

ДНІПРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ОЛЕСЯ  
ГОНЧАРА

Біолого-екологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Кваліфікаційна робота**

другий (магістерський) рівень вищої освіти

спеціальність 162. Біотехнології та біоінженерія

на тему: «ІНТЕНСИФІКАЦІЯ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ  
*STREPTOMYCES* SP. 31 ДЛЯ ОТРИМАННЯ БІОПРЕПАРАТІВ  
СТИМУЛЮЮЧОЇ ДІЇ»

Виконавець

Студент групи БН-22м

Семененко Ігор Валерійович

(П.І.Б)

(підпис)

Керівник

канд.біол.наук, доцент

Лихолат Тетяна Юріївна

(П.І.Б)

(підпис)

Завідувач випускової кафедри

мікробіології, вірусології та біотехнології

канд.біол.наук, доцент

Скляр Тетяна Володимирівна

(П.І.Б)

(підпис)

## РЕФЕРАТ

Дипломна кваліфікаційна робота містить: 55 сторінок, 1 таблицю, 15 рисунків, 68 джерел.

Об'єкт дослідження: штам *Streptomyces* sp. 31, отриманий зі звичайних чорноземних ґрунтів.

Мета даної роботи полягає у визначенні впливу деяких амінокислот на біосинтетичну активність штаму *Streptomyces* sp. 31.

Методи дослідження: біохімічні, біометричні, мікробіологічні.

Одержані висновки та їх новизна. Виявлено, що не всі досліджені амінокислоти можуть бути використані в якості індукторів біосинтетичної активності *Streptomyces* sp. 31. Також встановлено, що на різні аспекти біосинтетичної активності стрептоміцета мають вплив різні досліджувані амінокислоти. Спостерігалася пряма кореляція збільшення синтезу білка та біомаси при використанні тільки однієї амінокислоти (серед досліджених) – треоніну у концентраціях 100 та 200 мкг/мл.

Практичне та теоретичне значення. Отримані результати є науковою основою впровадження оптимального складу поживного середовища під час отримання біотехнологічних препаратів з організму *Streptomyces* sp. 31.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** СТРЕПТОМІЦЕТИ, АМІНОКИСЛОТИ, ЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ, ФЕРМЕНТАЦІЯ, ІНДУКТОРИ.

## RESUME

Diploma qualification work contains: 55 pages, 1 table, 15 figures, 68 sources.

The object of the study: *Streptomyces sp. 31* strain obtained from ordinary chernozem soils.

The aim of this work is to determine the influence of certain amino acids on the biosynthetic activity of the *Streptomyces sp. 31* strain.

Research Methods: biochemical, biometric, microbiological.

Conclusions and Novelty: It has been found that not all investigated amino acids can be used as inducers of biosynthetic activity in *Streptomyces sp. 31*. It is also established that different amino acids studied have an impact on various aspects of the biosynthetic activity of the actinomycete. A direct correlation was observed between increased protein and biomass synthesis when using only one amino acid (among those studied) - threonine at concentrations of 100 and 200 µg/ml.

Practical and theoretical significance. The obtained results serve as a scientific basis for implementing the optimal composition of nutrient media during the production of biotechnological preparations from the organism *Streptomyces sp. 31*.

KEYWORDS: ACTINOMYCETES, AMINO ACIDS, LYTIC ACTIVITY, FERMENTATION, INDUCERS.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	5
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	7
1 Загальна характеристика організмів роду <i>Streptomyces</i> .....	7
1.1 Основі властивості стрептоміцетів .....	9
1.2 Роль <i>Streptomyces</i> в біотехнології.....	11
1.3 Фактори, що впливають на біосинтетичну активність <i>Streptomyces</i> .....	13
2 Оптимізація середовища культивування як метод підвищення виходу цільового продукту .....	22
2.1 Огляд наявних біотехнологічних препаратів стимуляторів вироблених організмами роду <i>Streptomyces</i> .....	27
2.2 Ефекти біоудобрення .....	27
2.3 Ефекти біостимуляції .....	28
2.4 Біопротекція.....	29
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	32
3 Матеріали та методи досліджень .....	32
3.1 Характеристика місця проведення досліджень .....	32
3.2 Характеристика об'єкта досліджень.....	33
3.3 Методи досліджень.....	34
3.4 Статистична обробка даних.....	38
4 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ .....	41
4.1 Дослідження впливу ряду амінокислот на розвиток <i>Streptomyces</i> <i>sp.31</i> .....	41
4.2 Вивчення альтернативних джерел азотного живлення .....	44
ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	47

## ВСТУП

Одним з головних завдань біотехнології є постійний пошук шляхів для підвищення ефективності того чи іншого виробничого процесу. Це досягається різними способами: підвищенням швидкості накопичення біомаси мікроорганізма-продуцента, інтенсифікацією синтезу цільового метаболіту (продукту); зменшенням кількості необхідних ресурсів, оптимізацією виробничих енерговитрат тощо [1, 2]. Задля досягнення цієї мети науковці постійно шукають та досліджують зовнішні та внутрішні фактори впливу, які для певного продуцента будуть мати індукційний ефект, тобто будуть тим чи іншим шляхом прискорювати або змінювати метаболічні процеси самого біологічного об'єкта.

Використання стимуляторів хімічного походження не завжди є прийнятним для біотехнологічних промислових процесів, особливо на виробництвах біопрепаратів медичного та харчового призначення.

Але, відомо, що потенційними продуцентами біологічно активних речовин – стимуляторів метаболічних процесів у живих організмів є мікроорганізми. Встановлено успішне використання стимуляторів мікробного походження в рослинництві, тваринництві, бджільництві, рибництві [3, 4].

Одними з продуцентів таких індукторів впливу є мікроорганізми роду *Streptomyces*. Стрептоміцети є продуцентами вітамінів групи В, гіберелінів, імуномодуляторів, антибіотиків тощо.

Тому необхідно вести пошук препаратів-індукторів для прискорення розвитку самих стрептоміцетів, з метою отримання у перспективі за їх допомогою більшої кількості біологічно-активних речовин.

Спектр індукторів, що використовуються, або можуть теоретично бути задіяні в інтенсифікації розвитку мікроорганізмів є дуже широким.

Прикладом стимуляторів біологічної природи є антибіотики у певних концентраціях. Вони впливають на ростові процеси, накопичення біомаси та

активують окремі фізіологічні функції. Так, пеніцилін у дозах 1-5 мкг/мл мав дуже різний вплив на розвиток продуцента стрептоміцину *Streptomyces griseus* в залежності від віку культури. В ранні строки росту даного виду стрептоміцету антибіотик пригнічував, а в пізні строки – стимулював синтез стрептоміцину [5, 6].

Важливий вплив на біосинтетичну активність мікроорганізмів має склад поживного середовища, в тому числі і такий його компонент як джерело азоту. Відомі роботи, в яких показані позитивні дані впливу ряду амінокислот на відповідні фізіологічні характеристики *Streptomyces recifensis var. lyticus 2P-15* [7, 8, 9].

Але, вплив органічних або неорганічних форм азоту як індукторів біосинтезу та росту є вкрай індивідуальним для кожного мікроорганізму і повинен визначатися емпіричним шляхом. Саме тому актуальним є проведення дослідження впливу амінокислот на метаболізм *Streptomyces sp. 31*.

Мета даної роботи полягає у визначенні впливу деяких амінокислот на біосинтетичну активність штаму *Streptomyces sp. 31*.

Відповідно до мети, задачі роботи наступні:

- дослідження впливу ряду амінокислот в якості додаткового джерела живлення на розвиток штаму *Streptomyces sp. 31*;
- вивчення впливу деяких амінокислот як індукторів на біосинтез білка, активність стафілолітичних ферментів та динаміку накопичення біомаси штамом *Streptomyces sp. 31*;
- дослідження впливу треоніну в ролі єдиного джерела азотного живлення, з виключенням неорганічних форм азоту, зокрема  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , на відповідні фізіологічні характеристики штаму *Streptomyces sp. 31*.

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1 Загальна характеристика організмів роду *Streptomyces*

Рід *Streptomyces* вперше був описаний Ваксманом і Хенрічі у 1943 році. Рід *Streptomyces* відноситься до родини *Streptomycetaceae*. Загалом родина *Streptomycetaceae* може бути визначена за фізіологічними та морфологічними характеристиками, хімічним складом клітинних стінок, типом пептидоглікану, фосфоліпідів, ланцюгів жирних кислот, вмістом ГЦ та аналізом 16S рРНК. а також гібридизацією ДНК-ДНК [10].

Родина *Streptomycetaceae* належить до філуму *Actinobacteria* та порядку *Actinomycetales* в межах класу *Actinomycetales*. Рід *Streptomyces* є єдиним представником цієї родини. З точки зору кількості та різноманітності ідентифікованих видів, *Streptomyces* представляє одну з найбільших таксономічних одиниць серед визнаних актиноміцетів (Рисунок 1.1) [11, 12].

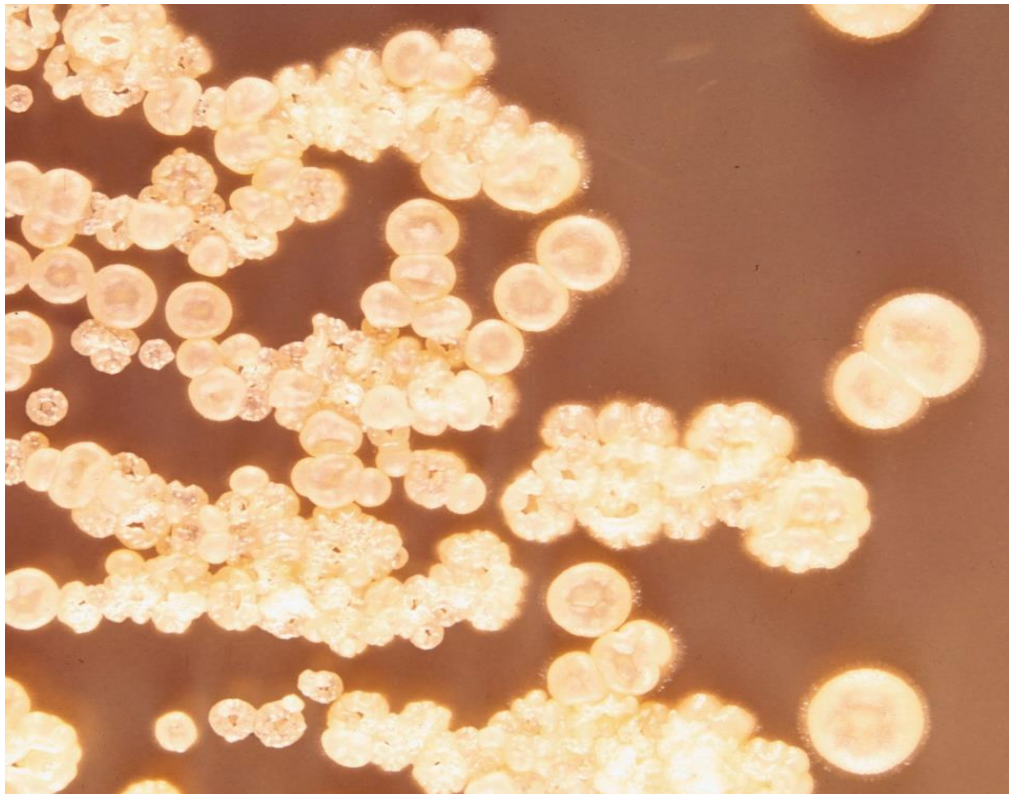


Рисунок 1.1 — Фотографія колоній *Streptomyces griseus* на поживному агарі

Стрептоміцети відомі як грампозитивні бактерії, аеробні, нестійкі до кислот та мають високий вміст ГЦ (понад 70 %). Вони здатні рости на різних середовищах і формують шар повітряних гіф, які можуть трансформуватися в ланцюг спор. Описано понад 500 видів роду *Streptomyces*, і майже дві третини антибіотиків, які зустрічаються в природі, виробляються саме ними [10].

### 1.1 Основі властивості стрептоміцетів

*Streptomyces* - це найбільший рід *Actinobacteria* і типовий рід сімейства *Streptomycetaceae*. Види *Streptomyces* є хемоорганотрофними, ниткоподібними грампозитивними бактеріями, не є грибами, але зустрічаються в тих же місцях існування [13, 14].

Вони мають геноми з високим вмістом ГЦ 69-78 %. Нитки та спори дуже малі — зазвичай 1 мкм або менше в діаметрі. Спори утворюються шляхом фрагментації ниток і розташовуються прямими, хвилястими або спіральними ланцюгами. Колонії повільно ростуть і часто мають запах ґрунту через виділення леткого метаболіту — геосміну [15, 16].

На початку життєвого циклу, колонії мають відносно гладку поверхню, але з часом утворюють повітряний міцелій, який може мати вигляд флокозної, зернистої, порошкоподібної або оксамитової структури [11].

Види *Streptomyces* є нерухомими, каталазопозитивними, здатними до редукції нітратів, розкладання аденіну, ескуліну, казеїну, желатину, гіпоксантину, крохмалю та тирозину. Пептидоглікан клітинної стінки містить велику кількість L-діамінопімелінової кислоти (L-DAP). Вони не мають міколевої кислоти, але містять у великій кількості насичені, ізо- та антиізо- жирні кислоти, а також гекса- або октагідрогенізовані менахінони з дев'ятьма ізопреновими одиницями [17, 18].

Життєвий цикл стрептоміцетів починається, коли спора осідає в живильному середовищі. Це стимулює спори проростати і утворювати

зародкові трубки. З ростом і розгалуженням зародкових трубок вони утворюють мережу ниток, яку називають субстратним міцелієм (Рисунок 1.2) [15].

Зі зростанням колонії, міцелій у центрі починає диференціюватися. Це призводить до утворення нового типу клітин — повітряних гіф. Коли надземні гіфи ростуть спіралью, мультигенієвими антени гіфів припиняють рости, і надземні гіфи починають синхронний поділ клітин, що призводить до моноплоїдних компартментів, які в кінцевому підсумку перетворюються на стійкі спори [19, 20].

