

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ МУЛЬТИОМНЫЙ АНАЛИЗ ВЫЯВИЛ КЛЮЧЕВЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ, ПРОИЗОШЕДШИЕ В ПРОГРАММЕ КЛАССИЧЕСКОГО УЛУЧШЕНИЯ ШТАММА *ACREMONIUM CHRYSOGENUM* RNCM F-408D ДЛЯ ПРОДУКЦИИ АНТИБИОТИКА ЦЕФАЛОСПОРИНА С

А.А. Жгун¹, М.В. Думина¹, А.В. Белецкий¹, А.Т. Копылов², В.Г. Згода²

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия;

² Институт биомедицинской химии РАН, Москва, Россия

Ферментация высокоурожайных штаммов плесневых грибов является важнейшим источником для промышленного получения антибиотиков [1,2]. Все используемые в промышленности штаммы получили, начиная с 1950-х, в результате так называемых классических методов улучшения, связанных с многоаундовым случайным мутагенезом и последующей селекцией по уровню продукции целевого антибиотика [3]. Однако до сих пор нет четкого представления, какие события, произошедшие после случайного мутагенеза и превращающие штамм дикого типа в биологическую фабрику по продукции целевого метаболита, отбираются на молекулярном уровне [4,5].

Цефалоспорин С – важная исходная субстанция для получения антибиотиков цефалоспоринового ряда 1-5 поколений, которые занимают больше 20% рынка антибиотиков [6–9]. Для промышленной продукции цефалоспоринона С проводят ферментацию высокоурожайных штаммов мицелиального гриба *Acremonium chrysogenum*. После программы классического улучшения в штамме *A. chrysogenum* HY (RNCM 4081D) продукция цефалоспоринона С увеличилась более чем в 200 раз по сравнению с исходным штаммом дикого типа *A. chrysogenum* WT (ATCC 11550) [10,11]. Сравнительные данные геномного, протеомного анализов и эксперсии генов «ранних» и «поздних» кластеров бета-лактамов показывают, что существуют некие ключевые изменения, приводящие к повышенной продукции целевого вторичного метаболита. Сравнение с мультиомными данными, изученными для других грибных высокоурожайных продуцентов антибиотиков показывают, что существуют некие универсальные изменения, связанные с: i) увеличением экспрессии целевых биосинтетических генных кластеров (БГК) ii) инактивацией альтернативных БГК; iii) изменениями на уровне глобальной регуляции вторичного метаболизма; iv) перераспределением энергетических потоков и потоков первичных метаболитов в пользу целевого вторичного метаболизма и v) прочие изменения. Кроме того в ходе мутагенеза возникают множественные побочные мутации, некоторые из которых также несут универсальный характер. Например, изменения в метаболизме полиаминов может быть связано с защитной реакцией на мутагенное воздействие [12].

Полученные данные позволяют выбирать мишени для метаболической инженерии высокоурожайных штаммов, в частности *A. chrysogenum* HY, с целью направленного воздействия для дополнительного увеличения целевой продукции.

Литература

1. Aminov R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future // *Frontiers in Microbiology*. 2010. Vol. 1. 134.
2. Aly A.H., Debbab A., Proksch P. Fifty years of drug discovery from fungi // *Fungal Diversity*. 2011. Vol. 50. P. 3–19.
3. Fouillaud M., Dufossé L. Microbial secondary metabolism and biotechnology // *Microorganisms*. 2022. Vol. 10. № 1. 123.
4. Keller N.P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery // *Nature Reviews Microbiology*. 2019. Vol. 17. P. 167–180.
5. Zhgun A.A. Fungal BGCs for production of secondary metabolites: main types, central roles in strain improvement, and regulation according to the piano principle // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. № 13. 11184.
6. Liu L., Chen Z., Liu W. et al. Cephalosporin C biosynthesis and fermentation in *Acremonium chrysogenum* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022. Vol. 106. № 19. P. 6413–6426.
7. Duan S., Yuan G., Zhao Y. et al. Simulation of computational fluid dynamics and comparison of cephalosporin C fermentation performance with different impeller combinations // *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2013. Vol. 30. № 6. P. 1097–1104.

