



УДК 579.66

DOI 10.18413/2075-4671-2018-42-3-297-307

**РАЗРАБОТКА НЕКОТОРЫХ ЭТАПОВ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА
ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОСНОВЕ STREPTOMYCES****DEVELOPMENT OF SOME STAGES OF TECHNOLOGY OF MICROBIAL
SYNTHESIS OF HYALURONIC ACID BASED ON STREPTOMYCES****Е.Ф. Семенова, А.А. Полякова, К. О. Агабалаева, Е.А. Грибкова, О.В. Савоськин
E.F. Semenova, A.A. Polyakova, K.O. Agabalaeva, E.A. Gribkova, O.V. Savoskin**Пензенский государственный университет,
Россия, 440026, г. Пенза, ул. Красная, 40Penza State University,
40 Krasnaya St., 440026, Penza, Russia

E-mail: sef1957@mail.ru; a.polyakova2016@yandex.ru

Аннотация

Цель исследования – разработка отдельных этапов биотехнологического получения гиалуроновой кислоты на основе глубоинной культуры стрептомицета. В работе использованы культурально-морфологический, вискозиметрический и статистический методы анализа. Выявлены культурально-морфологические особенности штаммов на жидких и агаризованных средах различного компонентного состава. Показаны характерные изменения темпов и скорости роста штаммов в динамике культивирования: для Ac-1313 увеличение ростовых показателей в течение 5 суток, а для Ac-1314 – в течение 3 суток, при этом максимальная скорость отмечена у штамма Ac-1313. Проведено сравнительное исследование реологических характеристик культуральной жидкости при глубинном выращивании продуцента в зависимости от источников углерода и азота в питательных средах. Максимальный показатель удельной вязкости культурального фильтрата обнаружен на среде Красильникова № 71 (1.072), наименьший показатель – на среде Гаузе (0.673), что свидетельствует о положительном влиянии аммонийного азота и кукурузного экстракта на биосинтетическую активность штамма ВКМ Ac-1313. Это следует учитывать при проведении ферментаций и оптимизации биотехнологических параметров.

Abstract

The article reveals development of separate stages of biotechnological production of hyaluronic acid based on the basis of submerged cultivation of bacteria of the genus *Streptomyces*. The culture-morphological, viscosimetric and statistical methods of analysis were used in this work. In the process of developing elements of biotechnology nutrient media of various composition were used to cultivate microorganisms: Gause 1, Waksman, Krasilnikov No. 1, No. 6 and No. 71. In the course of the study were revealed cultural and morphological features of strains on liquid and agar media of various component composition. Characteristic changes in the rates and rates of growth of two strains in the dynamics of cultivation were shown. So, for Ac-1313 was characterized by an increase in growth rates for 5 days. The growth indicators increased within 3 days for the strain Ac-1314. The maximum rate was noted for the strain Ac-1313. Besides, a comparative study was conducted of rheological characteristics of cultural liquid at submerged cultivation of a producer depending on sources of carbon and nitrogen in nutrient mediums. In the end of the study, the authors give some results of the viscosimetry method. In particular, the maximum and minimum indicators the specific viscosity of the culture liquid filtrate on mediums Krasilnikova No. 71 and Gause. Data based on which it is possible to draw a conclusion on the effect of ammonia nitrate and corn extract on biosynthetic activity of a strain of VKM Ac-1313 have been obtained as a result obtained.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, микробный синтез, биотехнология, бактерии, *Streptomyces violascens*.**Keywords:** hyaluronic acid, microbial synthesis, biotechnology, bacteria, *Streptomyces violascens*.



Введение

С развитием современной биотехнологии появилась тенденция к широкому внедрению высокомолекулярных биополимеров в различные сферы пищевой, фармацевтической промышленности и здравоохранения. Исследование функций и механизмов биологического действия ряда биополимеров, полученных посредством технологий биологического синтеза, способствует созданию все новых продуктов и препаратов на их основе, а также активному их внедрению в передовые области медицины (регенеративная медицина, онкомедицина, травматология, аппаратная хирургия, нейрохирургия, гинекология, косметология и др.) [Papakonstantinou et al., 2012; Тарасенко, Кулага, 2016]. Одним из таких биополимеров является гиалуроновая кислота (ГК).

Гиалуроновая кислота (hyaluronic acid – HA, гиалуронан) – натуральный полисахарид, встречается у всех позвоночных организмов [Чайковская, Парсагашвили, 2011] и содержится в дерме, соединительной ткани (хрящевой ткани), мышечной ткани, сердце, нервной ткани, в стекловидном теле глаза и в синовиальной жидкости [Белоусов и др., 2016]. При этом, учитывая различную гистоспецифичность глюкозаминогликанов, распределение гиалуроновой кислоты в тканях неравномерно. Максимальная концентрация содержания гиалуроновой кислоты в теле человека наблюдается в синовиальной жидкости, пупочном канатике, стекловидном теле глаза и некоторых слоях дермы [Oliveira et al., 2016]. Молекулярная масса ГК варьирует в широких пределах (10^5 – 10^7 Да) и зависит от способа получения, однако ввиду отсутствия изомерии, получаемый гиалуронат всегда химически идентичен стандартному [Marcellin et al., 2014].