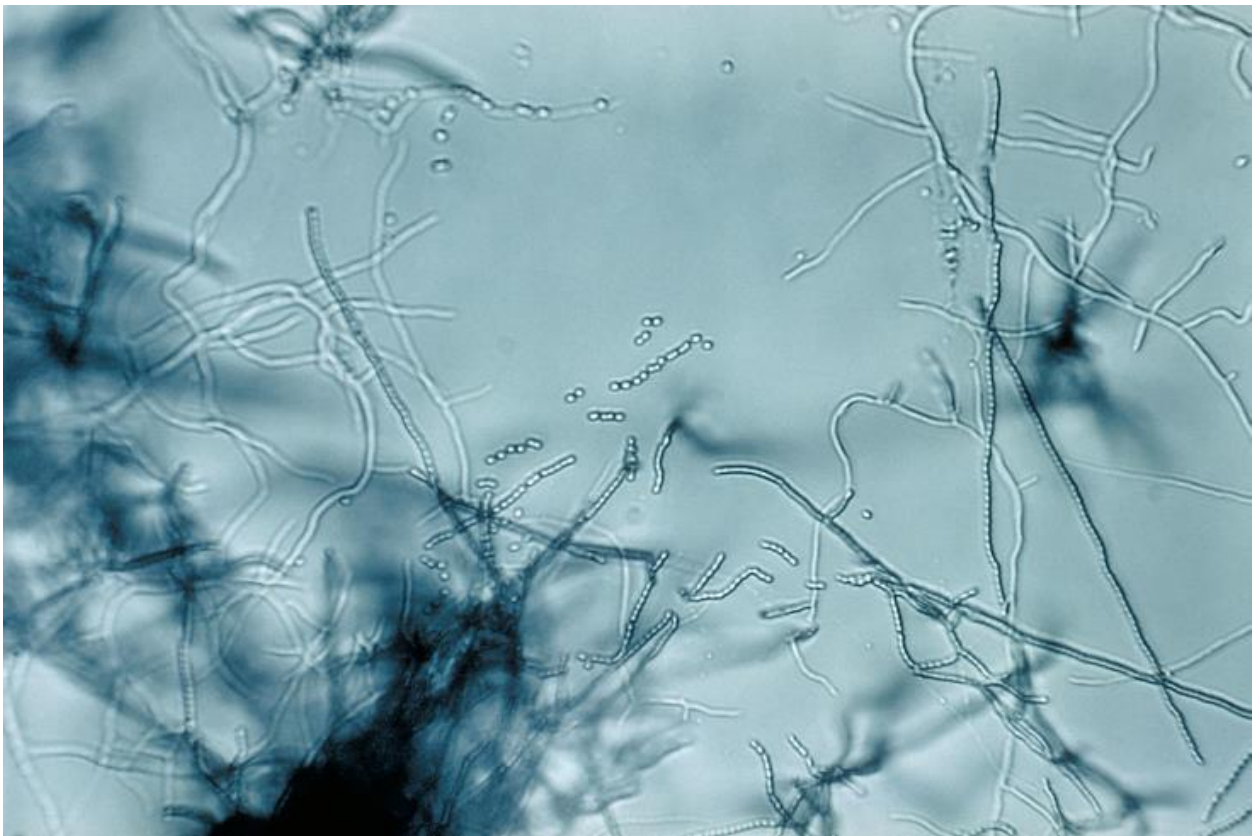


Рисунок 1.2 — Мікрофотографія міцелію *Streptomyces*

Життєвий цикл *Streptomyces sp.* був вивчений за допомогою методу фарбування ядер і описаний наступним чином: I - початкова фаза ядерного поділу; II - первинний міцелій; III - вторинний міцелій (включаючи повітряний); IV - утворення спор (Рисунок 1.3).

Первинний міцелій розвивається після початкової фази ядерного поділу і утворює бічні поділки, які пізніше викликають здуття в гіфах. Ці набряки ростуть і утворюють великі круглі клітини, кожна з яких містить багато ядер. Розвивається вторинний міцелій, частина якого стає надземною і закінчується утворенням ланцюжків спор [17, 18, 19].

Стрептоміцети - це аеробні, хемоорганотрофні бактерії, які потребують органічного джерела вуглецю, неорганічного джерела азоту та мінеральних солей і не залежать від вітамінів і факторів росту. Вимоги *Streptomyces* були досліджені Кустером і Вільямсом [20].

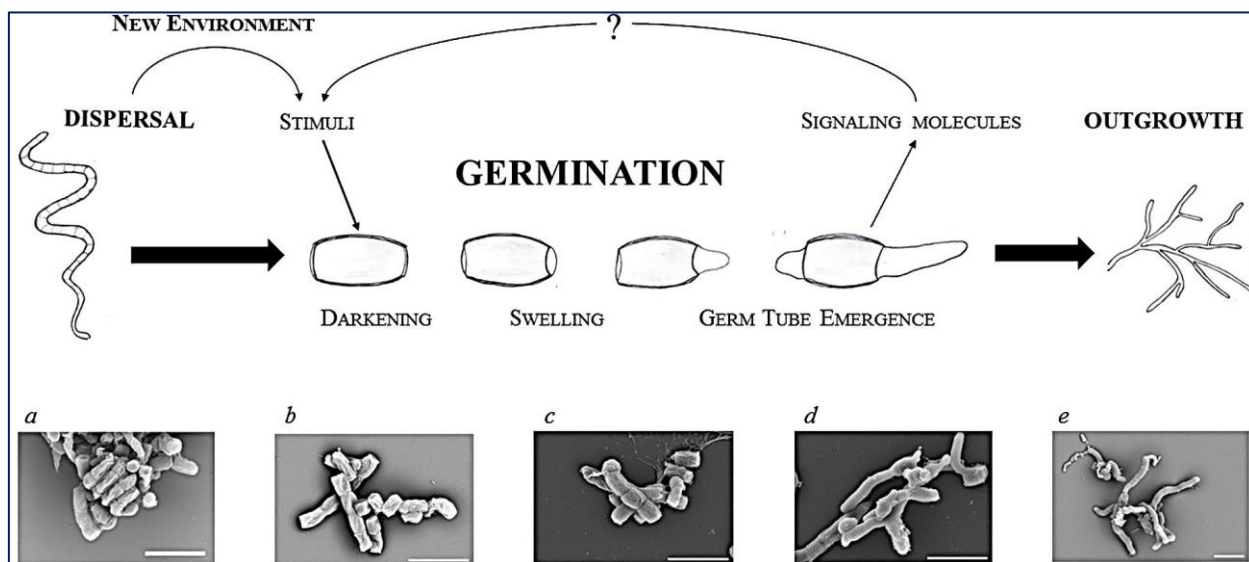


Рисунок 1.3 — Схема та фотографії проростання спор стрептоміцетів

Більшість *Streptomyces* sp. є мезофілами і ростуть при температурах від 10 до 37 градусів, але три види, такі як *Streptomyces thermonitrificans*, *S. thermovulgaris* і *S. thermoflavus*, є теплолюбними і ростуть при температурі 45-55 градусів Цельсія. Стрептоміцети ростуть при рН 6,5-8,0. Вони не тільки більш стійкі до посухи і утворюють артроспори, але також потребують менше вологи, ніж інші бактерії, і дуже чутливі до зволоження. Деякі звіти також вказують, що стрептоміцети зазвичай знаходяться в більшій кількості у сухих ґрунтах, таких як супіски та вапняки, порівняно з важкими глинистими ґрунтами [21, 22].

## 1.2 Роль *Streptomyces* в біотехнології

Рід *Streptomyces* відіграє надзвичайно важливу роль у біотехнології як виробник вторинних метаболітів з біомедичними застосуваннями, такими як антибіотики, протигрибкові, протівірусні та антигельмінтні засоби, протиново-новоузягнення, антигіпертензивні препарати, імунодепресори, гербіциди і цікаві пігменти. Основні вторинні метаболіти, вироблені стрептоміцетами, - це антибіотики: їх виробництво є видоспецифічним і важливим для штамів, щоб виживати в різних різноманітних середовищах, таких як суша або морське дно, і конкурувати з іншими мікроорганізмами, з якими вони можуть зіштовхнутися. На сьогоднішній день дві третини всіх антибіотиків, присутніх на ринку для медичного, ветеринарного та сільськогосподарського використання, виробляються штамми *Streptomyces*, такі як аміноглікозиди, лактами, макроліди, полієни та тетрацикліни для понад 5000 різних молекул і глобальний ринок понад 46 мільярдів доларів у 2018 році (Рисунок 1.4) [23, 24, 25].

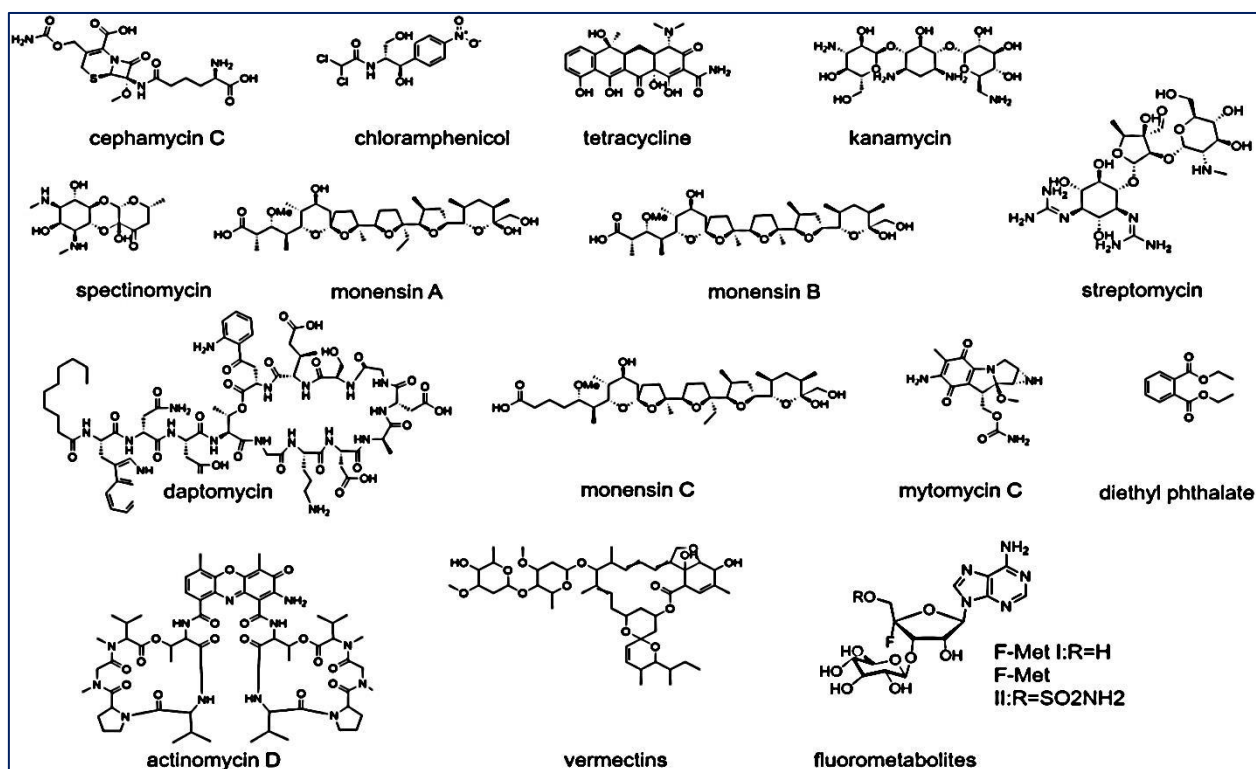


Рисунок 1.4 — Хімічна структура антибіотиків-вторинних метаболітів стрептоміцетів

Промислове виробництво вторинних метаболітів стрептоміцетами передусім відбувається шляхом ферментації в масштабних біореакторах. У рідинних занурених культурах більшість видів не утворюють спори, але виробляють міцелій, структура якого варіюється від ниток (*Streptomyces clavuligerus*) до скупчень та пелетових клітинних агрегатів (*S. coelicolor* або *S. griseus*). Ця різновидність морфології є фундаментальною для виробництва вторинних метаболітів та навіть необхідною для отримання великого виходу продукту. Існують кілька проблем у процесах ферментації стрептоміцетів для виробництва вторинних метаболітів: оскільки ці речовини виробляються головним чином в пізньому рості або стаціонарній фазі і в низьких концентраціях, промислові процеси зазвичай є дуже тривалими та витратними, часто із низькими виходами і продуктивністю [26, 27, 28].

Вибір штаму, склад середовища, рН та температура росту, швидкість подачі кисню в реакторі та стан агрегації міцелію завжди були ключовими параметрами, які потрібно враховувати при розробці ефективного промислового процесу. У останні роки класичні стратегії контролю цих параметрів були поєднані з більш інноваційними підходами, такими як ферментація на основі іммобілізованого міцелію, контроль метаболічних шляхів та доповнення попередників антибіотиків, генетична маніпуляція штаму або методи інженерії метаболізму [29, 30, 31].

У цій перспективі вивчення морфології, проведене з використанням скануючої електронної мікроскопії (SEM), трансмісійної електронної мікроскопії (TEM) або конфокально-лазерної скануючої флуоресцентної мікроскопії (CLSM), для кореляції змін міцелію з різними використовуваними підходами та кількістю вироблених вторинних метаболітів, також виявилось ключовим як у занурених, так і в іммобілізованих клітинних культурах [27, 28].

### 1.3 Фактори, що впливають на біосинтетичну активність *Streptomyces*

Фактори, що впливають на біосинтетичну активність *Streptomyces*. Існує кілька факторів та складних механізмів регулювання шляхів, специфічних для переходу від первинного до вторинного обміну речовин. Перемикач, який активується на конкретних стадіях розвитку бактерій, реагує на такі умови середовища, як температура, світло, рН, доступність джерел вуглецю, азоту та фосфору, концентрації металів та кисню, або додавання. Біотехнологічні підходи намагалися регулювати розпочаток та розвиток біосинтезу вторинних метаболітів, також розумно розробляючи склад поживних середовищ для росту та оптимізації умов ферментації. Але ці підходи завжди вимагали великих зусиль, оскільки активація шляху вторинного обміну речовин є видоспецифічною, і для кожного штаму *Streptomyces* необхідно розробляти індивідуальні протоколи. Вплив поживних речовин, особливо джерел вуглецю, на виробництво вторинних метаболітів був предметом численних і постійних досліджень з точки зору біохімії та процесу ферментації [32, 33, 34].

Вибір правильного джерела вуглецю може бути критичним для початку вторинного обміну речовин і обміну речовин. На молекулярному рівні використання одного джерела вуглецю замість іншого може вплинути на активацію або репресію (репресію вуглеводу) генів та транскрипційних сигналів; це явище є видоспецифічним і регулює синтез вторинних метаболітів і морфологічну диференціацію. Синтез аміноглікозидів, таких як стрептоміцин (*S. griseus*) і неоміцин (*S. fradiae*), призупиняється глюкозою за допомогою репресії біосинтетичних ферментів, таких як маннозідострептоміциназа та алкалічна фосфатаза [35, 36, 37].