8. Yang Y., Xia J., Li J. et al. A novel impeller configuration to improve fungal physiology performance and energy conservation for cephalosporin C production // Journal of Biotechnology. 2012. Vol. 161. № 3. P. 250–256.
9. Zhgun A.A. Industrial production of antibiotics in fungi: current state, deciphering the molecular basis of classical strain improvement and increasing the production of high-yielding strains by the addition of low-molecular weight inducers // Fermentation. 2023. Vol. 9. № 12. 1027.
10. Newton G.G.F., Abraham E.P. Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D- α -aminoadipic acid // Biochemical Journal. 1956. Vol. 62. № 4. P. 651–658.
11. Dumina M.V., Zhgun A.A., Novak M.I. et al. Comparative gene expression profiling reveals key changes in expression levels of cephalosporin C biosynthesis and transport genes between low and high-producing strains of *Acremonium chrysogenum* // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2014. Vol. 30. № 11. P. 2933–2941.
12. Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Nuraeva G.K. et al. Hydroxylamine analogue of agmatine: Magic bullet for arginine decarboxylase // Biomolecules. 2020. Vol. 10. № 3. 406.

УДК 577.15

DOI: <http://doi.org/10.20914/2304-4691-2025-3-8-9>

БИОХИМИЯ И ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИАМИНОКСИДАЗ И ОКСИДАЗ D-АМИНОКИСЛОТ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Д.Л. Атрошенко^{1,2,3}, Е.П. Сергеев^{1,2}, Д.И. Головина^{1,2}, В.И. Тишков¹

¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

³Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Медицинский институт, Москва, Россия

Полиаминоксидазы (РАО) — FAD-зависимые ферменты, катализирующие окислительное дезаминирование полиаминов (спермидина, спермина, путресцина и их ацетилированных производных) с образованием пероксида водорода и соответствующих аминокислот. Структурно ферменты содержат домен связывания FAD и изогнутый катионо-направляющий канал, обеспечивающий распознавание полиаминовой цепи. У эукариот РАО локализованы в цитозоле, пероксисомах и/или апопласте и вовлечены в регуляцию роста, стресс-ответов и сигнальных путей, где пероксид водорода выступает вторичным мессенджером. Функции дрожжевых полиаминоксидаз остаются изучены неполно. Распространённая гипотеза об их участии в синтезе β -аланина, показанная для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в наших экспериментах не получила универсального подтверждения на модели *Ogataea parapolymorpha* DL-1, что делает изучение дрожжевых РАО актуальной задачей фундаментальной биохимии.

Изменение концентраций полиаминов в биологических жидкостях человека может служить маркером различных патологических состояний, включая злокачественные новообразования и нейродегенеративные процессы [1,2]. Наиболее распространённые аналитические подходы — ВЭЖХ–МС/МС либо ВЭЖХ–флуориметрия после предварительной дериватизации; однако они требуют сложной пробоподготовки, дорогостоящего оборудования и высокой квалификации персонала. Альтернативой является ферментативное определение: образование H_2O_2 в реакции, катализируемой РАО, делает эти ферменты удобными элементами электрохимических, оптических и хемилюминесцентных систем детекции. Таким образом, исследование дрожжевых полиаминоксидаз важно как с фундаментальной, так и с прикладной точки зрения.

Нами клонированы гены, кодирующие предполагаемые полиаминоксидазы, из *O. parapolymorpha* DL-1 (3 гена), *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, *Lachancea thermotolerans* CBS 6340, *Sporopachyderma lactivora* Y-1647, *Cyberlindnera jadinii* Y-74, *Candida blankii* Y-2100. При экспрессии в *Escherichia coli* в растворимой форме были получены пять ферментов, для которых были изучены основные физико-химические свойства. Все ферменты демонстрируют различную субстратную специфичность и повышенную термостабильность по данным анализа ThermoFAD [3]. Один из ферментов *O. parapolymorpha* DL-1 проявлял высокие каталитические константы в реакциях с ацетилированными производными спермидина и спермина ($k_{cat} \approx 200$ и 350 с^{-1} соответственно), что делает его перспективным для детекции ацетилированных полиаминов. Фермент из *K. marxianus* показал умеренные каталитические параметры по отношению к широко распространённым полиаминам, что допускает его использование для оценки суммарного уровня полиаминов.