

УДК 579.049

С.Л. Голембіовська, Л.В. Поліщук, А.Ю. Коцюк, Б.П. Мацелюх

Інститут мікробіології і вірусології НАНУ, вул. Заболотного, 154,
Київ, МСП, ДО3680, Україна, e-mail: golembiowska@ukr.net

ЛІМІТУЮЧІ КАРОТИНОГЕНЕЗ УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ МУТАНТІВ *STREPTOMICES* *GLOBISPORUS* 1912

Мета. Встановити компоненти синтетичного середовища та умови культивування, які блокують ознаку біосинтезу каротиноїдів у мутантних штамах *Streptomyces globisporus* 1912 Нр7 і Нр7С. **Методи.** Приготування агаризованих синтетичних середовищ з попередньо математично прорахованим співвідношенням С:N. Вплив солей на ознаку біосинтезу каротиноїдів визначали за допомогою методу лунок, перенесення поверхневого міцелію на досліджувані середовища здійснювали методом репліки. Ознаку біосинтезу каротиноїдів на досліджуваних середовищах проводили візуально. **Результати.** Проаналізовано вплив несприятливих для каротиногенезу чинників культивування для штаму *S. globisporus* 4Lcp отриманих раніше. На їх основі визначали чинники, які блокують біосинтез каротиноїдів у мутантних штамах *S. globisporus* 1912 Нр7 та *S. globisporus* 1912 Нр7С. Визначено, що 0,007% $FeSO_4$ лімітує утворення каротиноїдів досліджуваними штамами на оптимальних середовищах Ваксмана та Красильникова СРІ. Показано, що вміст джерел вуглецю по відношенню до джерел азоту є меншим за 24:1 та рН нижчим за 7 без застосування $CaCO_3$, який запобігає закисленню в процесі культивування, блокує утворення каротиноїдів. З'ясовано, що процес каротиногенезу досліджуваними штамами потребує стрес-чинників, таких як $MgSO_4$. **Висновки.** Визначено лімітуючі каротиногенез чинники культивування для мутантних штамах *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С: 0,007% $FeSO_4$, співвідношення С:N нижче за 24:1 та рівень рН нижче за 7, за відсутності $CaCO_3$ та стимулювальних каротиногенез солей, зокрема $MgSO_4$.

Ключові слова: стрептоміцети, каротиногенез, лімітуючі чинники.

Каротиноїди – внутрішньоклітинні природні пігменти. Вони утворюються шляхом поєднання C_5 -ізопреноїдів у молекули з C_{30} , C_{35} , C_{40} , C_{45} , C_{50} – вуглецевим скелетом, що містять спряжені подвійні зв'язки (СПЗ), кількість яких впливає на спектр поглинання енергії світла. Каротиноїди, які мають від 7-ми СПЗ поглинають кванти світла у видимій ділянці і людське око сприймає їх різні відтінки від світложовтого до темночервоного забарвлення [3, 7].

Каротиноїди виконують захисні функції для організмів, які постійно перебувають в агресивних умовах навколишнього середовища. Біосинтез каротиноїдів у нефотосинтезувальних мікроорганізмів, якими є стрептоміцети, носить регулятивний характер. В більшості стрептоміцетів гени біосинтезу каротиноїдів (*crt*-кластера) знаходяться в критичному стані, а їх активація

© С.Л. Голембіовська, Л.В. Поліщук, А.Ю. Коцюк, Б.П. Мацелюх, 2016



відбувається у відповідь на стресові чинники, такі як освітлення $\lambda = 450-550$ нм, підвищення температури, внесення окисників, кислот, солей, зміною рН середовища [8, 10].