Але, глюкоза також призупиняє синтез полікетиду актинородину (*Streptomyces lividans*) за допомогою репресії синтезу глобального регуляторного білка, який бере участь в стимуляції виробництва вторинних

метаболітів. Останнім часом для вивчення феноменів репресії вуглеводів було запропоновано транскриптомний аналіз. В останній роботі використовувався підхід використання мікрочіпів для вивчення механізму репресії вуглеводів *S. coelicolor M145* та ролі глюкозокінази, основного ферменту фосфорилування глюкози, в цьому механізмі. Дослідження показало, що глюкоза та глюкозокіназа впливали або змінювали експресію 651 та 134 генів відповідно. В майбутньому ці дослідження допоможуть краще зрозуміти, як вивільнити експресію генів та виробництво вторинних метаболітів шляхом модуляції джерела вуглецю. Використання гліцеролу замість глюкози може бути дієвою альтернативою, але часто середовища для виробництва вторинних метаболітів формуються з більш складними джерелами вуглецю, такими як декстрин, крохмаль, соєве борошно та картопляний екстракт. Використання середовищ зі складними джерелами вуглецю все ще є вигірною класичною стратегією, яка дозволяє як вибирати та перевіряти нові високопродуктивні штами, так і підвищувати виробництво вторинних метаболітів в процесах ферментації [33, 34].

Наприклад, хоча стрептоміцин виробляється промислово з *S. griseus* з 1945 року для поточного світового ринку, в літературних статтях все ще досліджують можливий вибір нових високопродуктивних штамів стрептоміцину з ґрунту на основі оптимізації складу середовища. Стрептоміцин - це водорозчинний аміноглікозид, який діє проти численних патогенних бактерій і широко використовується в медицині для лікування гострих інфекцій дихальних шляхів і сечовивідних шляхів у людей, а також ефективний як пестицид проти патогенних бактерій і грибків у рослин та дерев. Досліджуючи найкращий рН, в межах від 6,0 до 8,5 і змінюючи спеціально розроблене середовище на основі казеїну, додавши іони Fe (у формі  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), які виявилися найкращими металами для підтримки виробництва порівняно з Ca, Zn, Fe, Co, і крохмал як найкраще джерело вуглецю замість сахарози, мальтози, лактози та глюкози, недавно було отримано дуже високу концентрацію стрептоміцину в  $4,3 \text{ г} / \text{л}^{-1}$  протягом 96

годин росту на агаризованому середовищі новим штамом, віділеним з ґрунту. Останнім часом статистичні моделі також виявилися інноваційними та дуже корисними інструментами для оптимізації всіх компонентів середовища для росту [38, 39, 40].

Меланін - це темно-чорний пігмент та добрий захист від ультрафіолетового випромінювання та вільних радикалів, широко використовується як харчова добавка. Модель допомогла ідентифікувати амілодекстрин, екстракт дріжджів та  $\text{CuSO}_4$  як ключові вуглеводи, азот та метал для біосинтезу меланіну та визначити їх оптимальні концентрації для підвищення виробництва меланіну до  $13,7 \text{ г/л}^{-1}$  протягом 128 годин. Незважаючи на те, що в літературі є багато робіт, які намагалися краще зрозуміти всі події під час переходу від первинного до вторинного обміну речовин, поки що не існує повної картини взаємозв'язку між первинним і вторинними метаболічними мережами. Гарний первинний обмін речовин є фундаментальним для підтримки ефективного вторинного обміну речовин, оскільки він постачає енергію і енергію для побудови біомаси, а також попередників антибіотиків. Нові біотехнологічні підходи використовують аналізи обміну речовин і позначеної вуглецем  $^{13}\text{C}$  для вивчення вуглецевого потоку [41, 42].

У недавній статті аналізовано вуглецевий потік первинного обміну речовин двох штамів *S. coelicolor* A3 (дикого типу (M 145) і зміненого штаму, якому бракує генетичних кластерів, що кодують синтез антибіотика актинородину (M 1146), при сталому стані і порівняно для кращого розуміння впливу біосинтезу антибіотиків на центральний обмін речовин. У зміненому штаму було виявлено вищу швидкість росту, вищу формування біомаси та вищий потік через шлях пентоз-фосфату, а також накопичення ацетил-СоА як попередника актинородину [43, 44].

Отже, метаболічні відмінності між двома штамми дозволили визначити енергетичні витрати на синтез актинородину. У іншому дослідженні використовувався той самий штам *S. coelicolor* A3 M 145 в

глибинних ферментерах, щоб точно визначити перехід від первинного до вторинного обміну речовин у відповідь на вичерпання фосфату або L-глутамату та зв'язати його з виробництвом антибіотика актинородину. Деякі поживні речовини, такі як фосфати та амінокислоти, є необхідними для початкової первинної фази росту. Коли вони починають вичерпуватися і стають обмежувачими компонентами для росту, починається стаціонарна фаза і виробництво антибіотиків. Але їх початкові концентрації також важливі: з надлишком фосфату в початковому середовищі, наприклад, ріст спрямовується на виробництво більшої кількості біомаси і утворення великого міцелію, але стаціонарна фаза відкладається та / або виробництво великої кількості антибіотиків припиняється або пригнічується. Концентрація фосфатів 4,6 мМ виявилася достатньою для підтримки росту *S. coelicolor* A3 M 145 (до 6,0 г/л<sup>-1</sup>) і навіть для підвищення виробництва антибіотиків, тоді як L-глутамат є хорошим альтернативним джерелом азоту порівняно з більш загально використовуваним і складним казеїном з молоком та кращим, ніж амоній, який призводить до дуже повільного росту міцелію [45, 46].

В поєднанні з глюкозою він надає достатньо енергії та пониженої потужності для підтримки високої швидкості росту. Постачання попередників, поєднане з оптимізацією середовища, останнім часом було розумною стратегією для підвищення виходу антибіотиків [42, 43].

Даптоміцин - це циклічний ліпопептидний антибіотик, який виробляється *Streptomyces roseosporus* та затверджений FDA в 2003 році як засіб для лікування інфекцій шкіри, ендокардиту правої сторони і бактерії, оскільки він здатний діяти проти метицилінорезистентних *Staphylococcus aureus* та ванкоміцинорезистентних штамів *Enterococci* [45, 46].

В культивуваннях *S. roseosporus* NRRL 11379 натрієвий деканоат використовувався як ефективний попередник даптоміцину, оскільки є думка, що він підсилює виразність ключових білків біосинтетичних шляхів, таких як гуанозинпентапентазна синтетаза, полірібонуклеотиднотрансферазна

фосфорилаза та трипептидиламінопептидаза. За допомогою доповнення натрієвим деканоатом ( $0,6 \text{ г/л}^{-1}$  додано за 48 годин) разом з культуральним середовищем на основі декстрину як основного джерела вуглецю та екстракту дріжджів як джерела азоту, склад якого було оптимізовано ортогональним експериментальним дизайном, та живленням декстрином, коли концентрація джерела вуглецю була нижче  $20 \text{ г/л}^{-1}$ , було досягнуто виробництво даптоміцину в  $0,81 \text{ г/л}^{-1}$  за 288 годин в 3,6-літрових партійних експериментах [47, 48].

Важливими регуляторами метаболізму є білки та ферменти. Біосинтез метаболітів залежить від злагодженої регуляції біологічних механізмів, які беруть участь у трансляції ДНК в функціональні білки. У *Streptomyces* було виявлено кілька мереж взаємодії регуляторів, створених шляхово-специфічними регуляторами та плейотропними загальними регуляторами [49].

Інгібітори гістондеацетилази (HDAC) стимулюють деякі біосинтетичні шляхи. HDAC протистоїть ацетилюванню гістонів та контролює експресію генів, викликаючи зміни в структурі хромосом та експресії генів у еукаріотів. Навпаки, інгібітори HDAC спрямовано впливають на HDAC для зміни цього регуляційного ефекту. Що цікаво, інгібіторам HDAC властивий вплив на обмін речовин у *S. coelicolor* [47].

Інгібітори HDAC, такі як натрієвий бутират у концентрації 25 мМ та вальпроїнова кислота у концентрації 0,5 мМ, інгібували продукцію АСТ та зменшили продукцію RED на середовищі R5, що є багатим середовищем для штаму *S. coelicolor* A3 (2), M145. Однак з мінімальним середовищем 25 мМ натрієвий бутират сильно індукує продукцію АСТ та слабо індукує продукцію RED, тоді як 1 мМ вальпроїнова кислота сильно індукує продукцію АСТ. Крім того, інгібітори HDAC, такі як субероїланлідгідроксамова кислота, трихостатин А, апіцідин, фенілбутират, сплітоміцин, резвератрол та кверцетин, інгібують продукцію АСТ і/або RED в *S. coelicolor*. Зокрема, варіація, викликана натрієвим бутиратом, подібна до

тієї, яку викликає індукція N-ацетилглюкозаміну, яка викликана транскрипційним фактором DasR. Тим часом, інгібітори HDAC пригнічують продукцію АСТ на багатому середовищі і сприяють перепродукції АСТ на пластинках з мінімальним середовищем, виявляючи взаємодію з поживнішим регулюванням. Це свідчить про існування синергетичного ефекту і вказує на новий напрямок для вивчення молекулярного механізму, яким цей інгібітор HDAC змінює регуляцію синтезу антибіотиків [50, 51].

HDAC та його пов'язані білки відомі як репресори або співрепресори зв'язування з ДНК. Перевищення сиртуїноподібної молекули SCO6464 пригнічувало продукцію АСТ та RED *S. coelicolor* на агарі R5, і цей ефект був знятий додаванням сплітоміцину. Інгібітори HDAC зняли це пригнічення, відрегулювавши динамічну хроматиноподібну структуру нуклеоїду в *S. coelicolor*. Підвищення деяких біосинтетичних шляхів (включаючи цукор, сесквітерпен, гопаноїди, герміцидин та коелібактин) після обробки інгібіторами HDAC в *S. coelicolor* може відбуватися через модифікацію структури нуклеоїду з одночасною зміною експресії генів класів вторинного обміну, серед іншого. Ймовірно, цей метод може бути використаний для відбору потенційних нових антибіотиків, підвищення активності існуючих антибіотиків чи подолання інгібіторного впливу на виробництво антибіотиків [49, 50].

Також, оксидаза холестерину підсилює виробництво антибіотиків, виступаючи як детектор грибів [52].

Оксидази холестерину є флавопротеїнами, які каталізують розклад холестерину або інших стеролів з 3- $\beta$ -гідроксильною групою. До цього часу виявлено численні генні кластери *Streptomyces* для синтезу невеликих поліфнів, які містять ген, що кодує оксидазу холестерину, такі як генні кластери пімарицину, тетраміцину, філіпіну та рімоцидіну/CE-108 [51, 52].

У *S. natalensis*, rimE, здається, має очевидну роль у виробництві антигрибкових речовин, а саме впливає на синтез та конденсацію вуглецевого скелету та глікозилу. Однак функціональні аналізи

підтверджують, що *rimE* є необхідним для біосинтезу пімарицину. Ця екстрацелюлярна оксидаза холестерину була виявлена відновлювати виробництво пімарицину при додаванні до культур клітин з нективованими мутантами або "спокійними клітинами". Вони також підтвердили, що додатковий екземпляр *sgnE*, який надає вищу активність оксидази холестерину, підсилює виробництво пімарицину в *S. gilvosporeus* [53].

Було запропоновано те, що оксидаза холестерину може виступати як детектор грибів. Як тільки виявлено ергостерол, представника грибів, спрацьовує відповідь, що викликає біосинтез антигрибкових антибіотиків, і починається виробництво натаміцину. Останні дослідження з *S. gilvosporeus* вказують, що регуляторний механізм оксидази холестерину може бути прямо пов'язаний з гомеостазом реактивних форм кисню (РФК) в *S. gilvosporeus*. Перекис водню ( $H_2O_2$ ) є кінцевим продуктом ензиматичної реакції. Дослідження показали, що його можна виробляти в ензиматичній реакції з використанням ергостеролу та стигматеролу як субстратів. Вироблення та накопичення  $H_2O_2$  і наступні зміни гомеостазу РФК пропонуються як сигнали, що викликають біосинтез натаміцину, який має властивості відновлення та антигрибкову активність, для запобігання дисбалансу РФК та відповіді на напад грибів. Дослідження знизу регуляторних білків та мішеней гена кластера синтезу натаміцину в цьому шляху залишаються в розробці [50, 51, 52].

Фосфопантетеїнілтрансфераза (PPTase) та її інгібітор *7ae* активують нове виробництво антибіотиків [54].

PPTase бере участь у біосинтезі та посттрансляційній модифікації полікетидів та нерибосомних пептидів. Гени PPTase у генному кластері для продукції пактаміцину, A-74528, тірандамицину, овієдоміцину, грісеородину та фредерикаміцину в різних видів *Streptomyces* були ідентифіковані. PPTase здається найбільш ймовірним ферментом для додавання 4'-фосфопантетеїнової групи до апоформи білка несучого ацилу (ACP) для отримання зрілих білків. Недавно було розроблено високоефективний підхід

для активації криптичних біосинтетичних шляхів через збільшення PPTase [53, 54].

При перенапрямуванні PPTase *S. alboniger* NRRL B-1832 виробляє три такі самі продукти, як і дикий тип, а також ще один відомий продукт (пуроміцин А) та два нових похідних (пуроміцини В та С). Через перенапрямування PPTase виробництво галіхоміцину в *S. ghanaensis*, овіедоміцину А (сімейство ангуцикліну) та овіедоміцини В та С (з помірною антираковою активністю) в *S. antibioticus* NRRL 3238 значно активується. Схожий ефект активації виробництва антибіотиків PPTases був продемонстрований в численних видах *Streptomyces*, таких як натаміцин у *S. chattanoogensis* L10 (збільшений на 40 %). Культури *S. venezuelae* ISP5230, які мають розірваний ген родини PPTase (*jadM*), виробляють лише 2-5 % титру дикого типу джадоміцину В [52, 53].

Інгібітори PPTase впливають на синтез антибіотиків через інший механізм. 7ae синтезується за участю фармацевтичного фармакофора антранілат 4-Н-оксазол-5-ону, який може послабити активність PPTase. Цікаво, що 7ae підсилює виробництво АСТ при додаванні до культур *S. coelicolor*. Фолі та ін. запропонували робочу гіпотезу. Два класи PPTase, зокрема PPTase типу *AspS* та PPTase типу *Sfp*, відповідальні за модифікацію доменів несучого білка в усіх вторинних метаболічних шляхах. Культивування мікроорганізмів з 7ae хімічно неактивує конституційні АСР, які діють лише на дисоційованій ацетиловий синтаза (FAS)-АСР, залишаючи FAS-АСР у вигляді апоформи. Хімічне вакуумування *AspS* передає сигнал про недостатність поживних речовин, тим самим викликаючи увімкнення генетичних кластерів вторинного метаболізму, які містять PPTase типу *Sfp*. Цей процес стійкий до інгібіторного впливу 7ae. Це збільшує потік ацетатних одиниць через біосинтетичний шлях АСТ шляхом зменшення вимог до спільного пулу підстратів та супутнього виробництва метаболітів. Таким чином, навпаки до протилежних ефектів HDAC та інгібіторів HDAC на синтез антибіотиків, перенапрямування PPTase та інгібітор PPTase 7ae

обидва позитивно впливають на виробництво антибіотиків, забезпечуючи кращу практичність [53, 54].