Клеточный синтез ГК – уникальный и высококонтролируемый процесс. Она синтезируется особым видом мембраносвязанных протеинов гиалуронансинтазами трех типов: HAS1, HAS2 и HAS3. ГК – несulfатированный гликозаминогликан, относится к гетерополисахаридам. Представляет собой линейную структуру, построенную из повторяющихся дисахаридных единиц, соединенных β -(1.4)-гликозидной связью. Дисахаридные фрагменты состоят из остатков β -D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил- β -D-глюкозамина, соединенных между собой β -(1.3)-гликозидной связью [Чайковская, Парсагашвили, 2011].

Гиалуроновая кислота в организме одновременно выполняет структурные (взаимодействие с другими гликозаминогликанами экстрацеллюлярного матрикса) и регуляторные (связывание воды и солей, взаимодействие с биомакромолекулами – белками, липидами, липопротеинами, рецепторами клеточной поверхности) функции. Гидратированные цепи гиалуроновой кислоты способствуют организации пути для клеточного движения, облегчают диффузию белков и электролитов [Деркач и др., 2009].

ГК в организме поддерживает эластичность и вязкость жидкостей соединительных тканей, таких как синовиальная жидкость и жидкость стекловидного тела глаза. В межсуставной жидкости ГК уменьшает трение между суставными поверхностями, играет роль смазывающего вещества, контролирует гидратацию тканей и транспорт воды, выполняет посреднические функции вместе с рецепторами при митозе, миграции, а также при воспалении [Necas et al., 2008]. ГК не обладает антигенной специфичностью и не приводит к развитию аллергических и иммунных реакций [Сигаева и др., 2012]. Кроме того, гиалуроновая кислота способна повышать активность интерферона, тем самым проявляя выраженное противовирусное действие. Была доказана высокая активность препаратов на основе гиалуроновой кислоты в отношении вируса герпеса и некоторых других [Cermelli et al., 2011].

Гиалуроновая кислота различного фракционного состава и происхождения имеет наименьшую по сравнению с прочими стимуляторами регенерации тканей (сукральфат, натриевая соль ϵ -ацетиламинокапроновой кислоты) алергогенность. Помимо этого, возможность модификации молекулярной структуры биополимерного вязкоупругого геля позволяет использовать ее в качестве основы терапевтических систем наружного

применения, противовоспалительных, противоожоговых, раневых, антимикробных препаратов (гели, пленки, трансдермальные терапевтические системы), заменителей синовиальной жидкости суставов, как среду при проведении глазных операций [Цепилов и др., 2013].

В настоящее время наблюдается хорошо выраженная тенденция к росту доли препаратов гиалуроновой кислоты среди ассортимента аптечных организаций как на мировом, так и на внутреннем рынке. На территории Российской Федерации зарегистрировано 155 наименований биологически активных добавок к пище и лекарственных средств на основе гиалуроновой кислоты. Согласно докладу аудиторской компании Alpha RM за 2017 г. на основе результатов открытого некоммерческого исследования федерального рынка гиалуроновой кислоты на период 2018 года прогнозируется значительное увеличение доли продукции ГК аптечного ассортимента на 9.14% [Белоусова и др., 2017]. Увеличение объемов рынка продукции ГК влечет пропорциональное увеличение спроса предприятий на сырьё и, как следствие, растёт цена на субстанцию.

Традиционные способы получения нативной гиалуроновой кислоты различного фракционного состава (общего веса от 5000 до 20000 кДа) основаны на экстракции биополимера из различных органов млекопитающих и птиц, в которых биополимер находится в комплексе с гликопротеинами и родственными глюкозаминогликанами, что затрудняет его выделение в чистом виде и делает необходимым введение в технологический процесс трудозатратных и дорогостоящих методов по очистке полупродукта от сопутствующих примесных соединений [Белодед, 2008]. Недостатком данного метода является зависимость от поставок сырья, которые могут носить сезонный или неравномерный характер [Савоськин и др., 2017]. Кроме того, сырьё животного происхождения трудно подвергать стандартизации и существует риск инфицирования сырья неспецифическими хозяину вирусами.

Данных недостатков лишен биотехнологический способ получения ГК [Белодед, 2008], основанный на культивировании микроорганизмов-продуцентов ГК. Сырьем для получения полисахарида данным способом являются сравнительно доступные соединения и компоненты, входящие в состав питательной среды культивирования: глюкоза, дрожжевой экстракт, минеральные соли [Пустынников и др., 2011].

Биотехнологические методы получения ГК обладают рядом преимуществ наряду с традиционными методами [Савоськин и др., 2017]: отсутствие зависимости от поставок сырья, масштабируемость, возможность перепрофилирования производства на основе микробного синтеза в случае изменения конъюнктуры рынка. Следует отметить, что продукты, получаемые методами биотехнологии, отличаются высокими показателями качества.

В настоящее время разработаны и активно внедряются в промышленность методы биотехнологии на основе условно-патогенных штаммов гемолитического стрептококка *Streptococcus zooepidemicus* [Цепилов и др., 2013; Vázquez et al., 2010, 2015], *Corynebacterium glutamicum* [Hoffmann, Altenbuchner, 2014], *Pichia pastoris* [Woo et al., 2014], генно-модифицированного штамма *Bacillus subtilis* [Савоськин и др., 2017], молочнокислых стрептококков *Streptococcus lactis* [Шахова, Горькова, 2014], *Lactococcus lactis* [Badle S.S. et al., 2014; Chauhan A.S. et al. 2014; Hmar R.V. et al. 2014; Prasad S.B. et al. 2010; Sheng J.Z. et al. 2010], *Escherichia coli* [Mao Z. et al., 2014; Yu H. and Stephanopoulos G., 2008].

