

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПО
ИЗЫСКАНИЮ НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ имени Г.Ф. ГАУЗЕ»
(ФГБНУ «НИИНА»)

На правах рукописи



Гаврюшина Ирина Александровна

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ
АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ - ЭМЕРИЦИЛЛИПСИНОВ
И РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Садыкова Вера Сергеевна

Москва – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
	ВВЕДЕНИЕ.....	7
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1	Антимикробные пептиды: разнообразие, структурные особенности и функции в природе.....	17
1.2	Антимикробные пептиды с противогрибковой активностью, выделенные из разных биологических объектов	20
1.3	Базы данных по антимикробным пептидам.....	24
1.4	Антимикробные пептиды, синтезируемые грибами. Структура и биологическая активность.....	28
1.5	Антифунгальная активность пептаиболов, выделенных из микроскопических грибов.....	32
1.6	Механизм действия антимикробных пептидов на патогенные грибы.....	37
1.7	Метод иммобилизации микроорганизмов на полимерных подложках для получения биологически активных веществ... Заключение по обзору.....	47 49
2	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	52
2.1	Схема исследования.....	52
2.2	Объекты исследования.....	53
2.3	Методы исследования.....	57
2.3.1	Питательные среды.....	57
2.3.2	Поддержание жизнеспособности культур.....	60
2.3.3	Подготовка матрицы бактериальной целлюлозы.....	60
2.3.4	Идентификация штаммов грибов и филогенетический анализ	60
2.3.5	Культивирование штаммов рода <i>Emericellopsis</i> в различных биотехнологических системах.....	62
2.3.6	Отделение культуральной жидкости от мицелия.....	64

2.3.7	Экстракция EmiA-E из культуральной жидкости и мицелия.....	64
2.3.8	Выделение EmiA-E методом ОФ-ВЭЖХ	65
2.3.9	Определение гомологов методом LC/ESI-MS/MS.....	66
2.3.10	Детекция EmiA и dEmiA методом биоавтографии	67
2.3.11	Определение фрагментации отдельных индивидуальных молекул EmiA и dEmiA методами MALDI-TOF MS и MS/MS.....	67
2.3.12	Оценка антимикробной активности экстрактов и индивидуальных соединений EmiA-E.....	68
2.3.13	Оценка антимикробной активности в отношении биопленкообразующих бактерий.....	70
2.3.14	Оценка цитотоксической активности EmiA <i>in vitro</i>	72
2.3.15	Оценка гемолитической активности EmiA <i>in vitro</i>	75
2.3.16	Статистическая обработка данных.....	75
3	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	76
3.1	Анализ способности изолятов коллекции штаммов рода <i>Emericellopsis</i> к образованию EmiA и отбор активных культур.....	76
3.2	Выделение индивидуальных соединений EmiA-E из концентрата <i>Emericellopsis alkalina</i>	81
3.3	Образование EmiA и dEmiA разными видами рода <i>Emericellopsis</i>	84
3.4	Выделение и характеристика dEmiA.....	85
3.5	Разработка биотехнологии получения EmiA.....	90
3.6	Антифунгальная активность EmiA-E.....	96
3.7	Активность EmiA в отношении расширенного набора клинических изолятов дрожжей.....	99
3.8	Действие EmiA на разрушение биопленок, сформированных	

	патогенными клиническими изолятами бактерий.....	101
3.9	Действие EmlA на формирование биопленок клиническими изолятами бактерий.....	102
3.10	Цитотоксическая активность EmlA.....	105
3.11	Гемолитическая активность EmlA.....	109
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	110
	ВЫВОДЫ.....	112
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
	ПРИЛОЖЕНИЕ.....	143
	Приложение 1. Филогенетическое дерево изолятов рода <i>Emericellopsis</i>	144
	Приложение 2. Лабораторный регламент на производство противогрибкового пептида EmlA.....	145

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГП – антимикробные грибные пептиды

АМП – антимикробные пептиды

ВЭЖХ – высокоэффективной жидкостной хроматографии

ДМСО – диметилсульфоксид

КЖ – культуральная жидкость

МБК – минимальная биоцидная концентрация

МБКб – минимальная биоцидная концентрация в отношении клинических изолятов бактерий

МБКд – минимальная биоцидная концентрация в отношении прикрепленных клеток

МБКп – минимальная биоцидная концентрация в отношении планктонных клеток

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МПА – мясопептонный агар

МХ – бульон Мюллер-Хинтона

AmpB – амфотерицин В

B16 – меланома мыши

CAS – каспофунгин

CI – клеточный индекс

dEmiA – дегидратированная форма эмерициллипсина А

EmiA – эмерициллипсин А

FZ – флуконазол

Gram S – грамицидин С

HCT-116 – аденокарцинома толстой кишки человека

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

MCF-7 – инвазивная карцинома протоков молочной железы человека

MDA-MB 231 – рак молочной железы человека

MQ – очищенная вода

PBS – фосфатный буфер

PFC – постнатальные фибробласты человека

K-562 – хронический миелоидный лейкоз человека

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы работы и степень её разработанности

Ухудшение экологической обстановки, эпидемия ВИЧ, COVID-19, широкое использование трансплантационной терапии, в целом, увеличение числа хирургических вмешательств приводит к значительному росту заболеваемости грибковыми инфекциями, в частности, глубокими (инвазивными) микозами, с трудом поддающимися лечению существующими лекарственными препаратами [Bongomin et al., 2017; Shadrivova et al., 2021; GAFFI in the news Annual Report, 2021]. У здоровых людей эти заболевания встречается довольно редко, однако в последние годы резко возросла заболеваемость поверхностными и инвазивными микозами людей, относящихся к «группе риска» с нарушениями в иммунной системе, нарушениями физических барьеров клетки или измененным микробиомом. Микозы кожи преимущественно вызывают рода *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*, наиболее распространенными инвазивными патогенами являются рода *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* и *Mucorales* [Pianalto et al., 2016]. Появляются новые виды клинически значимых патогенных грибов, как, например, недавно описанный вид *Candida auris* [Jeffery-Smith et al., 2018], а ранее известные как типично сапротрофные виды и роды грибов приобретают патогенность. Кроме того, в настоящее время растет число клинических изолятов грибов, устойчивых ко всем используемым противогрибковым препаратам [Geddes-McAlister et al., 2019; Revie et al., 2018; Patil et al., 2017].

Лекарственных препаратов антимикотиков крайне мало, и они имеют существенные недостатки, такие как токсичность, низкий терапевтический индекс, аллергические реакции. При этом последний класс противогрибковых препаратов эхинокандинов, который используется в клинике с 2000 гг., был открыт более пятидесяти лет назад, и с тех пор на рынке фармацевтических компаний не появлялось ни одного нового природного антибиотика с противогрибковым действием [Aldholmi et al.,

2019]. Это свидетельствует о том, что существует острая необходимость в разработке новых препаратов [Li et al., 2021].

В последние годы антимикробные пептиды (АМП) привлекают внимание в качестве терапевтических агентов, так как имеют следующие преимущества: высокую селективность, низкую иммуногенность, хорошую возможность проникновения в клетку-мишень и меньший риск развития резистентности за счет быстрого действия на клеточную стенку или мембрану. За последние два десятилетия общее число биоактивных пептидов, одобренных на основных фармацевтических рынках, увеличилось в два раза [Lau et al., 2018]. Природные биоактивные пептиды используют как для разработки лекарственных препаратов, так и в качестве модели для создания синтетических структурных аналогов на их основе. К основным недостаткам, препятствующим их применению, можно отнести их потенциальную цитотоксичность. [Casagrande et al., 2021]. Некоторые природные и полученные синтетическим путем АМП уже были изучены в клинических испытаниях с целью разработки лекарственных препаратов для лечения грибковых инфекций кожи [Hospenthal et al., 2013; Clancy et al., 2013; Edwards et al., 2010].

Одним из актуальных направлений поиска продуцентов АМП в мире является разработка новых методов их выделения из редких и некультивируемых ранее микроорганизмов разных экстремальных экониш – морской среды, растений, пещер, ледников и т.д. Из малоизученных местообитаний могут быть выделены новые штаммы, образующие новые антибиотические соединения. Представители микромицетов рода *Emericellopsis* активно изучаются как продуценты антибиотиков уже более полувека. Род *Emericellopsis* включает в себя 20 видов (<http://www.indexfungorum>, <https://www.mycobank.org>), которые в соответствии с различной филогенией и экологией разделяются на две отдельные группы – морские и наземные клады [Zuccaro et al., 2004]. Эти грибы распространены во многих экстремальных экотопах и являются

продуцентами уже известных АМП [Grum-Grzhimaylo et al., 2013, Gonçalves et al., 2020]. Зервамицины А-Е, рекомендованные к доклиническим исследованиям, синтезируются несколькими видами этого рода [Balashova et al., 2000]. У вида *Emericellopsis microspora* выделены и описаны эмеримицины II, III, IV [Георгиева и др., 2009]. А. Берг с соавт. [Berg et al., 1999] установил наличие у штамма *Emericellopsis donezkii* НК1005 синтеза бергофунгинов А и В, для которых в 2017 г. определена структура методом рентгенструктурного анализа [Gessmann et al., 2017]. Их гомологи, бергофунгины С и D, были обнаружены и у вида *E. salmosynnemata* [Shenkarev et al., 2007; Berg et al., 1999]. Штамм *Emericellopsis* sp. BAUA8289 [Ishiyama et al., 2000] продуцирует гептаибин, а *Emericellopsis minima* – сесквитерпены и гельволевую кислоту [Carreira Cátia et al., 2015]. Кроме того, для представителей этого рода известно о синтезе β -лактамных антибиотиков – цефалоспоринов Р, N, С, ответственных за лизис цианобактерий [Георгиева и др., 2009; Carreira Cátia et al., 2015].

Алкалофильный вид *Emericellopsis alkalina* был выделен из содовых озер Кулундинской степи (Россия) в 2013 г [Grum-Grzhimaylo et al., 2013]. Проведенный в 2015-2017 гг. первичный скрининг 10 изолятов этого вида выявил у них наличие противогрибковой активности в отношении возбудителей условно-патогенных микроскопических грибов [Baranova et al., 2017]. В 2018 г из экстракта культуральной жидкости штамма *E. alkalina* ВКПМ 1428 выделен и описан новый пептаибол эмерициллипсин А (EmiA), обладающий противогрибковой активностью в отношении возбудителей инвазивных аспергиллезов и кандидозов, в том числе с резистентностью к флуконазолу. [Rogozhin et al., 2018; Baranova et al., 2017]. Однако масштабного скрининга способности к образованию и накоплению противогрибковых соединений, в частности эмерициллипсинов в разных биотехнологических системах на большой выборке культур у грибов рода *Emericellopsis* ранее не проводилось.

Цель работы: исследование биологической активности, особенностей

накопления новых антимикробных пептидов – эмерициллипсинов, выделенных из алкалофильных грибов рода *Emericellopsis*, и разработка технологии их получения.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие **задачи исследования**:

1. провести исследование на наличие потенциальных продуцентов эмерициллипсинов среди коллекции штаммов (38 культур) алкалофильных грибов вида *Emericellopsis alkalina* и близкородственных видов *Emericellopsis* cf. *maritima* и *Emericellopsis* cf. *terricola*, изолированных из почв прибрежной зоны различных засоленных озер, изучить особенности накопления пептидов и структуру;
2. провести сравнительную оценку антифунгальной активности EmiA-E в отношении условно-патогенных коллекционных и клинических изолятов мицелиальных грибов с множественной резистентностью с целью отбора наиболее активного соединения;
3. провести оценку фунгицидной активности для основного компонента – EmiA на расширенной панели клинических изолятов патогенных дрожжевых грибов;
4. провести оценку цитотоксической и гемолитической активности для EmiA;
5. отработать условия культивирования EmiA в разных биотехнологических системах, обеспечивающих максимальный выход антибиотика. Разработать лабораторный регламент его получения.

Объектами исследования являлись штаммы алкалофильных грибов вида *E. alkalina* и близкородственных видов, выделенные из щелочных засоленных почв различных географических регионов. Культуры получены из коллекции «Грибы экстремальных местообитаний» кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (Россия).

Предмет исследования – биологически-активные вещества, оценка их цитотоксической, гемолитической активности, а также оценка

антимикробной активности и технологической рентабельности культур грибов для разработки регламента получения EmiA.

Научная новизна

Впервые охарактеризованы четыре новых антимикробных пептида – эмерициллипсина (EmiB-E), установлена структура их аминокислотных последовательностей, все они принадлежат к группе пептаиболов и являются структурными гомологами основного компонента – EmiA.

Для 32 изолятов алкалофильных грибов *Emericellopsis alkalina* из содовых почв показана способность к образованию эмерициллипсина А (EmiA), он детектирован в экстрактах из культуральной жидкости и мицелия, а для 15 изолятов этого вида также установлена способность к образованию его гомологов EmiB-E.

Кроме структурных гомологов для трех изолятов выделена и охарактеризована новая активная дегидратированная форма EmiA (dEmiA), не содержащая гидроксильную группу в составе молекулы. Способность к синтезу dEmiA установлена для двух близкородственных *Emericellopsis alkalina* видов из рода *Emericellopsis*.

Впервые проведены оценка биологической активности на большой выборке тест культур условно-патогенных коллекционных мицелиальных и дрожжевых грибов, а также исследования антифунгальной активности всех выявленных индивидуальных пептаиболов в отношении клинических изолятов мицелиальных и дрожжевых грибов – возбудителей системных и диссеминированных микозов, резистентных к применяемым в терапевтической практике препаратам *in vitro*.

Для EmiA показана цитотоксическая активность на опухолевую линию колоректальной карциномы (HCT116), за счет способности влиять на клеточный цикл и индуцировать апоптоз.

При исследовании эффекта на эритроциты человека показано низкое гемолитическое действие пептида, в концентрации 20 мкМ лизису подвергалось не более 12 % клеток, что свидетельствует о перспективности

данного соединения для дальнейшего изучения как нового природного антибиотика с противогрибковым действием для лечения глубоких и инвазивных микозов.

Теоретическая и практическая значимость

Отобранные штаммы грибов пополнили коллекцию культур микроорганизмов - продуцентов антибиотиков Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе и используются в научно-исследовательских и учебных целях.

Активность основного компонента EmiA исследована на расширенной панели клинических изолятов родов *Candida* и *Cryptococcus* с множественной лекарственной устойчивостью к флуконазолу (FZ), итраконазолу и низкой чувствительностью к каспофунгину (CAS). Показано что, антимикотик оказывает противогрибковое действие на патогенные и клинические изоляты рода *Aspergillus*, на клинические дрожжевые изоляты р. *Candida* и *Cryptococcus neoformans*. Среди клинически одобренных антибиотиков только амфотерицин В (AmrB) демонстрирует сравнимый профиль активности в отношении лекарственно-устойчивых *Cr. neoformans* и *Cr. laurentii*, полученные от ВИЧ-инфицированных пациентов с криптококковым менингитом.

Разработан лабораторный регламент получения нового противогрибкового пептида EmiA из алкалофильного гриба штамма *E. alkalina* E101 в условиях стационарного мембранно-жидкостного культивирования на (2D-) матрицах нанокристаллической бактериальной целлюлозы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Способность к образованию эмерициллипсинов не является штаммоспецифичным признаком, характеризуется сходным профилем синтезируемых пептидов у разных штаммов *Emericellopsis alkalina* и близкородственных видов, выделенных из засоленных содовых почв.

Накопление антимикробных пептидов происходит преимущественно в щелочных условиях.

2. Сформирована коллекция штаммов грибов алкалофильного рода *Emericellopsis* – продуцентов новых антимикробных пептидов эмерициллипсинов. Установлена структура для четырех новых EmiB-E, последовательности аминокислот в полипептидной цепи представляют собой гомологичные основному компоненту структуры с единичной заменой одной из аминокислот.

3. Доминирующий компонент – пептид EmiA обладает противогрибковым действием в отношении клинических изолятов патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью. Ингибирующая активность EmiA против азолустойчивых патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. проявляется на уровне антифунгального препарата амфотерицина В. Кроме того, EmiA ингибирует формирование биопленок грамположительных патогенных бактерий из группы ESKAPE.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6 Биотехнология, а именно пункту 1. Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии, пункту 4. Направленный биосинтез, получение биологически активных соединений, метаболитов, изучение их состава и разработка методов анализа, технико-экономических критериев оценки.

Личный вклад автора. Разработка и постановка экспериментальных научных исследований, изложенных в диссертационной работе, а также анализ полученных результатов исследовательской работы, были выполнены автором самостоятельно под руководством д.б.н. Садыковой Веры Сергеевны.

Автор, Гаврюшина Ирина Александровна, провела анализ актуальной литературы по теме работы. Осуществила оценку способности различных штаммов вида *E. alkalina*, а также близкородственных видов, изолированных

из различных экотопов, на способность образования комплекса эмерициллипсинов. Оработала условия культивирования в разных биотехнологических системах, обеспечивающих максимальный выход антибиотиков. Выделение и определение структуры индивидуальных пептидов EmiA-E проводила в сотрудничестве с институтом биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и Научно-исследовательским институтом физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Провела оценку антимикробной активности EmiA-E в отношении условно-патогенных и патогенных клинических изолятов микроорганизмов с множественной резистентностью в сотрудничестве с ГБУЗ Московским городским научно-практическим центром борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы. Разработала лабораторный регламент получения EmiA в условиях стационарного мембранно-жидкостного культивирования на носителе (бактериальной целлюлозе). Обработала и проанализировала результаты экспериментов.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обоснована использованием современных методов исследований и оборудования, а также статистической обработкой данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях: Международный конгресс «Биотехнологии: состояния и перспективы развития» (Москва, 2019 г.), научная конференция с международным участием «Вакцинология как ответ биологическим угрозам» посвященная 100-летию основания НИИВС им. И.И. Мечникова (Москва, 2019 г.), Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2021» (Москва, 2021 г., грамота), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 90-летию со дня основания медицинского вуза в Крыму «Теоретические и практические аспекты современной медицины» (Симферополь, 2021 г, диплом 3 степени за устный доклад), The 1st International Electronic

Conference on Antibiotics (Швейцария, 2021), 2-ая Всероссийская научная конференция с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям обитания среды» (Иркутск, 2022 г), The 2nd International Electronic Conference on Antibiotics – Drugs for Superbugs: Antibiotic Discovery, Modes of Action And Mechanisms of Resistance, 15-30 June, 2022.

