петри. В качестве мутагенного фактора использовали УФ-облучение в диапазоне 250–280 нм (лампа Mineralight, мощность 12,5 Вт). Водную суспензию спор помещали на расстояние 40 см от лампы, при этом интенсивность излучения лампы составляла 0,25 мВт/см². После облучения споровую суспензию в количестве 0,1 мл инокулировали в чашку Петри с 20 мл агаризованной среды, равномерно распределяли по всей поверхности агара и культивировали при температуре 28°C в течение 6–7 суток. После каждого облучения отбирали 10–20 мутантов. Отбор мутантов производился по отличию морфологических признаков по сравнению с исходным штаммом DSM 40559.

Степень выживаемости колоний определяли по соотношению выросших колоний на контрольных чашках и после облучения УФ в течение различных промежутков времени. Эффективность мутагенеза определяли по количеству возникающих морфологически измененных колоний после обработки УФ. Выросшие изолированные колонии пересекали на агаризованную среду, затем выращивали в ферментационной среде для качественного и количественного анализа продуктивности.

Условия культивирования.

Приготовление посевного материала. Из выросшей на агаризованной среде 6–7-дневной культуры готовили споровую суспензию. В колбу Эрленмейера, объемом 50 мл, содержащую 10 мл вегетативной среды, вносили 0,1 мл споровой суспензии (содержание КОЕ/мл не менее 10⁶). Культуру выращивали в

колбах на качалке “Innova 44” (New Brunswick, США) при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 28°C в течение 2 суток.

Культивирование в ферментационной среде. В колбу Эрленмейера объемом 50 мл, содержащую 10 мл ферментационной среды, вносили 1 мл посевного материала. Культуру выращивали в колбах на качалке “Innova 44” при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 28°C в течение 96 часов.

Генетическая идентификация.

Генетическую идентификацию родительского и мутантного штамма осуществляли путем секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S. Выделение ДНК осуществляли согласно методике, описанной в работе Булыгиной и др. (2002). Амплификацию фрагментов гена 16S рПНК проводили с использованием универсальных праймеров 11F и 1492R (Lane, 1991). Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рПНК, проводили по методу Sanger et al. (1977) с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA) согласно инструкциям производителя. Для секвенирования использовали вышеупомянутые праймеры, и считывание проводили в двух направлениях. Полученные данные сравнивали с последовательностями из базы данных NCBI GenBank при помощи программы BLAST. Филогенетический анализ и построение дендрограммы осуществляли по методу максимального подобия с использованием программного пакета MEGA v. 5.05.

Подбор оптимального состава ферментационной среды и синтетических адсорбирующих смол.

Подбор оптимального состава среды для полученного мутантного штамма осуществляли при помощи серии последовательных экспериментов с различными источниками углерода, органического и неорганического азота, а также макроэлементов. Контрольные среды для каждого этапа исследования приведены в соответствующих разделах секции «Результаты». Ферментацию проводили в условиях, аналогичных описанным выше.

В экспериментах с подбором синтетических адсорбирующих смол использовали пять различных видов сорбентов: неполярные, слабосшитые стирол-дивинилбензолные смолы Amberlite XAD-1, XAD-7, XAD-16 (Rohm&Hass, США), сильнокислотная катионообменная смола на основе сульфонированного полистирола Amberlite IR120 (Acros Organics, Бельгия) и смола на основе полистирола/дивинилбензола DIAION™ HP20 (Sorbent Technologies, США). Смолы добавляли в ферментационную среду перед стерилизацией в количестве 20 г/л.

Анализ содержания вирджиниамина в культуральной жидкости.

Экстракцию вирджиниамина из образцов культуральной жидкости (в т.ч. содержащей сорбент) осуществляли равным объемом этилацетата, при перемешивании в течение 2 ч. После этого отделяли слой этилацетата, центрифугировали при 12000 об/мин в течение 3 мин, затем отбирали 200 мкл и высушивали. Полученный осадок растворяли в 400 мкл мобильной фазы (см. ниже). Объем пробы для проведения анализа составлял 10 мкл. Для определения содержания вирджиниамина, адсорбируемого из культуральной жидкости смолой, по окончании ферментации смолу отделяли от культуральной жидкости на сетке из нержавеющей стали (размер ячеек не более 0,1 мм) и промывали дистиллированной водой. Затем проводили раздельную экстракцию вирджиниамина из смолы и культуральной жидкости и подготовку проб для ВЭЖХ, как описано выше.

Предварительную оценку продуктивности полученных в процессе мутагенеза/селекции штаммов проводили методом тонкослойной хроматографии (Zvenigorodskii et al., 2001) с использованием пластин TLC Silica gel 60 (Merck, Германия). В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформ: метанол в соотношении 80:20, детекцию проводили на длине волны 254 нм. Количественное определение вирджиниамина в культуральной жидкости отобранных высокопродуктивных штаммов проводили методом ВЭЖХ (Gossele et al., 1991) с некоторыми модификациями на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) и колонке Zorbax C18-SB (5мкм, 250 × 4,6 мм, октадецилсиликагель, Agilent Technologies, США) со скоростью потока 1,0 мл/мин при 40°C. В качестве мобильной фазы использовали смесь ацетонитрил : дистиллированная вода : уксусная кислота (550:450:0.1). Спектрофотометрическую детекцию осуществляли при длине волны 220 нм. В качестве контроля использовали стандартные образцы вирджиниамина в комплексе (Santa Cruz Biotech, США) и его отдельных компонентов M1 и S1 (Sigma-Aldrich, США), предварительно растворенные в мобильной фазе. Время удерживания пика вирджиниамина M1 и S1 составляло 6,93 и 11,92 мин, соответственно. Время хроматографирования – 25 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

УФ-мутагенез и селекция штамма.

На первом этапе исследований для определения оптимального времени УФ-воздействия была оценена выживаемость и частота морфологических мутаций родительского штамма DSM 40559 в интервале экспозиции от 10 до 15 мин. Согласно полученным данным, экспозиция в течение 12 минут оказалась максимально эффективной для получения морфологических мутантов (частота возникновения составила 20,4-26,1%); при этом выживаемость DSM 40559 при облучении УФ в течение 12 мин составила 0,06%. Основываясь на этих данных, в дальнейшей работе использовали время экспозиции, равное 12 мин.

Проведение прямой селекции высокопродуктивных мутантных штаммов, синтезирующих вирджиниамидин, путем анализа продуктивности каждого отдельного штамма потребовало бы значительных затрат времени и сил. В связи с этим селекция мутантных изолятов в данной работе проводилась при помощи визуального отбора морфологически измененных по отношению к контролю колоний. При таком отборе рассчитывают не столько на корреляцию между количественным и морфологическим признаками, сколько на плеiotропный эффект мутаций, вызывающих резкое повышение уровня продукции и, как следствие нарушения метаболического баланса и те или иные морфологические изменения (Егоров, 1989). Визуально отобранные мутантные штаммы с измененной морфологией оценивали по содержанию вирджиниамидина в культуральной среде, и наиболее продуктивные отбирали для использования на следующих ступенях мутагенеза.