Фунгіцитні елікитори відіграють ключову роль у підвищенні експресії генів та регулюванні активності ферментів у синтезі антибіотиків. Ця група хімічних сполук має здатність стимулювати виробництво вторинних метаболітів не лише в рослин, але й в мікроорганізмів. Серед фунгіцитних елікиторів клітинна стінка грибів та фільтрат бродіння мають значущий вплив на синтез антибіотиків у *Streptomyces* [55].

У випадку *S. natalensis* HW-2 стінки клітин *Aspergillus oryzae* AS 3.2068 та *Penicillium chrysogenum* AS 3.5163, а також фільтрат їхніх бродінь, впливають на біосинтез натаміцину. Елікитори, отримані з *P. chrysogenum* AS 3.5163, підвищили виробництво натаміцину майже вдвічі. Ці елікитори також інгібують ріст *S. natalensis* HW-2 та прискорюють використання глюкози. Подібні ефекти на виробництво натаміцину спостерігаються у *S. nautilus* при взаємодії з фільтратом бродіння *A. niger* та *Saccharomyces cerevisiae* [54, 55].

Натаміцин є типовим полієним антибіотиком, який виявляє антигрибкову активність за участю інтеракцій з мембранними стеролами, такими як ергостерол, що є основним стеролом у грибних мембранах. Таким чином, можна припустити, що додавання фунгіцитних елікиторів викликає виявлення *Streptomyces* ергостеролу та спричинює виробництво антигрибкових сполук. У дослідженні механізму, яким фунгіцитні елікитори підвищують виробництво натаміцину, виявили збільшення рівнів РФК та  $\text{Ca}^{2+}$  після взаємодії з фунгіцитними елікиторами, а також зміни активності ферментів, включених у первинний метаболізм, таких як підвищена активність піруваткарбоксилази та фосфоенолпіруваткарбоксилази та зменшена активність цитратсинтази, як потенційні посередники цього процесу. З цих обмежених даних та припущень видно, що існує взаємозв'язок між фунгіцитними елікиторами, РФК,  $\text{Ca}^{2+}$ , первинним метаболізмом та синтезом антигрибкових антибіотиків у *Streptomyces*. Це свідчить про те, що фунгіцитний елікитор може сприяти витоку зовнішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  та

змінювати первинний метаболізм для підвищення виробництва попередників [56, 57].

Оскільки виробництво антибіотиків часто пов'язане з програмою морфофізіологічної диференціації, яку може впливати  $\text{Ca}^{2+}$ , кальцієзв'язаний білок може бути ще одним регулятором у штаммах, що виробляють натаміцин. Натаміцин - це зменшений полієн макролід, який може бути окислений  $\text{H}_2\text{O}_2$ , який є ключовим компонентом РФК. Таким чином, збільшене виробництво РФК, викликане фунгіцитними елікторами, може бути ще одним шляхом регулювання або "другим вісником" фунгіцитних елікторів в *Streptomyces*, подібним до циклічного ді-ГМФ у бактерій або  $\text{H}_2\text{O}_2$  у еукаріотів. Незважаючи на те, що деталі цього механізму залишаються невідомими, фунгіцитні еліктори відкривають шлях для покращення виробництва натаміцину та інших полієнів антибіотиків [58].

2 Оптимізація середовища культивування як метод підвищення виходу цільового продукту

В процесі розгляду наукової літератури по цій темі було знайдено цікаве наукове дослідження.

Для вибору відповідних мінералів, амінокислот, вуглецю та неорганічних джерел азоту на етапі вводу в оптимізацію було оцінено чотири мінерали (сульфат цинку, сульфат марганцю, сульфат заліза і сульфат міді), чотири амінокислоти (L-гістидин, L-глутамінова кислота, L-аспартова кислота і L-аргінін), чотири джерела вуглецю (сахароза, розчинний крохмаль, мальтоза і глюкоза) та чотири неорганічних джерела азоту (нітрат натрію, нітрат амонію, гіпофосфат амонію та хлорид амонію). Ці компоненти додавалися в колбу з кокосовою олією як базовим середовищем. Початковий вміст вологи у середовищі був налаштований на рівень 40 %. Після стерилізації і охолодження до амбієнтної температури в колби внесено 10 мл інокулюму. Загальний рівень вологості потім був добре утриманий на рівні

70 %. Виробництво неоміцину *Streptomyces fradiae* вимірювалося через інтервали 4-го, 6-го і 8-го днів інкубації при 30 °C [59].

На етапі вводу в оптимізацію відповідні поживні речовини були додані до кокосового середовища окремо. Додаткові поживні речовини суттєво збільшували концентрацію неоміцину в *Streptomyces fradiae* NCIM 2418 [60].

Ефект доповнення різними мінералами, амінокислотами, вуглецем та неорганічними джерелами азоту на виробництво неоміцину *Streptomyces fradiae* NCIM 2418 показано на рисунках 2.1-2.4.

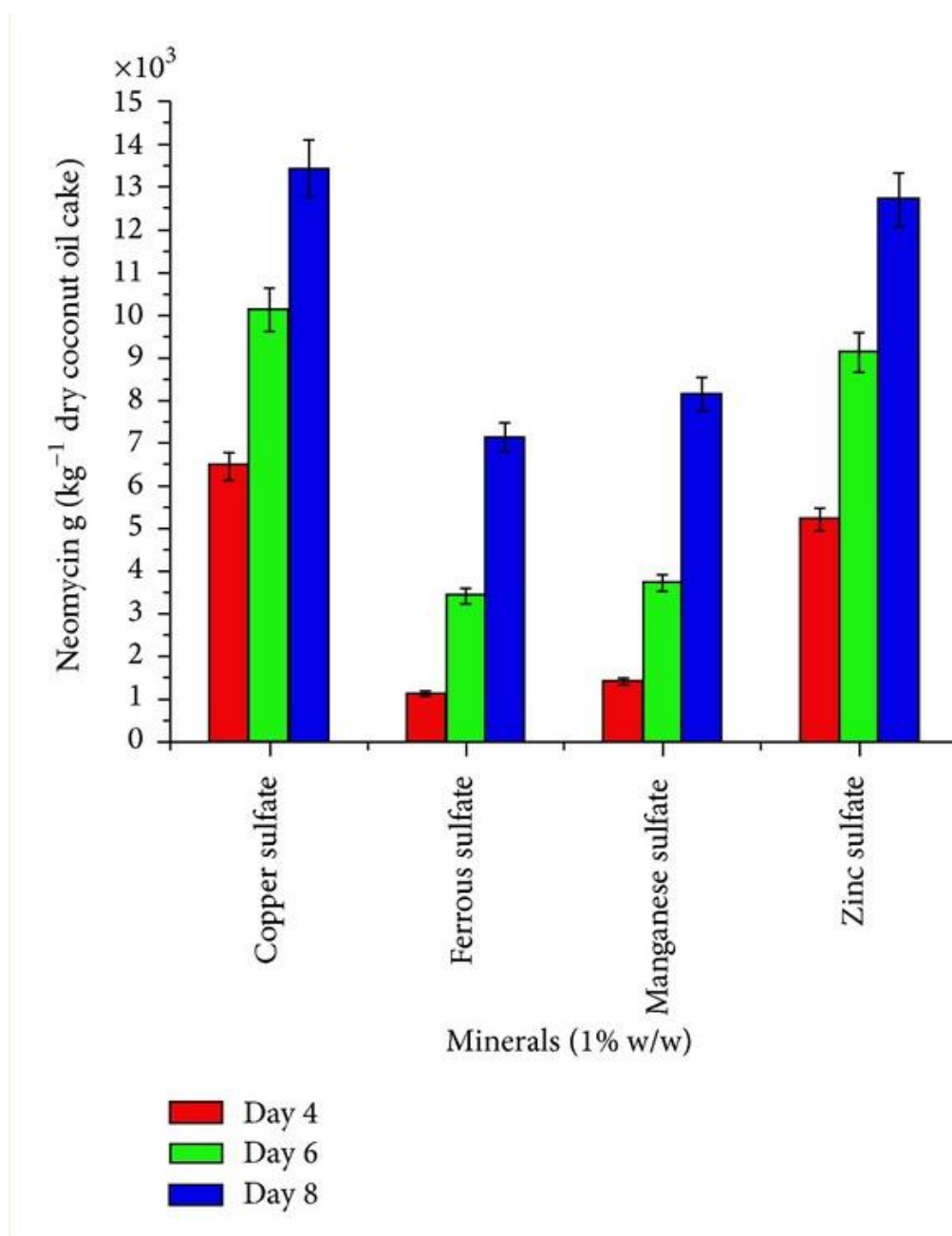


Рисунок 2.1 – Оцінка виходу неоміцину при додаванні різних мінералів

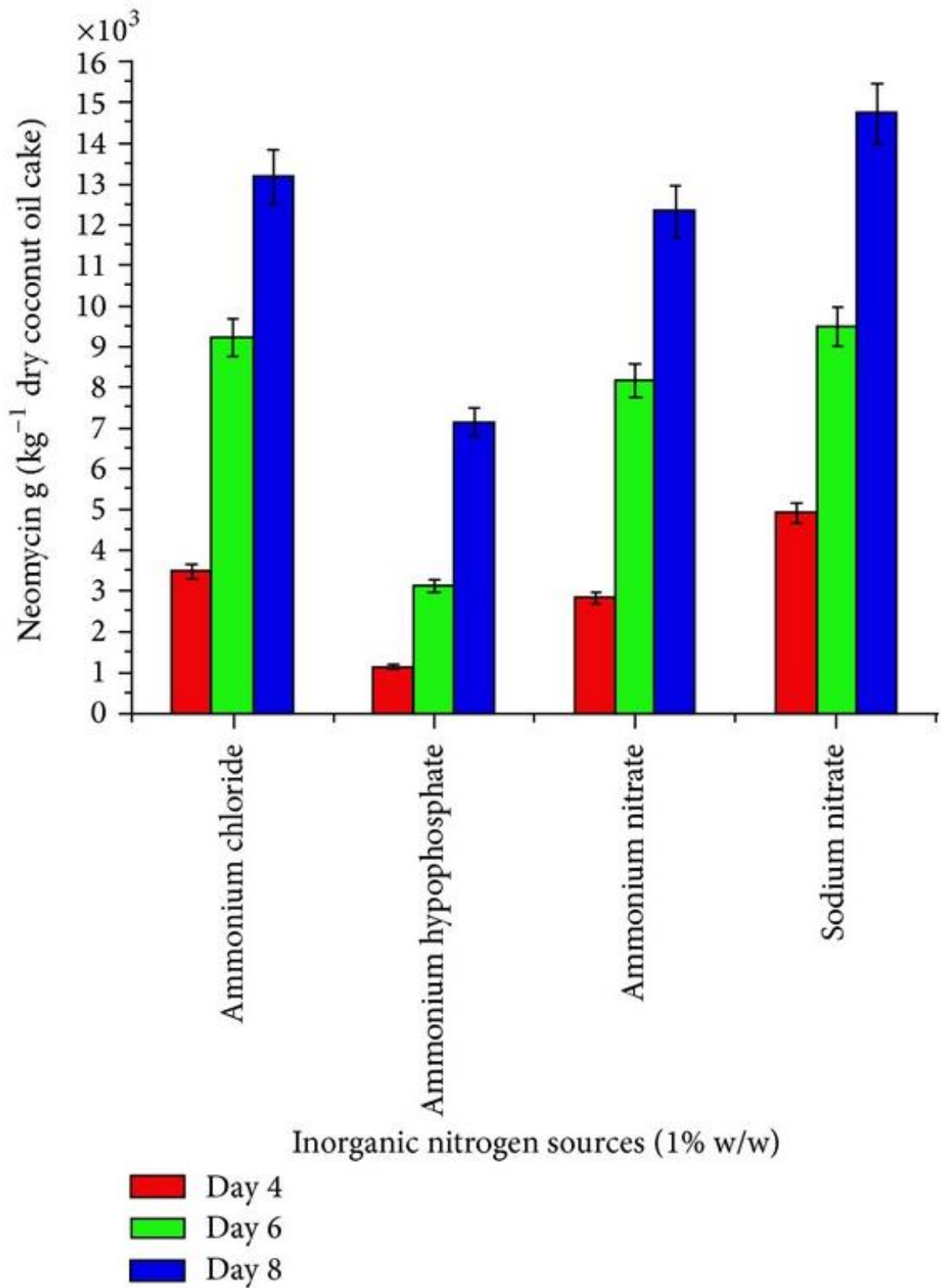


Рисунок 2.2 – Оцінка виходу неоміцину при додаванні різних неорганічних джерел азоту