Апробация диссертации была проведена на Ученом совете ФГБНУ «НИИНА», протокол № 6 от 16 июня 2022 года.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 19 научных статей и материалов конференций, из которых – 5 статей в изданиях, индексируемых в базах данных, RSCI, Scopus и Web of Science, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, в том числе 3 в изданиях, входящих в первый и во второй квартиль по импакт-фактору, согласно рейтингу научных журналов SCImago (SJR, SCImago Journal Rankings); все статьи опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ для публикации диссертационных работ. Получен Патент РФ № 2710377 «Способ получения противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А».

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 182 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложений. Работа содержит 11 таблиц, 23 рисунка и 2 приложения. Список литературы включает 240 источников, в том числе 227 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает благодарности своему руководителю д.б.н., доценту Садыковой В.С., сотрудникам кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова к.б.н. М.Л. Георгиевой, к.б.н. Е.Н. Биланенко, д.б.н. А.В. Куракову, сотрудникам лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ имени академиков

М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова к.х.н. Е.А. Рогожину, м.н.с. А.С. Барашковой, сотрудникам ФГБНУ «НИИНА» имени Г.Ф. Гаузе к.б.н. А.Е. Кувариной, к.б.н. Т.А. Ефименко, к.б.н. Н.Н. Маркеловой, инженеру М.А. Суконникову, сотрудникам Института Белозерского А.В. Тимофеевой, к.х.н. М.В. Серебряковой, сотруднику ГБУЗ МНПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы д.б.н. А.Б. Кулько.

Данная работа выполнена при поддержке грантов: РФФИ №19-34-90088 аспиранты, РФФИ №18-74-10073 и РФФИ №21-75-00062. Автор получала стипендию Правительства Российской Федерации в 2020/2021 и 2021/2022 гг.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Антимикробные пептиды: разнообразие, структурные особенности и функции в природе

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой молекулы небольшого размера, которые синтезируются всеми формами жизни, от многоклеточных организмов до бактериальных клеток и играют важную роль во врожденном иммунитете организма [Bahar et al., 2013]. Впервые термин «антимикробные пептиды» был предложен шведским ученым Г. Боманом в 1981 году [Steiner et al., 1981]. АМП активны не только в отношении патогенных микроорганизмов, но и играют определенную роль в регуляции аутоиммунной системы хозяина. Они имеют потенциальные перспективы в профилактике и лечении заболеваний у животных и растений, разработке новых лекарственных средств и в области биологической детоксикации [Fry, 2018; Li et al., 2021].

АМП существуют в природе более миллионов лет и обладают устойчивым потенциалом в борьбе с патогенными организмами. Преимуществом АМП является действие на мембрану патогенных микроорганизмов, поэтому у микроорганизмов, как правило, отсутствует или очень медленно развивается устойчивость клеток-мишеней бактерий и грибов [Yu et al., 2018; Rapo et al., 2003; Brogden, 2005; Nicolas, 2009]. При попадании в окружающую среду АМП расщепляются на аминокислоты, в отличие от других лекарственных средств, которые могут накапливать потенциально вредные метаболиты.

На сегодняшний день несколько тысяч АМП было выделено из различных природных источников, таких как бактерии, растения, насекомые, ракообразные, животные, люди и др. [Sarkar et al., 2021].

По сравнению с другими организмами, растения, как правило, синтезируют большее количество АМП из-за дупликации генов или полиплоидии. К АМП растительного происхождения относятся тионины, дефенсины [Nawrot et al., 2014; Tam et al., 2015]. У животных АМП

выделяют, в основном, из тканей и органов (кожа, глаза, уши, рот, дыхательные пути, легкие, кишечник, мочевыводящие пути и т.д.), которые подвергаются воздействию патогенов, переносимых по воздуху, и действуют как первая линия врожденной иммунной защиты [Schauber et al., 2008; Hilchie et al., 2013]. Млекопитающие продуцируют антимикробные пептиды, такие как дефенсины, гистатины, LL-37, индолицидин, протегрины и лактоферрины [Wang, 2014; Dutta et al., 2016], насекомые - цебропин, танатин, дефенсин, дрозомидин, апидецин, абаецин, мелиттин [Mylonakis et al., 2016], ракообразные - каллинектин, хомарин, пенеидин, гиастатин, аразин [Zanjani et al., 2018]. Некоторые АМП, такие как япононицин 2, нигроцин 2, темпорин, дермасептин, магайнин, буфорин II [Conlon et al., 2014; Patocka et al., 2019; Casciaro et al., 2020], изолированные из земноводных [Wang et al., 2016], обладают антимикробным действием широкого спектра против бактерий, грибов, дрожжей, простейших и вирусов, а также противоопухолевым действием [Rabanal et al., 2016].

Бациллы видов *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus* и др. образуют самую большую группу источников природных пептидов, которая широко используется в биологическом контроле фитопатогенных микроорганизмов. Из штамма *B. amyloliquefaciens* SYBC H47 было выделено противогрибковое вещество, которое проявляет антифунгальную активность на различные патогенные грибы, например, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum* и *Candida albicans* [Ortholand et al., 2004]. Другие виды бактерий так же могут синтезировать противогрибковые пептиды, но в настоящее время количество работ о них намного меньше, чем о видах рода *Bacillus*.

В последние годы активно изучаются АМП микроорганизмов, выделенных из морских мест обитания [Newman et al., 2016]. Виды рода *Streptomyces* синтезируют пептиды с противогрибковой активностью, антибактериальными, противовирусными и противопаразитарными свойствами и т.д., что делает их очень ценными при разработке новых

антибиотиков [Ding et al., 2016]. Эндуспептиды А–С (27-29) были выделены из рода *Streptomyces* sp, являются депсипептидами и имеют IC₅₀ 2-8 мкг/мл в отношении *Candida glabrata* [Chen et al., 2017].

Циклопептиды содержат как протеиногенные, так и небелковые аминокислотные остатки [Sarkar et al., 2021]. Среди них липопептиды, продуцируемые представителями рода *Bacillus*, представляют большой интерес благодаря их активности в отношении грибов, продуцирующих микотоксины. Эти низкомолекулярные вторичные метаболиты обладают широким спектром активности, высокой способностью к биологическому разложению и низкой токсичностью и обычно синтезируются с помощью NRPSs. Они состоят из гидрофильной циклической пептидной структуры из 7-10 аминокислот, соединенных с гидрофобной цепью жирных кислот с 13-19 атомами углерода. Эти соединения сохраняют свою активность при высоких температурах и различных значениях pH; кроме того, они устойчивы к обработке пептидазой и протеазой [Caulier et al., 2019; Jiao et al., 2021].

Липопептиды подразделяются на три основных семейства в соответствии с их аминокислотной последовательностью: итурины, которые представляют собой гептапептиды с α -аминожирной кислотой; фенгицины, которые представляют собой декапептиды с цепью α -гидроксижирной кислоты и сурфактины, гептапептиды, содержащие хвост α -гидроксижирной кислоты с синергическим действием с двумя предыдущими группами.

Дефензины, обнаруженные у млекопитающих, насекомых и растений (длиной 45-54 аминокислотных остатков), образуют самое большое семейство CRP и обладают высокой активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов. Независимо от происхождения, дефензины являются структурно подобными пептидами. Они имеют структуры-шпильки, стабилизированные тремя / четырьмя дисульфидными связями, но их последовательности расходятся и проявляют различную активность,

которая включает противогрибковую, антибактериальную или противоопухолевую активность [Van der Weerden et al., 2013].

Другая группа CRP, представляющая интерес, включает АМП грибкового происхождения, так называемые антимикробные грибные пептиды (АГП). Они представляют собой небольшие (45-64 аминокислоты) и катионные дефензиноподобные белки, которые продуцируются и секретируются в культуральную среду мицелиальными аскомицетами, в основном из родов *Aspergillus* и *Penicillium*, и проявляют противогрибковую активность [Hegedüs et al., 2013]. Некоторые из этих белков обладают активностью в отношении грибковых патогенов растений с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) в диапазоне низких микромолярностей [Gun Lee et al., 1999; Chen et al., 2013] и не токсичны для клеток бактерий, растений или животных [Moreno et al., 2006; Meyer et al., 2018].

Наконец, следует также отметить синтетические пептиды, обладающие противогрибковой активностью. Синтетические АМП разрабатываются на основе свойств природных АМП или идентифицируются с использованием комбинаторных подходов. Пептидные аналоги природных усилителей были синтезированы с замещенными, удаленными или расширенными аминокислотами. Синтетические аналоги получают модификацией аминокислотной последовательности либо уменьшением или увеличением длины пептида, либо слиянием фрагментов из разных пептидов [Marcos, Manzanares, 2012]. Эти подходы, в основном направлены на улучшение противогрибковой активности, снижение токсичности для клеток, не являющихся мишенями, и повышение устойчивости к деградации; кроме того, они внесли существенный вклад в увеличение числа и разнообразия известных АМП [Thery et al., 2019; Kerenga et al., 2019].

1.2 Антимикробные пептиды с противогрибковой активностью, выделенные из разных биологических объектов

Биологическая активность АМП, выделенных из бактерий, растений, животных и грибов кратко изложена ниже.

Противогрибковые АМП, выделенные из бактерий

Противогрибковые АМП бактерий широкого спектра действия способны контролировать рост грибов *in vitro* и *in vivo*. В основном это противогрибковые АМП, продуцируемые молочнокислыми бактериями, а также представителями родов *Streptomyces*, *Bacillus* и *Burkholderia*, которые особенно активны в отношении видов грибов, принадлежащих к родам *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*, а также рода *Byssochlamys*. Примером применения *in vivo* является противогрибковый белок YVGO, выделенный из *Bacillus thuringiensis*, который продлевает срок годности различных фруктовых соков [Manns et al., 2015]. Известно о высокой противогрибковой активности пептидов, синтезируемых *L. plantarum* TE10, в отношении *A. flavus*. Результаты продемонстрировали перспективное применение пептидной смеси в качестве средства биоконтроля для предотвращения роста *A. flavus* в кукурузе [Muhialdin et al., 2020].

Противогрибковые АМП, выделенные из растений

Противогрибковые АМП были выделены из различных видов растений. Различные семейства растений продуцируют активные пептиды, проявляющие ингибирующую активность в отношении фитопатогенных токсинообразующих микромицетов. К ним относятся виды рода *Fusarium*, особенно *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* и *F. solani*. Такие токсинообразующие виды грибов рода *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. niger*), *Penicillium* (*P. expansum*) и *Alternaria* (*A. alternata*, *A. solani*) также успешно ингибируются противогрибковыми АМП из растений [Thery et al., 2019; Shwaiki et al., 2021; Yan et al., 2015]. Например, дефензин Ace-AMP1 лука (*Allium cepa*) на листьях помидоров. Обработанные листья показали повышенную устойчивость к патогену томатов *A. solani*, что делает этот АМП перспективным фунгицидом для использования в сельском хозяйстве [Wu et al., 2011].

Противогрибковые АМП, выделенные из животных

Противогрибковые АМП животного происхождения выделяют с кожных и слизистых покровов [López-Meza et al., 2011]. Различные противогрибковые АМП были выделены из беспозвоночных и позвоночных животных (рыб, амфибий и млекопитающих). Несколько АМП беспозвоночных проявляют активность в отношении грибов, продуцирующих микотоксины, в частности родов *Aspergillus* и *Fusarium*. Они были выделены из различных организмов беспозвоночных и позвоночных животных (скорпионов, шелкопряда, плодовой мухи, богомола, пчел, термитов и клещей). Примером противогрибкового АМП является плевроцидин, катионный пептид, выделенный из зимней камбалы *Pleuronectes americanus*, который проявил противогрибковую активность в отношении грибов *F. culmorum* и *A. niger* [Souza et al., 2013]. Противогрибковые АМП млекопитающих обнаружены у человека и крупного рогатого скота и проявляют активность в отношении большого количества грибов, продуцирующих микотоксины, включая *F. culmorum* (DON, NIV, T-2 и ZON), *P. expansum* (PAT и CIT), *A. niger* (OTA), *A. nidulans* (ST), *F. oxysporum* (токсин T-2, токсин HT-2) и *A. flavus* (AFS).

Противогрибковые пептиды, продуцируемые животными, проявляют антифунгальную активность, например, пептид AFS активен в отношении грибов *A. flavus* и *A. parasiticus*, пептид OTA в отношении *A. carbonarius*, *A. ochraceus* и *P. nordicum*, пептид ST в отношении *A. versicolor* и пептид PAT в отношении *P. expansum* и *P. griseofulvum*. АМП из *P. digitatum* (PDAFPB) и *P. expansum* (PeAfpA, PeAfpB и PEAFPC) были протестированы против грибов, продуцирующих микотоксины и принадлежащих к родам *Alternaria*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Fusarium* и *Penicillium* [Martínez-Culebras et al., 2021]. Известно, что они продуцируют до 26 различных микотоксинов.

Известна противогрибковая активность человеческого дефензина 3 (HBD-3) в продуктах на основе злаков: 80 г/мл этого пептида задерживало на хлебе рост видов *F. culmorum*, *P. expansum* и *A. niger* [Thery et al., 2016].

Также известно о противогрибковой активности бычьего лактоферрина и производных пептидов [Fernandes et al., 2017; Muñoz et al., 2007]. Различные грибы родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* и *Fusarium*, продуцирующие микотоксины, были чувствительны к пептидам, полученным из лактоферрина [Niaz et al., 2019].

Противогрибковые АМП, выделенные из грибов

Способность к синтезу АМП наблюдается у многих микромицетов, в основном, у представителей аскомицетовых грибов порядков *Hypocreales* и *Eurotiales*. Например, грибами рода *Aspergillus* синтезируются наиболее известные в клинике противогрибковые эхинокандины, используемые для лечения инвазивных грибковых инфекций [Ganesan, 2008]. Детальнее основные классы АМП грибов, их структура и механизм действия будут рассмотрены подробно в разделе 1.3.

АГП различаются по аминокислотному составу [Garrigues et al., 2016; Leiter et al., 2017]. Дж. Дельгадо и др. [Delgado et al., 2015] оценили противогрибковую активность P_gAFP из *P. chrysogenum* против токсигенных грибов, встречающихся в продуктах сухого созревания. P_gAFP замедлял рост большинства протестированных грибов и грибов, продуцирующих микотоксины. АГП показали высокую активность в отношении большинства протестированных микотоксигенных грибов. P_EAFPC продемонстрировал ингибирование против *Byssochlamys spectabilis* (производитель PAT), который является важным токсинообразующим грибом, вызывающим порчу пастеризованных пищевых продуктов, таких как фруктовые соки и консервированные фрукты [Pitt, Hocking, 2009]. Рода *Aspergillus*, *Byssochlamys* и *Penicillium* были более чувствительны, чем род *Fusarium*. Более того, противогрибковая активность грибных пептидов различалась у одних и тех же видов [Delgado et al., 2015; Martínez-Culebras et al., 2021]. Эффективность некоторых АГП была доказана в экспериментах *in vivo*. Например, P_gAFP эффективно снижал количество *A. flavus*, инокулированного на колбасу сухого брожения [Delgado et al., 2015], в то

время как *A. giganteus* АГП защищал рассаду томатов от сосудистого увядания, вызванного *F. oxysporum f. sp. lycopersici* [Theis et al., 2005]. Также PdAfpB и PeAfpA контролировали рост *P. expansum* в плодах яблони [Gandía et al., 2020]. Подробнее наиболее обширная группа нерибосомальных АМП грибов – пептаиболы и липопетаиболы будет подробно рассмотрена в разделах 1.3 и 1.4

Увеличение выхода природного соединения возможно за счет расширения скрининга, усовершенствование методов экстракции, химическим синтезом, синтез в клетках прокариот или эукариот с использованием гетерологичных хозяев. Эти стратегии открывают возможность открытия искусственных аналогов, которые могут превзойти по своим фармакодинамическим или фармакокинетическим свойствам оригинальное природное соединение. [Aldholmi et al., 2019].

Структурная модификация позволяет улучшить растворимость и стабильность таких препаратов в дополнение к расширению их противогрибкового спектра [Alhassan et al., 2020]. В связи с этим можно использовать комбинации препаратов, которые помогают снижать лекарственную устойчивость. Активность противогрибковых пептидов очень высокая [Cortez et al., 2018], и поэтому их МИК соответственно низкие, относительно применяемых в клинике препаратов [Luong et al., 2020]. Например, было обнаружено, что значение МИК противогрибкового пептида P-1 в отношении *Trichothecium roseum* составляет всего 1 мкг/мл [Vasan et al., 2019; Li et al., 2021].

1.3 Базы данных по антимикробным пептидам

На сегодняшний день существуют различные базы данных по АМП (Рис.1) , наиболее крупные и систематизированные из них включают – Norine (<https://bioinfo.cristal.univ-lille.fr/norine/index.jsp>), Protein databases (<https://www.rcsb.org/>), Antimicrobial Peptide Database и DBAASP (<https://dbaasp.org/home>).