З 1998 року у відділі Генетики мікроорганізмів ІМВ імені Д.К. Заболотного НАНУ існує колекція мутантів штаму *Streptomyces globisporus* 1912, які синтезують каротиноїди лікопін і бета-каротин. Вони відносяться до C_{40} -каротиноїдів, містять 11 спряжених подвійних зв'язків, є кольоровими і їх накопичення фіксують візуально. Після проведення сиквенс-аналізу геному одного з каротинсинтезувальних мутантів [9] став зрозумілий конститутивний характер біосинтезу каротиноїдів у мутантів *S. globisporus* 1912. Тим не менш, актуальною є проблема дисоціації популяції з утворенням варіантів низькоактивних (жовті, кремові) та неактивних (білих) за різних умов культивування (рідкі, агаризовані середовища) або тривалості зберігання. При розсіві білих колоній на повноцінні агаризовані середовища спостерігається накопичення в їх популяції каротинсинтезувальних варіантів, що свідчить про вірогідну регуляцію процесів біосинтезу каротиноїдів умовами культивування. Тому метою роботи було дослідити компоненти синтетичних середовищ і умови культивування мутантних штамів *S. globisporus* 1912 та визначити фактори, що лімітують біосинтез каротиноїдів у продуцентів каротиноїдів *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С.

Матеріали і методи

Характеристики досліджуваних штамів наведені в таблиці 1.

Склад середовищ культивування, які використовували в роботі представлено в таблиці 2.

Гомогенізовану суспензію культур отримували змивом міцелію 7–10 добових культур зі скошеної поверхні агаризованого кукурудзяно-соевого середовища [1] стерильною дистильованою водою, ресуспендуванням та фільтруванням через стерильний ватний фільтр.

Таблиця 1

Характеристики використаних в роботі каротинсинтезувальних мутантів *S. globisporus* 1912

Table 1

Features of mutants *S. globisporus* 1912 used in the work

Штам	Колір колоній	Каротиноїд	Походження
<i>S. globisporus</i> 4 Lcp	Рожевий	Лікопін	4Crt спонтанно [2]
<i>S. globisporus</i> 1912 Нр7	Темно-рожевий	Лікопін	4 Lcp H ₂ O ₂ [1]
<i>S. globisporus</i> 1912 Нр7С	Оранжевий	Лікопін, β -каротин	Нр7 спонтанно



Розсів проводили в розведенні в розрахунку 50–100 колоній на чашку Петрі. Для застосування методу репліки міцелій штамів *S. globisporus* 4 Lcp, Hp7 та Hp7C за допомогою петлі секторами наносили на поверхню агаризованого повноцінного середовища в чашках Петрі і вирощували протягом 4–5 діб. Далі на підставку-реплікатор надівали стерильний фільтрувальний папір та фіксували його. На зовнішній поверхні всіх чашок Петрі робили позначку маркером. В стерильних умовах відкриту чашку з вирощеними культурами з невеликою силою притискали до паперу реплікатора, так щоб залишити на ньому частину поверхневого міцелію. Після цього з поверхні реплікатора робили відбиток на досліджувані агаризовані середовища, при цьому позначку маркера для всіх чашок залишали в одному положенні.

Таблиця 2

Склад середовищ, які підлягали порівняльному аналізу [2]

Table 2

Compound of the medium for comparative analysis [2]

Середовище	Склад середовища, %						
	C	N	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	NaCl	FeSO ₄	Інше
Красильникова СРІ	Глюкоза 2,0	NaNO ₃ 0,2	0,05	0,05	0,05	0,001	CaCO ₃ 0,3
Чапека з глюкозою	Глюкоза 2,0	NaNO ₃ 0,2	0,1	0,05	0,05	0,005	
Глюкозо-амонійне	Глюкоза 1,0	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,4	0,2	0,1	0,5	0,002	CaCl ₂ x 5H ₂ O 0,04
Ваксмана	Гліцерин 3,0	NaNO ₃ 0,2	0,05	0,05	0,05	0,001	
Гліцерин-амонійне	Гліцерин 1,0	NH ₄ Cl 0,1	0,1	0,05	0,05		CaCO ₃ 0,1