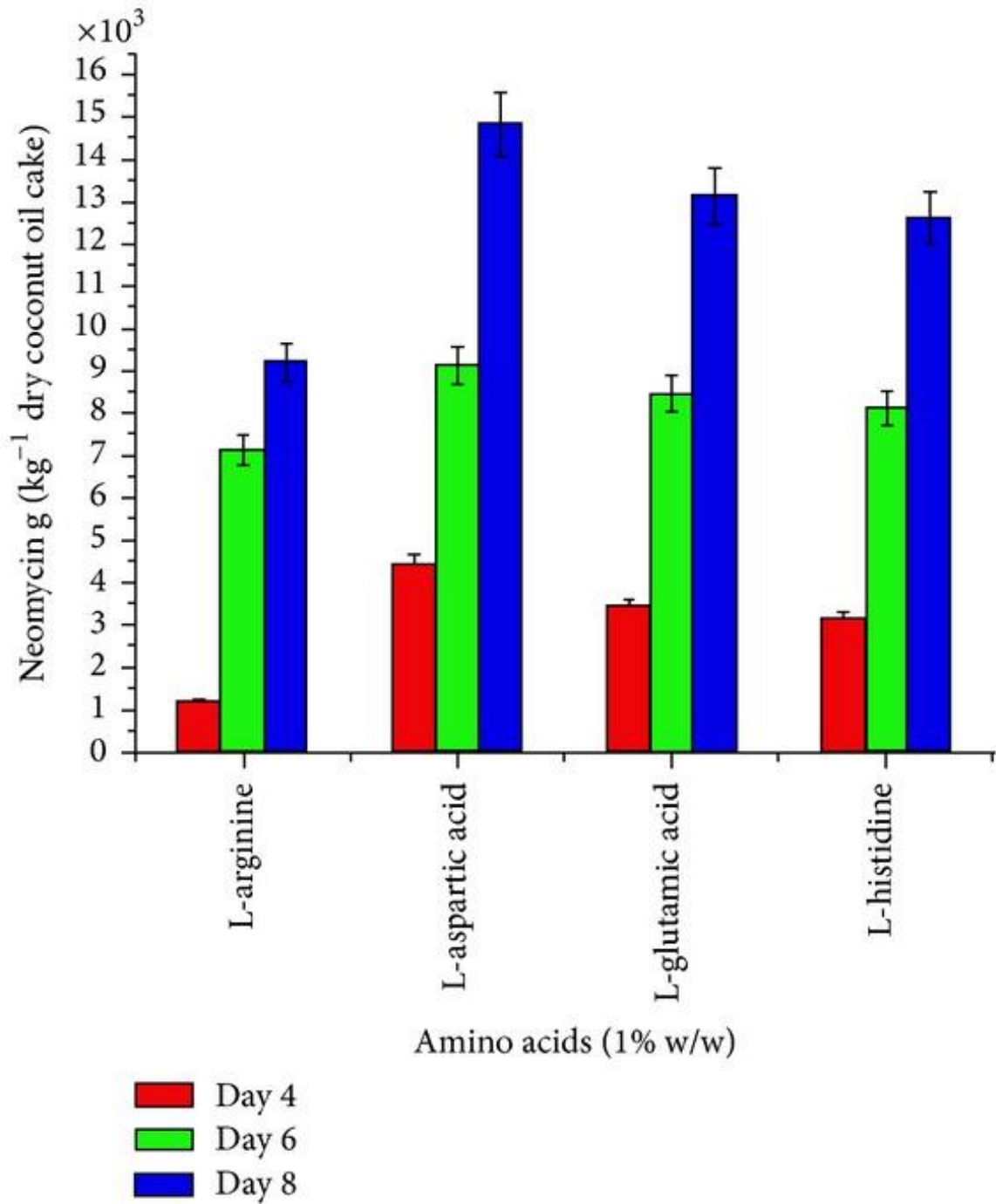


Рисунок 2.3 – Оцінка виходу неоміцину при додаванні різних амінокислот

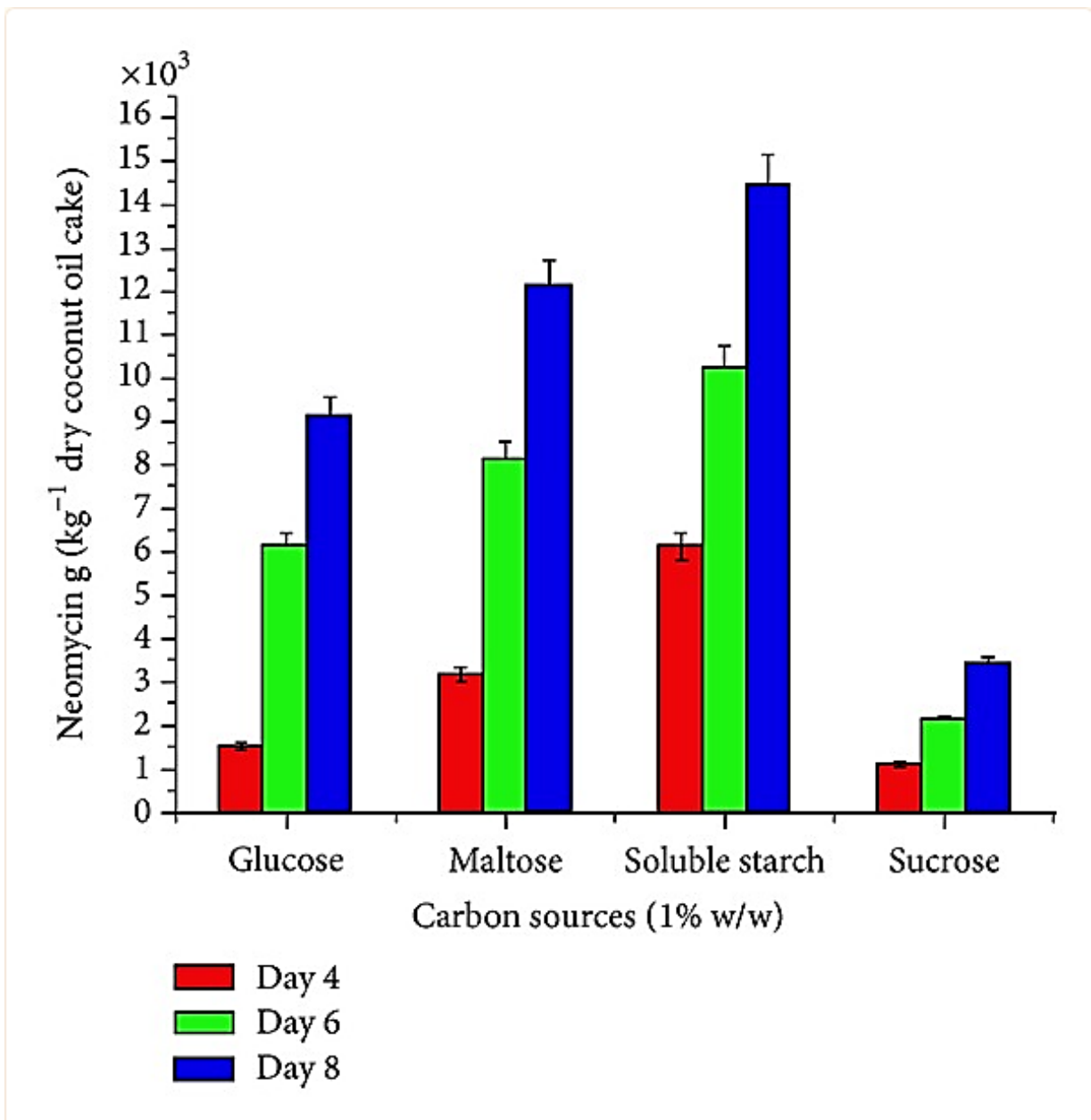


Рисунок 2.4 – Оцінка виходу неоміцину при додаванні різних джерел карбону

Мінерали, амінокислоти, вуглець та неорганічні джерела азоту в базовому середовищі були на рівні 1 % (вага/вага).

Ефекти доповнення мінералами досліджувались на рівні 1 % вага/вага і загалом виявили помірний вплив на виробництво неоміцину (Рисунок 2.1). Доповнення сульфатом міді та сульфатом цинку показали найвище виробництво неоміцину на 13423 та 12687 г/кг середовища на восьмий день інкубації.

Ефект доповнення органічним азотом досліджувався додаванням різних амінокислот у концентрації 1 % вага/вага. Результати вказують на те, що вони майже повністю стимулювали виробництво неоміцину на восьмий день інкубації. L-аргінін не вплинув на виходження неоміцину (Рисунок 2.3). Майже всі випробувані джерела вуглецю збільшили виробництво неоміцину на восьмий день інкубації. Сахароза зменшила виробництво неоміцину (Рисунок 2.4) [59].

Доповнення різними неорганічними джерелами азоту суттєво підвищило виходження неоміцину на 8-й день інкубаційного періоду. Додавання нітрату натрію, хлориду амонію та нітрату амонію у концентрації 1 % вага/вага показало найвищий вихід відповідно 14679, 13138 та 12314 г/кг середовища на восьмий день інкубації (Рисунок 2.2).

## 2.1 Огляд наявних біотехнологічних препаратів стимуляторів вироблених організмами роду *Streptomyces*

*Streptomyces*, виявляють ряд властивостей, які можуть поліпшити ріст рослин за допомогою різних механізмів. Як і в інших корисних взаємодіях, ефекти, пов'язані з ростом рослин, пов'язані з взаємодією *Streptomyces*-рослина, можуть бути розділені на такі частини як біоудобрення, біостимуляцію та біопротекцію [61].

## 2.2 Ефекти біоудобрення

Завдяки мінералогічним і електрохімічним властивостям багатьох ґрунтів деякі необхідні мінеральні поживні речовини недоступні рослинам, оскільки вони присутні у нерозчинних формах. Біоудобрення включає механізм, який поліпшує поглиблення (асиміляція) макро- чи мікроелементів рослинами. Поживні речовини, які затримані в кристалічній решітці мінеральної частки ґрунту, можуть бути розчинені і вивільнені в розчин

органічними кислотами (такими як глюконова кислота, лимонна кислота, сукцинінова кислота і оксалінова кислота), що виділяються різними мікроорганізмами. Вчені повідомили про вивільнення вільного фосфату внаслідок окислення за участю малинової та глюконових кислот *Streptomyces mhcr 0816* та *Streptomyces mhce 0811* відповідно. Ці автори також виявили збільшення кількості гілок і бічних коренів, довжини пагона, та вмісту мінералів Fe, Mn і P в рослинах пшениці, що були інокульовані цими стрептоміцетами. Ґрунт, оброблений фосфатрозчинним штамом *Streptomyces*, ізольованим з поля пшениці, збільшив вміст N, Fe, P та Mn у її пагонах. Крім того, повідомлялося про розчинення фосфату вапняку *S. youssoufiensis*. Стрептоміцети також можуть сприяти подачі мінералів, синтезуючи сидерофори. *Streptomyces* sp. *GMKU 3100* — сидерофор-продукуючий ендоефітний стрептоміцет, мав здатність сприяти росту рису, тоді як його сидерофор-дефіцитний мутант не відрізнявся від неінокульованого контролю [62].

### 2.3 Ефекти біостимуляції

Ріст рослин може бути безпосередньо поліпшений за участі мікробної продукції метаболічних сполук з фітогормональною активністю в концентраціях від мікромолярних до наномолярних. Оксин та оксиноподібні сполуки регулюють багато аспектів росту та розвитку рослин, включаючи пластичність клітин, еластичність тканин, ембріогенез, домінування верхівки, та появу бічних коренів. Виробництво індол-3-оцтової кислоти (IAA) *Streptomyces* spp. було виявлено в кількох дослідженнях. Наприклад, *S. atrovirens* *ASU14* використовував триптофан та виробляв 22 мкг/мл IAA. Дія, схожа на дію оксину, викликана птеридиновою кислотою А, яка була вироблена *S. hygrosopicus* *TP-A0451*, ізольованого з пагонів *Pteridium aquilinum* (папороть). Ця сполука стимулювала подовження коренів та

індукувала утворення прикореневих коренів у гіпокотилах *Phaseolus vulgaris* [63].

## 2.4 Біопротекція

Мікроорганізми, пов'язані з рослинами, можуть мати здатність мінімізувати наслідки, що викликаються фітопатогенами. Ця біоконтрольна активність може проявлятися у вигляді антагонізму, конкуренції за поживні речовини та простір, паразитизму, хижацтва, гіповіруленції та індукованої системної стійкості, які є непрямими механізмами стимулювання росту рослин. Універсальне виробництво вторинних метаболітів, що беруть участь у біоконтролі, передусім є конкурентною стратегією для успішного колонізування кореневої зони. Рід *Streptomyces* широко визнаний здатним синтезувати кілька біоактивних метаболітів, які контролюють фітопатогени та надають перевагу ризосферній чи ендofітній колонізації. Повідомляється, що антифунгіцидні метаболіти, що виробляються 213 штамами *Streptomyces*, ізольованими з різних місць мешкання, проявляли антагоністичну активність *in vitro* проти *Rhizoctonia solani*. Дослідження нематоцидної властивості *Streptomyces roseoverticillatus* СМУ-МН 021 виявило вироблення вторинних метаболітів, що діють проти кореневого вузликового нематода *Meloidogyne incognita*. *Streptomyces roseoverticillatus* СМУ-МН 021 виробляв фервенулін, який зменшував відсоток вилуплення яєць і збільшував відсоток смертності личинок другого етапу; виробляв ізокумарин, який також збільшував о має відсоток смертності личинок другого етапу. Недавно випущена розшифровка геному антагоніста-мікопаразита *Streptomyces* sp. штаму 150 FB, щблизьку відповідності до геному *S. avermitilis* МА-4680, виявила можливі фактори, пов'язані з пригніченням захворювання, а саме набір генів, що кодують позаклітинні ферменти, включені у розкладання полісахаридів клітинної стінки грибів, руйнування мембран і білків, а також пероксидаз і рибонуклеаз. Крім того, виявлено два терпени і два генні кластери біосинтезу

сидерофорів. Стрептоміцети також можуть стимулювати захист рослин за допомогою феномену примусового реагування, що призводить до індукованої системної стійкості. *Streptomyces* sp. штам Ас Н505 пригнічував зараження дубової мучистої роси [62]. Цей стрептоміцет стимулював системний захисний відгук в дуба (*Quercus robur*), індукуючи шляхи залежності від яскравої кислоти/етилену і шляхи залежності від саліцилової кислоти [64].

Вторинні метаболіти від видів стрептоміцетів включають не тільки ефекти біопротекції рослин (в рамках поточного огляду), але й інші властивості біоактивності, пов'язані з застосуванням в медичній науці.

Корисні стрептоміцети, пов'язані з рослинами, також можуть вигідно впливати на господарські рослини, пом'якшуючи абіотичний стрес, такий як тепло, холод, посуха та вичерпання поживних речовин, тим самим зменшуючи їхні негативні наслідки і, відповідно, збільшуючи ріст рослин. Застосування *Streptomyces filipinensis* по. 15, який виробляє 1-аміноциклопропан-1-карбоксиліову кислоту (АСС) деаміназу та ІАА, зменшило ендогенні рівні АСС — безпосереднього попередника етилену, як у коренях, так і в пагонах, і внаслідок цього підвищило пристосованість рослин до середовища. Для стрептоміцета *Streptomyces* sp. штаму РGPA39, що виробляє АСС деаміназу та толерує солі, продемонстрував збільшення росту та зменшення стресу при дії солі на рослинах томату (*Solanum lycopersicum*) [65].

Крім того, отримав особливу увагу інший підхід, що базується на непрямих механізмах стимулювання росту рослин за допомогою РGPS. У дослідженні, що включало трипартітну систему культури, здавалося, що стрептоміцети діють як модулятори як у мікоризі, так і в азотфіксуючому симбіозі, збільшуючи їх здатність стимулювати ріст рослин. Збільшене число, розмір і живучість кореневих вузлів спостерігалось на молодих рослинах гороху (*Pisum sativum*), вирощених в ґрунті з природно великою кількістю *Rhizobium* та інокульованих *S. lydicus* WYEC108. *Streptomyces* sp.

*AcH505*, ізольований з гіфосфери ялини (*Picea abies*), сприяв міцеліальному росту та частоті мікоризації *Amanita muscaria* і *Suillus bovinus*, тоді як він стримував міцеліальне розширення патогенів рослин *Armillaria obscura* і *Heterobasidion annosum*.