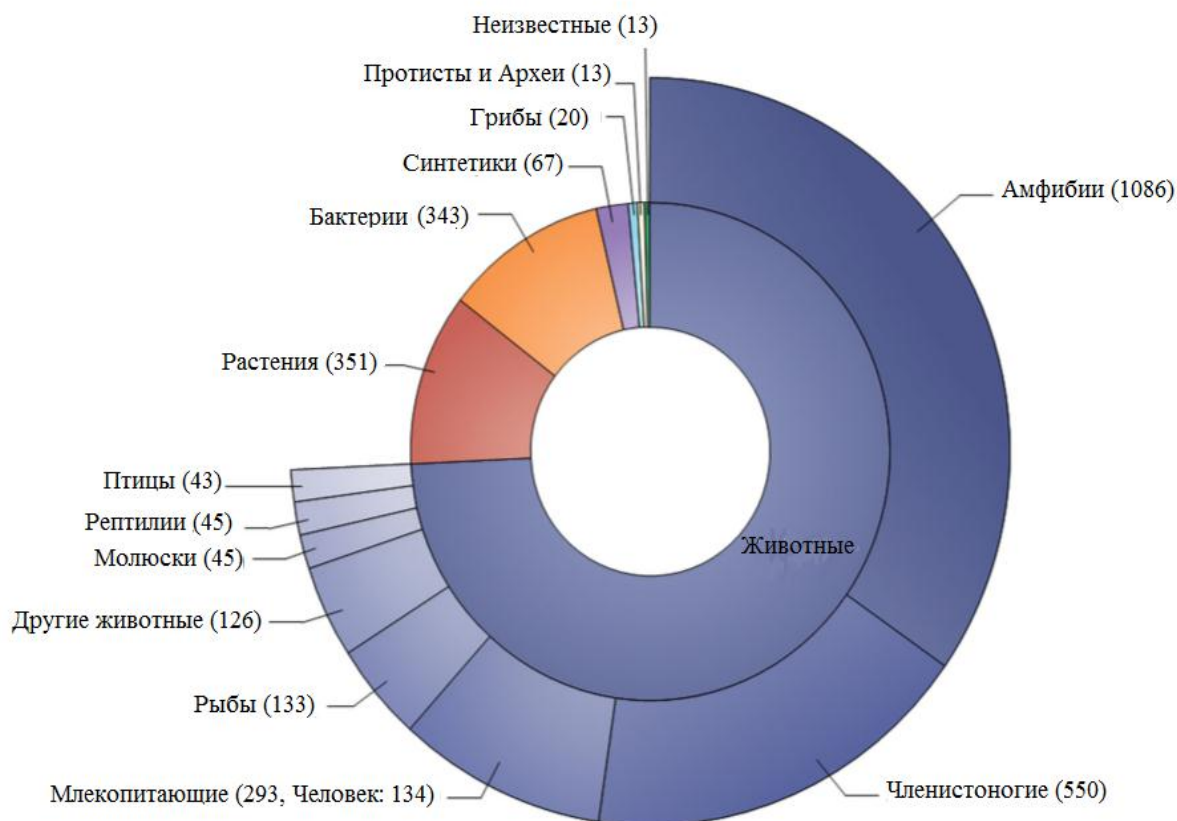


Рисунок 1. Источники АМП, зарегистрированные в базе данных антимикробных пептидов (APD; <http://aps.unmc.edu/AP>). База данных содержит 3128 АМП из шести царств (бактерии, археи, протисты, грибы, растения и животные) [Mahlaruu et al., 2020]

В базе данных антимикробных пептидов **Antimicrobial Peptide Database** насчитывается около 2700 видов АМП, из них только 1000, или около того, обладают противогрибковой активностью. В настоящее время в рамках исследований изучения химических структур и механизма действия были обнаружены и определены многие противогрибковые пептиды. [Li et al., 2021].

Norine – представляет собой платформу, которая включает базу данных пептидов и различные инструменты для их анализа. Название Norine расшифровывается как нерибосомальные пептиды. База данных Norine в настоящее время содержит 1740 пептидов. Для каждого пептида в базе данных хранится информация его структуре, а также и другая информация, например, биологическая активность, названия продуцентов,

библиографические ссылки. База данных может быть использована для поиска пептидов по названиям, а также по их мономерным структурам. В последнем случае пользователь может указать состав, всю структуру или структурный образец (возможно, включая «неопределенные мономеры») исследуемого пептида (<https://bioinfo.cristal.univ-lille.fr/norine/index.jsp>).

DBAASP – эта база данных содержит информацию об антимикробной активности и структурах пептидов. База данных была разработана для предоставления информационных и аналитических ресурсов для разработки противомикробных соединений с высоким терапевтическим индексом. DBAASP предоставляет информацию о трехмерной структуре и антимикробной активности тех пептидов, у которых она была экспериментально оценена в отношении конкретных видов-мишеней. База данных содержит информацию о рибосомальные, нерибосомальные и синтетических пептидах, которые проявляют антимикробную активность в виде мономеров, мультимеров и мульти-пептидов. Данные включают: чувствительность конкретного штамма к одному определенному пептиду и в комбинации с другим пептидом или антибиотиком, чувствительность того же штамма к другому пептиду или антибиотику отдельно и в комбинации. DBAASP - это хранилище необходимой информации для изучения структуры пептидов. Сервис прогнозирования позволяет выявить наличие антимикробной активности для запрашиваемых пептидов только на основе информации об аминокислотной последовательности. Инструменты, обеспечивающие прогноз с высокой точностью, позволяют вести целенаправленный дизайн новых антибиотиков и, как следствие, снижать затраты на его производство. DBAASP предлагает поиск по конкретным целевым видам и показателям активности и представляет результаты поиска в форме ранжированного списка значений активности. Также есть возможность разграничивать наборы пептидов на молекулы с определенными антимикробными свойствами, экспериментально подтвержденные против определенных видов-мишеней. Следовательно,

DBAASP обеспечивает разработку прогнозирования на основе машинного обучения и эффективного метода создания антибиотиков (<https://dbaasp.org/home>).

CAMP_{R3} это база данных об аминокислотных последовательностях, структурах и идентификаторах прокариотических и эукариотических АМП (www.camp3.bicnirrh.res.in).

В настоящее время база данных CAMP_{R3} включает 10247 аминокислотных последовательностей, 757 структур и 114 идентификаторов для 45 семейств АМП.

Известно, что семейства АМП различаются между собой по составу аминокислотных последовательностей, например, по наличию цистеина в дефензинах [Ganz, 2013], аминокислотной кислоты в пептаиболах [Duclohier, 2010] и лантионина в бактериоцинах (лантибиотиках) [Lohans, Vederas, 2014], содержанию большого количества гистидинов в гистатинах [van Dijk et al., 2015] и т.д. Отличительный признак в составе аминокислотной последовательности определенного семейства АМП может быть использован как идентификатор для поиска АМП в базе данных.

Использование идентификаторов особенно важно для поиска аминокислотных последовательностей АМП. Например, АМП, такие как тионин-2.1 (идентификатор UniProt: Q42596), пептид varv A/kalata-B1 (идентификатор UniProt: Q5USN7), невозможно найти в базе данных UniProtKB при помощи поиска ключевых слов. Поэтому для поиска этих АМП в базе данных необходимо ввести идентификаторы их семейств.

Исследования АМП и их аналогов показали, что изменения в аминокислотных последовательностях пептидов могут изменять их антимикробную активность [Vila-Perelló et al., 2003]. В базе данных CAMP_{R3} возможно проанализировать, как влияет замена одного аминокислотного остатка на антимикробную активность АМП [Waghu et al., 2015].

1.4 Антимикробные пептиды, синтезируемые грибами. Структура и биологическая активность

АМП, образуемые путем классического рибосомального синтеза

В период с 2010 по 2019 года были обнаружены новые природные пептиды, обладающие противогрибковой активностью в отношении патогенов человека. Противогрибковый термостабильный пептид 5773-Da, выделенный из штамма гриба (VR) *Aspergillus clavatus* подавляет рост *Alternaria solani*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* и *F. solani*, но не активен в отношении дрожжей и бактерий [Skouri-Gargouri et al., 2008]. Новый тетрапептид D-Phe-L-Val-D-Val-L-Tyr был выделен из культуры *Penicillium canescens*. Тетрапептид обладает аналогичной противогрибковой активностью в отношении патогена сои *Fusarium virgule*, как и коммерческий продукт беномил [Bertinetti et al., 2009].

Противогрибковый белок PAF, выделенный из штамма *Penicillium chrysogenum*, представляет собой небольшой катионный белок, который не проявляет токсичность в отношении клеток млекопитающих, активный в отношении патогенных изолятов, вызывающих инвазивные аспергиллезы. Механизм противогрибкового действия основан на передаче сигналов, связанных с G-белком и последующим апоптозом чувствительных грибов. PAF состоит из пяти бета-нитей, образующих два ортогонально упакованных бета-листа [Batta et al., 2009].

Методом нормально-фазовой ВЭЖХ на аналитических и препаративных колонках TSK-gel Amide-80 из культуральной жидкости (КЖ) *Pichia ohmeri* 158 и *Candida guilliermondii* P3 был выделен токсин белковой природы с молекулярной массой <3 кДа, который проявляет противогрибковую активность в отношении штамма *Penicillium expansum* № 2 [Coelho et al., 2009].

Низкомолекулярный противогрибковый белок из *Aspergillus giganteus* секретируется в виде неактивного предшественника с шестью

аминокислотными добавками на NH₂-конце, он проявляет противогрибковую активность *in vitro* и *in vivo* в отношении фитопатогенов.

АМП (2-10) кДа из культуры *Saccharomyces cerevisiae* ССМІ 885, обладают фунгистатическим действием в отношении штаммов *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kluyveromyces thermotolerans* и *Torulasporea delbrueckii*, и фунгицидной активностью в отношении штамма *Kluyveromyces marxianus* [Albergaria et al., 2010].

Термостабильный, с большим содержанием цистеина АМП (АСАМР) с молекулярной массой 6,0 кДа из *Aspergillus clavatus* ES1 обладает противогрибковой и антибактериальной активностью и демонстрирует высокую гомологию последовательностей с другими пептидами аскомицетов. Этот пептид можно использовать в биоконтроле болезней растений и сохранении пищевых продуктов [Наджи et al., 2010].

Противогрибковый белок с молекулярной массой 9,5 кДа и противогрибковой активностью против *Flammulina velutipes*, был выделен из гриба *Hypsizyugus marmoreus* [Suzuki et al., 2011].

Aspergillus giganteus синтезирует катионный дефензиноподобный противогрибковый белок АФРNN5353 богатый цистеином, который подавляет прорастание и рост аскомицетов, патогенных для человека и растений, а также модельные организмы *Aspergillus nidulans* и *A. niger* [Binder et al., 2011].

Нерибосомальные АМП, синтезируемые микроскопическими грибами

Нерибосомальные пептиды классифицируются по своей структуре на пять групп: пептаиболы, липопептаиболы, циклические пептабиотики, липоаминопептиды и другие пептабиотики.

Пептаиболы представляют собой АМП, выделенные из грибов, содержащие от 4 до 21 аминокислотных остатка. Молекулярная масса пептаиболов от 500 до 2200 Да. Пептаиболы относятся к самой большой группе пептидов. В 1983 г. установили, что пептаиболы содержат большое количество остатков α-аминоизомасляной кислоты (Aib), в основном, с N-

концевой ацетильной группой и с С-концевой модификацией в виде аминокислотной группы. Для них также характерно наличие небелковых аминокислот, в частности, изовалина и 2-этилаланина.

Пептаиболы делятся на группы по длине их аминокислотной цепи: пептаиболы с длинной последовательностью (18-21 аминокислотных остатков обычно с центральным расположением Pro и остатками Gln около обоих концов); пептаиболы с короткой последовательностью (11-16 аминокислотных остатков, с несколькими Aib-Pro и обычно либо Ac-Aib-Asn, либо Ac-Aib-Gln- в качестве N-конца); ультракороткие липопептаиболы (7-11 аминокислотных остатков, с высоким содержанием Gly и N-концевых аминокислотных остатков, ацилированных жирной кислотой C8-C15. Содержание Aib составляет примерно 40% в длинных пептаиболах и от 14 до 56 % в коротких. Основа молекулы пептаибола образует спиральную структуру из-за конформационных ограничений, обусловленных многочисленными Aib.

Существует большое структурное разнообразие пептаиболов. Далее приведены примеры некоторых структур пептаиболов, выделенных из микроскопических грибов (Рис. 2).

Многие описанные соединения этой группы представляют собой гомологи, отличающиеся локальными аминокислотными заменами, например, такие как атровиридины, неоатровиридины, лонгибрахины и эмерициллипсины [Gupta et al., 2015].

Виды рода *Emericellopsis* синтезируют большое количество пептаиболов, обладающих антибактериальной и противогрибковой активностью.

К пептаиболам, выделенным из рода *Emericellopsis* относятся бергофунгины A-D [Gessmann et al., 2017], зервамицины [Ovchinnikova et al., 2007], гептаибин и эмеримицины [Ishiyama et al., 2000] и др.

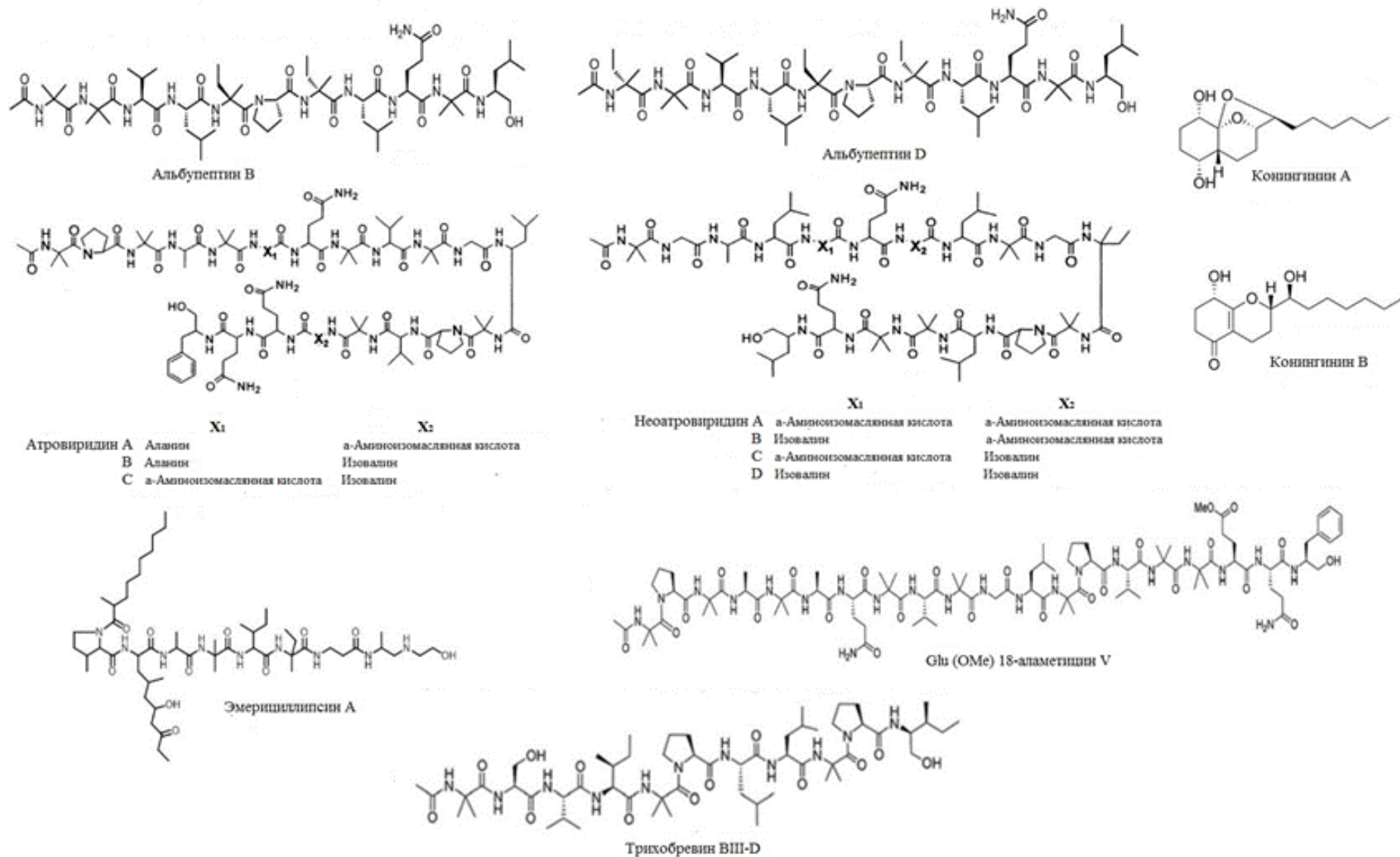


Рисунок 2. Структуры пептаиболов, выделенных из микроскопических грибов [Гаврюшина, 2021]

Зервамицины ПА и ПВ синтезируются грибом *Emericellopsis salmosynnemata* и относятся к семейству пептаиболов. Установлено, что зервамицины обладают нейролептической активностью [Ovchinnikova et al., 2007]. Из штамма *Emericellopsis minima* был выделен грибной пептаибол эмеримицин IV, который проявляет антибактериальную активность в отношении клинических изолятов метициллин-резистентного золотистого стафилококка и ванкомицин-резистентного *Enterococcus faecalis*, значения МИК составляют от 100 до 12,5 мкг/мл [Inostroza et al., 2018].

1.5 Антифунгальная активность пептаиболов, выделенных из микроскопических грибов

Антифунгальная активность пептаиболов в большинстве случаев проявляется у фитопатогенов, и в настоящее время активно изучается для внедрения этих соединений в качестве биофунгицидов [Szekeres et al., 2005; Neuhofer et al., 2007; Tyagi et al., 2019; Oh et al., 2002; Ding et al., 2015; Katoch et al., 2019; Zotti et al., 2011; Shenkarev et al., 2013; Berg et al., 2003]. Гораздо менее изучена активность пептаиболов по отношению к патогенным микроскопическим грибам [Ovchinnikova et al., 2007; Riedl et al., 2011]. Основные соединения пептидной природы, активные в отношении патогенных грибов, описанные с 2000 г., представлены в Таблице 1.

Атровиридины А-С и неоатровиридины А-Д представляют собой 20- и 18-мерные пептаиболы *Trichoderma atroviride*, обладающие антимикробной активностью не только в отношении фитопатогенных грибов, но и в отношении *Candida albicans*.

Гептаибин подавляет рост *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* и *Cr. neoformans*. Лонгибрахины А-II-b проявляли ингибирующую активность в отношении условно-патогенного *A. fumigatus* [Mohamed-Benkada et al., 2016].

Септоцилиндрины А и В структурно родственны хорошо изученному пептаиболу аламетицину. Эти соединения проявляют умеренную активность в отношении *C. albicans* [Summers et al., 2007; Nelissen et al., 2012].