В результате проведения многоступенчатого мутагенеза был получен штамм S 15-30, продуктивность которого составила 2.6 ± 0.05 г/л вирджиниамидина, что значительно превысило данный показатель исходного штамма DSM 40559 (0.35 г/л), а процентное соотношение синтезируемых M1 и S1 оказалось равным 72:28, т.е. в рамках синергического диапазона. Генетическая стабильность штамма S 15-30 была проверена путем трех последовательных пересевов на агаризованной среде с проверкой продуктивности при каждом пересеве; согласно полученным результатам, уровень биосинтеза вирджиниамидина оставался неизменным.

Физиологические и биохимические свойства штамма S 15-30.

Мутантный штамм *Streptomyces* sp. S 15-30 отличался от родительского штамма DSM 40559 по ряду морфологических характеристик, включая цвет колоний на агаризованной среде (темно-серые с желтоватым ободком вместо однородных желто-коричневых) и субстратного мицелия (светло-коричневый вместо желтого).

Отношение к источникам углеводов.

Результаты сравнительного исследования способности к усвоению различных моно- и полисахаридов штаммами *Streptomyces* sp. DSM 40559 и S 15-30 представлены в табл. 1. В отличие от исходного штамма, штамм S 15-30 оказался способен утилизировать маннозу, а также гидролизовать крахмал.

Таблица 1. Утилизация различных источников углерода штаммами *Streptomyces* sp. DSM 40559 и S 15-30

Источники углерода	<i>Streptomyces</i> sp. DSM 40559	<i>Streptomyces</i> sp. S 15-30
Глюкоза	+	+
Арабиноза	—	—
Ксилоза	+	+
Манноза	—	+
Лактоза	—	—
Галактоза	—	—
Мальтоза	+	+
Сахароза	+	+
Фруктоза	+	+
Крахмал	—	+
Рафиноза	—	—

Отношение к источникам азота.

Проведенное исследование способности штамма S 15-30 утилизировать различные источники азота не выявило его отличий от родительского штамма.

Отношение к антибиотикам.

В отличие от родительского штамма, мутантный штамм S 15-30 оказался устойчив к повышенной концентрации собственного антибиотика (5.0 мг/мл) и ванкомицину (до 0.25 мг/мл).

Генетическая идентификация.

С целью генетической идентификации полученного мутантного штамма S 15-30 было проведено секвенирование исходного и полученного штаммов. Была определена практически полная последовательность (1480 нуклеотидов) бактериального компонента амплификата гена, кодирующего 16S рРНК. Архейных, а также минорных компонентов ДНК для данных образцов выявлено не было. Нуклеотидные последовательности ПЦР-фрагментов для обоих образцов оказались идентичными между собой. Сравнение полученной последовательности с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank, показало, что филогенетически наиболее близким к исследованным образцам среди описанных бактерий оказался штамм *S. graminofaciens* NBRC 13455 (100% сходство). Для более точного определения таксономического положения штамма *Streptomyces* sp. S 15-30 было построено филогенетическое дерево последовательностей генов, кодирующих 16S РНК у ближайших типовых видов стрептомицетов (Рис. 1). Исследуемый штамм оказался в одном кластере с типовым штаммом *S. graminofaciens* NBRC 13455. Таким образом, на основании результатов генетической идентификации можно предположить, что штамм *Streptomyces* sp. S15-30 относится к виду *Streptomyces graminofaciens*.

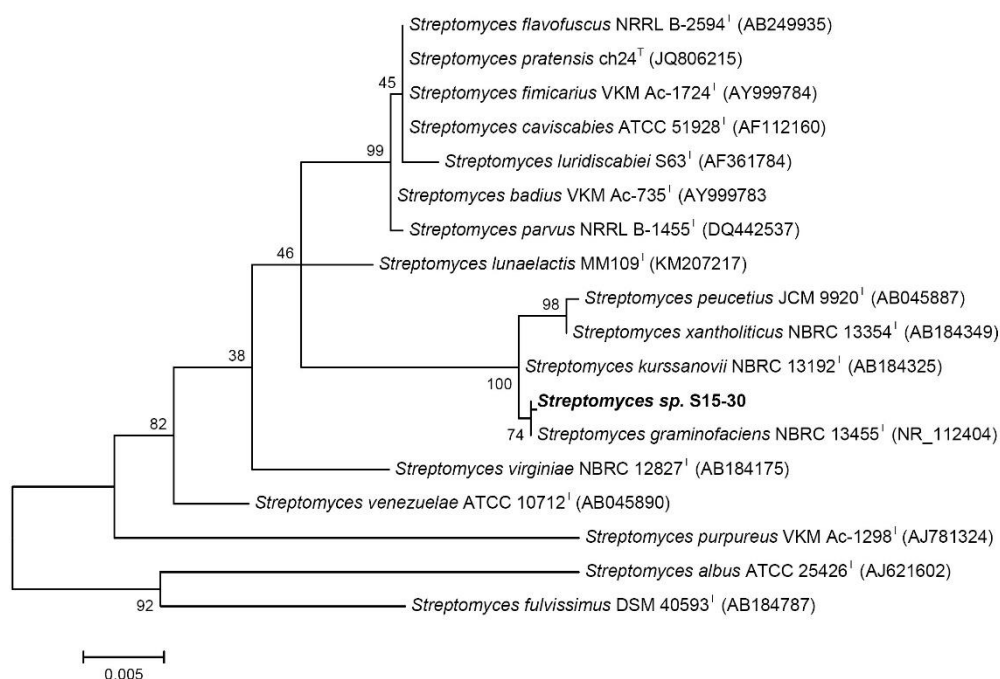


Рис. 1. Схема филогенетического родства последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК у ближайших к штамму *Streptomyces* sp. S 15-30 представителей рода *Streptomyces*. Достоверности ветвления рассчитаны на основании сравнения топологий 600 альтернативных дендрограмм. Анализ проведен на длине в 1370 нуклеотида.

Влияние различных источников углерода на биосинтез вирджинииамицина штаммом S 15-30.

Изменения метаболизма мутантных штаммов, связанные с повышением их продуктивности, могут также оказывать влияние на эффективность и возможность утилизации тех или иных источников питательных веществ (Егоров, 1989). Следовательно, для каждого штамма-суперпродуцента целесообразно проводить анализ и подбор количественного и качественного состава ферментационной среды, способной дополнительно увеличить продуктивность отобранного штамма. В связи с этим в лабораторных условиях был проведен ряд опытов по подбору оптимальных концентраций источников углерода, азота, а также макро- и микроэлементов для улучшенной ферментации штамма S 15-30.