В связи с активным научным поиском решений промышленного производства ГК на основе микробного синтеза наиболее выгодных с точки зрения безопасности конечного продукта и экономической целесообразности нами было показано, что *Streptomyces violascens* может использоваться в качестве продуцента гиалуроновой кислоты [Мыльникова, 2013; Агабалаева и др., 2017; Грибкова и др., 2017].

Цель: разработать отдельные этапы биотехнологического получения гиалуроновой кислоты на основе глубинной культуры стрептомицета.

Задачи:

1. Сравнительное изучение по культурально-морфологическим признакам и физиолого-биохимическим свойствам штаммов *Streptomyces violascens*.



2. Исследование реологических характеристик фильтратов культуральных жидкостей, полученных на средах различного компонентного состава.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали 2 коллекционных штамма грамположительных бактерий, относящиеся к виду *Streptomyces violascens* ВКМ Ас-1313, ВКМ Ас-1314 [Хоулт и др., 1997; Гаузе и др., 2007].

Материалом для изучения служили 5 образцов культуральной жидкости *S. violascens*, выращенных на питательных средах Красильникова № 1, Красильникова № 6, Красильникова № 71, Ваксмана, Гаузе.

Глубинное культивирование осуществляли в стеклянных колбах объемом 250 мл на шутгель-платформе (150 качаний/мин) в течение 7 суток.

Поверхностное культивирование осуществлялось в чашках Петри с 1.5 %-ными агаризованными питательными средами при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

В экспериментах изучали питательные среды следующего состава (г/л):

– картофельно-декстрозная (картофельный отвар – 1000.0, декстроза – 10.00, натрия хлорид – 5.00);

– мясо-пептонная (мясной отвар – 1000.0, пептон – 10.00, натрия хлорид – 5.00);

– глюкозо-пептонная (пептический перевар животной ткани – 20.00, глюкоза – 10.00, натрия хлорид – 5.00);

– Красильникова № 1 (глюкоза – 20.0, KNO_3 – 1.0, K_2HPO_4 – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, NaCl – 0.5, CaCO_3 – 1.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – следы);

– Красильникова № 6 (крахмал растворимый – 10.0, кукурузный экстракт – 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3.0, NaCl – 0.3, CaCO_3 – 3.0);

– Красильникова № 71 (крахмал растворимый – 15.0, кукурузный экстракт – 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4.0, K_2HPO_4 – 2.0, CaCO_3 – 3.0);

– Гаузе (крахмал растворимый – 20.0, KNO_3 – 1.0, K_2HPO_4 – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, NaCl – 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – следы);

– Ваксмана (глицерин – 3.0, K_2HPO_4 – 1.0, NaNO_3 – 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, KCl – 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01).

Измерение вязкости проводили с помощью капиллярных стеклянных вискозиметров ВПЖ–1 при температуре $25\text{--}27^\circ\text{C}$. Для вискозиметрического определения брали 20 образцов по 20 мл фильтрованной через бумажный фильтр (синяя лента) культуральной жидкости. Далее измеряли время истечения культуральных и контрольных жидкостей, рассчитывали удельную (кинетическую) вязкость $\eta_{\text{уд}}$ [ГФ XIII, 2015].

В качестве растворов сравнения в вискозиметрических исследованиях использовали воду дистиллированную и среды Гаузе, Ваксмана, Красильникова № 1, Красильникова № 6, Красильникова № 71.

Обработку экспериментальных данных проводили методами вариационной статистики, используя программный комплекс Statistica [Мокшин, Лукаткин, 2011].

Результаты и обсуждение

*Культурально-морфологический анализ штаммов *Streptomyces violascens* на жидких и агаризованных питательных средах различного компонентного состава*

Нами были охарактеризованы глубинные культуры по следующим визуальным показателям: степень мутности, осадок, характер пленки, цвет среды (табл. 1, 2). Максимальное накопление штаммом ВКМ Ас-1313 биомассы в виде обильного, шарообразного осадка наблюдалось на средах Гаузе и Ваксмана, а обильного, хлопьевидного осадка – на средах Красильникова № 6 и № 71. Биомасса штамма ВКМ Ас-1314 в виде рыхлого, хлопьевидного осадка интенсивно накапливалась на средах: картофельно-декстрозной, мясо-пептонной, Ваксмана, Красильникова № 6 и № 71. При этом поверхностная пленка была особенно выражена на картофельно-декстрозной среде и отсутствовала на среде Красильникова № 1 у обоих штаммов. Высокой мутностью



характеризовались культуральные жидкости, полученные на средах Красильникова № 6 и № 71, что, по-видимому, связано со стимулирующим действием кукурузного экстракта на размножение клеток изучаемых штаммов.