Таблица 1. Пептаиболы микроскопических грибов, обладающие антифунгальной активностью, выделенные с 2000 г [Kuvarina et al., 2021]

Пептаиболы	Продуцент	Антифунгальная активность	Ссылка
Эмерициллипсины А-Е	<i>E. alkalina</i> ВКПМ F-1428	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Cr. neoformans</i> возбудители инвазивных микозов с мультирезистентностью	[Rogozhin et al., 2018; Kuvarina et al., 2021]
Трихоконины (TKs)	<i>T. longibrachiatum</i> SMF2	<i>C. albicans</i>	[Zhao et al., 2018]
Атровиридины А-С	<i>T. atroviride</i>	Фитопатогенные грибы	[Oh et al., 2002]
Неоатровиридины А-Д	<i>T. atroviride</i>	Фитопатогенные грибы	[Oh et al., 2002]
Гипориенталин А	<i>T. orientale</i> LSBA1	Клинические изоляты <i>C. albicans</i>	[Marik et al., 2017]
Лонгибрахины А-II-b	<i>T. longibrachiatum</i> MMS151	Клинические изоляты <i>A. fumigatus</i>	[Mohamed-Benkada et al., 2016]
Трибакопин AV	<i>T. lixii</i> ПИМ-В4	<i>C. albicans</i>	[Katoch et al., 2019]
Конингиопсин	<i>T. koningiopsis</i> SZMC 12500	<i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>	[Marik et al., 2019]
Триконингин KAV	<i>T. koningiopsis</i> SZMC 12500	<i>A. alternata</i> , <i>R. solani</i> , <i>P. cucurbitacearum</i>	[Marik et al., 2019]
Альбупептины В и D	<i>G. album</i> KSH 719	<i>B. cinerea</i> , <i>Septoria tritici</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Aspergillus sp.</i>	[Otto et al., 2015]
Гептаибин	<i>Emericellopsis sp.</i> BAUA828	<i>A. fumigatus</i> T1MM 0069, <i>C. albicans</i> ATCC 90018, <i>Cr. neoformans</i>	[Zotti et al., 2011]
Трихофумины А-Д	<i>Trichoderma sp.</i> НКI 0276	<i>Phoma destructiva</i>	[Berg et al., 2003]
Бревицелсины	<i>T. flagellatum</i> SzMC 22608, <i>T. sinensis</i>	Опportunистические мицелиальные грибы	[Marik et al., 2019]

	SzMC 22609, <i>T. parareesei</i> SzMC 22615		
Сферостильбелины	<i>Sphaerostilbella toxica</i> (микопаразит)	Патогенные <i>C. albicans</i> , <i>Cr. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i>	[Perlatti et al., 2020]
Трилонгины VI-BIV	<i>Trichoderma sp.</i> P8BDA1F1 эндофит из <i>Begonia venosa</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	[Grigoletto et al., 2020]
AFP	<i>Aspergillus giganteus</i>	<i>Fusarium spp.</i>	[Theis et al., 2005]
AcAFP	<i>A. clavatus</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i>	[Skouri-Gargouri et al., 2008]
AcAMP	<i>A. clavatus</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i>	[Mohamed et al., 2010]
Anafp	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i>	[Gun et al., 1999]
FgAFP	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>F. verticilloides</i> , <i>F. proliferatum</i>	[Patiño et al., 2018]
MAFP1	<i>Monascus pilosus</i>	<i>Fusarium spp.</i>	[Tu et al., 2016]
NFAP	<i>Neosartoria fischeri</i>	<i>A. nidulans</i> , <i>F. graminearum</i>	[Kovács et al., 2011]
NFAP2	<i>N. fischeri</i>	<i>A. nidulans</i>	[Tóth et al., 2016]
PcPAF	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>F. oxysporum</i>	[Wen et al., 2014]
PAF	<i>P. chrysogenum</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>A. flavus</i>	[Kaiserer et al., 2003]

PgAFP/PAFB	<i>P. chrysogenum</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>A. flavus</i>	[Huber et al., 2018]
Pc-Arctin/PAFC	<i>P. chrysogenum</i>	<i>A. longipes</i> , <i>B. spectabilis</i>	[Holzknecht et al., 2020]
PdAfpB	<i>P. digitatum</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>P. expansum</i>	[Garrigues et al., 2017]
PeAfpA PeAfpB PeAfpC	<i>P. expansum</i>	<i>A. alternata</i> , <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Byssochlamys spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i>	[Martínez-Culebras et al., 2021]

Гипориенталин А, аналог пептаибола лонгибрахина-А-II, проявлял выраженную активность по отношению к клиническим изолятам *C. albicans* с МИК от 2,49 до 19,66 мМ, что сравнимо с таковой у антифунгального препарата амфотерицина В. Это указывает на то, что гипориенталин А подходит для лечения кандидоза [Marik et al., 2017; Kredics et al., 2013].

Трихофумины А-D различаются своей способностью влиять на морфогенез *Phoma destructiva* [Berg et al., 2003].

Трибакопин AV, полученный из *T. lixii*, эндофита из *Vasopa monnieri*, является новым пептаиболом с уникальной последовательностью (Ac-Gly-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Pro-Leu-Aib-Val-Gln-OH). Было обнаружено, что этот пептаибол обладает активностью в отношении *C. albicans* при МИК 25 мкг/мл [Katoch et al., 2019]. Четыре новых пептаибола с 11 аминокислотными остатками, альбупептины А-D, были выделены из мицелиальной культуры *Gliocladium album* KSH 719.

Альбупептины В и D относятся к редкому классу пептаиболов, которые содержат оба стереоизомера изовалина (Iva) D- и L- конфигурации. Альбупептины проявили умеренную активность в отношении *Bacillus cinerea* и условно-патогенных *Aspergillus* sp. Примечательно, что эффект ингибирования роста *B. cinerea* увеличивался с увеличением количества присутствующих остатков Iva (IC₅₀: один остаток Iva = 49,6 мкг/мл; два остатка Iva = 38,9 мкг/мл; три остатка Iva = 35,2 мкг/мл; четыре остатка Iva = 24,5 мкг/мл). Альбупептин А также не обладал значительной активностью в отношении *Phytophthora infestans* (IC₅₀, 100 мкг/мл), а соединения В-D проявили только незначительную активность (IC₅₀: два остатка Iva = 97,6 мкг/мл; три остатка Iva = 84,7 мкг/мл; четыре остатка Iva = 84,3 мкг/мл) [Otto et al., 2015].

Недавно Т. Марик с соавт. [Marik et al., 2019; Marik et al., 2018.] идентифицировали две новые группы пептаиболов конингиопсины из *Trichoderma koningiopsis*. Они структурно близки к триконингину KAV, который характеризуется наличием колеблющихся правых и левых

спиральных конформаций. Ингибирующей активности экстрактов пептаибола на клинических дрожжах не было выявлено, тогда как условно-патогенные мицелиальные грибы проявляли значительную чувствительность [Marik et al., 2018.]. Пептаиболы с последовательностью из 19 аминокислотных остатков - бревицелсины, продуцируемые тремя видами (*T. flagellatum* SzMC 22608, *T. sinensis* SzMC 22609 и *T. parareesei* SzMC 22615), проявляли ингибирующее действие на условно-патогенные мицелиальные грибы [Marik et al., 2019].

МИК для сферостильбелинов А и В были установлены в размере 2 М для каждого из них в отношении *Cr. neoformans*, 1 М для *A. fumigatus* и 4 М и 2 М, соответственно, для *C. albicans*. Хотелось бы отметить, что при этих концентрациях клетки макрофагов мыши оставались неизменными [Perlatti et al., 2020]. Наконец последняя группа пептаиболов включает в себя эмерициллипсин А из алкалофильного гриба *Emericellopsis alkalina*, продемонстрировавший антифунгальную активность в отношении клинических изолятов *Aspergillus terreus* 1133m, *A. fumigatus* 163m, *A. ochraceus* 497m, *Saccharomyces cerevisiae* 77m и *Cryptococcus laurentius* с множественной лекарственной устойчивостью к флуконазолу и амфотерицину В [Rogozhin et al., 2018; Baranova et al., 2019; Baranova et al., 2017; Kuvarina et al., 2021].

1.6 Механизм действия антимикробных пептидов на патогенные грибы

Характеристика механизма действия АМП необходима для улучшения их активности, предотвращения развития резистентности и возможности их использования в качестве терапевтических средств. АМП могут воздействовать на несколько клеточных мишеней. Катионные АМП взаимодействуют с отрицательно заряженными микробными оболочками [Zasloff et al., 2002]. У грибов клеточная стенка играет ключевую роль в активности АМП. Известно, что АМП воздействуют на клеточную стенку

грибов, ингибируя синтез глюкана или хитина, а также и на маннопротеины клеточной стенки у чувствительных грибов [Buda De Cesare et al., 2020].

Как только АМП диффундируют через клеточную стенку, они сталкиваются с клеточной мембраной. Нарушение плазматической мембраны влияет на распределение, регуляцию, активность и сигнальную функцию мембранных белков. Катионные и амфипатические АМП разрушают липидные клеточные мембраны, вызывая образование пор, потерю биофизических свойств и гибель клеток [Brogden et al., 2005; Guilhelmelli et al., 2013]. Однако пептиды, действующие через литические механизмы, часто очень токсичны для различных типов клеток [Rautenbach et al., 2016]. Поэтому предпочтительны АМП с нелитическим механизмом, такие как проникающие в клетки пептиды (CPPS) [Marcos et al., 2009]. Наиболее известными механизмами действия противогрибковых АМП являются: нарушение целостности клеточной стенки, нарушение клеточной мембраны, активация сигнальных путей, изменение метаболизма, нарушение ионного гомеостаза, дисфункция органелл, нарушение клеточного цикла, повреждение ДНК / нарушение транскрипции окислительный стресс, запрограммированная смерть клетки [Hegedüs et al., 2013; Rautenbach et al., 2016] (Рис. 3).

АМП также могут влиять и на другие процессы, такие как образование вторичных метаболитов, включая микотоксины, что открывает новые аспекты для их будущего использования в сельскохозяйственных культурах, послеуборочных и пищевых процессах. Однако мало что известно об их механизмах, влияющих на образование микотоксинов у фитопатогенных грибов. Исследования влияния на образование микотоксинов ограничены в основном циклопептидами, полученными из бактерий, такими как липопептиды, небольшие белки, богатые цистеином (CRP), которые включают дефензины и противогрибковые усилители грибкового происхождения (AFP), и ненатуральные синтетические пептиды.

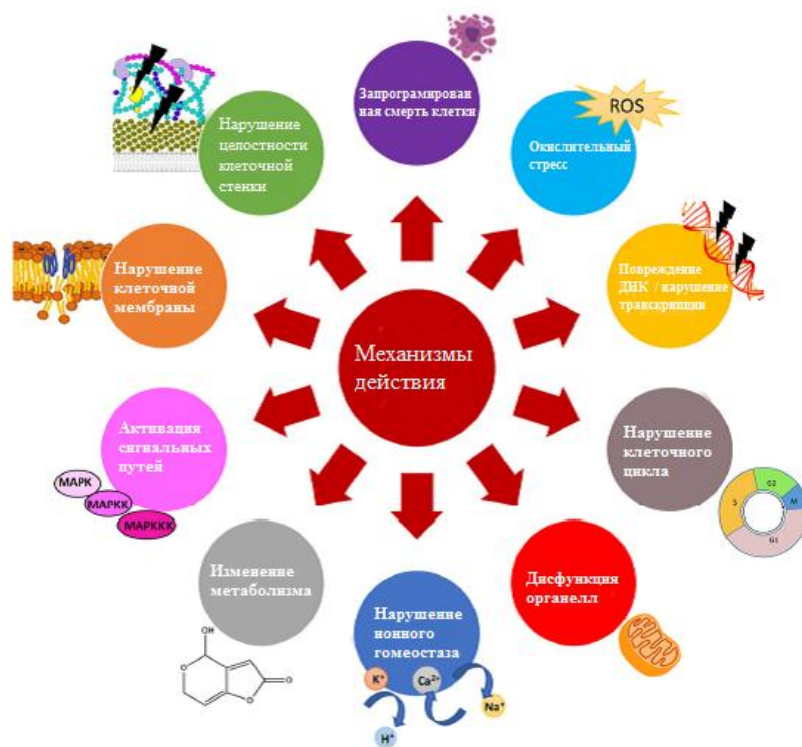


Рисунок 3. Механизмы действия противогрибковых АМП [Rautenbach et al., 2016]

АМП воздействуют на стенки микробных клеток с помощью определенного механизма, который отличается от механизма, используемого для других противогрибковых препаратов. Это эффективно позволяет избежать проблемы высокой токсичности на клетки млекопитающих.

Механизм, с помощью которого противогрибковые и антимикробные пептиды действуют на клеточные стенки, отличается главным образом из-за наличия в их клеточных стенках гликанов [Jenssen et al., 2006]. Клеточные стенки грибов состоят из углеводов (например, глюкана), хитина, гликопротеинов (например, маннопротеинов) и различных белков [García-Rubio et al., 2019]. β -глюканы являются основными полисахаридами в клеточных стенках грибов. Они имеют сетчатую структуру, образованную путем соединения мономеров глюкозы с помощью β -(1,3)- или β -(1,6)-гликозидных связей. Полученная сетчатая структура оказывает поддерживающее действие на клеточные стенки, на ее поверхности имеется большое количество специфических рецепторных участков, которые

помогают грибам распознавать и индуцировать иммунные реакции хозяина [Akramiene et al., 2007]. Некоторые противогрибковые пептиды, например, эхинокандины, являются неконкурентными ингибиторами β -(1,3)-глюкансинтазы, которая влияет на синтез клеточных стенок грибов. Это основной способ действия каспофунгина [Chandrasekar et al., 2002], микафунгина [Wasmann et al., 2018] и анифгина. Полусинтетический липопептид анифгин проявляет свою антибактериальную активность, ингибируя синтеза (1,3)- β -D-глюкана в клеточных стенках грибов рода *Candida* и *Aspergillus*, это позволяет ему оказывать ингибирующее действие на штаммы, устойчивые к азольным или полиеновым противогрибковым препаратам [Martín Mazuelos et al., 2008]. Кроме того, исследования показали, что некоторые соединения семейства эхинокандинов действуют по тому же механизму действия [Debono et al., 1994].

Хитин представляет собой аминополисахарид, состоящий из N-ацетил-D-глюкозаминовых единиц [Cohen, 2001]. Он является важным компонентом клеточных стенок грибов и поэтому может влиять на регуляцию жизнеспособности клеток и иммунного ответа хозяина [Lenardon et al., 2010]. Было обнаружено, что хитин влияет на чувствительность некоторых грибов к противогрибковым препаратам [Walker et al., 2013]. Хитин может индуцировать и активировать различные защитные реакции растений. Чтобы избежать защитных механизмов растений, грибы могут превращать хитин в хитозан в процессе заражения растений [Plaza et al., 2020]. Многие противогрибковые вещества, выделенные из рода *Streptomyces*, действуют на хитин. Например, Н. Мидзухара и др. исследователи выделили циклотиазомицин В1 из *Streptomyces* НА 125-40, который вызывает разрыв клеточных стенок путем связывания с хитином, что приводит к гибели клеток грибов [Mizuhara et al., 2011]. Другими примерами являются никкомицин и полиоксин, которые являются конкурентными ингибиторами хитинсинтазы [Larwood et al., 2020; Zhang, Miller, 1999] и оказывают действие на многие виды патогенных бактерий [Becker et al., 1983; Hector et

al., 1990; Fernandes et al., 2014]. Также было обнаружено, что комбинация никкомицина Z и эхинокандинов оказывает синергический эффект в отношении вида *Aspergillus fumigatus* [Ganesan et al., 2004], что также связано с их действием на хитин [Walker et al., 2013; Walker et al., 2015]. Х.Дж. Ким с соавторами показали, что кроме соединений из стрептомицетов был получен противогрибковый циклический липопептид хромобактомицин из *Chromobacterium* C61, который проявлял антибактериальную активность *in vitro* (путем добавления хитина в среду) [Kim et al., 2014]. Маннан содержится в наружном слое клеточных стенок грибов. Он может быть гликозилирован белками или пептидами с различными адгезионными свойствами, образует макромолекулы маннопротеинов. Он обладает сильными адгезивными свойствами и определяет адгезию грибов к клеткам-хозяевам [Fukazawa et al., 1997]. Кроме того, маннан играет важную роль в иммунном распознавании и вирулентности грибов [Hall et al., 2013]. Активность противогрибкового соединения прадиимицина (PRM) направлена на маннан клеточной стенки.

Существуют две различные физические модели связывания природных АМП с липидными бислоями. Разница между ними заключается в соотношении пептида к липиду, которое определяет чувствительность клеток к АМП. При низком соотношении пептида к липиду АМП связываются с липидными бислоями. С увеличением соотношения пептида к липиду пептид действует вертикально на мембрану и образует поры (такое соотношение пептида называют состоянием I) [Lee et al., 2004]. Соотношение пептида I типа к липиду изменяется в зависимости от состава пептида и целевого липида и описывается тремя различными моделями действия [Lee et al., 2015].

Бочковая модель. В этой модели спиральные пептиды агрегируются внутри стенки и образуют фасцикулярные поры в мембране с центральной полостью [Matsuzaki, 2019]. Амфотерицин В, полиеновый противогрибковый антибиотик, является единственным природным соединением, который с

помощью этого механизма оказывает противогрибковое действие [Yamamoto et al., 2019]. Амфотерицин В направлен на мембранные стеролы, его противогрибковая активность отражается в образовании трансмембранных ионопроницаемых каналов в клеточной стенке с эргостеролом [Matsumori et al., 2009; Mesa-Arango et al., 2014]. Этот механизм объясняет селективную токсичность амфотерицина В [Czub, Baginski, 2006]. Этот механизм взаимодействия нуждается в дальнейшем изучении, хотя и был проверен во многих экспериментах с участием монослоев [Wang et al., 2020] и бислоев фосфолипидов [Umegawa et al., 2012]. Исследования показали, что флуконазол может снижать количественное содержание эргостерола, а его комбинация с амфотерицином В может оказывать антагонистическое действие [Santos et al., 2012]. Пептиды гликоотриазола, полученные Е.Ф.К. Джуниором и др., показали сходные эффекты с флуконазолом. Фунгицидная активность этих пептидов продемонстрирована путем ингибирования биосинтеза эргостерола, это связано с присутствием как моносахаридного, так и триазольного колец [Junior et al., 2017].