Було запропоновано ряд різних методів для підвищення здатності ендоефітних діазотрофних бактерій *Herbaspirillum seropedicae* штам *HRC54* до стимулювання росту рослин. Один з методів включав аксенічні дослідження, в яких комбінували *H. seropedicae* з штамом *Streptomyces bellus* *UENF AC06*, який був ізольований з дозрілого вермікомпосту. Цей змішаний посів збільшив зростання популяції та швидкість фіксації азоту *Herbaspirillum*, виміряну активністю редукції ацетилену. Таким чином, штам *AC06 Streptomyces bellus* може бути використаний для покращення відповіді на стимулювання росту рослин штамом *HRC54 Herbaspirillum seropedicae* [66].

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 3 Матеріали та методи досліджень

#### 3.1 Характеристика місця проведення досліджень

Науково-дослідний інститут біології є структурним науковим підрозділом науково-дослідної частини Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара. У НДІ біології здійснюються фундаментальні й прикладні дослідження за пріоритетними напрямками розвитку науки й техніки в Україні, виконуються дослідження, які спрямовані на вирішення актуальних екологічних та біологічних проблем та розвиток господарського комплексу країни. Співробітники НДІ біології беруть участь у виконанні міжнародних проектів та програм.

У лабораторії НДІ біології спільно зі співробітниками біолого-екологічного факультету активно досліджується широкий спектр наукових напрямків. Однією з основних наукових проблем є дослідження екосистем великих водосховищ територій бувшого СРСР та Європи. Ця проблема включає в себе розробку прогнозів формування екосистем у водних басейнах, а також оцінку впливу антропогенних чинників на ці екосистеми.

Додатково, у лабораторії проводяться дослідження з біотехнологій, екології та збереження навколишнього середовища. Спеціалісти активно працюють над розробкою нових біологічних методів лікування найпоширеніших захворювань та методів діагностики.

Окремою науковою проблемою є дослідження та застосування комплексних ферментних препаратів стрептоміцетного походження. Ці препарати мають потенціал для використання в різних галузях, включаючи фармацію та біотехнології.

Крім того, лабораторія активно працює над створенням біологічних інсектицидів та біостимуляторів для захисту сільськогосподарських культур

від хвороб і шкідників. Це важливе завдання в сільському господарстві для забезпечення врожаю та збереження довкілля.

Однією зі значущих наукових проблем є також дослідження нейроспецифічних білків і їхнє використання в діагностиці порушень центральної нервової системи. Ця робота може призвести до розробки нових методів діагностики та лікування неврологічних захворювань.

Усі ці дослідження спрямовані на вирішення важливих наукових і практичних завдань у галузі біології, біотехнологій та екології, і вони відображають велику наукову експертизу та досягнення лабораторії у цих галузях.

### 3.2 Характеристика об'єкта досліджень

Об'єктом дослідження був штам *Streptomyces* sp. 31, отриманий зі звичайних чорноземних ґрунтів. Цей штам є антагоністом до фітопатогенних бактерій та грибів. Таксономічне положення організму наступне:

Домен: *Bacteria* (Бактерії)

Відділ: *Actinobacteria* (Актинобактерії)

Клас: *Actinobacteria* (Актинобактерії)

Ряд: *Streptomycetales* (Streptomycetales)

Родина: *Streptomycetaceae* (Streptomycetaceae)

Рід: *Streptomyces*

Вид: *Streptomyces* sp.31

Завданнями дослідження було вивчення впливу додавання до поживного середовища триптофану, треоніну, глутамінової кислоти та аргініну на біосинтетичну активність *Streptomyces* sp.31; а також впливу заміни джерела азотного живлення з  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  на треонін. Магістерська дослідницька робота проводилась за наступною схемою (Рисунок 3.1):

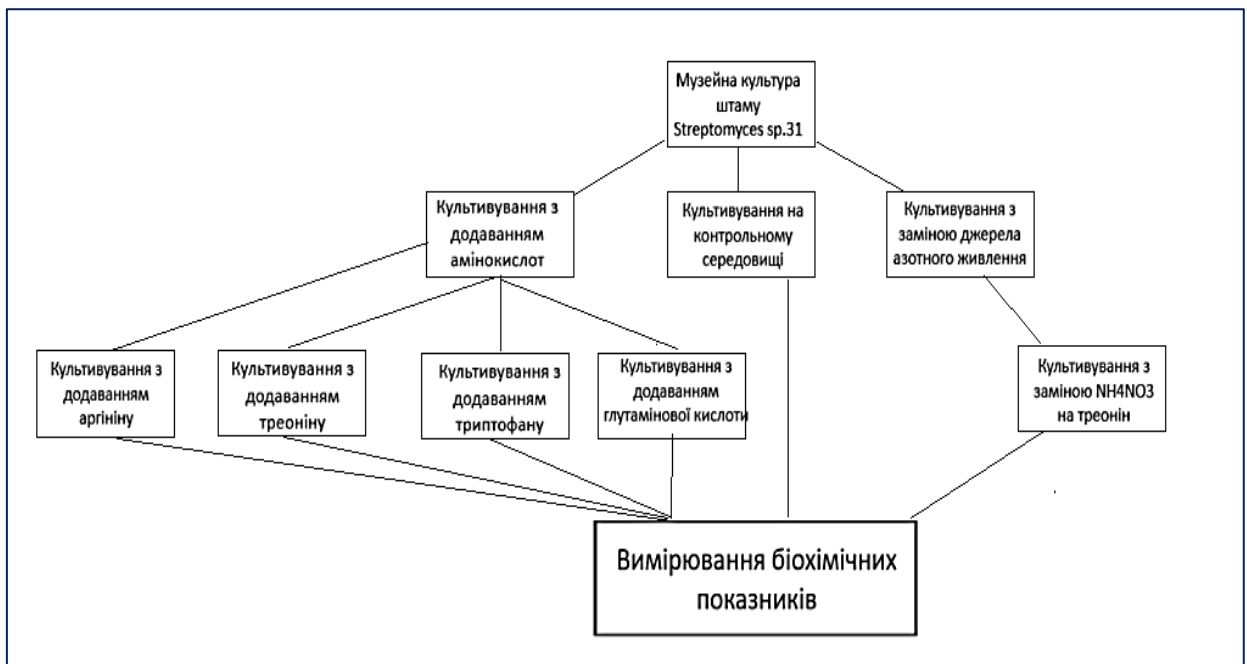


Рисунок 3.1 — Схема проведення дослідницьких робіт

### 3.3 Методи досліджень

Спорову культуру підтримували при 28 °С протягом 12 діб на агаризованому середовищі Гаузе 1 наступного складу (г/л): крохмаль (розчинний) – 20,0;  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4$  – 0,5;  $KNO_3$  – 1,0;  $NaCl$  – 0,5;  $FeSO_4$  – 0,01; агар-агар – 20; рН=7,2-7,4.

Для отримання вегетативного посівного матеріалу спорову культуру стрептоміцета засівали блоком розміром 1см×1см і вирощували дві доби при 28 °С в умовах глибинного культивування (220 об/хв) на посівному середовищі наступного складу (г/л): соєве борошно – 4,75; крохмаль – 30,0;  $NH_4NO_3$  – 0,75;  $K_2HPO_4$  – 0,1;  $CaCO_3$  – 2,0;  $CaCl_2$  – 1,0; рН=7,8-8,0.

Вегетативну культуру у кількості 5 % від об'єму засівали у спеціально розроблене ферментаційне середовище (ФС-3), яке мало наступний склад (%): соєве борошно – 0,6;  $NH_4NO_3$  – 0,15; глюкоза – 1,1;  $K_2HPO_4$  – 0,027;  $CaCO_3$  – 0,42;  $CaCl_2$  – 0,2;  $FeSO_4$  – 0,005;  $MnCl_2$  – 0,0015;  $MgCl_2$  – 0,056;  $ZnSO_4$ – $0,2 \cdot 10^{-4}$ ; рН=8,0.

Ферментацію проводили при 28 °С в умовах глибинного культивування (220 хв/об) протягом 72 годин. Проби відбирали кожні 12 годин та аналізували відносно: накопичення біомаси клітин, активності стафілолітичних ферментів, активності ферментів ліпаз, синтезу білків.

При дослідженні впливу попередників синтезу білка (амінокислот) на ростові показники продуцента, використовували по 1 амінокислоті у концентраціях 50, 100 та 200 мкг/мл, які додавали до ферментаційного середовища ФС-3 після стерилізації. У дослідах використовували амінокислоти фірми «Реахім» – DL-триптофан, DL-треонін, L-глутамінова кислота, L-аргінін.

Величину накопичення продуцентом біомаси виражали в мг сирої маси в 1 мл живильного середовища. Культуральну рідину з клітинами продуцента центрифугували на лабораторній центрифугі при 7000 об/хв протягом 15 хв. Зважування біомаси проводили за допомогою аналітичних вагів.

Визначення кількості білка проводили за методом Бредфорда. Принцип взаємодії:

Барвник Кумассі-Бредфорда використовується для визначення концентрації білка за допомогою його здатності утворювати комплекси з амінними групами білка. Основна ідея полягає в тому, що амінні групи (зазвичай лізин та аргінін) утворюють стабільні комплекси з молекулою барвника, що веде до зміни кольору розчину.

Реакційний механізм:

Барвник Кумассі-Бредфорда (зазвичай містить Кумассі Блю G-250) взаємодіє з амінними групами білка, утворюючи іонно-дипольні та гідрофобні зв'язки. Ця взаємодія призводить до утворення стійкого комплексу, який може бути вимірний за зміною кольору від червоного до синього. Важливо враховувати, що конкретний механізм може різнитися залежно від структури та хімічного складу конкретного білка.

Вплив рН на реакцію:

pH впливає на ефективність реакції, оскільки амінні групи можуть бути протоновані чи депротоновані в залежності від значення pH. Важливо підтримувати стабільні умови pH для забезпечення повноцінної взаємодії білка з барвником.

Колориметричні вимірювання:

Оптична щільність визначається колориметром чи спектрофотометром. Зміна кольору комплексу вимірюється при певній довжині хвилі, і отримані дані використовуються для кількісного визначення концентрації білка в зразку.

Стандартизація та калібрування:

Стандартні розчини білка використовуються для побудови калібрувальної кривої, де зміни оптичної щільності відомих концентрацій білка відображаються на графіку. Ця крива потім використовується для визначення концентрації білка в невідомому зразку.

Фактори впливу:

Чутливість до забруднень, стабільність розчину, тип білка та ефективність його взаємодії з барвником є факторами, які можуть впливати на точність та надійність результатів. Деякі речовини можуть конкурувати з білком за взаємодію з барвником, що призводить до неточностей.

Використання та області застосування:

Метод Бредфорда широко використовується у біохімії для визначення концентрації білка в різних зразках, таких як клітинні екстракти, фракції білків та інші біологічні речовини. Цей метод є швидким, чутливим та ефективним інструментом для кількісного визначення білкової концентрації в експериментах біохімічного дослідження [67].

Культуральну рідину з клітинами центрифугували для їх відділення від рідкої фази при 7000 об/хв протягом 15 хв на лабораторній центрифугі ОПМ-8. Готували 20 % суспензію цих клітин у фізіологічному розчині і проводили її обробку ультразвуком 6 разів по 30 с на приладі УЗДН-А та

центрифугували зруйновані клітини при 15000 об/хв протягом 50 хв. Визначення білків проводили в супернатанті.

Літичну активність в культуральній рідині визначали турбідиметричним способом за методом Isono. Основи світлорозсіювання та турбідиметрія:

Світлорозсіювання - це фізичне явище, що виникає, коли світловий промінь взаємодіє з частинками в розчині та розсіюється в усі напрямки. Зміна шляху світла пояснюється коливанням електричного поля світла при взаємодії з електричним полем частинки. Закон Міє визначає взаємозв'язок між інтенсивністю розсіювання, діаметром частинки та довжиною хвилі світла. Інтенсивність розсіювання пропорційна квадрату діаметра частинки та обернено пропорційна довжині хвилі.

Турбідність визначається як сума розсіювання та поглиблення світла у розчині. Це є мірою взаємодії світла з частинками, такими як клітини чи бактерії. Оптична щільність, з іншого боку, визначає, наскільки змінюється світло при проходженні через розчин, враховуючи наявність частинок.

Турбідиметр і вимірювання турбідності:

Турбідиметр, як пристрій для вимірювання турбідності розчину, складається з джерела світла, камери для розчину та детектора світла. Промінь світла проходить через розчин, а детектор реєструє кількість світла, яке розсіюється частинками. Вимірюючи зміну турбідності в часі, можна отримати інформацію про взаємодію світла з частинками у розчині, зокрема, при використанні турбідиметрії для визначення літичної активності.

Турбідиметричний метод став важливим інструментом в біологічних дослідженнях, зокрема при визначенні літичної активності, де важливо вимірювати зміни в турбідності розчину під впливом лізису клітин чи бактерій [68].

Реакційну суміш, що містила 1 мл культуральної рідини та 1 мл суспензії клітин тест-культури (оптична густина реакційної суміші при довжині хвилі 590 нм та довжині світлового шляху 0,5 см складала 0,5-0,6), інкубували протягом 30 хвилин при 55 °С. За одиницю літичної активності

приймали таку кількість ферменту, яка знижувала оптичну густину суспензії на 0,001 за одну хвилину при розведенні ферменту, яке здатне гідролізувати 25-30 % клітин. В якості субстрату бактеріолітичних ферментів використовували відмиті живі клітини *Staphylococcus aureus* 209P, що вирощувалися на м'ясо-пептонному агарі протягом 18 годин.

Досліди проводили у 3-х кратній повторності. Математичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel з використанням методів математичної статистики.

### 3.4 Статистична обробка даних

Для статистичного аналізу використано ряд методів, включаючи:

Дисперсійний аналіз (ANOVA)

Дисперсійний аналіз є статистичним методом, розробленим для порівняння середніх значень трьох чи більше груп. Він використовується для виявлення впливу категоріальних факторів (груп) на кількісні змінні.

Поняття варіації:

- Внутрішньогрупова варіація (within-group variation): Вимірює розсіювання даних всередині кожної групи. Мінімізується, якщо групи однорідні.

- Міжгрупова варіація (between-group variation): Вимірює розсіювання середніх значень кожної групи. Зростає при наявності статистично значущих відмінностей між групами.

Процедура:

1. Постановка гіпотез:

- Нульова гіпотеза ( $H_0$ ): Немає статистично значущих відмінностей між групами.

- Альтернативна гіпотеза ( $H_1$ ): Є статистично значущі відмінності хоча б між двома групами.

## 2. Розрахунок внутрішньо- та міжгрупової варіації:

- Використовуються різні статистичні показники (сума квадратів, середні квадрати) для оцінки розподілу даних всередині груп і між групами.

## 3. Визначення F-статистики:

- F-статистика розраховується як відношення міжгрупової до внутрішньогрупової варіації. Велике значення F-статистики може свідчити про статистичну значущість.

## 4. Прийняття рішення:

- Визначення рівня значущості ( $\alpha$ ).

- Порівняння F-статистики з табличним значенням F за визначеним рівнем значущості.