Вплив FeSO₄ на блокування біосинтезу каротиноїдів проводили на оптимальних середовищах Ваксмана та Красильникова СРІ. За допомогою пробійника (d=10мм) в товщі середовища з щільно засіяним мутантами газонем робили лунки, в які вносили по 0,1 мл FeSO₄ в концентраціях від 0,1 до 0,5% з кроком 0,1%. Розраховували кількість солі в 0,1 мл за різних концентрацій. Через 7–10 діб лінійкою вимірювали величину зон відсутності росту продуцентів, блокування каротиноїдів та пригнічення їх синтезу. Математично вивчали об'єм середовища навколо лунок, поширення солі в агарі навколо лунок (геометрична прогресія) та вірогідну концентрацію солі (з похибкою 5%), яка лімітує ріст досліджуваних мутантів. Після чого середовища Ваксмана та Красильникова СРІ готували з внесенням 0,005 до 0,009% з кроком 0,001% FeSO₄, які засівали методом репліки.

Для середовищ з гліцерином і амонієм C:N 24:1 методом лунок визначали потребу в солях K₂HPO₄, NaCl, MgSO₄ та CaCO₃. Готували 4-ри розчини: №1



містив по 1% суміші всіх солей, №2 не містив CaCO_3 , №3 – MgSO_4 , №4 – MgSO_4 та CaCO_3 . В агарі чашок Петрі робили лунки, куди вносили по 0,1 мл вищенаведених розчинів.

Вплив еквімолярних співвідношень вуглецю до азоту на біосинтез каротиноїдів досліджували із внесенням гліцерину та глюкози з 0,08% сульфатом амонію, інші солі (г/л): K_2HPO_4 – 0,5, NaCl – 0,5, MgSO_4 – 0,5, CaCO_3 – 0,5. Досліджуваними співвідношеннями С:N були 12:1, 24:1, 36:1, 48:1 та 60:1. Масову частку атомів азоту або вуглецю в молекулах, що їх містять визначали за формулою:

$$W = n \times A_r / M [5],$$

де W — масова частка елемента; A_r — відносна атомна маса елемента в таблиці Менделєєва; n — кількість атомів елемента у формулі; M_r — відносна молекулярна маса речовини, в якій міститься елемент.

Вплив початкового рН на синтез каротиноїдів досліджували за співвідношення С:N 24:1. Джерелами вуглецю були: сахароза, фруктоза, етанол, глюкоза, інозит, сорбіт та арабіноза, які вносили в концентрації 1%, етанолу – 0,5%, джерелами азоту – 0,1% нітрат натрію та 0,08% сульфату амонію. Для випадку внесення етанолу додавали 0,07% нітрату натрію або 0,05% сульфату амонію. Використовували солі (г/л): K_2HPO_4 – 1,0 та NaCl – 1,0. Досліджуваними значеннями рН були 6,0, 7,0 та 8,0, які доводили перед стерилізацією до необхідного значення NaOH або HCl . Пересівання досліджуваних штамів на середовища здійснювали за допомогою методу репліки. Ознаку біосинтезу каротиноїдів лікопіну та бета-каротину аналізували візуально після вирощування впродовж 7–10 діб в термостаті за t 28 °С.

Результати досліджень та їх обговорення

На початку дослідження проаналізовано вплив середовищ культивування на інтенсивність каротиногенезу у мутантного штаму *S. globisporus* 4 Lcp [2] та вибрані необхідні для дослідження впливу у напрямку визначення лімітуючих каротиногенез чинників культивування (табл. 3).