Модель ковра. В этой модели пептид покрывает ковром поверхность мембраны и параллельно взаимодействует с мембраной за счет электростатического взаимодействия с анионной фосфолипидной группой. Образование мицелл при высокой концентрации пептида разрушает фосфолипидный бислой [Shai, 1999]. Этот механизм заставляет пептиды лизировать клетки различных микроорганизмов и проявляет токсичность по отношению к нормальным клеткам млекопитающих [Shai, 1999]. К этой группе относится семейство липопептидов сирингомицина, которое синтезирует *Pseudomonas syringae*. Трансмембранные поры, образованные этими липопептидами, проницаемы для катионов и вызывают некроз патогенов. Основная причина гемолиза заключается в том, что они образуют ионные каналы в клеточной мембране и заставляют коллоид растворяться [Hutchison et al., 1995]. Известно, что присутствие холестерина может снижать связывание АМП с различными липидными двухслойными

модельными мембранными системами, тем самым снижая литическую способность этих пептидов на эукариотических клетках [Abraham et al., 2005; Verly et al., 2008] (Рис. 4).

Модель кольцевой поры. В этой модели пептидная спираль сначала встраивается в мембрану, образуя пору, и липидный монослой непрерывно изгибается, пока не пройдет через мембрану. Гидрофильная структура мембраны затем обволакивает две стороны вместе, образуя поровое отверстие тороидальной формы [Christoffersen et al., 2015]. Этот способ действия был широко подтвержден в различных противогрибковых пептидах животного происхождения, таких как мелиттин (обнаруженный в пчелином яде) [Yang et al., 2001] и противомикробный пептид из шпорцовых лягушек (обнаруженный в коже *Xenopus*) [Matsuzaki et al., 1997]. Существует много других противогрибковых пептидов, которые проявляют свою активность, взаимодействуя с мембранами с помощью механизмов, которые ещё полностью не изучены [Li et al., 2021].

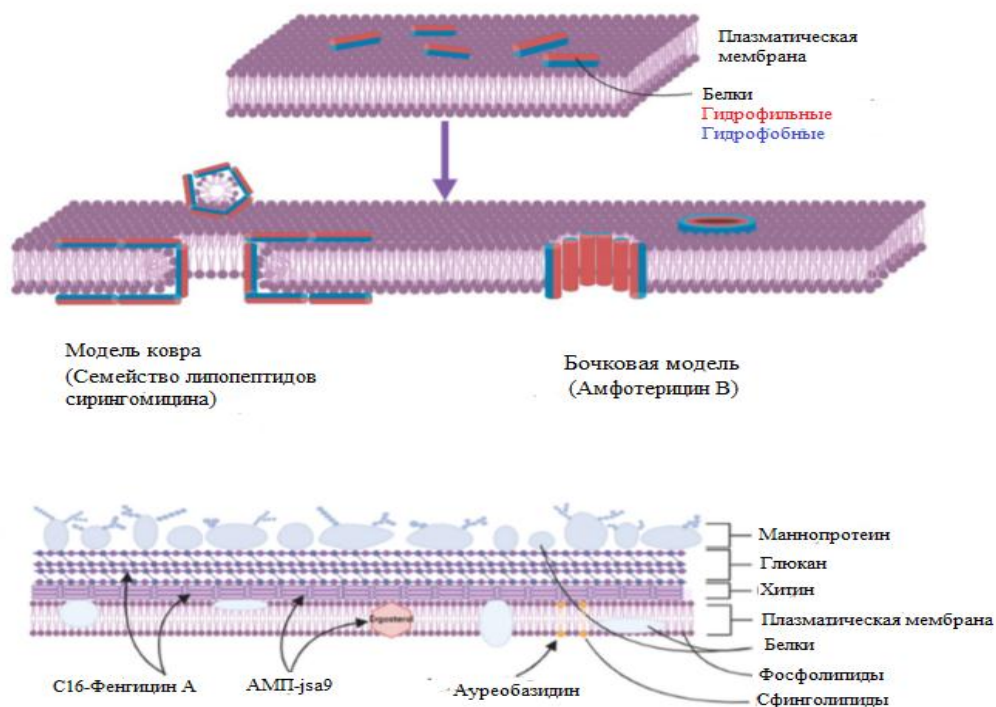


Рисунок 4. Механизм действия АМП. Бочковая модель и модель ковра [Li et al., 2021]

На сегодняшний день большинство АМП, обнаруженных в природе, действуют на клеточные мембраны. Реализация этого действия зависит главным образом от физико-химических свойств противогрибковых пептидов и целевых мембранных тканей, которые являются детерминантами стабильного пептидно-мембранного взаимодействия. Например, электростатическая связь между АМП и поверхностной структурой целевой мембраны, образуется за счет противоположного заряда, которой пептид притягивается к клеточной мембране. Благодаря амфифильной природе антимикробных пептидов, они могут объединяться с липидным бислоем и образовывать различные вторичные структуры (такие как α -спирали, β -листы и так далее). Это необходимо для проявления их активности. Значительной антимикробной активностью обладают только те пептиды, которые могут образовывать высокоамфифильные структуры [Jin et al., 2005], селективность различных конформаций к липидам также различна [Blazyk et al., 2001]. Более того, Р.М. Мартинс и др. в ходе исследования триализина обнаружили, что селективность активных пептидов для конкретных организмов, связана со структурными особенностями их N- и C-концов [Martins et al., 2006]. Кроме линейных конфигураций АМП обычно имеют также кольцевую конформацию, образуют структуру спирали II, внутримолекулярные дисульфидные связи играют важную роль в стабилизации конфигурации [Cabiaux et al., 1994]. Кроме того, гидрофильность и гидрофобность также являются важными свойствами, которые делают АМП не только растворимыми в водной среде, но и позволяют проникнуть в богатую липидами мембрану [Izadpanah et al., 2005]. Это свойство тесно связано с цитотоксичностью и селективностью АМП [Aoki, Ueda, 2013]. Исследователи с целью оптимизации свойств природных АМП (таких, как повышение их стабильности и биоактивности) часто их модифицируют путем гидроксирования, гликозилирования, липидизации и циклизации [Wang, 2012].

Для успешного скрининга необходимо определять физические и химические свойства АМП, выделенных из микромицетов, чтобы в дальнейшем установить их стабильность и принять решение об их применении в качестве антибиотиков. Исследования включают в себя определение их структурной устойчивости к кислотным / щелочным условиям и температуре, действию различных протеаз, ионов металлов, химических реагентов и ультрафиолетового (УФ) света. Важно определить категорию, к которой относится противогрибковое вещество (липopeптид, полипептид, белок и т.д.). Чтобы определить толерантность вещества к кислой/щелочной среде, необходимо определить диапазон рН, в котором активность противогрибкового пептида относительно стабильна. Этот диапазон может находиться в пределах нейтральных [Zhao et al., 2013], кислотных [Rong et al., 2020] / щелочных [Seyedjavadi et al., 2019] условий. Самая высокая противогрибковая активность не всегда проявляется в нейтральной среде. Например, противогрибковый пептид PсРАF наиболее активен в слабокислых средах [Wen et al., 2014]. Самая высокая температура, которую выдерживают большинство противогрибковых пептидов, соответствует 100 °С [Zhang et al., 2017; Wang et al., 2016]. Однако З. Чжао и др. обнаружили активные метаболиты (продуцируемые эндофитной палочкой *Bacillus vallismortis* ZZ185), которые могут сохранять более 50 % своей противогрибковой активности после воздействия температурой 121 °С в течение 30 минут [Zhao et al., 2010]. Поверхностно-активные вещества (например, додецилсульфат натрия и мочевины), органические соединения (например, этилендиаминтетрауксусная кислота, трихлоруксусная кислота, хлороформ) и сульфат аммония обычно используются для проверки стабильности противогрибковых пептидов. Исследователи обычно выбирают противогрибковые пептиды, которые не чувствительны к этим химическим веществам [Ramachandran et al., 2014]. Более того, некоторые активные вещества проявляют более высокую активность и стабильность в присутствии поверхностно-активных веществ [Schmidt et al., 2012]. Многие

другие химические соединения также широко используются при разделении и очистке противогрибковых пептидов, поэтому необходимо убедиться, что выбранный метод разделения не влияет на активность противогрибкового соединения. Чтобы проверить противогрибковое вещество на устойчивость к ультрафиолетовому излучению, вещество облучают ультрафиолетовым излучением в разное время и в разных дозах [Shokri et al., 2014]. Для выявления стабильности протеазы, часто определяется антидеградационное действие противогрибкового пептида на протеазу К, папаин, пепсин, трипсин и т.д. Чувствительность различных противогрибковых пептидов к этим веществам различна, что является основным показателем, используемым для оценки категории, к которой относится противогрибковый пептид [Yan et al., 2018; Tan et al., 2013; Wu et al., 2005].

Знание механизмов действия в сочетании с результатами анализа структуры природных противогрибковых пептидов дает информацию для получения новых соединений с более сильной противогрибковой активностью и меньшей токсичностью для хозяина. Однако в настоящее время знания о механизмах, с помощью которых функционируют противогрибковые пептиды, не являются полными. Например, с помощью участков D-маннозида в клеточных стенках *Candida albicans*, образующих тройной комплекс прадимицина, D-маннозида и кальция, происходит разрушение целостности клеточной мембраны грибка и достигается противогрибковый эффект [Walsh et al., 1997]. Этот механизм наделяет его широким спектром противогрибковой активности *in vitro* в отношении видов *Candida species*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus species*, дерматозных плесеней и т.д. Он также не обладает значительной токсичностью и хорошим терапевтическим индексом. Новый класс противогрибковых соединений проходит доклинические и ранние клинические испытания I фазы [Walsh et al., 1997]. PRM также может индуцировать апоптоз клеток у *Saccharomyces cerevisiae* посредством накопления активных форм кислорода [Hiramoto et al., 2003], а также может воздействовать осмотически на сайт N-

гликозилирования чувствительного белка Sln1 и, таким образом, проявлять бактерицидную активность [Hiramoto et al., 2005]. Было обнаружено, что бенаномидин и другие представители этого же семейства действуют через аналогичный противогрибковый механизм (связывание участков маннана клеточной стенки) [Yasuoka et al., 1995].

1.7 Метод иммобилизации микроорганизмов на полимерных подложках для получения биологически активных веществ

Одним из перспективных методов культивирования для получения биологически активных метаболитов микроорганизмов является способ культивирования с иммобилизацией. Иммобилизация – физическое разделение биообъекта (клетка, фермент) и растворителя, то есть биообъект закреплен на нерастворимом носителе, а субстрат и продукты свободно обмениваются между биообъектом и растворителем.

Исследованиями по иммобилизации клеток микроорганизмов стали активно заниматься в 70-е годы XX века, особенно в Японии. В 1974 г японские ученые первыми получили в промышленных масштабах иммобилизованные клетки для получения аспарагиновой кислоты. С помощью иммобилизации клеток грибов рода *Aspergillus* получают лиазные и коллагенрасщипляющие ферменты [Патент №18919, 2007].

Одним из важнейших условий проведения иммобилизации является правильный выбор носителя, который должен соответствовать ряду требований. Чаще всего используют полимерные носители. Для данных видов носителей характерна высокая химическая и механическая прочность, большая удельная поверхность, пористость, достаточная проницаемость для субстрата и аэрируемого воздуха, невысокая стоимость [Березин и др., 1987]. Иммобилизация на полимерном носителе позволяет в несколько раз снизить затраты на выделение и очистку целевого продукта.

Наряду с полимерными носителями для иммобилизации мицелия можно использовать в качестве мембран и подложек растительные субстраты. При культивировании продуценты не только иммобилизуются на

растительном субстрате, но и используют его в качестве источника питания [Громовых и др., 2018; Патент RU 2707541, 2019; Гаврюшина и др., 2020].

Аналогом растительной целлюлозы является бактериальная целлюлоза. Бактериальная целлюлоза представляет собой полимер, состоящий из элементарных звеньев D-глюкозы, которые соединены между собой 1,4-β-гликозидными связями в линейные неразветвленные цепи. По структуре имеет сходство с целлюлозой растений, но различается по числу глюкозных остатков и степени полимеризации мономеров. Степень полимеризации бактериальной целлюлозы составляет 2-6 тыс. остатков глюкозы. В бактериальной целлюлозе содержится только целлюлоза в чистом виде без содержания примесей лигнина, гемицеллюлоз, пектина и восков. Это очень важный факт для применения бактериальной целлюлозы в различных областях, потому что ее состав представлен 99,8 % воды и 0,2 % инертного полисахарида [Gayathry et al., 2014].

Молекулы бактериальной целлюлозы имеют нитевидную форму, объединяются в мицеллы и формируют микрофибриллы диаметром 15–20 нм. Микрофибриллы образуют макрофибриллы, диаметр которых 50–100 нм. Длина макромолекулы бактериальной целлюлозы от 1 μм до 9 μм. Макрофибриллы имеют вид целлюлозы Iα и Iβ. В бактериальной целлюлозе содержится в большом количестве тип Iα, который составляет 60% [Bielecki et al., 2005].

Бактериальная целлюлоза обладает рядом уникальных свойств. Она прозрачная, эластичная, упругая, прочная. Пористость обеспечивает ей хорошую аэрацию. Имеет высокую чистоту, высокую степень кристалличности, её плотность составляет от 300 до 900 кг/м³, высокую способность удерживать влагу от 96 до 98,2 %. Полимер является наноматериалом, имеющем микропоры размером от 5x10 до 50x100 нм, на котором хорошо иммобилизуются клетки прокариот и эукариот. Также бактериальная целлюлоза нетоксична и биосовместима [Lu et al., 2014].

Впервые в 1886 году А. Г. Брауном было обнаружено, что бактерия *aceti* (*Acetobacter xylinum* или *Gluconoacetobacter xylinum*), которая в то время считалась основным продуцентом уксусной кислоты, продуцирует жесткую студенистую пленку чистой целлюлозы [Brown, 1886; Bielecki et al., 2005].

Известно несколько родов бактерий способных синтезировать бактериальную целлюлозу, такие как *Gluconacetobacter*: *G. kombuchae*, *G. intermedius*, *G. swingsii*, *G. rhaeticus*, *G. nataicola*, *G. oboediens*, *G. europaeus*, *G. hansenii*, *G. entanii*; *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Zooglea* и цианобактерии. Повышенный интерес к себе привлекают представители рода *Gluconacetobacter*: *G. xylinus*, *G. hansenii*, *G. kombuchae*, *G. intermedius* и др. С развитием науки, открывается возможность использования этих штаммов в различных современных отраслях, получить новые полимеры, которые можно будет использовать в нанотехнологии, а также создавать новые различные материалы для подложек [Debasree et al., 2007; Neera et al., 2015].

Заключение по обзору:

Ученые активно ведут поиск новых молекул среди природных и химически синтезированных пептидов для борьбы с патогенными микроорганизмами, однако пока лишь некоторые из них были переведены на коммерческую основу. Это связано с некоторыми существенными недостатками природных и химически синтезированных АМП. К таким недостаткам можно отнести короткий период полураспада из-за чувствительности к расщеплению протеазой, потеря активности при физиологических концентрациях солей, цитотоксичность для клеток-хозяев, отсутствие соответствующих стратегии для устойчивой и целевой доставки АМП. К недостаткам также можно отнести их ограниченный синтез природными источниками, неэкономичный химический синтез для длинных последовательностей АМП, короткий период полураспада природных АМП из-за системной токсичности, связанной с деградацией протеаз, проблемы с доставкой на целевой сайт-мишень. Несмотря на это, на сегодняшний

момент они признаны как многообещающий альтернативный класс новых соединений для борьбы с антибиотикорезистентностью.

Открытие новых пептаиболов среди продуцентов микроскопических грибов из морских глубин, из грибов, обитающих в холодных и засоленных почвах, а также из других уникальных экстремальных местообитаний расширяет возможности поиска новых пептидных антибиотиков из природных источников. В этот обзор мы включили информацию о некоторых недавно описанных пептидах, выделенных из экстремофильных грибов. Наличие Aib, которая придает устойчивость к протеазам патогена, делает эти эксклюзивные пептидные антибиотики предпочтительными для фармакологических исследований. Несомненно, они будут играть важную роль в дальнейших разработках лекарственных соединений.

Хорошо известно, что основным молекулярным механизмом действия пептаиболов является мембранно-активный механизм, а линейная полипептидная цепь образует пространственную спиральную структуру. Можно предположить, что все пептаиболы с антифунгальной активностью также обладают цитотоксической активностью в отношении раковых клеток, что, однако, требует экспериментального подтверждения. Доступность сложных биохимических методов и активное использование биоинформатики для изучения открытия новых молекул и расшифровки их структуры, моделирование синтетических пептидов, использование синергетических эффектов двух или более пептаиболов для успешного лечения заболеваний открывают новые возможности для дальнейших исследований этой группы соединений.

Будущие исследования должны быть сосредоточены на изучении новых противогрибковых пептидных источников и на разработке новых противогрибковых препаратов с высокой активностью и низкой токсичностью. Необходимо будет провести скрининг и очистку выделенных противогрибковых пептидов, определить взаимосвязь их структуры и антимикробной активности, найти способы их искусственного синтеза. С

целью получения более эффективных, стабильных и безопасных противогрибковых пептидов, встречающиеся в природе противогрибковые пептиды могут быть структурно модифицированы с использованием методов генной инженерии и биоинформатики. Разработка систем доставки лекарств и использование новых комбинаций лекарств являются важными направлениями для лечения грибковых инфекций. Общая цель должна состоять в разработке противогрибковых биологических препаратов, которые будут использоваться в клинике в целях профилактики и лечения.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Схема исследования

Для выполнения работы была разработана схема проведения исследования (Рис. 5).