- Прийняття або відхилення нульової гіпотези.

## Застосування:

Дисперсійний аналіз використовується для порівняння середніх значень в групах у випадках, коли ми маємо більше двох груп чи умов. Він застосовується в наукових дослідженнях, клінічних випробуваннях, соціальних дослідженнях та інших областях, де потрібно визначити вплив факторів на змінні.

ANOVA визначено як (Рисунок 3.2):

$$F = \frac{MSG}{MSW}$$

де:

- $F$  - значення статистики F,
- $MSG$  - середній квадрат внутрішньої групової варіації,
- $MSW$  - середній квадрат внутрішньої групової варіації.

Рисунок 3.2 — Формула дисперсійного аналізу

## Кореляційний аналіз

Кореляційний аналіз використовується для визначення залежностей між різними параметрами. Залежність між синтезом білка ( $(X)$ ) та біомасою ( $(Y)$ ) при використанні різних амінокислот може бути виражена формулою (Рисунок 3.3):

$$r = \frac{\Sigma((X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y}))}{\sqrt{\Sigma(X_i - \bar{X})^2 \cdot \Sigma(Y_i - \bar{Y})^2}}$$

де:

- $r$  - коефіцієнт кореляції,
- $X_i, Y_i$  - значення змінних білка та біомаси відповідно,
- $\bar{X}, \bar{Y}$  - середні значення відповідних змінних.

Рисунок 3.3 — Формула кореляційного аналізу

## t-тест

t-тест використовується для порівняння двох середніх значень, і його формула визначається як (Рисунок 3.4):

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

де:

- $t$  - значення t-статистики,
- $\bar{X}_1, \bar{X}_2$  - середні значення для двох груп,
- $s_1, s_2$  - стандартні відхилення для двох груп,
- $n_1, n_2$  - розмірності відповідних груп.

Рисунок 3.4 — Формула t-тесту

## 4 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 4.1 Дослідження впливу ряду амінокислот на розвиток *Streptomyces* sp.

31

В ході проведення експериментів до поживного середовища додавали такі амінокислоти як: триптофан, треонін, глютамінова кислота та аргінін у концентраціях 50, 100 та 200 мкг/мл, згідно з попередніми дослідженнями. Виявлено, що досліджувані амінокислоти мали різний вплив на рівень синтезу білка у стрептоміцета. Отримані результати представлені графічно (рисунок 4.1).

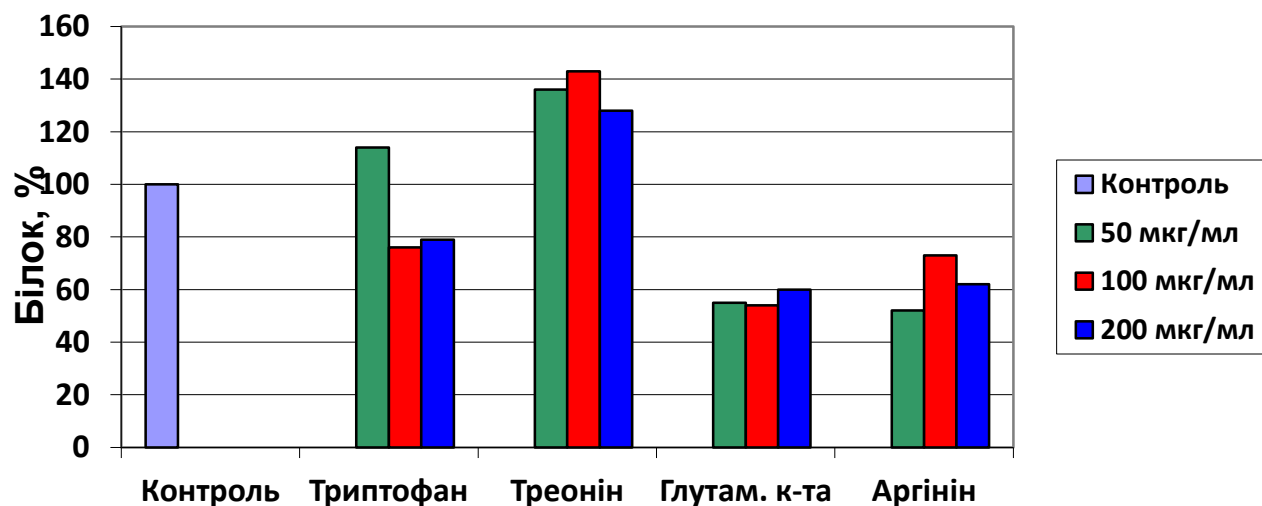


Рисунок 4.1 – Вплив досліджуваних амінокислот на біосинтез білка штамом *Streptomyces* sp. 31

Як видно з діаграми, синтез білка у присутності треоніну збільшився при додаванні його у всіх трьох концентраціях, хоча максимального значення - 143 % від контролю спостерігалось при 100 мкг/мл. Показники при мінімальній та максимальній концентраціях склали відповідно – 136 % і 128 %. Таким чином, концентрація треоніну 100 мкг/мл була найоптимальнішою і викликала у штаму *Streptomyces* sp. 31 максимальний синтез білка.

У присутності триптофану концентрація білка збільшилась при 50 мкг/мл цієї амінокислоти і склала 114 % в той час як показники вмісту білка при вищій концентрації (100 мкг/мл та 200 мкг/мл) досліджуваної амінокислоти були менші ніж 100 % (76 та 79 %).

Глутамінова кислота та аргінін зовсім не викликали підвищення синтезу білка ні в одному з випадків їх додавання у будь-якій концентрації. Показники синтезу білка були суттєво нижчі за контроль.

Таким чином, за результатами цього досліду було показано, що не всі амінокислоти індують біосинтез білка у стрептоміцета. З даних чотирьох амінокислот такою здатністю володіє треонін і частково триптофан, а ось глутамінова кислота і аргінін навіть навпаки – інгібують біосинтез білка.

В роботі також була перевірена дія вказаних амінокислот на накопичення біомаси досліджуваним штамом, що показано на рисунку 4.2.

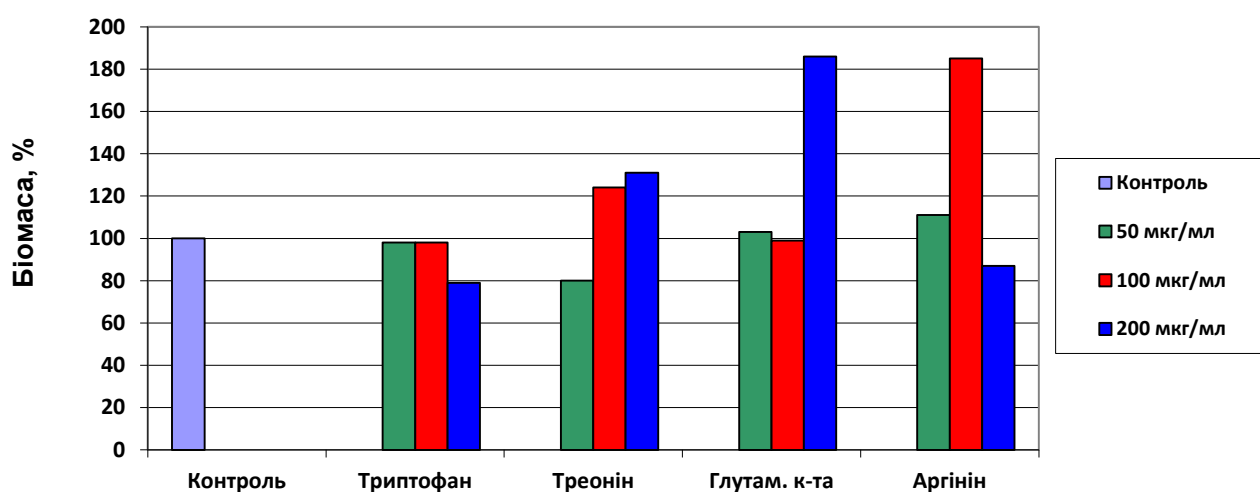


Рисунок 4.2 – Накопичення біомаси штамом *Streptomyces* sp. 31 у присутності різних амінокислот

З діаграми видно, що присутність треоніну у концентраціях 100 та 200 мкг/мл збільшила вихід біомаси штаму на 24 та 31 % відповідно відносно контролю.

Присутність глютамінової кислоти у концентрації 200 мкг/мл збільшила накопичення біомаси штаму до максимального значення 186 %. Додавання менших концентрацій не призвело до такого суттєвого підвищення.

Додавання 50 мкг/мл аргініну призвело до збільшення біомаси клітин стрептоміцету на 11 %, а 100 мкг/мл – на 85 % у порівнянні з контролем.

Триптофан зовсім не викликав підвищення кількості біомаси продуцента.

Задля встановлення впливу відповідних амінокислот на синтез стафілолітичних ферментів досліджуваного штаму були проведені необхідні досліди та розрахунки, що представлені на рисунку 4.3.

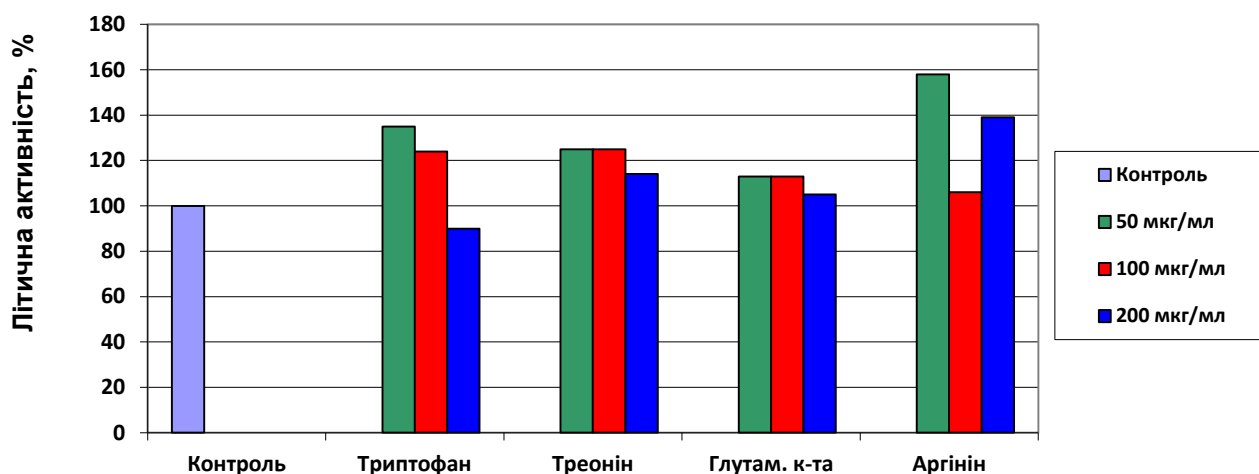


Рисунок 4.3 – Синтез стафілолітичних ферментів штамом *Streptomyces sp. 31* у присутності різних амінокислот

Отримані графічні дані свідчать, що під впливом всіх екзогенно внесених амінокислот виникло підвищення активності стафілолітинів від 5 % до 58 %. Спостерігалася чітка закономірність зниження активності з підвищенням концентрації амінокислот, лише тільки максимальна концентрація триптофану (200 мкг/мл) не сприяла синтезу стрептолітинів вище контрольних показників, а була навіть нижчою – 90 %. Максимальний показник активності стафілолітичних ферментів (158 %) виявлено у присутності аргініну (50 мкг/мл).

Отже, виявлено, що активно збільшено синтез білка на 43 % при екзогенному внесенні треоніну (100 мкг/мл), помірно – на 14 % триптофану (50 мкг/мл); активно, але не максимального збільшено вихід біомаси стрептоміцету на 24-31 % також треоніном (100 та 200 мкг/мл); більш інтенсивно (на 85-86 %) - глутаміною кислотою та аргініном відповідно; збільшено активність стафілолізинів на 58 % - аргініном, помірно на 14-35 % - глутаміною кислотою, треоніном, триптофаном.

Таким чином, спостерігалася пряма кореляція збільшення синтезу білка та біомаси при використанні тільки однієї амінокислоти – треоніну у концентраціях 100 та 200 мкг/мл. Це пояснюється, ймовірно, легкістю засвоєння саме треоніну клітинами продуцента порівняно з іншими амінокислотами через її меншу молекулярну масу.

#### 4.2 Вивчення альтернативних джерел азотного живлення

Оскільки було отримано стабільні позитивні дані про біосинтетичні характеристики штаму *Streptomyces* sp. 31 у присутності треоніну, було досліджено можливість заміни у ферментаційному середовищі джерела азотного живлення –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  на треонін у концентрації 100 мкг/мл, що представлено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

#### Біосинтетичні характеристики штаму *Streptomyces* sp .31 при заміні джерела азотного живлення $\text{NH}_4\text{NO}_3$ на треонін

Варіант дослідження	Білок		Біомаса		Літична активність	
	мг/мл	К <sup>1)</sup> ,%	мг/мл	К, %	од/мл	К, %
Контроль без амінокислоти	0,39	100	8,3±0,05	100	1987±50,73	100
Заміна джерела азотного живлення	0,087	22	7,54±0,01	91	976±21,89	49

Примітка: <sup>1)</sup>Контроль

Як видно з таблиці, заміна сприяла дуже низькому рівню синтезу білка. У присутності треоніну без  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  рівень синтезу білка склав лише 22 % до контролю. Накопичення біомаси стрептоміцетів становило 91 %, а активність ферментів, лізуючих клітини стафілокока зменшено майже у 2 рази. Такий низький рівень синтезу білка, ферментів, накопичення біомаси пояснюється, скоріш за все тим, що найбільш оптимальною формою азотного живлення для стрептоміцету є неорганічна в умовах даного експерименту. Таким чином, заміна іонів  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  на треонін була недостатньою.

## ВИСНОВКИ

1. Не всі дослідженні зміни складу поживного середовища мають позитивний вплив на біосинтетичну активність продуцента *Streptomyces* sp. 31.

2. Встановлено, що різні амінокислоти індукують різні параметри біохімічної активності. Так, збільшенню виходу білку передувало додавання триптофану та треоніну. Збільшення виходу біомаси індукували треонін, аргінін та глютамінова кислота. Збільшенню літичної активності посприяли в тій чи іншій мірі всі чотири амінокислоти.

3. Підвищення концентрації амінокислот не корелює зі збільшенням показників біосинтетичної активності. У випадку білку найбільш успішною виявилась концентрація треоніну в 100 мкг/мл, а не максимальна – 200 мкг/мл. У випадку біомаси найефективнішою виявились концентрації глютамінової кислоти у 200 мкг/мл, в той же час для аргініну це було 100 мкг/мл. У випадку літичної активності найбільш успішною взагалі виявилась концентрація аргініну в 50 мкг/мл.