Найбільшу увагу привертала середовища Красильникова СРІ та Чапека, які схожі за компонентним складом, але відрізняються продуктивністю. Для Чапека було застосовано пояснення закислення середовища в процесі культивування до 4,8, аналогічно глюкозо-амонійному – 5,5 за відсутності CaCO_3 . У даному дослідженні зосередили увагу на причинах закислення. Одна з них – FeSO_4 в середовищі Чапека, що здійснює вплив на окисно-відновлювальний потенціал та сприяє накопиченню H^+ -йонів в середовищі [5]. Оптимальні для каротиногенезу середовища в прописі мають цю речовину у п'ять разів меншій кількості, ніж в Чапека. Для підтвердження впливу FeSO_4 на блокування біосинтезу пігментів на оптимальних середовищах Красильникова СРІ та Ваксмана її вносили у вищій, ніж в прописі кількості. Внесення 0,2–0,5% FeSO_4 по 0,1 мл в лунку пригнічувало ріст досліджуваних штамів навколо лунки з середньою зоною затримки росту $d=13\pm 2,0$ мм.



Таблиця 3

Накопичення біомаси та синтез лікопіну штамом *S. globisporus* 4Lcp при глибинному культивуванні на синтетичних середовищах [2]

Table 3

Accumulation of biomass and lycopene biosynthesis of strain *S. globisporus* 4Lcp in liquid synthetic medium [2]

Середовище	C:N	рН		Суха біомаса, г/л середовища	Лікопін мг/г СБМ
		до	після		
		вирощування			
Красильникова СРІ	24:1	7,5	6,5	2,0 ± 0,1	1,30 ± 0,01
Чапека з глюкозою	24:1	7,4	4,8	2,0 ± 0,2	0,50 ± 0,02
Глюкозо-амонійне	12:1	7,4	5,5	2,0 ± 0,2	0,50 ± 0,02
Гліцерин-амонійне	24:1	7,3	7,0	1,5 ± 0,1	Сліди
Ваксмана	36:1	7,0	7,2	3,0 ± 0,2	1,30 ± 0,05

Далі на агарі фіксували білі зони росту культур, величина діаметрів яких була пропорційною концентраціям внесеної солі. Навколо лунки, куди вносили 0,1 мл 0,1% FeSO₄ газон досліджуваних штамів був білим, а зони пригнічення росту не фіксували. Математично прорахували, що кількість солі, яка не сприятиме росту культур становитиме 0,01%. Подальші приготування вищеназваних середовищ містили 0,005–0,009% концентрації FeSO₄. При їх порівняльному реплікаційному аналізі визначено, що внесення 0,007% FeSO₄ блокувало біосинтез пігментів без впливу на ріст штамів *S. globisporus* 1912Hr7 та Hr7C. Потрібно зауважити, що така кількість FeSO₄ близька до концентрації в прописі Чапека – 0,005%, що доповнює пояснення низького синтезу каротиноїдів для цього середовища.

Рівень низького біосинтезу лікопіну у штаму *S. globisporus* 4 Lcp на глюкозо- та гліцерин-амонійних середовищах пояснювали блокуванням лікопіногенезу солями амонію. Крім цього, глюкозо-амонійне середовище містить співвідношення атомів вуглецю до азоту 12:1, а визначене раніше оптимальне для продуктивності *S. globisporus* 4 Lcp складає 48:1 [2]. Відомо, що вміст великої кількості вуглецевих молекул на тлі браку джерел азоту активує процес біосинтезу каротиноїдів у нефотосинтезувальних мікроорганізмів [4, 7]. Не сприятливість лікопіногенезу гліцерин-амонійного за C:N 24:1, за відсутності FeSO₄ і нейтральному рН робило необхідним ретельніше його дослідити.

Гомогенізовані суспензії мутантних штамів *S. globisporus* 1912-Hr7 та Hr7C в розведеннях висівали на агаризовані глюкозо- (12:1) і гліцерин- (24:1)



амонійні середовища порівняно з оптимальними та спорідненими за джерелом вуглецю нітратними Красильникова СРІ (24:1) і Ваксмана (36:1).

На чашках з окремими колоніями спостерігалася велика різниця в забарвленні колоній на середовищах з амонієм порівняно з нітратними, що підтверджувало попередню гіпотезу блокування солями амонію каротиногенезу у штаму *S. globisporus* 4 Лср. Колонії варіантів на середовищах Ваксмана та гліцерин-амонійному були більшими, з краще розвиненим поверхневим міцелієм, вірогідно через вищий вміст гліцерину в прописі середовища Ваксмана (рис. 1).