Таблица 1
Table 1

Макроморфологический анализ культуральной жидкости штамма VKM Ac-1313
Macroscopic characteristics of the culture fluid of the strain VKM Ac-1313

Среда	Критерии оценки				Цвет среды
	Степень мутности	Осадок	Пленка		
			Структура	Особенности	
Картофельно-декстрозная	Низкая	Хлопьевидный, рыхлый; от скудного до обильного	Складчатая, рыхлая или плотная	Обильный зеленый псевдомицелий	Желтый
Мясо-пептонная	Низкая	Хлопьевидный; от скудного до обильного	Толстая, плотная, неровная	Обильный белый псевдомицелий	Коричневый
Глюкозо-пептонная	Средняя	Хлопьевидный, рыхлый; от скудного до обильного	Плотная, неровная	Отсутствуют	Светло-желтый
Гаузе	Средняя	Обильный, шарообразный осадок с четкими контурами	Отсутствует		Зеленовато-желтый
Ваксмана	Средняя	Обильный, шарообразный осадок с четкими контурами	Отсутствует		Соломенно-желтый
Красильникова № 1	Средняя	Скудный, рыхлый, зеленовато-белого цвета	Отсутствует		Светло-зеленый
Красильникова № 6	Высокая	Обильный, хлопьевидный светло-коричневого цвета	Отсутствует		Светло-зеленый
Красильникова № 71	Высокая	Обильный, хлопьевидный светло-коричневого цвета	Отсутствует		Коричневый

Таблица 2
Table 2

Макроморфологический анализ культуральной жидкости штамма VKM Ac-1314
Macroscopic characteristics of the culture fluid of the strain VKM Ac-1314

Среда	Критерии оценки			Осадок
	Степень мутности	Пленка		
		Структура	Особенности	
Картофельно-декстрозная	Прозрачный	Толстая плотная складчатая	Псевдомицелий зеленый	Рыхлый; обильный
Мясо-пептонная	Прозрачный	Очень тонкая	Пристеночный рост	Рыхлый; обильный



Окончание табл. 2

Глюкозо-пептонная	Прозрачный	Тонкая	Пристеночный рост	Хлопьевидный, рыхлый; от скудного до обильного
Гаузе	Средняя	Тонкая	Пристеночный рост	Рыхлый; скудный
Ваксмана	Средняя	Тонкая	Отсутствуют	Хлопьевидный; обильный
Красильникова № 1	Средняя	Отсутствует	Отсутствуют	Рыхлый; скудный
Красильникова № 6	Высокая	Тонкая	Пристеночный рост	Хлопьевидный, рыхлый; обильный
Красильникова № 71	Высокая	Тонкая	Пристеночный рост	Хлопьевидный, рыхлый; обильный

Морфометрический анализ поверхностных культур на плотных средах позволил определить популяционную вариабельность, а также темпы развития и скорость их роста (рис. 1, 2). На картофельно-декстрозном и глюкозо-пептонном агаре скорость роста достигала максимальных значений (1.1–1.5 мм/сут), коэффициент вариации диаметра колоний был стабильно высоким ($CV = 62.5–69.0$ и $CV = 64.5–66.7\%$, соответственно), что позволяет рекомендовать эти среды для отбора высокоактивных вариантов по ростовым показателям. Однако более подходящими для хранения и поддержания продуцента следует считать среды Гаузе и Ваксмана, на которых культурально-морфологическая вариабельность выражена слабо или умеренно ($CV = 0.0–29.5$ и $CV = 28.0–33.3$, соответственно). При этом следует отметить изменение темпов и скорости роста штаммов в динамике культивирования. Например, для Ас-1313 характерно увеличение ростовых показателей в течение 5 суток, а для Ас-1314 – в течение 3 суток, что следует учитывать при проведении ферментаций и оптимизации биотехнологических параметров.

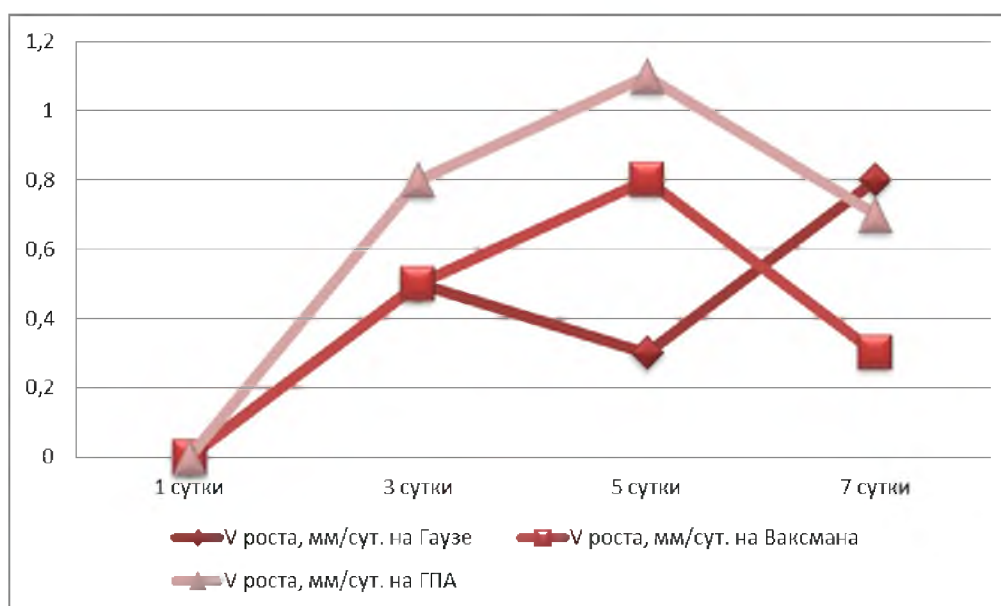


Рис. 1. Характеристика ростовых показателей штаммов Ас-1313 на агаризованных средах различного компонентного состава