На первом этапе было изучено влияние различных источников углерода и их содержания в ферментационной среде на продуктивность штамма S 15-30 и соотношение М1:С1. Для этого штамм культивировали в среде следующего состава (г/л): кукурузный глютен – 5,0; мясной пептон – 2,5; дрожжевой экстракт – 1,0; мальтозный экстракт – 10,0; мел – 5,0; KH_2PO_4 – 1,6; Na_2HPO_4 – 1,0. В качестве источника углерода в среду добавляли один из четырех утилизируемых штаммом углеводов (глюкоза, сахароза, манноза и крахмал) в четырех разных концентрациях. Согласно полученным результатам, максимальный уровень биосинтеза вирджинииамицина (3.05 ± 0.10 г/л) наблюдали при использовании в качестве источника углерода глюкозы в концентрации 50 г/л; при этом соотношение М1:С1 составило

74:26 (рис. 2). Следует отметить, что использование различных источников углерода приводило к достаточно заметным вариациям данного соотношения (от 75:25 до 60:40).

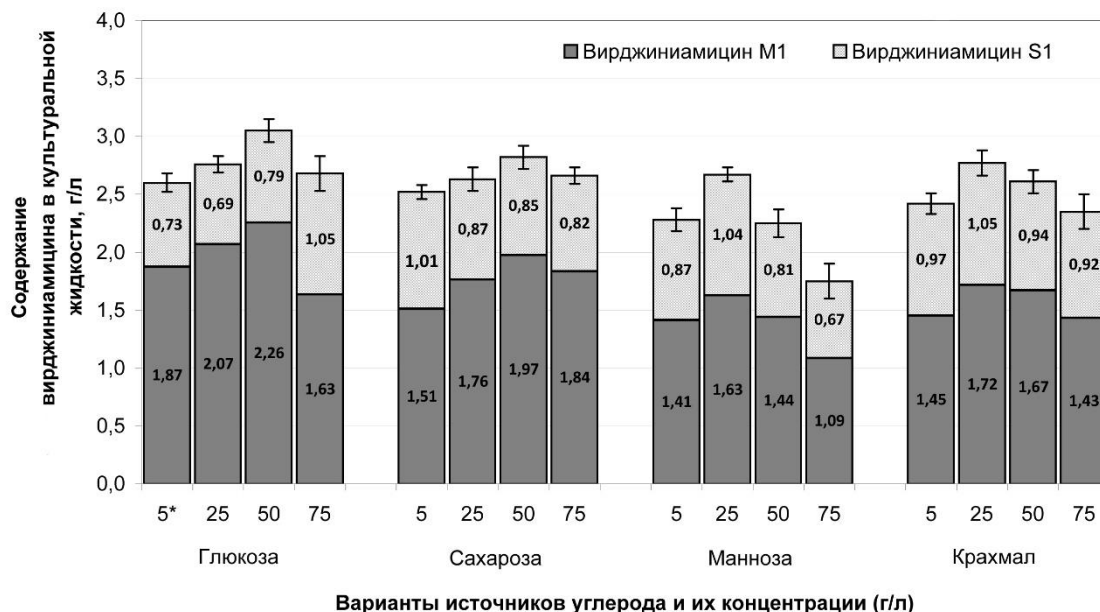


Рис. 2. Влияние дополнительных источников углерода в ферментационной среде на биосинтез вирджиниамцина S1 и M1 штаммом *Streptomyces sp.* S 15-30. Звездочкой отмечена среда, использованная в качестве контрольной. Здесь и на последующих рисунках приведенные стандартные отклонения указаны для содержания вирджиниамцина M1+S1.

Влияние различных источников азота на биосинтез вирджиниамцина штаммом S 15-30.

Большинство микроорганизмов усваивают азот из минеральных соединений (нитратов, нитритов, аммонийных солей и т.п.), однако для синтеза биологически активных веществ сверх потребностей самого микроорганизма необходимы и готовые органические азотсодержащие соединения (белки, аминокислоты, пурины, пиримидины и др.). При необходимости данные соединения используются одновременно как источник углерода и азота.

Богатыми источниками органического азота являются различные виды муки. Помимо белков и аминокислот, в них присутствуют углеводы, нуклеиновые кислоты, жиры, микроэлементы, органические кислоты и других соединения, играющие важную роль в синтезе ряда соединений. Результаты оценки влияния дополнительных источников органического азота на продуктивность штамма S 15-30 и соотношение отдельных компонентов вирджиниамцина M1 и S1 приведены на рис. 3. В качестве контрольной среды (К), не содержащей дополнительных источников азота, использовали среду следующего состава (г/л): кукурузный глютен – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; мясной пептон – 2,5; мальт экстракт – 10,0; мел – 5,0; глюкоза – 50,0; KH_2PO_4 – 1,6; Na_2HPO_4 – 1,0 (рН 7.0-7.2). Максимальное содержание вирджиниамцина в культуральной жидкости было отмечено в случае использования среды с добавлением соевой муки в концентрации 15 г/л (3.45 ± 0.09 г/л); при этом соотношение факторов M1 и S1 составляло 23:78. В зависимости от источника дополнительного азота упомянутое соотношение варьировало от 85:15 (перьевая мука, 5 г/л) до 59:41 (овсяная мука, 5 г/л), выходя за рамки синергического интервала.

Источники неорганического азота (соли аммония, нитраты, нитриты, карбамид и т.п.) являются важным компонентом ферментационных сред для многих микроорганизмов. Вследствие изменения метаболизма мутантные штаммы часто оказываются способными усваивать только определенные формы неорганического азота, поэтому оценка влияния различных источников данного нутриента на продуктивность нового штамма является важным этапом подбора наиболее оптимальной среды. Результаты такой оценки, проведенной для мутантного штамма S 15-30, представлены в табл. 2. Соотношение факторов M1 и S1 в процессе культивирования на всех вариантах сред находилось в пределах максимального синергизма (25-28% фактора S1 и 72-75% фактора M1). Небольшое увеличение продуктивности вирджиниамцина (3.76 ± 0.11 г/л) было отмечено при использовании нитрата аммония в концентрации 1 г/л.