4. Для організму *Streptomyces* sp. 31 джерело неорганічного азоту є набагато більш ефективним, аніж його органічна альтернатива у вигляді амінокислоти треоніну. При такій заміні суттєво зменшились всі показники біосинтетичної активності.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Advances in the 16 $\alpha$ -hydroxy transformation of hydrocortisone by *Streptomyces roseochromogenes* / O. F. Restaino та ін. *Process biochemistry*. 2016. Т. 51, № 1. С. 1–8. URL: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.11.009> (дата звернення: 23.12.2023).
2. Analysis of ascomycin production enhanced by shikimic acid resistance and addition in *streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* / H. Qi et al. *Biochemical engineering journal*. 2014. Vol. 82. P. 124–133. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.006>
3. Antagonistic potential of two native streptomyces strains in biocontrol of the major causals of common scab of potato in iran / M. K. Z. . et al. *Asian journal of plant sciences*. 2005. Vol. 5, no. 1. P. 5–8. URL: <https://doi.org/10.3923/ajps.2006.5.8>
4. Antimicrobial activities of some marine Streptomyces / M. Abou-Dobara et al. *Scientific journal for damietta faculty of science*. 2016. Vol. 6, no. 1. P. 28–39. URL: <https://doi.org/10.21608/sjdfs.2015.194527>
5. Baskaran, R., Vijayakumar, R., Mohan, P. M. Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian journal of microbiology*. 2011. URL: <https://doi.org/10.21161/mjm.24410>
6. Biotechnological transformation of hydrocortisone into 16 $\alpha$ -hydroxyprednisolone by coupling arthrobacter simplex and *streptomyces roseochromogenes* / O. F. Restaino та ін. *Molecules*. 2020. Т. 25, № 21. С. 4912. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules25214912> (дата звернення: 23.12.2023).
7. Characterization of bioactive compound from actinomycetes for antibiofilm activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria / Waturangi, D.

- E. et al. *Malaysian journal of microbiology*. 2016.  
URL: <https://doi.org/10.21161/mjm.80915>
8. Characterization of two new aromatic amino acid lyases from actinomycetes for highly efficient production of p-coumaric acid / P. Cui et al. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2020. Vol. 43, no. 7. P. 1287–1298.  
URL: <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02325-5>
  9. Cholesterol-oxidase-magnetic nanobioconjugates for the production of 4-cholesten-3-one and 4-cholesten-3, 7-dione / S. Ghosh et al. *Bioresource technology*. 2018. Vol. 254. P. 91–96.  
URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.030>
  10. Enhancement of ascomycin production in *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* by combining resin HP20 addition and metabolic profiling analysis / H. Qi et al. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2014. Vol. 41, no. 9. P. 1365–1374. URL: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1473-9>
  11. Hexaene Derivatives of Nystatin Produced as a Result of an Induced Rearrangement within the *nysC* Polyketide Synthase Gene in *S. noursei* ATCC 11455 / T. Brautaset et al. *Chemistry & biology*. 2002. Vol. 9, no. 3. P. 367–373. URL: [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(02\)00108-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(02)00108-4)
  12. High-level production of melanin by a novel isolate of *Streptomyces kathirae* / J. Guo et al. *FEMS microbiology letters*. 2014. Vol. 357, no. 1. P. 85–91. URL: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12497>
  13. Imine reductase based all-enzyme hydrogel with intrinsic cofactor regeneration for flow biocatalysis / P. Bitterwolf et al. *Micromachines*. 2019. Vol. 10, no. 11. P. 783. URL: <https://doi.org/10.3390/mi10110783>
  14. Immobilization of cholesterol oxidase from *Streptomyces* sp. on magnetite silicon dioxide by crosslinking method for cholesterol oxidation / M. S. Perdani et al. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2020. Vol. 191, no. 3. P. 968–980. URL: <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03241-w>

15. Lin B., Tao Y. Whole-cell biocatalysts by design. *Microbial cell factories*. 2017. Vol. 16, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0724-7>
16. Martín J. F., Liras P. The balance metabolism safety net: integration of stress signals by interacting transcriptional factors in streptomyces and related actinobacteria. *Frontiers in microbiology*. 2020. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03120>
17. Regulation of antibiotic production by signaling molecules in streptomyces / D. Kong et al. *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02927>
18. Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an oasis in Tunisia / S. Smaoui et al. *Archives of biological sciences*. 2011. Vol. 63, no. 4. P. 1047–1056. URL: <https://doi.org/10.2298/abs1104047s>
19. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro / L. Caly et al. *Antiviral research*. 2020. Vol. 178. P. 104787. URL: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104787>
20. Wright G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Current opinion in microbiology*. 2010. Vol. 13, no. 5. P. 589–594. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.005>
21. AraC-like transcriptional activator CuxR binds c-di-GMP by a PilZ-like mechanism to regulate extracellular polysaccharide production / S. Schäper et al. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2017. Vol. 114, no. 24. P. E4822–E4831. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1702435114>
22. Bachmann B. O. Applied evolutionary theories for engineering of secondary metabolic pathways. *Current opinion in chemical biology*. 2016. Vol. 35. P. 133–141. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.021>
23. Baltz R. H. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2016. Vol. 44, no. 4-5. P. 573–588. URL: <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1815-x>

24. Bioengineered polyhydroxyalkanoates as immobilized enzyme scaffolds for industrial applications / J. X. Wong et al. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020. Vol. 8.  
URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00156>
25. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis* / H. Ikeda et al. *Nature biotechnology*. 2003. Vol. 21, no. 5. P. 526–531.  
URL: <https://doi.org/10.1038/nbt820>
26. Dual, site-specific modification of antibodies by using solid-phase immobilized microbial transglutaminase / P. R. Spycher et al. *ChemBioChem*. 2017. Vol. 18, no. 19. P. 1923–1927.  
URL: <https://doi.org/10.1002/cbic.201700188>
27. Efficient production of gamma-aminobutyric acid by engineered *Saccharomyces cerevisiae* with glutamate decarboxylases from *Streptomyces* / H. Yuan et al. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2019. Vol. 67, no. 2. P. 240–248. URL: <https://doi.org/10.1002/bab.1840>
28. Enhancing nemadectin production by *Streptomyces cyaneogriseus* ssp. noncyanogenus through quantitative evaluation and optimization of dissolved oxygen and shear force / X. Song et al. *Bioresource technology*. 2018. Vol. 255. P. 180–188.  
URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.033>
29. Enzyme-catalyzed regio-selective demethylation of papaverine by CYP105D1 / C. Shen et al. *Biotechnology letters*. 2018. Vol. 41, no. 1. P. 171–180. URL: <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2626-0>
30. Genilloud O. The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie van leeuwenhoek*. 2014. Vol. 106, no. 1. P. 173–188. URL: <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0204-6>
31. Immobilization of *Streptomyces thermotolerans* 11432 on polyurethane foam to improve production of Acetylisovaleryltylosin / H. Zhu et

- al. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2014. Vol. 42, no. 1. P. 105–111. URL: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1545-x>
32. Immobilized MAS1 lipase showed high esterification activity in the production of triacylglycerols with n-3 polyunsaturated fatty acids / X. Wang et al. *Food chemistry*. 2017. Vol. 216. P. 260–267. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.041>
33. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomyces / G. Liu et al. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2013. Vol. 77, no. 1. P. 112–143. URL: <https://doi.org/10.1128/membr.00054-12>
34. Ochi K., Hosaka T. New strategies for drug discovery: activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012. Vol. 97, no. 1. P. 87–98. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4551-9>
35. Ochi K. Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. *The journal of antibiotics*. 2016. Vol. 70, no. 1. P. 25–40. URL: <https://doi.org/10.1038/ja.2016.82>
36. Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces* sp. strain isolated from saltpan environment / F. Boughachiche et al. *African journal of biotechnology*. 2016. Vol. 15, no. 26. P. 1401–1412. URL: <https://doi.org/10.5897/ajb2016.15259>
37. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source / B. Ruiz et al. *Critical reviews in microbiology*. 2010. Vol. 36, no. 2. P. 146–167. URL: <https://doi.org/10.3109/10408410903489576>
38. *Streptomyces* spp. in the biocatalysis toolbox / J. Spasic et al. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018. Vol. 102, no. 8. P. 3513–3536. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8884-x>
39. Tippelt A., Nett M., Vela Gurovic M. S. Complete genome sequence of the lignocellulose-degrading actinomycete *streptomyces albus*

- CAS922. *Microbiology resource announcements*. 2020. Vol. 9, no. 21.  
URL: <https://doi.org/10.1128/mra.00227-20>
40. Zhu H., Sandiford S. K., van Wezel G. P. Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2013. Vol. 41, no. 2. P. 371–386.  
URL: <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1309-z>
41. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes / A. van der Meij et al. *FEMS microbiology reviews*. 2017. Vol. 41, no. 3. P. 392–416.  
URL: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
42. Covington B. C., Xu F., Seyedsayamdost M. R. A natural product chemist's guide to unlocking silent biosynthetic gene clusters. *Annual review of biochemistry*. 2021. Vol. 90, no. 1. P. 763–788.  
URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-081420-102432>
43. Daniel-Ivad M., Pimentel-Elardo S., Nodwell J. R. Control of specialized metabolism by signaling and transcriptional regulation: opportunities for new platforms for drug discovery?. *Annual review of microbiology*. 2018. Vol. 72, no. 1. P. 25–48. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-022618-042458>
44. Du C., van Wezel G. P. Mining for microbial gems: integrating proteomics in the postgenomic natural product discovery pipeline. *Proteomics*. 2018. Vol. 18, no. 18. P. 1700332. URL: <https://doi.org/10.1002/pmic.201700332>
45. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery / D. A. van Bergeijk et al. *Nature reviews microbiology*. 2020. Vol. 18, no. 10. P. 546–558. URL: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
46. Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene (*vgb*) / S. Wang et al. *World journal of microbiology and biotechnology*. 2013. Vol. 30, no. 4. P. 1369–1376. URL: <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1561-4>

47. Farrell K., Jahan M., Kovicich N. Distinct mechanisms of biotic and chemical elicitors enable additive elicitation of the anticancer phytoalexin glyceollin I. *Molecules*. 2017. Vol. 22, no. 8. P. 1261. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules22081261>
48. Fungal elicitors combined with a sucrose feed significantly enhance triterpene production of a *Salvia fruticosa* cell suspension” / S. Kümritz et al. *Applied microbiology and biotechnology*. 2016. Vol. 100, no. 16. P. 7071–7082. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7432-9>
49. Interplay between carbon, nitrogen and phosphate utilization in the control of secondary metabolite production in *Streptomyces* / A. Romero-Rodríguez et al. *Antonie van leeuwenhoek*. 2018. Vol. 111, no. 5. P. 761–781. URL: <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1073-1>
50. Katz L., Baltz R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2016. Vol. 43, no. 2-3. P. 155–176. URL: <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
51. Locatelli F. M., Goo K.-S., Ulanova D. Effects of trace metal ions on secondary metabolism and the morphological development of streptomycetes. *Metallomics*. 2016. Vol. 8, no. 5. P. 469–480. URL: <https://doi.org/10.1039/c5mt00324e>
52. Martín J. F., Liras P. The balance metabolism safety net: integration of stress signals by interacting transcriptional factors in streptomycetes and related actinobacteria. *Frontiers in microbiology*. 2020. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03120>
53. Okada B. K., Seyedsayamdost M. R. Antibiotic dialogues: induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules. *FEMS microbiology reviews*. 2016. Vol. 41, no. 1. P. 19–33. URL: <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw035>
54. Regulation of antibiotic production by signaling molecules in streptomycetes / D. Kong et al. *Frontiers in microbiology*. 2019. Vol. 10. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02927>

55. Substantial improvement of toyocamycin production in *Streptomyces diastatochromogenes* by cumulative drug-resistance mutations / X.-P. Shentu et al. *Plos one*. 2018. Vol. 13, no. 8. P. e0203006. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203006>
56. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria / E. A. Barka et al. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2015. Vol. 80, no. 1. P. 1–43. URL: <https://doi.org/10.1128/mubr.00019-15>
57. The application of regulatory cascades in streptomyces: yield enhancement and metabolite mining / H. Xia et al. *Frontiers in microbiology*. 2020. Vol. 11. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00406>
58. Tyurin A., Alferova V., Korshun V. Chemical elicitors of antibiotic biosynthesis in actinomycetes. *Microorganisms*. 2018. Vol. 6, no. 2. P. 52. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020052>
59. Wang C., Huang D., Liang S. Identification and metabolomic analysis of chemical elicitors for tacrolimus accumulation in *Streptomyces tsukubaensis*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2018. Vol. 102, no. 17. P. 7541–7553. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9177-0>
60. Wang L., Li Y., Li Y. Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from streptomyces sp. ZL-24. *International journal of biological macromolecules*. 2019. Vol. 123. P. 521–530. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.061>
61. Activation of chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 by ethanol shock: insights from the promoter fusion studies / O. N. Sekurova et al. *Microbial cell factories*. 2016. Vol. 15, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0484-9>
62. Enhanced uptake of antibiotic resistance genes in the presence of nanoalumina / C. Ding et al. *Nanotoxicology*. 2016. Vol. 10, no. 8. P. 1051–1060. URL: <https://doi.org/10.3109/17435390.2016.1161856>
63. Generation of *Streptomyces hygroscopicus* cell factories with enhanced ascomycin production by combined elicitation and pathway-engineering

- strategies / C. Wang et al. *Biotechnology and bioengineering*. 2019. Vol. 116, no. 12. P. 3382–3395. URL: <https://doi.org/10.1002/bit.27158>
64. Medium engineering for enhanced production of undecylprodigiosin antibiotic in *Streptomyces coelicolor* using oil palm biomass hydrolysate as a carbon source / S. K. Bhatia et al. *Bioresource technology*. 2016. Vol. 217. P. 141–149. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.055>
65. Metabolic network model guided engineering ethylmalonyl-coa pathway to improve ascomycin production in *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* / J. Wang et al. *Microbial cell factories*. 2017. Vol. 16, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0787-5>
66. Sarkale A. M., Kumar A., Appayee C. Organocatalytic approach for short asymmetric synthesis of (r)-paraconyl alcohol: application to the total syntheses of IM-2, SCB2, and a-factor  $\gamma$ -butyrolactone autoregulators. *The journal of organic chemistry*. 2018. T. 83, № 7. С. 4167–4172. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00122> (дата звернення: 23.12.2023).
67. SrnR from *Streptomyces griseus* is a nickel-binding transcriptional activator / Y. Beniamino et al. *JBIC journal of biological inorganic chemistry*. 2019. Vol. 25, no. 2. P. 187–198. URL: <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01751-5>
68. Isono M, Takahashi T, Yamadzaki Y. винахідники; Bacteriolytic enzyme and process for the production there of. Patent 3649454 USA, С 12 К 1/06.М. 1972 Квіт. [in USA].