Fig. 1. Comparative characteristics of growth parameters of strains of Ac-1313 on solid agar media of different component composition

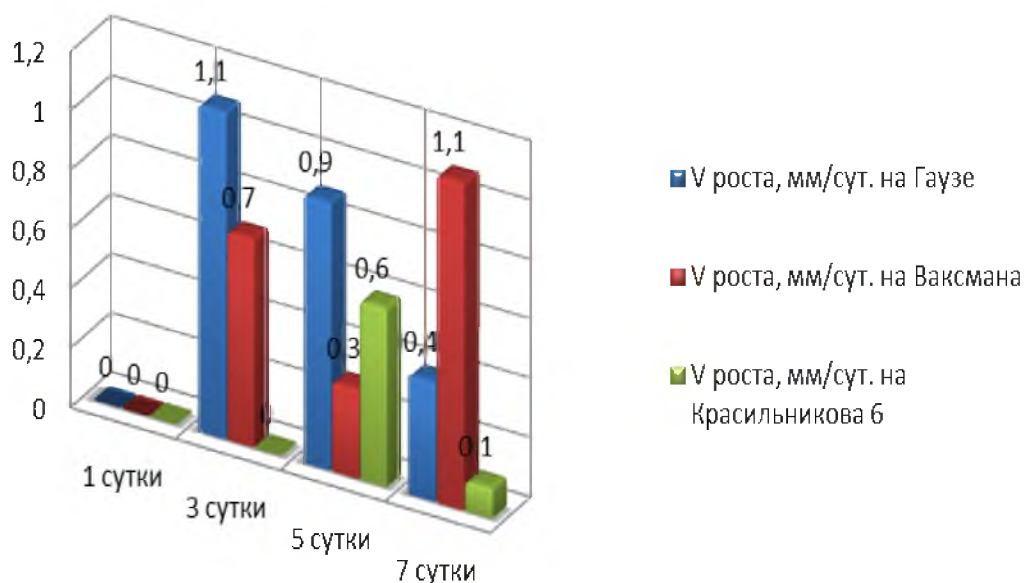


Рис. 2. Характеристика ростовых показателей штаммов Ac-1314 на агаризованных средах различного компонентного состава

Fig. 2. Comparative characteristics of growth parameters of strains of Ac-1314 on solid agar media of different component composition

Сравнительный анализ реологических характеристик фильтратов культуральных жидкостей штамма ВКМ Ac-1313 на различных питательных средах

Одним из самых информативных и доступных методов исследования реологических свойств фильтратов культуральной жидкости, содержащих различные комбинации полидисперсных линейных полимеров, является метод вискозиметрии. Различают динамическую, кинематическую, относительную, удельную, приведенную и характеристическую вязкости [Киреев, 2013]. Нами был использован вискозиметрический метод на основе расчета удельной вязкости, который пригоден для определения количественного содержания линейных полимеров в реостабильных неньютоновских жидкостях (например, жидкостях, содержащих гиалуроновые кислоты различной молекулярной массы). Однако он требует проведения серийных анализов со смоделированными стандартными растворами.

Удельная вязкость ($\eta_{уд}$) показывает, какая часть вязкости раствора обусловлена присутствием в нем растворенного вещества и рассчитывается по формуле:

$$\eta_{уд} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1,$$

где η – вязкость раствора; η_0 – вязкость растворителя.

Результаты вискозиметрических исследований показали существенные различия удельной вязкости культуральных жидкостей, полученных на основе питательных сред различного компонентного состава (табл. 3).

Максимальными показателями удельной вязкости характеризовались фильтраты культуральных жидкостей, полученных на средах Красильникова № 1 – 0.837, Красильникова № 71 – 1.072. Наименьшие значения вязкости имел фильтрат со среды Гаузе. Аналогичная закономерность наблюдалась в случаях, если критериями в оценке реологических свойств являлось изменение удельной вязкости между культуральной жидкостью и контрольными растворами (соответствующими питательными средами, водой дистиллированной).



Сравнительный анализ качественного и количественного состава ферментационных сред указывает на стимулирующий эффект аммонийного азота и кукурузного экстракта в отношении биосинтетической активности продуцента. Различия в показателях удельной вязкости косвенно могут указывать на различия в молекулярных массах гиалуроновых кислот и их содержании в биотехнологическом сырье.

Таблица 3

Table 3

Результаты вискозиметрического анализа фильтратов культуральных жидкостей продуцента
Results of viscometric analysis of filtrates of cultured producer fluids

Контрольный раствор	$t_{кр}, c$ К	$t_{кж}, c$ КЖ	$t_{кж} - t_{к}$	$\eta_{уд} (КР), Pa$	$\eta_{уд} (КЖ), Pa$	$\eta_{уд} (КЖ) - \eta_{уд} (КРпс), Pa$	$\eta_{уд} (КЖ) - \eta_{уд} (КРН_2O), Pa$
Гаузе	235	271	36	0.659	0.673	0.014	0.043
Ваксмана	248	268	38	0.740	0.768	0.028	0.138
Красильникова № 1	263	292	62	0.754	0.837	0.083	0.207
Красильникова № 6	259	291	61	0.743	0.834	0.091	0.204
Красильникова № 71	321	353	23	0.920	1.072	0.152	0.442
Вода дистиллированная	230	–	–	0.630	–	–	–

Примечание:

К – контроль; КЖ – культуральная жидкость;

$t_{кр}$, – время истечения контрольных растворов;

