

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”**

ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ

КАФЕДРА ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

"На правах рукопису"

УДК _____

МАГІСТЕРСЬКА ДИСЕРТАЦІЯ

з спеціальності _____ **8.05140101 – промислова біотехнологія** _____
(код та назва спеціальності)

на тему: Характеристика та оптимізація біосинтезу антимікробних сполук
Streptomyces recifensis var. lyticus

Студент групи БТ-31м
(шифр групи)

Пескова Лілія Олександрівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

Науковий керівник: к.т.н., доц. Тодосійчук Т.С.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

Консультанти: к. т. н., доц., Орленко А.Т.
(вчені ступінь та звання, прізвище, ініціали)

Вступ

Актуальність теми. Стрептоміцети давно привертають увагу дослідників у галузях промислової мікробіології, біотехнології та генної інженерії як продуценти антимікробних біологічно активних речовин, в першу чергу антибіотиків і ферментів. Широке розповсюдження цієї групи мікроорганізмів у природі та значний біосинтетичний потенціал визначають актуальність пошуку нових продуцентів та поглиблене вивчення відомих культур. Можливість корегувати спрямованість біосинтезу, використання доступної сировини та широкий спектр продуктів метаболізму зумовлюють перспективи використання мікробних продуцентів для розробки біотехнологій антимікробних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконувалась на кафедрі промислової біотехнології НТУУ «КПІ» в рамках ініціативних пошукових досліджень за темою № ФБТ 1/2010 «Розробка технології модифікованих форм бактеріолітичного комплексу мікробного походження».

Мета й завдання дослідження.

Метою роботи є виділення і характеристика антибіотичних сполук *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М та оптимізації складу поживного середовища для біосинтезу антимікробних речовин досліджуваним продуцентом.

Для досягнення даної мети були поставлені наступні завдання:

1. Виділити антибіотичні сполуки досліджуваного штаму та вивчити їх основні характеристики.
2. Оптимізувати поживне середовище для біосинтезу культурою антимікробних сполук – бактеріолітичного ферментного комплексу та антибіотиків.
3. Встановити антимікробний спектр виділеного антибіотику та комплексу антимікробних метаболітів штаму.

4. Визначити області застосування отриманих зразків препаратів антимікробного комплексу.

Об'єкт дослідження – штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М та синтезовані антибіотичні сполуки.

Предмет дослідження – характеристики антибіотичних сполук штаму та біосинтез антимікробних метаболітів.

Наукове та практичне значення основних одержаних результатів

Вперше виділено низькомолекулярний продукт біосинтезу *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М – антибіотик, що характеризується фактором розділення $R_f = 0,65$ та оптимумом поглинання при 206 – 208 нм.

Розроблено склад поживного середовища для підвищеного у 2 рази синтезу антимікробних сполук штамом *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М. Вартість оптимізованого ферментаційного середовища у 1,5 рази нижча, від вихідного варіанту.

Результати дослідження є основою для створення комплексного та індивідуальних антисептичних препаратів з антибактеріальною та фунгіцидною дією ветеринарного, медичного та сільськогосподарського призначення.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, що включені до дисертації, були представлені на ІХ Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХІ століття» присвяченій 170-й річниці з дня народження І.І. Мечникова (Київ, 2015).

Експериментальна частина

Методи досліджень

В роботі використовували мікробіологічні, біотехнологічні, біохімічні та фізико-хімічні методи дослідження, а також математичної методи планування експерименту та обробки результатів.

Штам *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М підтримували на агаризованому середовищі Гаузе, біосинтез проводили на ферментаційному поживному

середовищі на основі сойового борошна та глюкози при температурі 28 ± 1 °C впродовж 5 діб.

Концентрацію біомаси в культуральній рідині (КР) визначали ваговим методом. Концентрацію білку визначали за методом Лоурі. Концентрації редукуючих цукрів визначали фериціанідним методом.

Визначення літичної активності (ЛА) бактеріолітичного ферментного комплексу по відношенню до тест-культур виконували турбідиметричним методом. За одиницю літичної активності приймали кількість ферменту, яка знижує оптичну густину суспензії тест-культури на 0,001 за 1 хвилину в 1 см^3 реакційної суміші при 50°C , при розведенні КР, що забезпечує лізис клітинної суспензії на 25 – 30%. Антибіотичну активність (АА) в КР визначали спектрофотометричним методом.