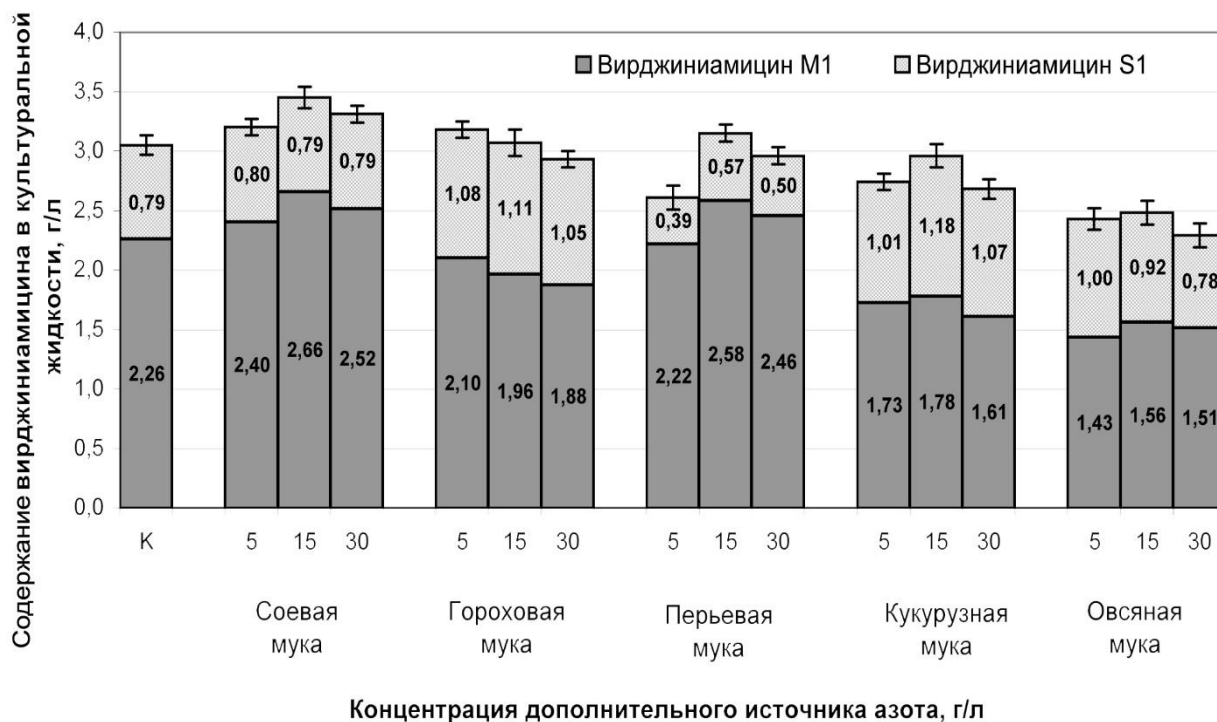


Рис. 3. Влияние дополнительных источников азота в ферментационной среде на биосинтез вирджиниамицина S1 и M1 штаммом *Streptomyces sp.* S 15-30. К – контрольная среда.

Таблица 2. Влияние различных источников минерального азота на уровень биосинтеза вирджиниамицина штаммом *Streptomyces sp.* S 15-30

Источник минерального азота	Концентрация, г/л	Содержание вирджиниамицина, г/л
Контроль	-	3.45 ± 0.10
	0,1	3.48 ± 0.11
	0,5	3.57 ± 0.09
	1	3.76 ± 0.11
	1,5	3.54 ± 0.10
Нитрат аммония	0,1	3.32 ± 0.10
	0,5	3.35 ± 0.11
	1	3.37 ± 0.08
	1,5	3.29 ± 0.10
	0,1	3.25 ± 0.10
Хлорид аммония	0,5	3.38 ± 0.10
	1	3.33 ± 0.10
	1,5	3.27 ± 0.08
	0,1	2.95 ± 0.08
	0,5	3.17 ± 0.09
Аммоний лимоннокислый	1	3.28 ± 0.10
	1,5	3.18 ± 0.07
	0,1	2.99 ± 0.08
	0,5	2.71 ± 0.09
	1	2.58 ± 0.10
Сульфат аммония	1,5	2.44 ± 0.11
	0,1	2.99 ± 0.08
	0,5	2.71 ± 0.09
Мочевина	1	2.58 ± 0.10
	0,5	2.71 ± 0.09
	1,5	2.44 ± 0.11

*Ферментационная среда (контроль) имела следующий состав (г/л): кукурузный глютен – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; мясной пептон – 2,5; мальт экстракт – 10,0; мел – 5,0; глюкоза – 50,0; соевая мука – 15,0; KH_2PO_4 – 1,6; Na_2HPO_4 – 1,0 (рН 7.0-7.2). Источники неорганического азота добавляли к контрольной среде в указанных концентрациях до стерилизации.

Влияние макроэлементов на биосинтез вирджиниамицина.

Макроэлементы (фосфор, сера, калий, кальций и магний) входят в состав клетки как структурные элементы или же являются частью ферментных систем. И в том и в другом случае они выполняют важнейшие физиологические функции клетки: регулируют проницаемость клеточной мембраны, участвуют в переносе энергии, выполняют роль активаторов ряда ферментов и т.д. Проведенная оценка эффективности внесения дополнительных источников некоторых макроэлементов (MgCl_2 , KNO_3 , NaCl , MgSO_4) в концентрациях от 0,5 до 3,0 г/л на биосинтез вирджиниамицина показала незначительное увеличение содержания антибиотика (3.9 ± 0.09 г/л) в культуральной жидкости при добавлении в среду, оптимизированную по источникам углерода и азота (см. предыдущие разделы) хлористого магния в концентрации 0,5 г/л; при этом во всех исследованных вариантах соотношение M1:S1 находилось в пределах максимального синергизма (23-30% фактора S1 и 70-77% фактора M1).

Влияние синтетических адсорбирующих смол на рост и продуцирующую способность штамма S 15-30.

Штаммы-суперпродуценты, полученные в процессе индуцированного ненаправленного мутагенеза, зачастую характеризуются повышенным уровнем метаболизма и, следовательно, усиленным выделением в среду культивации не только целевого продукта, но и прочих метаболитов, способных ингибировать рост и развитие самой культуры, а также биосинтез целевого вещества. Одним из способов эффективного снижения возможных эффектов цитотоксичности, нестабильности целевого продукта в среде, а также ингибирования процесса биосинтеза накапливающимся продуктом является проведение ферментации в присутствии адсорбирующих смол, селективно связывающих целевой продукт, удаляя его из культуральной жидкости (Phillips et al., 2013).

Однако в каждом отдельном случае необходимо проводить подбор конкретного типа смолы, т.к. даже при схожих физических характеристиках разные смолы могут обеспечивать как увеличение, так и снижение содержания целевого вещества в культуральной жидкости (Lam et al., 1995; Warr et al., 1996). В то же время, удачно подобранный адсорбент способен обеспечить существенное (иногда до 100 раз) повышение выхода целевого продукта (Singh et al., 2010).

В настоящем исследовании была проведена оценка пяти синтетических адсорбирующих смол различной химической природы. Смола DIAION™ HP20 (диаметр пор 260 Å) относится к сорбентам на основе полистирола/дивинилбензола, часто используемым для хроматографической очистки пептидов, белков, полифенолов и иных соединений с $M \geq 1000$. Смола Amberlite IR120 (сильнокислотная катионообменная смола гелевого типа на основе сульфонированного полистирола) характеризуется превосходной физической и химической стабильностью и термостойкостью, хорошей ионообменной кинетикой и высокой обменной ёмкостью. Наконец, неполярные, слабосшитые стирол-дивинилбензольные смолы Amberlite XAD-1, XAD-7 и XAD-16 отличаются высокой удельной поверхностью и устойчивостью к органическим растворителям, что позволяет их многократное использование.

