

Analiza repertuaru metabolicznego i morfologii promieniowca *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 w hodowlach bioreaktorowych prowadzonych przy różnych początkowych stężeniach źródeł węgla i azotu

M. Bizukojć*, A. Ścigaczewska, T. Boruta, A. Ruda, A. Kawka

*Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Wólczańska 213, *bizukojc.marcin@p.lodz.pl*

Farmaceutycznie istotne substancje, takie jak metabolity wtórne mikroorganizmów oraz enzymy, produkowane są w głównej mierze przez bakterie i grzyby strzępkowe [Del Carratore i in. 2022:102762; Seca, Pinto 2019:66]. Do mikroorganizmów strzępkowych najszerzej wykorzystywanych w bioprocessach na skalę przemysłową, w szczególności do biosyntezy antybiotyków, należą promieniowce. Jednym z przykładów tych pożytecznych, gram dodatnich nitkowych bakterii jest *Streptomyces rimosus*. Podstawowymi sposobami stymulowania mikroorganizmów do produkcji metabolitów wtórnych jest manipulacja warunkami wzrostu i składem pożywki hodowlanej [Bode i in., 2002:619–627]) Z kolei ilość węgla i azotu użytego w tym działaniu jest jednym z najsilniejszych czynników wpływających na procesy biosyntezy metabolitów. Z tego powodu w niniejszej pracy zbadano wpływ początkowego stężenia źródła węgla (glukoza) i azotu (ekstrakt drożdżowy) na powstawanie osiemnastu metabolitów wtórnych *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 oraz rozwój morfologiczny tego promieniowca w hodowlach bioreaktorowych.

Materiały i metody

Przeprowadzono serie hodowli *S. rimosus* ATCC 10970 w 5l bioreaktorach zbiornikowych mieszadłowych BIOSTAT® B (Sartorius). Początkowy skład pożywek hodowlanych różnił się stężeniem źródła węgla (glukoza) lub stężeniem źródła azotu (ekstrakt drożdżowy). Testowano następujące kombinacje. Do badania wpływu źródła azotu zastosowano trzy podłoża zawierające 1, 5 lub 20 g L⁻¹ ekstraktu drożdżowego przy 20 g L⁻¹ glukozy. Do zbadania wpływu źródła węgla zastosowano warianty: 0; 3,5; 7,0 i 20,0 g L⁻¹ glukozy przy 5 g L⁻¹ ekstraktu drożdżowego. Pozostała ilość składników była taka sama dla każdego wariantu hodowli.

Analiza metabolitów wtórnych, składu podłoży oraz morfologii *S. rimosus*

Próbki zawartości bioreaktorów pobierano co 24 godziny. Metabolity wtórne obecne w przesączach oraz składniki podłoży analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ACQUITY-UPLC®) z wykorzystaniem kolumny BEH Shield RP18 w układzie faz odwróconych (2,1 mm × 100 mm × 1,7 μm) i w połączeniu z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (ACQUITY-SYNAPT G2, Waters, USA).

Wyniki i wnioski

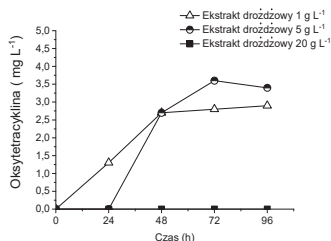
Niska początkowa ilość ekstraktu drożdżowego na poziomie 1 g L⁻¹ spowodowała silnie ograniczony azotem wzrost biomasy, której ilość nie przekraczała 2 g × L⁻¹ w 96 godzinie. Natomiast duża początkowa dostępność azotu (20 g L⁻¹ ekstraktu drożdżowego)

spowodowała wzrost ilości biomasy do $13 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ w 96 godzinie. Efekt zmiany początkowego stężenia glukozy (źródła węgla) nie był tak spektakularny, jak w przypadku źródła azotu. Gdy początkowe stężenie glukozy wzrastało, ilość powstającej biomasy była proporcjonalnie większa.

