

УДК 328

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕРИБОСОМАЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ АНТИБИОТИКОВ ГРИБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

**Е.А. Рогожин^{1,2,3}, В.С. Садыкова⁴, И.А. Гаврюшина⁴, Р.А. Габрия⁴, А.Е. Куварина⁴,
А.С. Барашкова¹, М.Л. Георгиева^{2,4}**

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

² Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе

³ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Нерибосомальные пептиды являются вторичными метаболитами, образуются в стадии идиофазы, когда прекращается активный рост гриба, или при создании специфических условий культивирования – добавлении предшественников. Интерес к ним резко возрос в последнее время в связи с перспективами использования для разработки лекарственных препаратов нового поколения (Abid et al., 2014; Bills et al., 2008). Они рассматриваются в качестве молекул-кандидатов, с помощью которых можно преодолеть устойчивость к антибиотикам у патогенных микроорганизмов. Антимикробные пептиды грибов имеют небольшой молекулярный вес, что удобно для модификации или последующего синтеза антибиотика, большую специфичность и активность, в сравнении с выделенными из других организмов. По данным различных баз биологически активных соединений ежегодно регистрируется не менее 500 соединений нерибосомальных пептидов, выделенных из грибных продуцентов. При этом поиск продуцентов целесообразно проводить среди недавно описанных видов, а также представителей уже известных таксонов, выделенных из ранее неисследованных природных эконих (Newman et al., 2016; Zang et al, 2018).

Цель исследования – отбор экстремофильных микроскопических грибов – продуцентов нерибосомальных пептидов и разработка условий управляемого биосинтеза по признаку антибиотикообразования, включая способ культивирования и оптимизацию состава питательной среды, для наиболее перспективного штамма.

В период 2011–2018 гг. был проведен масштабный скрининг 918 штаммов микромицетов из разных экстремальных экотопов и систематических групп. В результате комплексных химико-биологических исследований выделено 30 штаммов – продуцентов нерибосомальных пептидов, 15 из которых относятся к роду *Trichoderma*, 4 к роду *Sodiomyces*, 5 к роду *Emericellopsis*, 3 – к роду *Acremonium*, 3 – *Tolypocladium*.

В результате комплексных химико-биологических исследований выделено 30 штаммов – продуцентов нерибосомальных пептидов, 15 из которых относятся к роду *Trichoderma*, 4 к роду *Sodiomyces*, 5 к роду *Emericellopsis*, 3 – к роду *Acremonium*, 3 – *Tolypocladium*. Из психрофильного штамма *T. citrinoviride* ВКПМ F-1228 выделен и охарактеризован комплекс пептаиболов, обладающий фунгицидной активностью. Из 5 пептаиболов, один – описанный ранее трихорзин, остальные не определяются по базам природных соединений (Садыкова и др., 2016). Из психрофильного галотолерантного штамма *Tolypocladium inflatum* выделены антибиотики циклоспорины А, В, С.

Согласно нашим исследованиям, поиск продуцентов новых антимикробных пептидов целесообразно проводить среди представителей новых или недавно описанных видов грибов, метаболизм которых мало изучен, таких как *Emericellopsis alkalina*, *Sodiomyces alkalinus*. Среди представителей этих видов отобраны штаммы с высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также дрожжевых и мицелиальных грибов, в том числе возбудителей инвазивных микозов. Отобраны штаммы *E. alkalina*, сочетающие выраженное противогрибковое действие и высокий выход пептаиболов, из числа которых штамм ВКПМ F-1428 оказался одним из наиболее перспективных (Баранова и др., 2017). В качестве основного метаболита, отвечающего за антибиотические свойства, был выделен и охарактеризован ранее не описанный липопептаибол – эмерициллипсин А с выраженными противогрибковыми свойствами. (Rogozhin et al, 2018). Показана способность эмерициллипсина А подавлять рост патогенных грибов – возбудителей тяжелых и хронических микозов (Баранова и др., 2019).

В дальнейшем проводили разработку способов культивирования штамма, подбор условий роста и оптимизацию состава ферментационных сред для выхода эмерициллипсина А. Разработана композиция состава жидкой питательной щелочной среды для стационарного культивирования, обеспечивающая выход пептида до 20 мг/л на 10-е сутки процесса. Для установления оптимальных условий роста штамма была изучена зависимость его развития от ряда факторов, влияющих на рост грибов. Было исследовано влияние температуры, аэрации, состав питательных сред и количественного соотношения ингредиентов (хлорида натрия и редуцирующих сахаров) на накопление антибиотика в культуральной жидкости. Изучение уровня pH среды при культивировании штамма показало, что искусственное увеличение до 11–11,5 от исходного уровня pH 10 в щелочной среде не приводит к увеличению количества антибиотика. Сравнение влияния температур 25 и 28 °C на накопление антибиотика в стационарной культуре показало, что изменение температуры в указанных пределах не приводит к существенным различиям в выходе вещества. Показано, что в условиях анаэробного культивирования стационарно биосинтез антибиотика значительно снижается.

С целью подбора оптимальных условий для синтеза эмерициллипсина А культивирование штамма проводили в колбах на жидкой щелочной среде тремя различными способами: глубинным (при перемешивании на шейкере), поверхностным (стационарно, с образованием пленки мицелия на поверхности питательной среды) и комбинированным. Длительность культивирования составляла 14 суток, при 25°C. При комбинированном способе культивирования антибиотика синтезировались в следовых количествах. Оптимальным способом культивирования, обеспечивающим стабильный антибиотика в среде, был поверхностный.

Таким образом, подобраны условия управляемого биосинтеза и состав питательной среды по признаку антибиотикообразования эмерициллипсина А, позволяющие обеспечить максимум накопления пептида в среде.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 18–74–10073).

ЛИТЕРАТУРА

- Abid A., Bacha N., Ahmad B., Lutfullah G., Farooq U., Cox R. (2014) Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites / *Asian Pac J Trop Biomed*; 4(11): 859–870
- Bills GF, Platas G, Fillola A, Jiménez MR, Collado J, Vicente F, et al. (2008) Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. *J Appl Microbiol*; 104(6): 1644–1658.
- Садыкова В.С., Кураков А.В., Куварица А.Е. Рогожин Е.А. (2015а) Антимикробная активность штаммов грибов рода *Trichoderma* из Средней Сибири / *Прикладная биохимия и микробиология*, Т. 51 № 3. – С. 1–9.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. (2016) *J. Nat. Prod.*, 79 (3), 629–661.
- Zhang, X.; Li, S. – J.; Li, J. – J.; Liang, Z. – Z.; Zhao, C. – Q. (2018) Novel Natural Products from Extremophilic Fungi. *Mar. Drugs*, 16 (6), 194.
- Rogozhin, E. et al. (2018) Novel Lipopeptaibol Emericellipsin A with Antimicrobial and Antitumor Activity Produced by the Extremophilic Fungus *Emericellopsis Alkalina*. *Molecules*, 23 (11), 2785.
- А.А. Баранова и др. Антимикробный потенциал алкалофильных микромицетов *Emericellopsis alkalina*. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2017, Т. 53, № 6, с. 616–624.
- А.А. Баранова и др. Антимикробные пептиды алкалофильных грибов *Emericellopsis alkalina*: биосинтез и биологическая активность в отношении патогенных грибов с множественной резистентностью. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2019, Т. 55, № 2, с. 151–157.