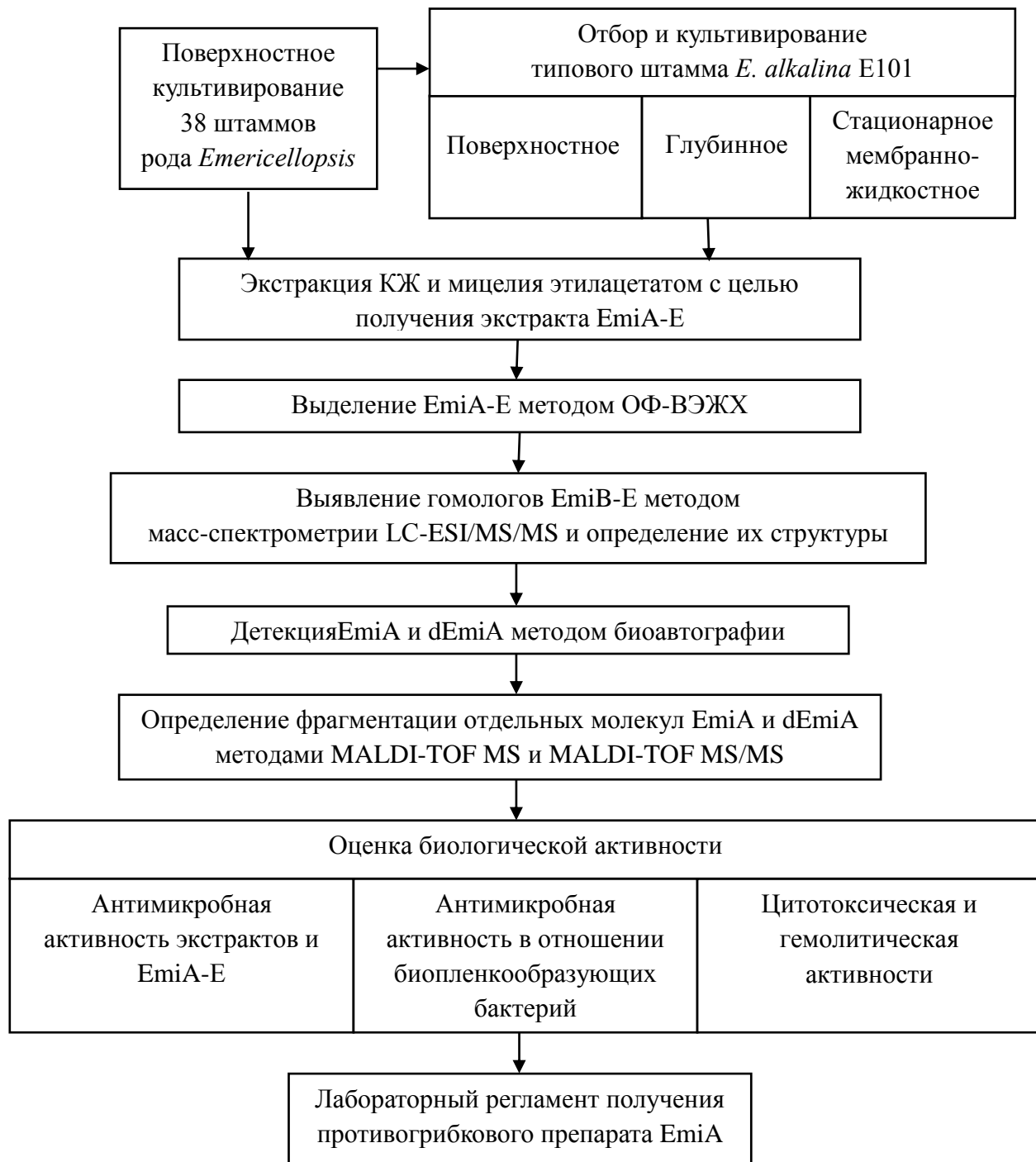


Рисунок 5. Блок-схема исследования

2.2 Объекты исследования

Объектами исследования были 38 алкалофильных и алкотолерантных изолятов рода *Emericellopsis* выделенных из содовых солончаков Кулундинской степи, Забайкалья и Северо-Восточной Монголии из коллекции культур «Грибы экстремальных местообитаний» кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Штамм *Emericellopsis alkalina* A118 (ВКПМ F-1428) (*Hypocreales, Ascomycota*), ранее отобранный и депонированный в ВКПМ как продуцент EmiA, использовали как контрольный для сравнения по содержанию антибиотика (Рис. 6).

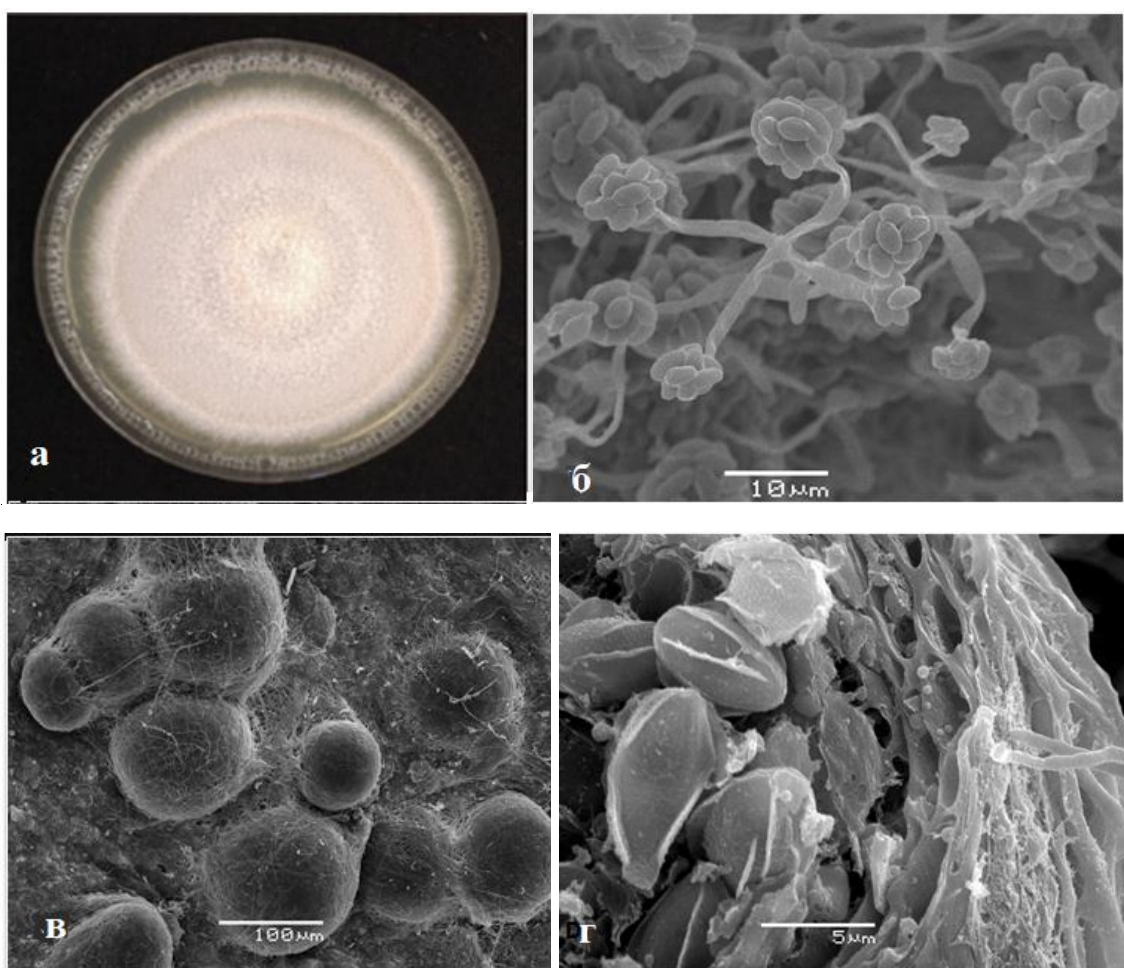


Рисунок 6. Макро и микроморфология штамма ВКПМ F-1428 *Emericellopsis alkalina*: а – рост культуры на сусло-агаре, б – конидиальное спороношение, в – плодовые тела, г – вскрывшееся плодовое тело с аскоспорами

Все штаммы рода *Emericellopsis* были выделены из почв, прилегающих к содовым или соленым озерам (Таблица 2), и все они показали способность к росту на щелочной агаризованной и жидкой щелочной среде при pH 10.5. Морфологические исследования штаммов проводились методом сканирующей электронной микроскопии (SEM). Изоляты были охарактеризованы также на основе анализа мультилокусных последовательностей ДНК, т.е. рДНК с большой субъединицей, внутренние транскрибируемые спейсеры 1 и 2, включая 5.8S рДНК, RPB2, TEF1- и -tub. Определения таксономического статуса штаммов, сделанные во время описания видов, подтвердили, что 32 штамма, использованные в этой работе, принадлежали к виду *Emericellopsis alkalina* (NCBI: txid1419734). Некоторые из изолятов были депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, Пущино, Россия) и Российской национальной коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, Москва). 4 штамма 1KS17-1, 3KS17-1, 3KS17-2 и 3KS17-12 были отнесены в морскую кладу, 2 штамма 1KS17-4, 2KS17-1 в наземную кладу. Два штамма 1KS17-1 и 2KS17-1 из морской клады были идентифицированы как *Emericellopsis cf. maritima*, так как они близки к известному типовому штамму *E. maritima* (CBS 491.71).

Штамм 1KS17-4 из наземной клады был идентифицирован как *Emericellopsis cf. terricola*, так как он входит в группу известного штамма *E. terricola* (CBS 124.42). Остальные штаммы из засоленных почв образуют свои клады в линии *Emericellopsis*, не попадая в ранее известные, поэтому они идентифицированы как *Emericellopsis* sp.

Штамм 1KS17-4 из наземной клады был идентифицирован как *Emericellopsis cf. terricola*, так как он входит в группу известного штамма *E. terricola* (CBS 124.42). Остальные штаммы из засоленных почв образуют свои клады в линии *Emericellopsis*, не попадая в ранее известные, поэтому они идентифицированы как *Emericellopsis* sp.

Таблица 2. Штаммы алкалофильных грибов рода *Emericellopsis*, характеристика мест изоляции культур типа [Kuvarina et al., 2022]

№	Номер штаммов; номер коллекций ВКМ, ВКПМ	Номер в Генбанке	Зона изоляции	Место изоляции	pH почвы	Общее содержание солей	
Содово-хлоридный тип засоления почвы							
1	A118, F-1428	KC987155	Кулундинская степь, Алтай, Россия	Озеро Желтыр	9,6	137,0	
2	M20, FW-3040, CBS 120044	KC987169			9,6	137,0	
Содовый тип засоления почвы							
3	E101, F-4108, CBS 127350T	KC987171	Кулундинская степь, Алтай, Россия	Озеро Танатар-II	10,1	73,0	
4	A121, VKM FW-1475	KC987158			10,2	73,0	
5	5KS17-3, SLF 117.0503	OM489388			11,0	73,0	
6	6KS17-1, SLF 117.0601	OM489390			11,0	73,0	
7	7KS17-1, SLF 117.0701	OM489391			11,0	73,0	
8	8KS17-1, SLF 117.0801	OM489392			11,0	73,0	
9	9KS17-3, SLF 117.0903	OM489389			11,0	73,0	
10	10KS17-1, SLF 117.1001	OM489393			11,0	73,0	
11	14KS17-1, SLF 117.1401	OM489394			Озеро Танатар I	11,0	-
12	A120	KC987157			Озеро Безымянное	9,9	310,0
13	M14, F-3905, CBS 120043	KC987168		9,9		310,0	
14	A123	KC987160		Солончаки	-	-	
15	A124	KC987161		юг, Бердабай	10,1	60,0	
16	6KS10-2, SLF 110.0602	OM489386		юг	9,8	48,0	
17	A112	KC987149		Северо-Восточная Монголия	Озеро Бурд	10,1	33,0
18	A113, FW-1476	KC987150		Район Чойбалсан, Северо-Восточная Монголия	Солончаки	11,0	57,0

19	A125	KC987162	Забайкалье, Россия	Озеро Нуху-Нур	10,1	7,1
20	A126, FW-1472	KC987163			10,1	1,9
21	A127	KC987164			10,1	1,9
Содово-хлоридно-сульфатный тип засоления почвы						
22	A103	KC987140	Кулундинская степь, Алтай, Россия	Озеро Мирабилит	9,6	100,0
23	A116	KC987153			9,6	100,0
Хлоридный тип засоления почвы						
24	A114, FW-1473	KC987151	Кулундинская степь, Алтай, Россия	Озеро Соляное	10,0	187,0
25	A122	KC987159		Солончаки	9,5	65,0
26	3KS17-13, SLF 117.0313	OM489387		Озеро Малиновое	8,0	350,0
27	2KS17-1*, SLF 117.0201	OM489383			7,5	350,0
28	3KS17-1*, SLF 117.0301	OM489384			8,0	350,0
29	3KS17-2*, SLF 117.0302	OM489385			8,0	350,0
30	3KS17-12*, SLF 117.0312	OM489380			8,0	350,0
31	1KS17-1*, SLF 117.0101	OM489381		Озеро Кулундинское	8,5	200,0
32	1KS17-4*, SLF 117.0104	OM489382			8,5	200,0
Хлоридно-сульфатный тип засоления почвы						
33	A115, FW-1474	KC987152	Кулундинская степь, Алтай, Россия	Солончаки	9,6	225,0
34	A117, FW-1471	KC987154		Озеро Шукуртуз	9,9	53,0
35	A119	KC987156		Озеро Безымянное	10,1	38,0
Сульфатно-содовый тип засоления почвы						
36	A128	KC987165	Забайкалье, Россия	Озеро Сульфатное	10,3	139,4
37	M71, F-3907, CBS 120049	KC987170			10,3	139,0
Не определенный тип засоления почвы						
38	1KS18-5, SLF 118.0105	OM489395	Кулундинская степь, Алтай, Россия	Озеро Танатар IV	9,0	3,0

Все изоляты относятся к *E. alkalina*, за исключением тех, которые отмечены звездочкой (*).

- Нет данных

В качестве продуцента бактериальной целлюлозы использовали штамм *Glucanacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547). Штамм *G. hansenii* GH-1/2008 был выделен из культуры «чайного кваса» в ГОУ ВПО Московском государственном университете прикладной биотехнологии (МГУПБ). Штамм – подвижные грамотрицательные бактерии цилиндрической формы, расположенные поодиночке, в парах, в коротких цепочках или в небольших кластерах, спор не образуют. Размер клеток составляет 0,6-1,2×1-3 мкм. Колонии бледные, пигменты не продуцирует. Методом анализа 16S РНК штамм был идентифицирован до вида [Патент RU 2464307, 2012].

2.3 Методы исследования

2.3.1 Питательные среды

1. При культивировании штаммов *E. alkalina* и родственных видов в различных биотехнологических условиях использовали жидкую щелочную среду. Состав, г/л: минеральная основа (Na_2CO_3 – 24,0; NaHCO_3 – 6,0; NaCl – 6,0; KNO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0) и органическая основа (дрожжевой экстракт – 1,0; солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 30,0). Минеральную и органическую основы стерилизовали отдельно в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121 °С в течение 30 мин. После стерилизации Минеральную и органическую основы объединяли при температуре 50 °С [Георгиева и др., 2009].

2. При культивировании типового штамма *E. alkalina* E101 при различных значениях рН от 7,0 до 10,0 в поверхностных и глубинных условиях культивирования использовали жидкие щелочные среды (буфер и органическая основа). Буферы и органическую основу стерилизовали отдельно в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121°С в течение 30 мин. После стерилизации буферы и органическую основу объединяли при температуре 50°С.

При $pH=7,0$. Состав, г/л: буфер (0,1М раствор $C_6H_8O_7$ – 19,21; 0,2М раствор $HNa_2O_4P \times 12H_2O$ – 71,63) и органическая основа (дрожжевой экстракт – 1,0; солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 30,0).

При $pH=9,0$. Состав, г/л: буфер (0,1М раствор Na_2CO_3 – 10,6; 0,1М раствор $NaHCO_3$ – 8,1) и органическая основа (дрожжевой экстракт – 1,0; солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 30,0).

При $pH=10$. Состав питательной щелочной среды как 1 пункте.

3. При хранении штаммов *E. alkalina* и родственных видов использовали агаризованную щелочную среду. Состав, г/л: минеральная основа (Na_2CO_3 – 24,0; $NaHCO_3$ – 6,0; $NaCl$ – 6,0; KNO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0) и органическая основа (дрожжевой экстракт – 1,0; солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 30,0; агар-агар – 20,0). Минеральную и органическую основы стерилизовали отдельно в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121 °С в течение 30 мин. После стерилизации Минеральную и органическую основы объединяли при температуре 50 °С [Георгиева и др., 2009].

4. При хранении и культивировании штамма-продуцента бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* использовали жидкую синтетическую среду Н-5. Состав, г/л: сахароза – 70,0; дрожжевой экстракт – 5,0; Na_2HPO_4 – 2,7; K_2HPO_4 – 2,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 3,0; моногидрат лимонной кислоты – 1,15. Питательную среду стерилизовали в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121 °С в течение 30 мин [Патент RU 2464307, 2012].

3. При культивировании грибных тест-культур использовали агаризованную среду Сабуро и бактериальных тест-культур МПА и агаризованную среду LB, бульон Мюллера-Хинтона. Питательные среды стерилизовали в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121 °С в течение 30 мин. Ниже приведен состав питательных сред:

Среда МПА, г/л: мясо-пептонный бульон – 30,0; агар-агар – 20,0 [Биргер, 1982].

Среда Сабуро, г/л: сахароза – 40,0; пептон – 10,0; агар-агар – 20,0 [Sabouraud, 1892].

Среда LB, г/л: триптон – 10,0; NaCl – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; агар-агар – 20,0 [Lennox, 1955].

Бульон Мюллера-Хинтона, г/л: вытяжка из говядины – 300; гидролизат казеина кислотный – 17,5; крахмал растворимый – 1,5 [Mueller, Hinton, 1941].