$t_{кж}$, – время истечения культуральной жидкости;

$t_{кж} - t_{к}$, – разность времени истечения культуральной жидкости;

$\eta_{уд} (КР)$ – удельная вязкость контрольного раствора;

$\eta_{уд} (КРпс)$ – удельная вязкость питательной среды;

$\eta_{уд} (КРН_2O)$ – удельная вязкость дистиллированной воды;

$\eta_{уд} (КЖ)$ – удельная вязкость культуральной жидкости;

$\eta_{уд} (КЖ) - \eta_{уд} (КРпс)$ – разность удельных показателей вязкости культуральной жидкости и контрольного раствора – питательной среды;

$\eta_{уд} (КЖ) - \eta_{уд} (КРН_2O)$ – разность удельных показателей вязкости культуральной жидкости и контрольного раствора – воды дистиллированной.

Выводы

1. Выявленные культурально-морфологические особенности 2 штаммов на жидких и агаризованных средах различного компонентного состава позволили определить, что наибольшей скоростью роста характеризовался штамм ВКМ Ас-1313 по сравнению с ВКМ Ас-1314 и лучшими средами для его развития являлись Красильникова № 6 и № 71.

2. Оптимальными средами для длительного хранения и поддержания продуцента гиалуроновых кислот следует считать агар Гаузе и агар Ваксмана, на которых культурально-морфологическая вариабельность выражена слабо и скорость роста минимальна.

3. Характерные изменения темпов и скорости роста штаммов в динамике культивирования (для Ас-1313 увеличение ростовых показателей в течение 5 суток, а для Ас-1314 – в течение 3 суток) следует учитывать при проведении ферментаций и оптимизации биотехнологических параметров.

4. Обоснованные технико-методические подходы определения реологических характеристик фильтратов культуральной жидкости штаммов *S. violascens* показывают возможности косвенного экспресс-анализа уровня накопления гиалуроновых кислот в ферментационной среде.

5. Проведенное сравнительное исследование при глубинном выращивании продуцента в зависимости от источников углерода и азота в питательных средах выявило



максимальный показатель удельной вязкости культурального фильтрата на среде Красильникова № 71 (1.072), наименьший показатель – на среде Гаузе (0.663), что свидетельствует о положительном влиянии аммонийного азота и кукурузного экстракта на биосинтетическую активность штамма ВКМ Ас-1313.

Список литературы References

1. Агабалаева К.О., Полякова А.А., Грибкова Е.А., Савоськин О.В., Елистратова А.А., Пищаева Е.А., Семёнова Е.Ф., Моисеева И.Я. 2017. Сравнительное исследование влияния питательных сред на рост и развитие продуцента гиалуроновой кислоты. В кн.: Сборник трудов 6-ой международной научной конференции «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (г. Пенза, 14–15 сентября 2017 г.). Пенза, изд-во ПГУ: 118–120.
Agabalaeva K.A., Polyakova A.A., Gribkova E. A., Savos'kin, O.V., Elistratova, A.A., Pishhaeva E.A., Semenova E.F., Moiseeva I.Ya. 2017. Comparative study of effect of culture media on the growth and development of a producer of hyaluronic acid. In: Sbornik trudov 6-oy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Aktual'nye problemy medicinskoj nauki i obrazovanija» [Proceedings of the 6th international scientific conference «Actual problems of medical science and education»] (Penza, 14–15 September, 2017). Penza, PGU: 118–120. (in Russian)
2. Белодед А.В. 2008. Микробиологический синтез и деградация гиалуроновой кислоты бактериями р. Streptococcus. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., МГУПБ, 23.
Beloded A.V. 2008. Microbial synthesis and degradation of hyaluronic acid by bacteria Streptococcus. Abstract. dis. ... cand. biol. Ciencias. M., MSUAB, 23. (in Russian)
3. Белоусова О.В., Белоусов Е.А., Королькова А.И. 2017. Исследование ассортимента косметических средств, содержащих гиалуроновую кислоту, в аптечных организациях г. Белгорода. Научные ведомости БелГУ. Медицина. Фармация, 12 (261): 99–111.
Belousova O.V., Belousov E.A., Korolkova A.I. 2017. Study the range of cosmetics, containing hyaluronic acid at pharmacies in the city of Belgorod. Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy, 12 (261): 99–111. (in Russian)
4. Белоусов Е.А., Белоусова О.В., Марцева Д.С. 2016. Формирование рационального ассортимента лекарственных препаратов, обладающих адаптогенной активностью. Научные ведомости БелГУ. Медицина. Фармация, 19 (240): 125–131.
Belousov E.A., Belousova O.V., Martseva D.S. 2016. Formation of rational range of drugs with adaptogenic activity. Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy, 19 (240): 125–131. (in Russian)
5. Гаузе Г.Ф., Преображенская М.А., Свешникова М.А. 1983. Определитель актиномицетов. М., Наука, 248.
Gauze G.F., Preobrazhenskaya M. A., Sveshnikov. M. A. 1983. Opredelitel' aktinomicetov. [Manual of actinomycetes.]. Moscow, Nauka, 248. (in Russian)
6. Грибкова Е.А., Агабалаева К.О., Полякова А.А., Савоськин О.В., Семёнова Е.Ф. 2017. Фармакогностический анализ биотехнологического сырья *Streptomyces violascens*. В кн.: Сборник трудов 6-ой международной научной конференции «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (г. Пенза, 14–15 сентября 2017 г.). Пенза, Изд.-во ПГУ: 129–132.
Gribkova E.A., Agabalaeva K.A., Polyakova A.A., Savos'kin O.V., Semenova E.F. 2017. Analysis pharmacognosy quality of biotechnological raw materials *Streptomyces violascens*. In: Sbornik trudov 6-oy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Aktual'nye problemy medicinskoj nauki i obrazovanija» [Proceedings of the 6th international scientific conference «Actual problems of medical science and education»] (Penza, 14–15 September, 2017). Penza, PGU: 129–132. (in Russian)
7. Деркач Н.Н., Коржов М.В., Коржов В.И., 2009. О возможности коррекции некоторых биохимических процессов в коже при старении. Украинский журнал дерматологии, венерологии, косметологии: 3 (сентябрь): 45–49.
Derkach N.N., Korzhov M.V., Korzhov V.I., 2009. About possibility of correction of some biochemical processes in a skin at an aging. Ukrainian Journal of Dermatology, Venereology, Cosmetology: 3 (September): 45–49. (in Russian)
8. Киреев В.В. 2013. Высокомолекулярные соединения. М., Издательство Юрайт, 602.
Kireev V.V. 2013. Vysokomolekuljarnye soedinenija [High-molecular compounds]. Moscow, Urait, 602. (in Russian)
9. Мокшин Е.В., Лукаткин А.С. 2011. Постановка научного эксперимента. Саранск, Изд-во Мордов. ун-та, 201.