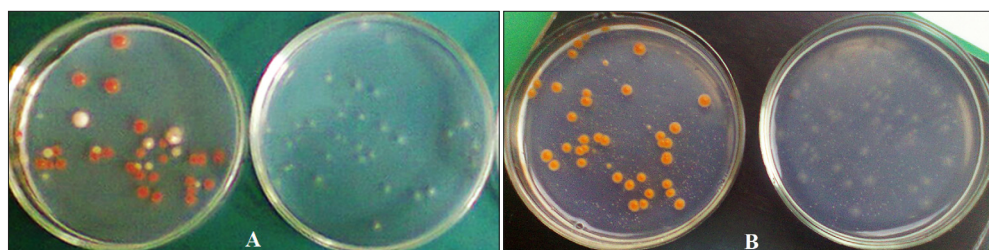


Рис. 1. Колонії мутантних штамів *S. globisporus* 1912Hp7 (А) та Hp7C (В) на середовищі Ваксмана (зліва) та гліцерин-амонійному (справа)

Fig. 1. Mutant strains colonies *S. globisporus* 1912Hp7 (A) and Hp7C (B) on Waksman (left) and glycerol-ammonium (right) medium

У зв'язку з цим, вирішили дослідити вплив співвідношення С:N 12:1, 24:1, 36:1, 48:1 та 60:1 для гліцерину і глюкози до азоту – сульфат амонію на синтез каротиноїдів у мутантних штамів *S. globisporus* 1912 Hp7 та Hp7C. В результаті на середовищах з варіантами С:N 12:1 та 24:1 колонії мутантів були неактивними за синтезом каротиноїдів (білі). При додатковому внесенні молекул вуглецю 36:1, 48:1 та 60:1 поверхневий міцелій колоній мутантного штаму *S. globisporus* 1912 Hp7 був світло рожевим, а Hp7C – світло оранжевим. Амоній відомий як донор протонів водню [5], тому потрібно було дослідити ознаку біосинтезу каротиноїдів за початкового рівня рН 6, 7 та 8, що є важливим показником для утворення каротиноїдів у мукових грибів [6]. Визначено, що в умовах рН 7 поверхневий міцелій мутантів *S. globisporus* 1912 Hp7 та Hp7C набував світлих відтінків рожевого та оранжевого кольорів, відповідно. Тоді як, при розсіві окремими колоніями культури в таких самих умовах були білими (попередній дослід з визначенням С:N). Отже, спостерігалася підсилення синтезу каротиноїдів за сумісного вирощування, що є наближеним до умов глибинного культивування, на протигагу самостійному росту колоніями. Досліджено, що рівень рН 6 не сприяв розвитку поверхневого міцелію мутантів, а субстратний був безпігментним. За початкового рівня рН 8 замість газону виростили поодинокі каротинсинтезувальні колонії. Тому, одним з лімітуючих каротиногенез чинників на гліцерин-амонійному середовищі є недостатня кількість ОН⁻-іонів. Також, для цього середовища з рН 7 була досліджена потреба в солях MgSO₄



та CaCO_3 . Навколо лунки, куди вносили 0,1 мл розчину №1 – всі солі K_2HPO_4 , NaCl , MgSO_4 та CaCO_3 по 1%, синтез каротиноїдів досліджуваними мутантами був інтенсивнішим, ніж в цілому на газоні гліцерин-амонійного середовища. Відсутність MgSO_4 та CaCO_3 , як разом, так і поодиноці не впливала на ріст штамів, але не сприяла накопиченню ними каротиноїдів. Сіль MgSO_4 може виступати як стресстимулювальний чинник або ко-фактор процесів біосинтезу каротиноїдів, а CaCO_3 запобігає зниженню рівня рН. Відсутність обох солей віднесено до лімітуючих каротиногенез чинників у штамів *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С, вміст яких для продуктивності гліцерин-амонійного середовища має бути у вищій, ніж в прописі кількості. Завдяки візуальній оцінці утворення поверхневого міцелію навколо лунок та попередньо визначеним кількостям K_2HPO_4 та NaCl [2] в подальшому їх додавали по 1,0 г/л для обох варіантів.