Состав ферментационной среды в контроле соответствовал наилучшему варианту, определенному в ходе предыдущих экспериментов: кукурузный глютен – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; мясной пептон – 2,5; мальт экстракт – 10,0; мел – 5,0; глюкоза – 50,0; соевая мука – 15,0; KH_2PO_4 – 1,6; Na_2HPO_4 – 1,0; NH_4NO_3 – 1,0; MgCl_2 – 0,5 (pH 7.0-7.2). Согласно полученным результатам, добавление в ферментационную среду смол Amberlite XAD-1, XAD-7 и IR120 приводило к ингибированию синтеза вирджиниамицина на 34,0; 16,4 и 55,9%, соответственно, причем соотношение M1:S1 в первом (82:18) и третьем (61:39) случаях выходило за рамки синергического диапазона (Рис. 4). В то же время добавление в ферментационную среду смол HP20 и XAD-16 увеличивало продуктивность штамма на 11,5 и 29% по сравнению с контролем с сохранением в обоих случаях оптимального соотношения M1:S1 (78:22 и 72:28, соответственно). Максимальное содержание вирджиниамицина было отмечено при использовании смолы XAD-16 (5.03 ± 0.12 г/л); при этом степень сорбции упомянутой смолой вирджиниамицина M1 и S1 из культуральной жидкости достигала 95 и 92%, соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка промышленных штаммов-продуцентов целевых метаболитов, в т.ч. антибиотиков, предполагает получение в относительно небольшой промежуток времени стабильно работающих штаммов, характеризующихся высокой продуктивностью. Методы классической селекции и скрининга, а также направленного мутагенеза в данном случае нецелесообразны, поскольку занимают слишком много времени. Гораздо более продуктивными являются современные методики, включающие как получение генномодифицированных организмов, так и применение ненаправленного индуцированного мутагенеза.

Однако в случае вирджиниамицина, представляющего собой комплекс из нескольких компонентов, биосинтез которых регулируется довольно большой группой генов (Pulsawat et al., 2009), и антибиотическая эффективность которого, к тому же, зависит от правильного соотношения

синтезируемых компонентов M1 и S1, получение стабильного рекомбинантного штамма с высокими показателями продуктивности представляется чрезвычайно сложной задачей.

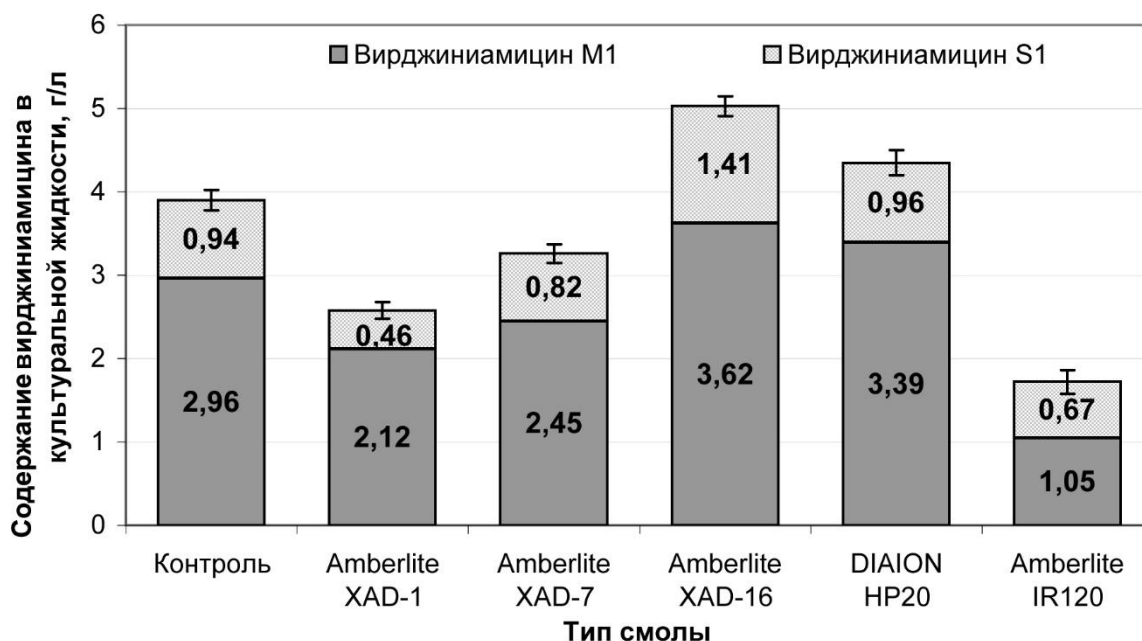


Рис. 4. Влияние различных адсорбирующих смол на биосинтез вирджиниамицина штаммом *Streptomyces sp.* S 15-30.

Это, в частности, подтверждается тем фактом, что проведенный нами анализ научно-технической информации, в т.ч. патентов, не выявил ни одного упоминания о разработке и получении генномодифицированных штаммов *S. virginiae* с повышенным уровнем продукции вирджиниамицина M+S; все найденные публикации по генной модификации данного микроорганизма были связаны главным образом с отключением либо, наоборот, усилением биосинтеза одного из компонентов вирджиниамицина (см., например, Takuya и Shigeru; 2007; Pulsawat et al., 2009).

Следует отметить, что и в случае применения технологии индуцированного мутагенеза проблема получения штаммов, синтезирующих оба компонента антибиотика в нужном соотношении, остается актуальной. Так, например, в ходе выполнения долгосрочной программы экстенсивной селекции штаммов-продуцентов вирджиниамицина компании Phibro Animal Health (основного мирового производителя вирджиниамицина) с помощью УФ и химического мутагенеза был получен широкий спектр мутантных штаммов с различными характеристиками, в том числе с полностью заблокированным синтезом одного или обоих компонентов вирджиниамицина, а также с измененным соотношением M1 и S1 (Lahoot et al., 2005). Возможно, вышесказанное объясняет весьма небольшое количество публикаций и патентов, посвященных разработке новых высокопродуктивных промышленных штаммов *S. virginiae*, причем в большинстве из них авторы сообщают об увеличении выхода вирджиниамицина, но не приводят информацию о контроле упомянутого соотношения. С этой точки зрения полученный нами штамм S 15-30, обеспечивающий оптимальное соотношение компонентов вирджиниамицина, представляет собой особую ценность для промышленного производства.