4. При культивировании клеточных линий использовали готовые питательные среды RPMI 1640 [Atlas, Snyder, 2006] и DMEM (модифицированная по Дальбекко среда Игла) [Atlas, Snyder, 2006]. Ниже приведен состав питательных сред:

Среда RPMI 1640, г/л: D-глюкоза – 2,0; глутатион – 0,001; феноловый красный х Na – 0,0053; Ca(NO₃)₂·4H₂O – 0,1; MgSO₄·7H₂O – 0,04884; KCl – 0,4; NaHCO₃ – 2,0; NaCl – 6,0; Na₂HPO₄ – 0,8; L-аргинин х HCl – 0,2; L-аспарагин – 0,05; L-аспарагиновая кислота – 0,02; L-цистин х 2 HCl – 0,0652; L-глутаминовая кислота – 0,02; L-глутамин – 0,3; глицин – 0,01; L-гистидин х HCl х H₂O – 0,015; гидрокси-L-пролин – 0,02; L-изолейцин – 0,05; L-лейцин – 0,05; L-лизин х HCl – 0,04; L-метионин – 0,015; L-фенилаланин – 0,015; L-пролин – 0,02; L-серин – 0,03, L-треонин – 0,02, L-триптофан – 0,005, L-тирозин – 0,02184, L-валин – 0,02; D-биотин – 0,0002; хлорид холина – 0,003; фолиевая кислота – 0,001; мио-инозитол – 0,035; ниацинамид – 0,001; p-аминобензойная кислота – 0,001; D-пантотеновая кислота х ½ Ca – 0,00025; пиридоксин х HCl – 0,001; рибофлавин – 0,0002; тиамин х HCl – 0,001; витамин B12 – 0,000005 [Atlas, Snyder, 2006].

Среда DMEM, г/л: D-глюкоза – 1,0, феноловый красный х Na – 0,0159; пируват натрия – 0,11; CaCl₂ – 0,2; нонагидрат железа – 0,0001; MgSO₄·7H₂O – 0,09767; KCl – 0,4; NaHCO₃ – 3,7; NaCl – 6,4; Na₂HPO₄ – 0,109; L-аргинин х HCl – 0,084; L-цистин х 2 HCl – 0,0626; L-глутамин – 0,584; глицин – 0,03; L-гистидин х HCl х H₂O – 0,042; L-изолейцин – 0,105; L-лейцин – 0,105; L-

лизин х HCl – 0,146; L-метионин – 0,03; L-фенилаланин – 0,066; L-серин – 0,042, L-треонин – 0,095; L-триптофан – 0,016; L-триозин х 2 Na х 2 H₂O – 0,10379; L-валин – 0,094; хлорид холина – 0,004; фолиевая кислота – 0,004; мио-инозитол – 0,0072; ниацинамид – 0,004; D-пантотеновая кислота х ½ Ca – 0,004; пиридоксин х HCl – 0,004; рибофлавин – 0,0004; тиамин х HCl – 0,004 [Atlas, Snyder, 2006].

2.3.2. Поддержание жизнеспособности культур

Культуры грибов рода *E. alkalina* и родственных видов пересекали на агаризованную щелочную среду [Георгиева и др., 2009]. Инкубировали при температуре 28 °С в термостате («Binder», Германия) в течении 5-7 суток. Культуры грибов хранили при температуре от 0 до 4 °С.

Культуру штамма-продуцента бактериальной целлюлозы штамма *G. hansenii* GH-1/2008 пересекали в пробирки с жидкой синтетической средой Н-5 [Патент RU 2464307, 2012]. Предварительно удаляли пленку, отбирали 1 мл культуральной жидкости и вносили в пробирку с жидкой синтетической средой Н-5 объемом 9 мл, затем добавляли 100 мкл этанола. Инкубировали при температуре 27 °С в термостате в течении 7-10 суток. Культуру *G. hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) хранили при температуре от 0 до 4 °С.

2.3.3 Подготовка матрицы бактериальной целлюлозы

В качестве продуцента для наращивания пленок бактериальной целлюлозы использовали штамм *G. hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547). Культивирование штамма-продуцента бактериальной целлюлозы *G. hansenii* GH-1/2008 осуществляли в стационарных условиях при температуре 27 °С в течение 14 суток на жидкой синтетической среде Н-5 [Патент RU 2464307, 2012] в колбах Эрленмейера. После культивирования полученную матрицу бактериальной целлюлозы отделяли от культуральной жидкости, отмывали ее от клеток продуцента в течение 2 суток 0,1М раствором NaOH, а затем отмывали в течение 3 суток дистиллированной водой [Moniri et al., 2017]. Отмытую матрицу бактериальной целлюлозы высушивали в лиофильной

сушилке («Labconco», Германия) и стерилизовали в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 120 °С в течение 30 мин.

2.3.4 Идентификация штаммов грибов и филогенетический анализ

Молекулярную идентификацию штаммов грибов проводили на основе ПЦР-амплификации внутреннего транскрибируемого спейсерного участка рДНК (ITS) грибов с использованием праймеров ITS1f и ITS4r. Геномную ДНК выделяли с помощью набора реагентов DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen Inc., США) в соответствии с инструкциями производителя. Конечный объем 50 мкл смеси для ПЦР включал: 25 мкл 2X PCR Master Mix (ThermoScientific, США), 0,5 мкМ каждого праймера, 1-100 нг выделенной ДНК и воду (без нуклеазы). ПЦР проводили по следующей схеме: 1 – 94 °С – 5 мин, 2-33 цикла с чередованием температурных интервалов 94 °С – 1 мин, 51 °С – 1 мин, 72°С – 1 мин, (3) 72°С – 7 мин. Фрагменты ДНК секвенировали методом Сэнгера на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Series. Вновь сгенерированные последовательности были депонированы в Gen-Bank с соответствующими инвентарными номерами. Чтобы проанализировать таксономию наших штаммов, была выполнена филогенетическая реконструкция, включающая 24 последовательности из штаммов *Emericellopsis* или типовых культур. Выравнивания были рассчитаны через онлайн-сервер MAFFT v. 7.429 с использованием стратегии L-INS-I. Выравнивание тщательно проверялось визуально и корректировалось вручную; все неоднозначные разделы были исключены из анализа. Филогенетические деревья были выведены с использованием метода максимального правдоподобия (ML). Перед анализом наиболее подходящая модель замещения для выравнивания оценивалась на основе информационного критерия Акаике (AIC) с использованием веб-службы IQ-TREE. Для набора данных ITS была выбрана модель «TIM2e plus Gamma», а программа RAxML вер. 7.0.3 использовалась для эвристического поиска.

2.3.5 Культивирование штаммов рода *Emericellopsis* в различных биотехнологических системах

Поверхностное культивирование

Культивирование 32 штаммов вида *E. alkalina* и 6 штаммов близкородственных видов осуществляли в термостате («Binder», Германия) в стационарных условиях при температуре 28 °С в течение 14 суток в колбах Эрленмейера на жидкой щелочной среде, разработанной ранее [Георгиева и др., 2009]. В качестве посевного материала использовали 5-суточную культуру гриба *E. alkalina*, выращенную на агаризованной щелочной среде.

Глубинное культивирование

Для штамма *E. alkalina* E101 с целью сравнения выхода пептидов EmiA-E проводили глубинное культивирование в шейкере-инкубаторе («Innova 40R», США) в течение 14 суток при температуре 28 °С, 105 об/мин на жидкой щелочной среде [Георгиева и др., 2009]. В качестве посевного материала использовали суспензию спор *E. alkalina* E101 плотностью $0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл по 1 мл на колбу.

Культивирование при различных значениях pH

С целью сравнения выхода EmiA проводили поверхностное культивирование в колбах Эрленмейера и глубинное культивирование в шейкере-инкубаторе («Innova 40R», США) (105 об/мин) штамма *E. alkalina* E101 при различных начальных значениях pH (7,0, 9,0 и 10,0) в динамике на 7, 14 и 21 сутки при температуре 28 °С.

В качестве посевного материала при поверхностном культивировании использовали 5-суточную культуру гриба *E. alkalina* E101. Мицелий и споры отделяли от культуральной жидкости центрифугированием. При глубинном культивировании в качестве посевного материала использовали суспензию спор *E. alkalina* E101 плотностью $0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл по 1 мл на колбу.

Стационарное мембранно-жидкостное культивирование

Алкалофильные грибы *E. alkalina* являются одними из важнейших доминантов на побережье содовых и соленых озер. Поскольку большинство

озер неглубокие, с непостоянной линией уреза воды, а в некоторых случаях озера могут полностью высыхать в летний период, организмы, обитающие на их побережье, приспособлены к условиям микроаэрофилии и в природе часто растут на пленках из цианобактериальных матов. Моделирование природных условий для выращивания продуцента на бактериальных пленках может способствовать увеличению синтеза целевых компонентов, в том числе антибиотиков.

С целью увеличения выхода основного вещества EmiA и получения гомологов проводили культивирование наиболее активного и продуктивного по выходу EmiA типового штамма *E. alkalina* E101 в экспериментальном ферментере [Шаркова и др., 2016], сконструированном по авторским чертежам, разработанным д.б.н. А.В. Кураковым в МГУ им. М.В. Ломоносова. Ферментер имеет вход для добавления питательной среды и выход для метаболитов (Рис. 7).



Рисунок 7. Экспериментальный ферментер

В ламинарном боксе в ферментер наливали 100-120 мл стерильной щелочной среды, на металлическую решетку помещали лиофильно-высушенную матрицу бактериальной целлюлозы диаметром 10 см, толщиной 1 мм. В качестве посевного материала использовали 1 мл суспензии спор *E. alkalina* E101 плотностью $0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл. Культивировали в течение 14 суток при температуре 28 °С.

2.3.6 Отделение культуральной жидкости от мицелия

Биомассу мицелия отделяли от культуральной жидкости на фильтровальной установке, которая состоит из воронки Бюхнера, колбы Бунзена и вакуумного насоса. Измеряли рН культуральной жидкости до экстракции. Массу мицелия определяли на аналитических весах («Ohaus», Китай). Мицелий, полученный в условиях мембрано-жидкостного культивирования, от матрицы бактериальной целлюлозы не отделяли.

2.3.7 Экстракция EmiA-E из культуральной жидкости и мицелия

Экстракцию эмерициллипсинов проводили из культуральной жидкости (КЖ) и мицелия.

Экстракция эмерициллипсинов из культуральной жидкости

Искомое вещество из культуральной жидкости экстрагировали этилацетатом в соотношении 1:5 (органический растворитель : КЖ). Экстракцию из культуральной жидкости проводили трижды в делительной воронке. Упаривали жидкую фракцию на роторном испарителе («Rotavapor Rbüchi», Швейцария) при температуре 42 °С до сухого остатка. Полученный сухой остаток взвешивали на аналитических весах («Ohaus», Китай). Сухой остаток растворяли в 50 %-ном водном этаноле и обрабатывали на ультразвуковой установке 60 Гц при температуре 22 °С («Elmasonic S10H», Германия) в течение 1 мин. Получили обогащенный водно-спиртовой концентрат комплекса эмерициллипсинов.

Экстракция эмерициллипсинов из мицелия

Мицелий измельчали механически до размеров частиц 1 мм. При экстракции искомого вещества из мицелия в качестве экстрагента использовали этилацетат в соотношении 1:2, экстрагировали в течение 24 часов, затем обрабатывали на ультразвуковой 60 Гц при температуре 22 °С («Elmasonic S10H», Германия) в течение 40 мин. Далее отделяли мицелий фильтрованием. Упаривали жидкую фракцию на роторном испарителе («Rotavapor Rbüchi», Швейцария) при температуре 42 °С до сухого остатка. Полученный сухой остаток взвешивали на аналитических весах (Ohaus,

Китай). Сухой остаток растворяли в 50 %-ном водном этаноле и обрабатывали на ультразвуковой установке 60 Гц при температуре 22 °С («Elmasonic S10H», Германия) в течение 1 мин. Получили обогащенный водно-спиртовой концентрат эмерициллипсинов.

2.3.8 Выделение EmlA-E методом ОФ-ВЭЖХ

Обогащенный водно-спиртовой концентрат эмерициллипсинов центрифугировали в центрифуге (Beckman Coulter Microfuge ® 22R) при комнатной температуре со скоростью 14 000 об/мин в течение 7 мин. Осадок удаляли, а надосадочную жидкость использовали для проведения ВЭЖХ-анализа. Выделение EmlA-E проводили с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), метод основан на гидрофобности эмерициллипсинов. Обогащенный концентрат эмерициллипсинов наносили на колонку XBridge ВЕН 4,6×250 мм («Waters», Ирландия) с неподвижной фазой C18 и осуществляли фракционирование в градиенте повышения концентрации ацетонитрила в воде с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты: 16-28 % – за 12 мин; 28-55 % – за 27 мин; 55-75 % – за 20 мин и 75-85 % – за 10 мин с последующим изократическим элюированием в течение 25 мин. Детектирование поглощения разделяемых веществ осуществляли при $\lambda=214$ нм. Хроматограммы были обработаны с использованием программного обеспечения «Multichrom для Windows 9x&NT версии 1,5x-E» (Ampersend, Россия).

Определение количественного содержания EmlA

Количественное содержание EmlA определяли методом аналитической ВЭЖХ (Рис. 8) в тех же условиях, что и выделение EmlA-E. В качестве стандарта использовали основной компонент EmlA с чистотой не менее 89%, выделенный ранее из штамма *Emericellopsis alkalina* A118 (ВКПМ F-1428) [Rogozhin et al., 2018]. Готовили стандартные разведения EmlA в 50 %-ном водном растворе метанола с концентрациями 1,2; 2,21; 5,18; 6,35; 8,64 мкг/мл.

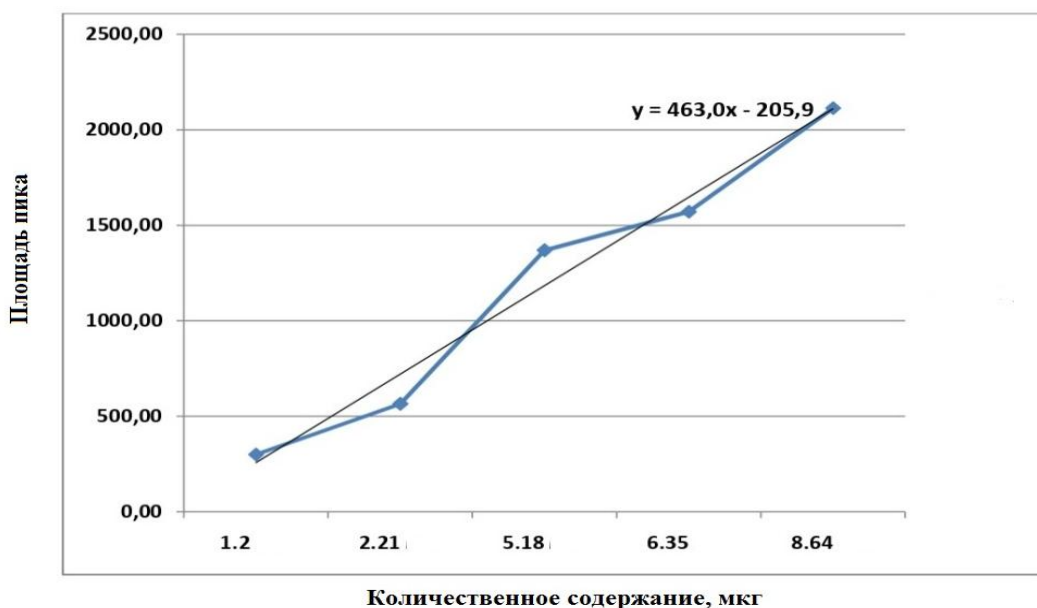


Рисунок 8. Калибровочная кривая для определения EmiA [Kuvarina et al., 2022]

2.3.9 Определение гомологов методом LC/ESI-MS/MS

Очищенные соединения анализировали методом аналитической жидкостной хроматографии /масс-спектрометрии сверхэффективной (UPLC-MS) с использованием прибора Thermo Finnigan LCQ Deca XP Plus с ионной ловушкой и системой Thermo Accela UPLC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Образцы автоматически наносили на микроколонку YMC Triart (C₁₈ 150 мм × 2 мм, 1,9 мкм) (YMC Co., Киото, Япония). Определение поглощения контролировали с помощью детектора с диодной матрицей UV/Vis (UV-VIS DAD) (190-600 нм) и масс-спектрометрией полного сканирования (MS) (электрораспылительная ионизация (ESI+), 150-2000 а.о.). Фракции преимущественно растворяли в смеси вода / метанол / уксусная кислота (88:10:2) до конечной концентрации 1 мг/мл, затем фильтровали через 0,45-миллиметровый нейлоновый фильтр и вводили в систему жидкостной хроматографии (LC) с помощью автоматического пробоотборника.

2.3.10 Детекция EmiA и dEmiA методом биоавтографии

С целью обнаружения форм EmiA и dEmiA использовали метод биоавтографии [Блинов, Хохлов, 1970].

Фракцию EmiA в концентрациях 0,25; 0,50 и 1,00 мкг/мл наносили на пластину Sorbifil (L = 50 мм). Хроматографию проводили в камере с системой элюентов хлороформ : метанол в соотношении 3:1. Высушенную пластину помещали в чашки с тест-культурами *Aspergillus niger*, *Candida albicans* на агаризованной среде Сабуро [Sabouraud, 1892]. Для приготовления инокулята использовали суспензию клеток дрожжей и суспензию спор грибов плотностью $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Чашки с пластиной инкубировали в течение 24 ч при температуре 28 °С и определяли Rf (фактор замедления) активной фракции.

2.3.11 Определение фрагментации отдельных индивидуальных молекул EmiA и dEmiA методами MALDI-TOF MS и MS/MS

Методом MALDI-TOF MS/MS определяли спектр фрагментации отдельных индивидуальных молекул EmiA и dEmiA и сопоставляли с заявленной формулой EmiA [Rogozhin et al., 2018].