Було вирішено дослідити вплив початкового рівня рН 6, 7 та 8 при відсутності солей MgSO_4 , CaCO_3 та С:N 24:1 на біосинтез каротиноїдів у *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С. Джерелами вуглецю були: 1) сахароза, фруктоза та етанол як несприятливі [2]; 2) глюкоза, шестиатомні спирти інозит і сорбіт для порівняння; 3) п'ятиатомний цукор арабіноза для визначення утилізації пентоз. Як джерело азоту використовували амоній сульфат і нітрат натрію. В результаті спостерігали відсутність синтезу каротиноїдів у лікопінсинтезувального штаму *S. globisporus* 1912 Нр7 за рН 6 для всіх джерел вуглецю, крім арабінози, в поєднанні з обома застосованими джерелами азоту. Штам *S. globisporus* 1912 Нр7С, що накопичує каротиноїди лікопін та бета-каротин не утворював каротиноїди за рН 6 з внесенням цукрів у поєднанні з солями амонію, а спиртів з обома джерелами азоту. Гіпотеза блокування солями амонію каротиногенезу за рН 7 [2] знайшла підтвердження тільки при внесенні цукрів в середовище культивування лікопінсинтезувального мутанта *S. globisporus* 1912 Нр7. В інших варіантах за рівня рН 7 поверхневий міцелій досліджуваних штамів набував світлих відтінків відповідного для кожного мутанта кольорів, крім внесення арабінози та інозиту з обома джерелами азоту. В останніх поверхневий міцелій досліджуваних мутантів набував інтенсивніших відтінків кольорів властивих продуцентам. Натомість, накопиченню каротиноїдів сприяв рівень рН 8, хоча при цьому у більшості виростали поодинокі інтенсивно пігментовані колонії, а на середовищах з етанолом та сорбітом в поєднанні з нітратом ріст мутантів взагалі був відсутній. Вірогідно, надлишок гідрокси-йонів підсилювався окисником нітратом натрію, що не сприяло росту культур, тоді як відновлювальні властивості амонійної солі за рН 8 виявилися сприятливими. В цілому для всіх застосованих варіантів джерел вуглецю при рН 8 сульфат амонію був кращим субстратом для синтезу пігментів мутантними штамами *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С.

Дослідженнями встановлено продуктивні варіанти накопичення пігментів при внесенні інозиту в поєднанні з обома джерелами азоту за рН 7 та арабінози за всіх досліджуваних рН. Цей факт свідчить про наявність обох відомих на сьогодні шляхів біосинтезу C_{40} -каротиноїдів у мікроорганізмів: мевалонатного та метилеритритолфосфатного (МЕР-шлях) [3]. Крім того, можливість утво-



рювати мутантними штамами каротиноїди при застосуванні вищеназваних субстратів без внесення $MgSO_4$ свідчить, що він не може бути ко-фактором процесів біосинтезу каротиноїдів, але носить стресстимулювальний характер.

Отже, утворення каротиноїдів мутантними штамами *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С лімітує низку чинників: 0,007% $FeSO_4$, співвідношення джерел вуглецю по відношенню до азоту нижче за 24:1, рН нижче за 7, крім внесення арабінози, за відсутності $CaCO_3$ та стрес-чинників, зокрема $MgSO_4$.