Виділення речовини антибіотичної природи з культуральної рідини проводили методом періодичної рідинної екстракції хлороформом. Для оцінки антибіотичної активності отриманого екстракту використовували стандартний метод паперових дисків. Антибіотичну активність визначали за зоною затримки росту тест-штаму навколо паперового диску з нанесеним екстрактом. Для аналізу антибіотичних речовин використовували метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) на хроматографічних пластинах Silufol UV-254. У ролі елюента використано систему хлороформ:толуол:метанолу (5:1:1).

Оптимізацію складу поживного середовища здійснювали за вмістом джерел вуглецевого та азотного живлення використовуючи методи математичного планування. При проведенні експерименту використовували плани попереднього експерименту – двофакторний дисперсійний аналіз та плани основного експерименту – центральний композиційний рототабельний план.

Основні результати дослідження

Штам *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М, давно відомий як продуцент лізоензимного ферментного комплексу широкого спектру дії, у даній роботі

досліджувався як продуцент також антибіотиків фунгіцидної дії.

На першому етапі роботи проводили виділення та характеристику антибіотичних речовин з культуральної рідини *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М методом періодичної рідинної екстракції, використовуючи фугату та біомасу. Встановлена антибіотична активність щодо *Candida albicans* відрізнялася за рівнем вияву: екстракт з фугату в 1,5 – 2 рази активніше, ніж з біомаси.

Хроматографічне дослідження компонентного складу антибіотичної речовини показало наявність в екстракті лише однієї сполуки з коефіцієнтом рухомості $R_f = 0,65$. Біоавтографія отриманої речовини підтвердила його антибіотичну природу. Визначена спектральна характеристика антибіотичної речовини - максимум поглинання при 206 – 208 нм.

На наступному етапі роботи оптимізовано склад поживного середовища для біосинтезу антимікробних сполук досліджуваним штамом з використанням методів математичного планування. Розроблено поживне середовище на основі меляси (замість глюкози або гідролізованого крохмалю), що дозволяє підвищити у 2-2,3 рази рівень синтезу антибіотику та ферменту та одночасно знизити вартість середовища у 1,5 рази.

Аналіз дослідних зразків препаратів показав провідну антибактеріальну активність ферментного комплексу, фунгіцидну – антибіотичної речовини та можливість використання комплексу цих антимікробних метаболітів штаму для розробки антисептику широкого спектру дії.

Висновки

Виділено та досліджено антибіотичну речовину *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435/М з оптимуму поглинання при 206-208 нм, що локалізована переважно екзогенно, активну по відношенню до *Candida albicans*. Розроблено склад поживного середовища, що дозволяє підвищити у 2-2,3 рази рівень синтезу антимікробних сполук штамом. Вартість оптимізованого ферментаційного середовища у 1,5 рази нижча, від вихідного варіанту.

Результати дослідження є основою для створення комплексного та індивідуальних антисептичних препаратів з антибактеріальною та фунгіцидною дією ветеринарного, медичного та сільськогосподарського призначення.

Ключові слова

STREPTOMYCES RECIFENSIS VAR. LYTICUS, ФЕРМЕНТ, АНТИБІОТИК, ЕКСТРАКЦІЯ, ОПТИМІЗАЦІЯ, ДИСПЕРСІЙНИЙ АНАЛІЗ

Публікації.

За результатами досліджень опубліковано 2 статті та 1 тези доповідей:

1. Пескова Л.О. Фермент ліпаза: аналіз галузей використання, продуцентів, способів одержання / Л.О. Пескова, Н.В. Дехтяренко // Наукові вісти НТУУ «КПІ». – 2014. – № 3. – С. 63 – 72.

2. Гончарова Д.О. Застосування мікробних гідролаз в процесах хлібопечення / Д.О. Гончарова, М.В. Молочко, Л.О. Пескова // Біотехнологія XXI століття: тези доповідей ІХ Всеукраїнської науково-практичної конференції. – К.: НТУУ «КПІ». - 2015. – С. 31.

3. Розробка готових форм антисептиків для ветеринарії та медицини на основі бактеріолітичного препарату циторецифен. / Л.О. Пескова [та інші] // Наукові вісти НТУУ «КПІ». – 2015. – №3. [подано до друку]