Mokshin E.V., Lukatkin A.S. 2011. Statement of the scientific experiment. Saransk, Mordovia Publishing House, 201. (in Russian)

10. Мыльникова Ю.В., Юдина А.М., Семенова Е.Ф. 2013. О возможности получения гиалуроновой кислоты на основе биотехнологического сырья. В кн.: Материалы I Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы науки XXI века» (Смоленск, 25 апреля 2013 г.). Вестник Смоленской медицинской академии. Спецвыпуск: 164.

Mylnikova Yu.V., Yudina A.M., Semenova E.F. 2013. On the possibility of obtaining hyaluronic acid on the basis of biotechnological raw materials. In: Materials of the 1st all-Russian scientific and practical conference of students and young scientists with International participation «Actual problems of science of the XXI century» (Smolensk, 25 April, 2013). Bulletin of the Smolensk Medical Academy. Special Issue^ 164. (in Russian)

11. Пустынников А.В., Ушаков Р.В., Ушакова Т.В., 2011. Современные возможности препаратов гиалуроновой кислоты в пародонтологии и имплантологии. Стоматолог, 3: 53–58.

Pustynnikov A.V., Ushakov R.V., Ushakova T.V., 2011. Modern possibilities of hyaluronic acid preparations in periodontology and implantology. Dentist, 3: 53–58. (in Russian)

12. Савоськин О.В., Семенова Е.Ф., Рашевская Е.Ю., Полякова А.А., Грибкова Е.А., Агабалаева К.О., Моисеева И.Я. 2017. Характеристика различных методов получения гиалуроновой кислоты. Научное обозрение. Биологические науки, 2: 125–135.

Savoskin, O.V., Semenova E.F., Rashevsky E.Yu., Polyakova A.A., Gribkova E.A., Agabalaeva K.O., Moiseeva I.Ya. 2017. Characteristics of different methods of producing hyaluronic acid. Scientific review. Biological science, 2: 125–135. (in Russian)

13. Сигаева Н.Н., Колесов С.В., Назаров П.В., Вильданова Р.Р. 2012. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применение в медицине. Вестник Башкирского университета, 3 (4883): 1220–1241.

Sigaeva N.N., Kolesov S.V., Nazarov P.V., Vildanov R.R. 2012. Chemical modification of hyaluronic acid and its application in medicine. Bulletin of the Bashkir University, 3 (4883): 1220–1241. (in Russian)

14. Тарасенко С.В., Кулага О.И. 2016. Препараты на основе гиалуроновой кислоты для лечения пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. Российский стоматологический журнал, 20 (6): 340–343.

Tarasenko S.V., Kulaga O.I. 2016. Application of hyaluronic acid preparations for patients with a chronic generalized periodontal disease. Russian Journal of Dentistry, 20 (6): 340–343. (in Russian)

15. Цепилов Р.Н., Белодед А.В., Самойленко И.И. 2013. Оптимизация процесса культивирования *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* – продуцента гиалуроновой кислоты. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2: 12–20.

Tsepilov R.N., Beloded A.V., Samoylenko, I.I. 2013. Optimization of cultivation process of streptococcus equi subsp. zooepidemicus – producer of hyaluronic acid. Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, 2: 12–20. (in Russian)

16. Хоулт Дж., Криг Н., Смит П., Стейли Дж., 1997. Определитель бактерий Берджи. Том 2. Пер. с англ. М., Мир, 672. (Holt J., Krieg N., Smith P., Staley J., 1997. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2. Biological Sciences Building, University of Georgia, 527).

Holt J., Krieg N., Smith P., Staley J., 1997. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2. Biological Sciences Building, University of Georgia, 527.

17. Цепилов Р.Н., Белодед А.В. 2015. Гиалуроновая кислота – старая молекула с новыми функциями: биосинтез и деполимеризация гиалуроновой кислоты у бактерий и в тканях позвоночных, в том числе в процессах канцерогенеза (обзор). Биохимия, 9, (2503): 1315–1333.