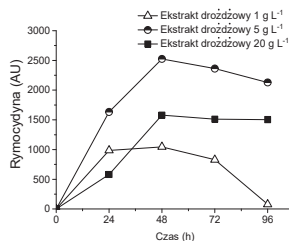
Podczas eksperymentów zidentyfikowano 18 metabolitów wtórnych *S. rimosus*. Poniżej omówiono najważniejsze wyniki. Wysokie początkowe stężenie azotu organicznego nie sprzyjało powstawaniu metabolitów wtórnych z grupy oksytetracyklin. W eksperymencie z ekstraktem drożdżowym w stężeniu 20 g L^{-1} nie wykryto zarówno oksytetracykliny, jak i 2-acetylo-2-dekarboksamidooksyntetracykliny. Niski poziom azotu organicznego (1 g L^{-1} ekstraktu drożdżowego) sprzyjał bardziej 2-acetylo-2-dekarboksamidooksyntetracyklinie, niż samej oksytetracyklinie. Istniała wyraźna korelacja dla trzech wykrytych rymocydyn. Dla wszystkich z nich optymalnym stężeniem ekstraktu drożdżowego w podłożu było 5 g L^{-1} . To samo dotyczyło turgicheliny, lucensomycyny, nienazwanej angucykliny, 7-dimetylo-glukopiericydyny A oraz milbemycyn. Jednak dla milbemycyny $a_3 + 4[\text{O}]$ jej poziomy były porównywalne zarówno dla 1, jak i 20 g L^{-1} ekstraktu drożdżowego. Cztery pozostałe metabolity wykazały zupełnie inną korelację z początkowym stężeniem azotu organicznego. Mowa o kwasie lorneinowym J, enaminomycynie B, spinoksazynie A i 2-metylotio-cis-zeatynie. Ich poziomy przy 1 g L^{-1} ekstraktu drożdżowego były bliskie zeru, a ich najwyższy sygnał wykryto w eksperymentach z największym początkowym stężeniem azotu organicznego w podłożu 20 g L^{-1} .

XIV OGÓLNOKRAJOWA KONFERENCJA NAUKOWA
POSTĘPY INŻYNIERII BIOREAKTOROWEJ
Konopnica, 25–27 Wrzesień 2023

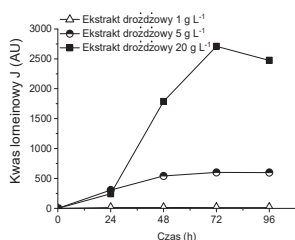
A



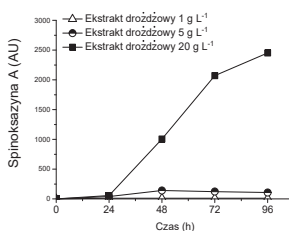
B



C



D



Rys. 1. Wpływ początkowego stężenia azotu (ekstrakt drożdżowy) na biosyntezę wybranych metabolitów wtórnych *S. rimosus*:

A – oksytetracyklina, B – rymocidyna,

C – kwas lorneinowy J, D – spinokszazyna A

Źródło: opracowanie własne.

Wpływ początkowego stężenia glukozy na metabolizm *S. rimosus* był bardziej przewidywalny. Zwykle w przypadku metabolitów wtórnych ich produkcja jest silnie zależna od źródła węgla, ponieważ to właśnie atomy węgla tworzą szkielet węglowy tych stosunkowo dużych cząsteczek.

Zawartość azotu oraz węgla w podłożu hodowlanym miała też wyraźny wpływ na morfologię *S. rimosus*, co mogło bezpośrednio przyczynić się do zmian metabolicznych mikroorganizmu.

Ogólnie można stwierdzić, że przy deficycie składników pokarmowych (eksperymenty z 1 g L⁻¹ ekstraktu drożdżowego i 0 g L⁻¹ glukozy) *S. rimosus* tworzył okrągłe, regularne aglomeraty zwane peletkami. Zwiększenie ilości azotu i węgla w podłożu prowadziło do wzrostu mikroorganizmu w postaci mniejszych form typu *clump* oraz grzybni rozproszonych.

Niniejsze badania zostały wykonane w ramach projektu UMO-2021/43/B/ST8/00268 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Bibliografia

Bode H.B., Bethe B., Höfs R., Zeeck A., (2002), *Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity*, "ChemBioChem", vol. 3, s. 619–627.

Del Carratore F., Hanko E.K., Breitling R., Takano E., (2022), *Biotechnological application of Streptomyces for the production of clinical drugs and other bioactive molecules*, "Current Opinion in Biotechnology", vol. 77, s. 102–762.

Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A., (2019), *Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites*, "Medicines" vol. 6, nr 2 s. 66.