УДК 579.049

С.Л. Голембиовская, Л.В. Полищук, А.Ю. Коцюк, Б.П. Мацелюх

Институт микробиологии и вирусологии НАНУ, ул. Заболотного, 154,
Киев, МСП, ДО3680, Украина, e-mail: golembiowska@ukr.net

ЛИМИТИРУЮЩИЕ КАРОТИНОГЕНЕЗ УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МУТАНТОВ *STREPTOMICES GLOBISPORUS* 1912

Реферат

Цель. Установить компоненты синтетической среды и условия культивирования лимитирующие каротиногенез мутантных штаммов *Streptomyces globisporus* 1912 Нр7 и Нр7С. **Методы.** Приготовление агаризованных синтетических сред с предварительно математически просчитанным соотношением С:N. Влияние солей на признак биосинтеза каротиноидов проводили с помощью метода лунок, перенесение воздушного мицелия осуществляли методом реплики. Признак биосинтеза каротиноидов на исследованных средах проводили визуально.

Результаты. Проведен анализ неблагоприятных каротиногенезу факторов для штамма *S. globisporus* 4Лср. На их основе определены факторы, которые блокируют биосинтез каротиноидов у мутантных штаммов *S. globisporus* 1912 Нр7 и *S. globisporus* 1912 Нр7С. Показано, что 0,007% $FeSO_4$ блокирует образование каротиноидов исследованными штаммами на оптимальных средах Ваксмана та Красильникова СРІ. Установлено, что содержание источников углерода по отношению к источникам азота ниже 24:1 и рН ниже 7 без применения $CaCO_3$, который предотвращает закисление в процессе культивирования блокирует образование каротиноидов. Определено, что процесс биосинтеза каротиноидов исследуемыми штаммами требует стресс-факторов, таких как $MgSO_4$. **Выводы.** Установлено лимитирующие каротиногенез мутантных штаммов *S. globisporus* 1912 Нр7 и Нр7С факторы культивирования: 0,007% $FeSO_4$, соотношение С:N ниже 24:1, уровень рН ниже 7, при отсутствии $CaCO_3$ и стимулирующих каротиногенез солей, в частности $MgSO_4$.

Ключевые слова: стрептомицеты, каротиногенез, блокирование.



UDK 579.049

S.L. Golembiovska, L.V. Polishchuk, A.Yu. Kotsyuk, B.P. Matselykh

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
154, Zabolotny st., Kyiv,
e-mail: golembiiovska@ukr.net

THE FACTORS OF CULTIVATION LIMITING CAROTENOGENESIS OF MUTANTS *STREPTOMICES GLOBISPORUS* 1912

Summary

Aim. To set the limiting carotenogenic components of the synthetic medium and conditions of cultivation for mutant strains *Streptomyces globisporus* 1912 Hp7 and Hp7C.

Methods. The synthetic agar media has been prepared with the pre-mathematically calculated ratio C:N. Influence of salts on the process of carotenoids biosynthesis has been determined by the method of holes, the aerial mycelium has been carried by the copies method. The sign of the carotenoids biosynthesis has been visual investigated.

Results. The analysis of the unfavorable factors for carotenogenesis have been conducted for strain *S. globisporus* 4Lcp. On their basis the factors has been determined, which block carotenoids biosynthesis in mutant strains *S. globisporus* 1912 Hp7 and *S. globisporus* 1912 Hp7C. It is shown that 0,007% FeSO_4 has inhibited the formation of carotenoids of tested strains on optimal medium Waxman and Krasyl'nikov CPI. It was shown that the content of carbon sources to nitrogen sources below 24:1 and pH below 7 without the use of CaCO_3 , that prevents acidification during cultivation has suppressed the carotenoids formation. Stimulation effect of stress factors, particularly MgSO_4 on tested strains carotenogenesis has been established. **Conclusions.** There were installed the limiting carotenogenic cultivation factors for mutant strains *S. globisporus* 1912 and Hp7 Hp7C: 0.007% FeSO_4 , the ratio of C:N below 24:1, pH below 7, in the absence of CaCO_3 and stimulating carotenogenesis salts, in particular MgSO_4 .

Key words: *Streptomyces*, carotenogenic, limiting factors.