Дополнительного повышения продуктивности штамма можно добиться путем оптимизации состава ферментационной среды. Существует ряд публикаций и патентов, описывающих разработку оптимизированных сред путем подбора источников углерода (Zvenigorodskii et al., 2001) и азота (Nomura et al., 1990; Zhang et al., 2011; Yong, 2015), добавления в ферментационную среду аминокислот и нуклеотидов (Zvenigorodskii et al., 2001), предшественников (Han et al., 2013) и регуляторов биосинтеза (Yang et al., 1995), позволяющих существенно увеличить выход вирджиниамицина вплоть до 3.5 г/л (Han et al., 2013). Однако в большинстве этих публикаций не отслеживали соотношение M1:S1 в общем выходе вирджиниамицина; контроль данного параметра проводили только при изучении эффекта добавления в ферментационную среду регулятора биосинтеза вирджиниамицина VB-C (Yang et al., 1995), причем как в присутствии, так и в отсутствие VB-C это соотношение было далеко от синергичного (91:9 и 86:14, соответственно). В то же время полученные нами результаты показывают, что различные источники углерода и азота способны влиять не только на общий выход вирджиниамицина, но и на указанное соотношение, причем в некоторых случаях достаточно высокий выход вирджиниамицина может

сопровождаться выходом за пределы оптимального диапазона данного параметра. Поскольку получение штаммов с повышенным выходом антибиотика при сохранении соотношения его индивидуальных компонентов позволяет исключить из технологической цепочки производства субстанции вирджиниамицина этапы, связанные с необходимостью коррекции соотношения M1:S1 в конечной субстанции или разделения синтезируемых компонентов с целью последующего смешения в нужной пропорции, представляется целесообразным проведение дополнительного контроля данного параметра в процессе разработки новых штаммов-продуцентов, а также оптимизации ферментационных сред.

В последние годы в микробиологическом производстве биологически активных веществ начали активно использовать адсорбирующие смолы, добавление которых в ферментационную среду позволяет уменьшить эффект самоингибирования, отрицательно влияющий на продуктивность штаммов. Несмотря на широкое применение такого подхода в отношении ряда антибиотиков, в том числе родственного вирджиниамицину антибиотика пристинамицина (Jia et al., 2006; Zhang et al., 2012), авторам не удалось найти информации об использовании таких смол в производстве вирджиниамицина, за исключением одного патента (Yong, 2015), описывающего применение неидентифицированной макропористой смолы Dow в комбинации с неионным сурфактантом (производные жирных кислот или полисорбат) в качестве средства, улучшающего проницаемость клеточных мембран, а также газообмен в ферментационной среде в условиях промышленной ферментации. Согласно данному патенту, с учетом описанной в патенте оптимизации ферментационной среды, введение таких добавок позволило увеличить продуктивность используемого штамма при культивировании в ферментере объемом 10 м³ до уровня более 6 г/л. Однако приводимая в патенте информация не позволяет оценить ни относительный прирост продуктивности, связанный с добавлением смолы, ни соотношение M1:S1 в конечном продукте. В то же время, проведенное нами исследование нескольких вариантов адсорбирующих смол, продемонстрировало вариативность данного соотношения в зависимости от типа смолы и позволило подобрать оптимальный сорбент, обеспечивающий дополнительное увеличение выхода вирджиниамицина на 29% до уровня свыше 5 г/л с одновременным сохранением оптимального соотношения M1:S1 (72:28). Подобранный сорбент Amberlite XAD-16 обеспечивает селективное связывание более 90% продуцируемых компонентов M1 и S1 из культуральной жидкости, что способно существенно облегчить дальнейшее выделение и очистку антибиотика. Кроме того, устойчивость данного сорбента к органическим растворителям позволяет его многократное использование для сорбции-десорбции вирджиниамицина; регенерацию смолы осуществляют путем промывки органическими растворителями (низшие спирты, ацетон) и 5% NaOH.

Следует отметить, что обнаруженная вариабельность соотношения M1:S1 в зависимости от типа используемой смолы представляет собой интересный феномен, не описанный ранее для производства вирджиниамицина, пристинамицина или иного подобного им двухкомпонентного антибиотика. Возможно, этот эффект связан со стерическими факторами, определяющими разный уровень адсорбции M1 и S1 различными смолами. С другой стороны, поскольку в нашем исследовании смолы добавляли в ферментационную среду до начала ферментации, они могли адсорбировать какие-то компоненты среды или метаболиты, важные для биосинтеза M1 и/или S1, создавая их дефицит, который, в свою очередь, мог приводить к сдвигу в соотношении вышеупомянутых компонентов. Для уточнения причин выявленного феномена необходимо проведение дополнительных исследований.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования был получен высокопроизводительный штамм-продуцент вирджиниамицина, подобран состав ферментационной среды и тип адсорбирующей смолы, обеспечившие конечный выход антибиотика на уровне свыше 5 г/л с сохранением оптимального соотношения его компонентов M1 и S1 (72:28). Впервые показано изменение соотношения M1:S1 в общем титре антибиотика в зависимости от различных компонентов среды и их концентрации. Полученные результаты будут использованы для дальнейшей селекционной работы, а также масштабирования технологии ферментации штамма S 15-30, и могут представлять определенный интерес для других исследователей, занимающихся производством данного антибиотика.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследование и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.579.21.0106 от 15.10.2015 г., RFMEFI57915X0106).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. Изучение нуклеотидных последовательностей *nifH* генов у представителей метанотрофных бактерий // Микробиология. – 2002. Т. 71. - № 4. – С. 500-508.