Tsepilov R.N., Beloded A.V. 2015. Hyaluronic acid is an old molecule with a new function: biosynthesis and depolymerization of hyaluronic acid in bacteria and in the tissues of vertebrates, including in the processes of carcinogenesis (review). Biochemistry, 9 (2503): 1315–1333. (in Russian)

18. Чайковская Е.А., Парсагашвили Е.З., 2011. Гиалуроновая кислота: биологический контроль над воспалением и ранозаживлением. Инъекционные методы в косметологии, 4: 20–29.

Chaikovskaya E.A., Parsagashvili E.Z., 2011. Hyaluronic acid: biological control over inflammation and wound healing. Injection methods in cosmetology, 4: 20–29. (in Russian)

19. Шахова Н.В., Горькова И.В. 2014. Выявление фазы максимального накопления гиалуроновой кислоты при культивировании молочнокислых стрептококков. Сетевой научный журнал Орел ГАУ, 3 (155): 51–58.



Shakhova N.V., Gorkova I.V. 2014. The identification phase of maximum accumulation of hyaluronic acid in the cultivation of lactic streptococci. Network scientific journal Orel GAU, 3 (155): 51–58. (in Russian)

20. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII, изд. 1 ОФС 1.2.1.0015.15 «Вязкость» // Фармакопея.рф URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#580 (дата обращения: 01 апреля 2018)

State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII, ed. 1 OFS 1.2.1.0015.15 «Viscosity» // <http://pharmacopoeia.ru> URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#580 (accessed 01 April 2018) (in Russian)

21. Badle S.S., Jayaraman G., Ramachandran K.B., 2014. Ratio of intracellular precursors concentration and their flux influences hyaluronic acid molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* and recombinant *Lactococcus lactis*. Bioresour. Technol, 163: 222–227.

22. Cermelli C., Cuoghi A., Scuri M., Bettua C., Neglia R., Ardizzoni A., Blasi E., Iannitti T. and Palmieri B. 2011. In vitro evaluation of antiviral and virucidal activity of a high molecular weight hyaluronic acid. Journal of Virol J., 8: 141.

23. Hmar R.V., Prasad S.B., Jayaraman G., Ramachandran K.B. 2014. Chromosomal integration of hyaluronic acid synthesis (*has*) genes enhances the molecular weight of hyaluronan produced in *Lactococcus lactis*. Biotechnology Journal, 9: 1554–1564.

24. Hoffmann J., Altenbuchner J. 2014. Hyaluronic acid production with *Corynebacterium glutamicum*: effect of media composition on yield and molecular weight. Journal of the Society for applied microbiology, 117 (3): 663–678.

25. Mao Z., Shin H.D., Chen R.A., 2009. Recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. Appl. Microbiol. Biotechnol, 84: 63–69.

26. Marcellin E., Steen J.A., Nielsen L.K. 2014. Insight into hyaluronic acid molecular weight control. Journal of Applied microbiology and biotechnology, 98 (16): 6947–6956.

27. Necas J., Bartosikova L., Brauner P., Kolar J., 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. Veterinarni Medicina, 53(8): 397–411.

28. Oliveira J., Carvalho L., Gomes A., Queiroz L., Magalhães B. 2016. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms Journal of Microb cell fact, 15: 119.

29. Papakonstantinou E., Roth M., Karakiulakis G. 2012. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. Journal of Dermatoendocrinol, 4 (3): 253–258.

30. Prasad S.B., Jayaraman G., Ramachandran K.B. 2010. Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis* Appl. Microbiol. Biotechnol, 86: 273–283.

31. Sheng J.Z., Ling P.X., Zhu X.Q., Guo X.P., 2009. Use of induction promoters to regulate hyaluronan synthase and UDP-glucose-6-dehydrogenase of *Streptococcus zooepidemicus* expression in *Lactococcus lactis*: a case study of the regulation mechanism of hyaluronic acid polymer J. Appl. Microbiol, 107: 136–144.

32. Vázquez J.A., Montemayor M.I., Fraguas J., Murado M.A. 2010. Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. Journal of Microb Cell Fact, 9: 46.

33. Vázquez J.A., Pastrana L., Piñeiro C. et al. 2015. Production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* on protein substrates obtained from *Scyliorhinus canicula* discards. Journal of Mar Drugs, 13 (10): 6537–6549.

34. Woo E. J., Jung Y. S., Kim H. 2014. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. Journal of Biotechnology, 185: 28–36.

35. Yu H., Stephanopoulos G., 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. Metab. Eng., 10: 24–32.

Ссылка для цитирования статьи

Reference to article

Семенова Е.Ф., Полякова А.А., Агабалаева К.О., Грибкова Е.А., Савоськин О.В. Разработка некоторых этапов технологии микробного синтеза гиалуроновой кислоты на основе *Streptomyces* // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. 2018. Т. 42, №3. С. 297–307. doi: 10.18413/2075-4671-2018-42-3-297-307

Semenova E.F., Polyakova A.A., Agabalaeva K.O., Gribkova E.A., Savoskin O.V. Development of Some Stages of Technology of Microbial Synthesis of Hyaluronic Acid Based on *Streptomyces* // Belgorod State University Scientific Bulletin. Natural sciences series. 2018. V. 42, №3. P. 297–307. doi: 10.18413/2075-4671-2018-42-3-297-307