Список використаної літератури

1. Голембівська С.Л., Лавренчук В.Я., Мацелюх Б.П. Багатоступенева селекція високопродуктивних по лікопіну мутантів // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – 2012. – Т. 4 – С. 334–338.
2. Голембівська С.Л., Тимошенко С.Г., Мацелюх Б.П. // Вплив джерел вуглецю і азоту на біосинтез лікопіну *Streptomyces globisporus* 4Lcp 1912 // Мікробіол. журн. – 2010. – т. 72, № 6. – С. 46–51.
3. Еришов Ю.В. Метилэритритолфосфатный (немевалонатный путь) синтеза изопреноидов. // Успехи биол. химии – 2005. – Т. 45. – С. 307–312.
4. Санникова В.М., Погуляка Ф.П., Санников В.Д., Тюна Г.Г. Разработка питательной среды для выращивания гриба – продуцента каротина // Биотехнология. – 1989. – Т. 5, № 1. – С. 58–60.
5. Посібник з хімії для вступників до вузів / Под ред. Хомченко Г.П., Демиденко Н.В. – К: АСК, 2003. – 480 с.



6. *Феофилова Е.П.* Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 30. – С. 181–196.
7. *Daisuke U., Tobias, A.V., Arnold F.H.* General Carotenoid Biosynthetic Pathways // MMBR. – 2005. – V. 69. – P. 51–78.
8. *Lee H.S., Ohnishi Y., Horinouchi S.* A sigmaB-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus* // J Mol. Microbiol Biotechnol. – 2001. – V. 3, № 1. – P. 95–101.
9. *Matselykh B.P., Polishchuk L.V., Lukyanchuk V.V., Golembiovskaya S.L., Lavrenchuk V.Y.* Molecular mechanism of the carotenoid biosynthesis activation in the producer *Streptomyces globisporus* 1912 // Biotechnologia Acta – 2014. – V. 7, № 6 – P. 69–74.
10. *Takano H., Obitsu S., Beppu T., Ueda K.* Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187, № 5. – P. 1825–1832.

References

1. Golembiovskaya SL, Lavrenyuk VYa, Matseliukh BP. Multi Selection of High Performance in Lycopene Mutants. Achievements and Problems of Genetics, Breeding and Biotechnology. 2012; 4: 334-38.
2. Golembiovskaya SL, Tymoshenko SG, Matselyukh BP. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Biosynthesis of Lycopene By *Streptomyces Globisporus* 4Lcp. Mikrobiol Z. 2010; 72.6: 46-51.
3. Ershov YuV. Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. USP BIOL KHIM. 2005; 45: 307-57.
4. **Sannikova VM, Pohulyaka FP, Sannikov VI, Tyupa GG. Research of a Nutrient Medium for Cultivation of the Fungus – Producer of Carotene.** Biotechnology. 1989; 5(1): 58-60.
5. Khomchenko GP, Demidenko NV. Manual in Chemistry for Entering Universities. Kiev: ASC; 2003. 480p.
6. Feofilova EP. Carotenoids of Fungi: Biological Function and Practical Use. Applied Biochemistry and Microbiology. 2004; 30: 181-96.
7. Umeno D, Tobias AV, Arnold FH. Diversifying Carotenoid Biosynthetic Pathways by Directed Evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2005; 69(1): 51-78.
8. Horinouchi S, Lee HS, Ohnishi Y. A SigmaB-like Factor Responsible for Carotenoid Biosynthesis in *Streptomyces Griseus*. J Mol. Microbiol Biotechnol. 2001; 3(1): 95-101.



9. Matselyukh BP. Molecular mechanism of the carotenoid biosynthesis activation in the producer *Streptomyces globisporus* 1912. *Biotechnologia Acta Biotechnol. Acta*. 2014; 7(6): 69-74.

10. Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. Light-Induced Carotenogenesis in *Streptomyces Coelicolor* A3(2): Identification of an Extracytoplasmic Function Sigma Factor That Directs Photodependent Transcription of the Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187 (5): 1825-832.

Стаття надійшла до редакції 29.02.2016 р.