- Грозина А.А., Пронин В.В., Дюмин М.С. Морфологическая оценка стенки кишечника цыплят кросса «Кобб 500» на фоне применения антибиотика и пробиотика // Российский ветеринарный журнал. – 2014. – № 4. – С. 16-17.
- Егоров Н.С. Промышленная микробиология. – М.: Высшая школа, 1989. – 688 с.
- Хойцман А., Старосельский А., Аппаш У., Тарасова К.С., Елисова Т.В. Влияние препарата Stafac®110 на продуктивность цыплят-бройлеров в промышленных условиях России // Птицеводство. – 2011. – № 7. – С. 30-32.
- Arshad M., Anjum Z.M., Asghar M., Bhatti H. Improving bio-ethanol yield: using virginiamycin and sodium flouride at a Pakistani distillery // African J. Biotechnol. – 2011. – V. 10. – No. 53. – P. 11071-11074.
- Biot A.M. 1984. Virginiamycins: properties, biosynthesis, and fermentation. In: Biotechnology of industrial antibiotics (Vandamme E.J., ed.). New York–Basel: Dekker. – P. 695–720.
- Cervantes H., Bafundo K., Ewing P., Pesti G., Bakalli R. Dietary supplementation with virginiamycin or phytase improves phosphorus utilization in broiler chicks // Poult. Sci. – 2002. – V. 81 (Suppl. 1). – P. 43.
- Cocito C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components // Microbiol. Rev. – 1979. – V. 43. – P. 145-198.
- De Somer P., Van Dijk P. A preliminary report on antibiotic number 899, a streptogramin-like substance // Antibiot. Chemother. – 1955. – V. 5. – P. 632-639.
- Di Giambattista M., Chinali G., Cocito C. The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes // J. Antimicrob. Chemother. – 1989. – Vol. 24. – P. 485–507.
- Feighner S.D., Dashkevich M.P. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53. – P. 331–336.
- Gossele F., Blain P., Marneffe T., Biot A. High-performance liquid chromatographic determination of virginiamycin in Stafac, premixes and animal feeds // Analyst. – 1991. – V. 116. – P. 1373-1380.
- Han F., Li G., Zou J., Deng J., Huang L. Method for biosynthesizing virginiamycin by streptomycete. Patent CN102943102. – 2013.
- Ives S.E., Titgemeyer E.C., Nagaraia T.G., del Barrio A., Bindel D.J., Hollis L.C. Effect of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed // J. Anim. Sci. – 2002. – V. 80. – P. 3005-3015.
- Jia B., Jin Z.H., Lei Y.L., Mei L.H., Li N.H. Improved production of pristinamycin coupled with an adsorbent resin in fermentation by *Streptomyces pristinaespiralis* // Biotechnol. Lett. – 2006. – V. 28. – P. 1811-1815.
- Lam K.S., Veitch J.A., Lowe S.E., Forenza S. Effect of neutral resins on the production of dynemicins by *Micromonospora chersina* // J. Ind. Microbiol. – 1995. – V. 15. – P. 453–456.
- Lane D.J. 1991. 16S/23S sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics / Stackebrandt E., Goodfellow M., eds. – Chichester: Wiley. – P. 115-175.
- Lanoot B., Vancanneyt M., Hoste B., Cnockaert M.C., Piecq M., Gossele F., Swings J. Phenotypic and genotypic characterization of mutants of the virginiamycin producing strain 899 and its relatedness to the type strain of *Streptomyces virginiae* // System. Appl. Microbiol. – 2005. – V. 28. – P. 77–84.
- Lavrenova V. 2016. Import of antibacterial drugs. In: Annual book «Business partner. Agriculture of Russia'2016». Moscow: Agricultural Technologies. – P. 38-41.
- Mast Y., Wohlleben W. Streptogramins – two are better than one! // Int. J. Med. Microbiol. – 2014. – V. 304. – P. 44-50.
- Nomura H., Kimura K., Sasao K., Okabe M., Ishikura T. A method for enhancing the yield of depsipeptide antibiotics by fermentation. Patent EP0247587. – 1990.
- Phillips T., Chase M., Wagner S., Renzi C., Powell M., DeAngelo J., Michels P. Use of *in situ* solid-phase adsorption in microbial natural product fermentation development // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – V. 40. – P. 411–425.
- Pietra F. 2002. Biodiversity and natural product diversity. – Pergamon: Elsevier. – P. 30.
- Prikrylova V., Blumauerova M., Sedmera P., Vanek Z., Marsalek J., Kristan V. Strain development in *Streptomyces virginiae*, a producer of virginiamycin // Biotechnol. Bioind. – 1987. – V. 2. – P. 20-22.
- Pulsawat N., Kitani S., Fukushima E., Nihira T. Hierarchical control of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae* by three pathway-specific regulators: VmsS, VmsT and VmsR // Microbiology. – 2009. – V. 155. – P. 1250–1259.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1977. – V. 84. – P. 5463-5467.
- Shojadoost B., Peighambari S.M., Nikpiran H. Effects of virginiamycin against experimentally induced necrotic enteritis in broiler chickens vaccinated or not with an attenuated coccidial vaccine // J. Appl. Poult. Res. – 2013. – V. 22. – P. 160–167.

- Singh M., Chauhan S.S., Kumar P. Effect of supplementation on diets with BMD and virginiamycin on the growth performance, carcass characteristics and bacterial population in broiler chickens // *Vet. World* – 2008. – V. 1. – P. 141-143.
- Singh M.P., Leighton M.M., Barbieri L.R., Roll D.M., Urbance S.E., Hoshan L., McDonald L.A. Fermentative production of self-toxic fungal secondary metabolites // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – V. 37. – P. 335–340.
- Takuya N., Shigeru K. Gene for biosynthesis of Virginiamycin M, their gene cluster and use thereof. Patent JP2007061045. – 2007.
- Van Boeckel T.P., Gandra S., Ashok A., Caudron Q., Grenfell B.T., Levin S.A., Laxminarayan R. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data // *Lancet Infect. Dis.* – 2014. – V. 3099. – P. 1–9.
- Virginiamycin global market and forecast research 2015. <http://www.marketresearchreports.com/chem-report/virginiamycin-global-market-and-forecast-research-2015> Accessed Oct 22, 2016.
- Warr G.A., Veitch J.A., Walsh A.W., Hesler G.A., Pirnik D.M., Leet J.E., Lin P.F.M., Medina I.A., McBrien K.D., Forenza A., Clark J.M., Lam K.S. BMS-182123, a fungal metabolite that inhibits the production of TNF- α by macrophages and monocytes // *J. Antibiot.* – 1996. – V. 49. – P. 234–240.
- Yang Y.K., Shimizu H., Shioya S., Suga K., Nihira T., Yamada Y. Optimum autoregulator addition strategy for maximum virginiamycin production in batch culture of *Streptomyces virginiae* // *Biotechnol. Bioeng.* – 1995. – V. 46. – P. 437-442.
- Yong R. Culture medium for producing virginiamycin through *Streptomyces virginiae* fermentation and feeding method of culture medium. Patent CN104480174. – 2015.
- Zhang L.J., Jin Z.H., Chen X.G., Jin Q.C., Feng M.G. Glycine feeding improves pristinamycin production during fermentation including resin for in situ separation // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2012. – V. 35. – P. 513-517.
- Zhang Z., Zhao W., Cheng Q. Culture medium for biosynthesis of virginiamycin M. Patent CN101538539. – 2011.
- Zvenigorodskii V.I., Tyaglov B.V., Voeikova T.A. Isolation of components of the peptide antibiotic virginiamycin and breeding of their producer, *Streptomyces virginiae* // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2001. – V. 37. – P. 260–266.

REFERENCES

- Arshad, M., Anjum, Z.M., Asghar, M., Bhatti, H. (2011) Improving bio-ethanol yield: using virginiamycin and sodium flouride at a Pakistani distillery. *African J. Biotechnol.*, 10(53), 11071-11074.
- Biot, A.M. (1984). Virginiamycins: properties, biosynthesis, and fermentation. In: *Biotechnology of industrial antibiotics* (Vandamme E.J. ed.). New York–Basel: Dekker.
- Bulygina, E.S., Kuznetsov, B.B., Marusina, A.I., Kravchenko, I.K., Bykova, S.A., Kolganova, T.V., Gal'chenko, V.F. (2002). Izychenie nukleotidnyh posledovatel'nostei *nifH* genov u predstavitelei metanotrofnih bakterii. *Mikrobiologiya*, 71(4), 500-508 (in Russian).
- Cervantes, H., Bafundo, K., Ewing, P., Pesti, G., Bakalli, R. (2002). Dietary supplementation with virginiamycin or phytase improves phosphorus utilization in broiler chicks. *Poult. Sci.*, 81 (Suppl. 1), 150.
- Cocito, C. (1979). Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol. Rev.*, 43(2), 145-198.
- De Somer, P., Van Dijck, P. (1955). A preliminary report on antibiotic number 899, a streptogramin-like substance. *Antibiot. Chemother.*, 5, 632-639.
- Di Giambattista, M., Chinali, G., Cocito, C. (1989). The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24, 485–507.
- Egorov, N.S. (1989). *Promyshlennaya mikrobiologiya*. Moscow: Vysshaya shkola (in Russian).
- Feighner, S.D., Dashkevich, M.P. (1987). Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 331-336.
- Gossele, F., Blain, P., Marneffe, T., Biot, A. (1991). High-performance liquid chromatographic determination of virginiamycin in Stafac, premixes and animal feeds. *Analyst*, 116, 1373-1380.
- Grozina, A.A., Pronin, V.V., Dyumin, M.S. (2014). Morfologicheskaya otsenka stenki kishechnika tsyplyat krossa 'Kobb 500' na fone primeneniya antibiotika i probiotika. *Rossiiskiy veterinarniy zhurnal*, 4, 16-17 (in Russian).
- Han, F., Li, G., Zou, J., Deng, J., Huang, L. (2013). *Method for biosynthesizing virginiamycin by streptomycete*. Patent CN102943102.
- Hoyzman, A., Staroselsky, A., Ashash, U., Tarasova, K.S., Elisova, T.V. (2011). Vliyanie preparata Stafac®110 na produktivnost tsyplyat-broilerov v promyshlennykh usloviyakh Rossii. *Ptitsvodstvo*, 7, 30-32 (in Russian).

- Ives, S.E., Titgemeyer, E.C., Nagaraia, T.G., del Barrio, A., Bindel, D.J., Hollis, L.C. (2002). Effect of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed. *J. Anim. Sci.*, 80, 3005-3015.
- Jia, B., Jin, Z.H., Lei, Y.L., Mei, L.H., Li, N.H. (2006). Improved production of pristinamycin coupled with an adsorbent resin in fermentation by *Streptomyces pristinaespiralis*. *Biotechnol. Lett.*, 28(22), 1811-1815.
- Lam, K.S., Veitch, J.A., Lowe, S.E., Forenza, S. (1995). Effect of neutral resins on the production of dynemicins by *Micromonospora chersina*. *J. Ind. Microbiol.*, 15(5), 453-456.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., eds.). Chichester: Wiley.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Cnockaert, M.C., Piecq, M., Gossele, F., Swings, J. (2005). Phenotypic and genotypic characterization of mutants of the virginiamycin producing strain 899 and its relatedness to the type strain of *Streptomyces virginiae*. *System. Appl. Microbiol.*, 28, 77-84.
- Lavrenova, V. (2016). Import of antibacterial drugs. In: Annual book Business partner. Agriculture of Russia 2016. Moscow: Agricultural Technologies.
- Mast, Y., Wohlleben, W. (2014). Streptogramins – two are better than one! *Int. J. Med. Microbiol.*, 304(1), 44-50.
- Nomura, H., Kimura, K., Sasao, K., Okabe, M., Ishikura, T. (1990). A method for enhancing the yield of depsipeptide antibiotics by fermentation. Patent EP0247587.
- Phillips, T., Chase, M., Wagner, S., Renzi, C., Powell, M., DeAngelo, J., Michels, P. (2013). Use of *in situ* solid-phase adsorption in microbial natural product fermentation development. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 411-425.
- Pietra, F. (2002) *Biodiversity and natural product diversity*. Pergamon: Elsevier.
- Prikrylova, V., Blumauerova, M., Sedmera, P., Vanek, Z., Marsalek, J., Kristan, V. (1987). Strain development in *Streptomyces virginiae*, a producer of virginiamycin. *Biotechnol. Bioind.*, 2(2), P. 20-22.
- Pulsawat, N., Kitani, S., Fukushima, E., Nihira, T. (2009). Hierarchical control of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae* by three pathway-specific regulators: VmsS, VmsT and VmsR. *Microbiology*, 155, 1250-1259.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5463-5467.
- Shojadoost, B., Peighambari, S.M., Nikpiran, H. (2013). Effects of virginiamycin against experimentally induced necrotic enteritis in broiler chickens vaccinated or not with an attenuated coccidial vaccine. *J. Appl. Poult. Res.*, 22(2), 160-167.
- Singh, M., Chauhan, S.S., Kumar, P. (2008). Effect of supplementation on diets with BMD and virginiamycin on the growth performance, carcass characteristics and bacterial population in broiler chickens. *Vet. World*, 1(5), 141-143.
- Singh, M.P., Leighton, M.M., Barbieri, L.R., Roll, D.M., Urbance, S.E., Hoshan, L., McDonald, L.A. (2010). Fermentative production of self-toxic fungal secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 335-340.
- Takuya, N., Shigeru, K. (2007). *Gene for biosynthesis of virginiamycin M, their gene cluster and use thereof*. Patent JP2007061045.
- Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect. Dis.*, 3099(14), 1-9.
- Virginiamycin global market and forecast research 2015*. Retrieved from: <http://www.marketresearchreports.com/chem-report/virginiamycin-global-market-and-forecast-research-2015> Accessed Oct 22, 2016.
- Warr, G.A., Veitch, J.A., Walsh, A.W., Hesler, G.A., Pirnik, D.M., Leet, J.E., Lin, P.F.M., Medina, I.A., McBrien, K.D., Forenza, A., Clark, J.M., Lam, K.S. (1996). BMS-182123, a fungal metabolite that inhibits the production of TNF- α by macrophages and monocytes. *J. Antibiot.* 49(3). 234-240.
- Yang, Y.K., Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K., Nihira, T., Yamada, Y. (1995). Optimum autoregulator addition strategy for maximum virginiamycin production in batch culture of *Streptomyces virginiae*. *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 437-442.
- Yong, R. (2015). *Culture medium for producing virginiamycin through Streptomyces virginiae fermentation and feeding method of culture medium*. Patent CN104480174.
- Zhang, L.J., Jin, Z.H., Chen, X.G., Jin, Q.C., Feng, M.G. (2012). Glycine feeding improves pristinamycin production during fermentation including resin for in situ separation. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 35(4), 513-517.
- Zhang, Z., Zhao, W., Cheng, Q. (2011). *Culture medium for biosynthesis of virginiamycin M*. Patent CN101538539.
- Zvenigorodskii, V.I., Tyaglov, B.V., Voeikova, T.A. (2001). Isolation of components of the peptide antibiotic virginiamycin and breeding of their producer, *Streptomyces virginiae*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 37(3), 260-266.