Проводили подготовку образцов. 0,3 мкл фракции EmiA в растворе (20% ацетонитрила; 79,5% MQ (очищенная вода); 0,5% трифторуксусной кислоты), собранные при разделении ВЭЖХ, смешивали с 0,3 мкл 50 %-ного водного этанола и с 0,5 мкл 2,5-дигидроксибензойной кислоты. Регистрация спектров и MS -анализ проводилась с использованием MS-спектрометра MALDI-TOF (UltrafleXtreme BrukerDaltonics, Германия), оснащенного УФ-лазером (Nd) в режиме регистрации положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность массового обнаружения составляет около 1Да. Спектры MALDI-TOF MS и MS/MS были обработаны с помощью программного обеспечения Daltonics FlexAnalysis 3.4 (Bruker).

2.3.12 Оценка антимикробной активности экстрактов и индивидуальных соединений EmiA-E

Проводили оценку антимикробной активности культуральной жидкости, постэкстракционной культуральной жидкости, экстрактов из культуральной жидкости и экстрактов из мицелия. До экстракции и после экстракции этилацетатом отбирали 1 мл культуральной жидкости.

Антимикробная активность в отношении мицелиальных и дрожжевых микроскопических грибов и бактерий из коллекции культур НИИНА имени Г.Ф. Гаузе

Использовали условно-патогенные плесневые и дрожжевые тест-культуры грибов видов *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 2091, тест-культуры штаммов грамположительных – *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и грамотрицательных бактерий – *Escherichia coli* ATCC 25922. Бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633 выращивали в пробирках на среде МПА [Биргер, 1982], *Escherichia coli* ATCC 25922 на агаризованной среде LB [Lennox, 1955] и грибы *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Candida albicans* ATCC 2091 на агаризованной среде Сабуро [Sabouraud, 1892]. Клетки бактерий суспендировали в физиологическом растворе до плотности $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Предварительно среды стерилизовали в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121 °С в течение 30 мин. Чашки с тест-культурами хранили при температуре от 0 до +4 °С, культивировали при температуре 28-37 °С.

Оценку антимикробной активности культуральной жидкости до экстракции и культуральной жидкости после экстракции проводили методом лунок. В слое агара, содержащего тест-культуру, пробочным сверлом вырезали лунку диаметром 10 мм и в нее вносили 100 мкл культуральной жидкости исследуемого образца. Чашки тест-культур с лунками помещали в термостат и инкубировали при температуре 28-37 °С. Результаты активности учитывали на следующие сутки, измеряли диаметр зоны ингибирования роста вокруг лунки.

Оценку антимикробной активности экстракта из культуральной жидкости и экстракта из мицелия проводили диско-диффузионным методом [Егоров, 2004]. На стерильные бумажные диски диаметром 6 мм наносили по 100 мкл исследуемого образца. Чашки тест-культур с дисками помещали в термостат («Binder», Германия) и инкубировали при температуре 28-37 °С. Результаты активности учитывали на следующие сутки, измеряли диаметр зоны ингибирования роста вокруг диска.

Противогрибковая активность в отношении клинических патогенных изолятов мицелиальных и дрожжевых грибов

Оценку противогрибковой активности проводили в отношении клинических изолятов мицелиальных и дрожжевых грибов, из коллекции микологической лаборатории ГБУЗ МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ: *Aspergillus niger* 1133 m, *A. terreus* 497, *A. fumigatus* 390m, *C. albicans* 1582, *C. glabrata* 1402, *C. tropicalis* 156, *C. krusei* 1447, *C. parapsilosis* 571, *Cryptococcus neoformans* 297 и *Cr. laurentii* 325m. Для приготовления инокулята использовали суспензию клеток дрожжей и суспензию спор грибов в стерильном физиологическом растворе (0,85 % NaCl), доводя ее до определенной плотности $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Оптическую плотность исходной суспензии дрожжей контролировали спектрофотометрически, добиваясь $D=0,11$ при $\lambda=530$ нм. Такую суспензию дрожжевых клеток разводили 1:1000 готовой стандартной средой RPMI 1640 [Atlas, Snyder, 2006] для получения суспензии инокулята, содержащего двукратную, по сравнению с опытом, концентрацию клеток. Конечная концентрация дрожжевых клеток в опыте составляла $1-5 \times 10^3$ клеток/мл.

Суспензию спор грибов подводили до оптической плотности 0,09 - 0,11 и разводили стандартной средой RPMI 1640 [Atlas, Snyder, 2006] в 100 раз. Конечная концентрация спор грибов в опыте составляла $0,4-5 \times 10^4$ клеток/мл. Количество клеток в инокуляте проверяли путем высева на агаризованную среду Сабуро и подсчета выросших колоний.

Тестируемые вещества растворяли в ДМСО (диметилсульфоксид) с

начальной концентрацией 2000 мкг/мл и в том же растворителе готовили серии двукратных разведений от 2000 до 1,5 мкг/мл. Затем полученные растворы в ДМСО разводили в 50 раз в стандартной используемой для опыта среде RPMI 1640 [Atlas, Snyder, 2006]. При постановке опыта (т.е. при смешивании с инокулятом тест-культур, приводившему к дальнейшему двукратному разведению) конечная концентрация растворителя снижалась до 1 %. Все растворы тестируемых препаратов готовили непосредственно перед использованием. Препаратом сравнения служил амфотерицин В (Sigma, США).

Эксперименты проводили в стерильных 96-луночных плоскодонных планшетах. Для этого в лунки каждого планшета вносили сначала по 100 мкл растворов серийных разведений тестируемых препаратов (среда RPMI 1640 [Atlas, Snyder, 2006], содержание ДМСО-2%), а затем по 100 мкл раствора инокулята тест-культуры. Конечная концентрация препаратов в опыте после внесения микробных инокулятов составляла от 20 до 0,15 мкг/мл при концентрации растворителя ДМСО 1%. Каждый препарат в эксперименте присутствовал не менее, чем в трех повторях. В панель эксперимента в качестве контроля включали лунки, не содержащие тестируемых препаратов или растворителя. Планшеты инкубировали при 35 °С. Оценку роста культур проводили визуально. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) противогрибковых препаратов считывали через 24 ч культивирования для *S. albicans* и 48 ч культивирования для *A. niger*. МПК определяли, как минимальную концентрацию препарата, полностью предотвращающую рост тест-культуры.

2.3.13 Оценка антимикробной активности в отношении биопленкообразующих бактерий

Клинические изоляты бактерий *Staphylococcus aureus* (4 изолята), *Enterococcus faecalis* (4 изолята), *E. faecium* (1 изолят), *Acinetobacter baumannii* (2 изолята), *Klebsiella pneumoniae* (1 изолят), выделенные из биологических жидкостей пациентов, были взяты из коллекции культур

лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ЦНИИ эпидемиологии (Москва, Россия). Клинические изоляты *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* и *Candida albicans*, выделенные из биологических жидкостей особей крупного рогатого скота, были взяты из коллекции кафедры микробиологии и заразных болезней Оренбургского государственного аграрного университета.

Тестируемые бактерии выращивали на среде МПА [Биргер, 1982] 18 ч при температуре 37 °С. Из выросших культур готовили бактериальную суспензию плотностью 0,5 мкФ в бульоне Мюллер-Хинтона (МХ) [Mueller, Hinton, 1941], которую затем разбавляли до концентрации 10⁵ КОЕ/мл. Приготовленный инокулят тестируемых бактерий добавляли по 150 мкл в лунки 96-луночного планшета, в которые помещали стерильные тефлоновые кубики размером 4x4 мм для формирования на их поверхности биопленок. Инкубировали в течение 20 ч на орбитальном шейкере при скорости вращения 110 об/мин и температуре 35 °С.

Антимикробная активность в отношении биопленкообразующих клинических резистентных бактерий

Кубики с биоплёнками, отмытые от среды, содержащей планктонные клетки, переносили в новый 96-луночный планшет со средой по 200 мкл, содержащей серийные двукратные разведения пептида. После инкубации в течение 18 ч при 37 °С определяли минимальную биоцидную концентрацию пептида в отношении дисперсных клеток биоплёнки (МБКд), для чего отбирали аликвоты по 10 мкл из лунок без видимого роста, делали высев на плотные питательные среды и инкубировали в течение 20 ч при 37 °С. За МБКд принимали концентрацию пептида, которая обеспечивала выживаемость субкультуры <0,1% по сравнению с контролем. Биоплёнки на поверхности тефлоновых кубиков механически разрушали и рекультивировали в бульоне МХ для определения минимальной биоцидной концентрации пептида, ингибирующей рост сформированных биопленок

(МБКб). Бактериальные клетки, сохранившие жизнеспособность в составе матрикса биоплёнки, возобновляли рост.

Антимикробная активность in vitro, ассоциированная с подавлением формирования биопленок

Минимальную концентрацию пептида, предотвращающую формирование биоплёнок, определяли путём культивирования бактерий на тефлоновых кубиках в лунках планшета в присутствии различных концентраций EmiA при 37 °С, 24 ч. Каждая лунка планшета с кубиком содержала 200 мкл инокулята плотностью 10^5 КОЕ/мл. После инкубации отработанную среду аспирировали, а кубики промывали раствором для удаления неприкрепленных бактерий и высушивали на воздухе. Образовавшиеся на поверхности кубиков биопленки окрашивали 0,1% водным раствором кристаллического фиолетового в течение 5 минут и экстрагировали этанолом. По оптической плотности полученных растворов при $\lambda=595$ нм определяли интенсивность формирования биоплёнок по сравнению с контролем. Для сравнения различий между контрольными и обработанными антимикробными биопленками использовался однофакторный дисперсионный анализ с помощью множественного сравнительного теста Бонферрони. Значение $p < 0,005$ считалось статистически значимым.

2.3.14 Оценка цитотоксической активности EmiA in vitro

Цитотоксическую активность EmiA проверяли на клеточных линиях: НСТ-116 (колоректальной карциномы человека), К-562 (хронический миелоидный лейкоз человека), MCF-7 (инвазивная карцинома протоков молочной железы человека), В16 (меланома мыши) и MDA-MB 231 (линия рака молочной железы). PFC (постнатальные фибробласты человека) был взят в качестве контрольного варианта. Клетки культивировали в среде DMEM (модифицированная по Дальбекко среда Игла) [Atlas, Snyder, 2006] и RPMI-1640 [Atlas, Snyder, 2006] с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл

стрептомицина при 37 °С, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста.

Навески изучаемых веществ растворяли в ДМСО до концентрации 10 мкМ. Полученные растворы пипетировали с помощью микропипетки до полной однородности. Растворы хранили при 4 °С. В качестве контроля использовали противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда - доксорубицин.

Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты (5-10×10³ клеток в 200 мкл культуральной среды). В лунки вносили растворы исследуемых препаратов, приготовленные путем кратного разбавления культуральной средой, или соответствующие растворители (контроль) в количестве, необходимом для создания в лунке изучаемой концентрации соединения. Объем вносимых веществ не превышал 5% объема среды в лунках. В качестве контрольного препарата сравнения использовали агент с известным противоопухолевым действием доксорубицин. Каждую концентрацию препаратов изучали в 2-3 повторностях. Культуры инкубировали при 37 °С, 5 % CO₂ в течение 72 ч. По окончании инкубации в лунки вносили 20 мкл реактива МТТ (тиазолий синий тетразолий бромид; 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолий бромид), и планшеты помещали в CO₂-инкубатор на 2-4 часа. О жизнеспособности клеток судили по цветной реакции, развивающейся при восстановлении тетразолия в формазандегидрогеназами митохондрий. Окраску регистрировали на спектрофотометре при длине волны возбуждения λ=540 нм. Оптическую плотность в лунках, где клетки инкубировались без добавления веществ (контроль), принимали за 100 %. Показатели оптической плотности в лунках с каждой концентрацией испытуемых препаратов усредняли и вычисляли процент выживших клеток при той или иной концентрации исследуемого препарата.

Для построения кривой выживания клеток строили зависимость процента выживших клеток (ось OY) от концентрации исследуемого вещества в лунке планшета (ось OX). По построенному графику определяли

концентрацию внесённого препарата, начиная с которой процент выживших клеток становился меньше 50 % (ингибирующая концентрация, IC₅₀), являющуюся определяющей при сравнении цитотоксического действия различных соединений.

Влияния пептида EтiA на клетки колоректальной карциномы (HCT116) в реальном времени

Использовали линию клеток колоректальной карциномы (HCT116). После оттаивания клетки пассировали два-три раза. Затем клетки культивировали в среде DMEM [Atlas, Snyder, 2006] с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки в клеточном инкубаторе при 5 % CO₂ и 37°C.

Анализ пролиферации клеточных линий в режиме реального времени проводили с использованием системы iCELLigence RTCA.

Система RTCA использует 16-луночные микротитровальные пластины с золотой микроэлектродной биосенсорной матрицей, которая измеряет импеданс. В процессе прикрепления клеток к микроэлектродам, возникает переменный ток, который фиксируется прибором в режиме реального времени. В результате обработки сигнала прибора измеряются адгезия и размножение клеток в течение заданных периодов времени. Когда клетки отсутствуют или не прикреплены к электродам, импеданс микроэлектродов в системах RTCA определяется с помощью раствора ионной среды для культивирования клеток. Прикрепленные клетки действуют как изолятор на поверхности электрода и изменяют ионную среду раствора, увеличивая импеданс. Чем выше скорость пролиферации и адгезии клеток, тем больше увеличивается импеданс. Клеточный индекс (CI) является функцией количества клеток и соотношения клеток в разные промежутки времени; CI=0, когда адгезия клеток отсутствует. Программное обеспечение используется в соответствии с протоколом: можно изменять продолжительность интервалов между измерениями, количество засеянных

клеток и концентрацию исследуемого вещества для каждой лунки [Şener et al., 2017].

Суспензии клеток HCT116 готовили в среде DMEM [Atlas, Snyder, 2006], плотность довели до 1×10^5 клеток/мл. Затем 300 мкл клеточной суспензии добавляли в ячейки кюветы прибора. Через сутки старую питательную среду заменяли новой средой, содержащей различные концентрации EmiA, и средой без пептида для контроля. Затем продолжали инкубировать клетки еще двое суток.

2.3.15 Оценка гемолитической активности EmiA *in vitro*

Эритроциты выделяли из венозной крови человека. Кровь инкубировали при 4 °С в течение 2-3 ч. Взвесь эритроцитов 100 мкл разбавляли физиологическим буфером (рН 7,2) до общего объёма 500 мкл. Растворы исследуемых веществ с начальной концентрацией 10 мкМ ДМСО разбавляли фосфатным буфером (PBS) 1:10. Полученные растворы вносили в эппендорфы в количестве необходимом для создания исследуемой концентрации 5, 10 и 20 мкМ. Добавляли смесь PBS с эритроцитами до общего объёма 200 мкл. Контроль (К) – смесь эритроцитов с водой (100 %-ный гемолиз). Интактный контрольный раствор (И) – смесь эритроцитов с PBS и растворителя ДМСО. В качестве контрольного образца с активным гемолизом использовали антибиотик грамицидин С (Gram S). Смесь инкубировали 1 ч при 37 °С. Измерение оптической плотности надосадков проводили на автоматическом фотометре для микропланшет («BioTek» ELx800, США) при $\lambda=570$ нм. За 100 % принимали оптическую плотность надосадочной жидкости в контрольной пробе с водой.

2.3.16 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Excel и Statistica.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ¹

3.1 Анализ способности изолятов коллекции штаммов рода *Emericellopsis* к накоплению EmiA и отбор активных культур

Для 38 изолятов рода алкалофильных культур рода *Emericellopsis* из коллекции «Грибы экстремальных местообитаний» кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и коллекции продуцентов Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, был проведен анализ на способность к продукции антимикробного пептида – EmiA. Все 38 штаммов были выделены из образцов почв, собранных на окраине многочисленных содовых

¹ Основные результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы следующих научных статьях автора:

1. Kuvarina A.E., **Gavryushina I.A.**, Sykonnikov M.A., Efimenko T.A., Markelova N.N., Bilanenko E.N., Bondarenko S.A., Kokaeva L.Y., Timofeeva A.V., Serebryakova M.V., Barashkova A.S., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. Exploring Peptaibol's Profile, Antifungal and Antitumor Activity of Emericellipsin A of *Emericellopsis* Species from Soda and Saline Soils // *Molecules*. 2022. V. 27. № 5. P. 1736. DOI: 10.3390/molecules27051736. IF(WoS): 4.412, SJR: 0.782, Q2
2. Kuvarina A.E., **Gavryushina I.A.**, Kulko A.B., Ivanov I.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. The Emericellipsins A-E from an Alkalophilic Fungus *Emericellopsis alkalina* Show Potent Activity against Multi-drug-Resistant Pathogenic Fungi // *Journal of Fungi*. 2021. V. 7. №2. P. 153. DOI:10.3390/jof7020153. IF(WoS): 4.621, SJR: 1.42, Q1
3. **Гаврюшина И. А.**, Георгиева М. Л., Куварина А. Е., Садыкова В. С. Пептаиболы как потенциальные антифунгальные и противоопухолевые антибиотики: современные исследования и перспективы (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021. Т. 57, № 5. С. 432-440. DOI:10.31857/S055510992105007X. IF(РИНЦ): 0.886 [**Gavryushina I.A.**, Georgieva M.L., Kuvarina A.E., Sadykova V.S. Peptaibols as Potential Antifungal and Anticancer Antibiotics: Current and Foreseeable Development (Review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2021. V. 57, № 5. P. 556-563. DOI: 10.1134/S0003683821050070. IF(WoS): 0.886, SJR: 0.25, Q4]
4. Садыкова В.С., **Гаврюшина И.А.**, Куварина А.Е., Маркелова Н.Н., Седых Н.Г., Георгиева М.Л., Барашкова А.С., Рогожин Е.А. Антимикробная активность липопептида Эмерициллипсина А, выделенного из *Emericellopsis alkalina* в отношении биопленкообразующих бактерий // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56, № 3. С. 250-256. DOI: 10.31857/S0555109920030101. IF(РИНЦ): 0.886 [Sadykova V.S., **Gavryushina I.A.**, Kuvarina A.E., Markelova N.N., Sedykh N.G., Georgieva M.L., Barashkova A.S., Rogozhin E.A. Antimicrobial Activity of the Lipopeptide Emericellipsin A Isolated from *Emericellopsis alkalina* against Biofilm-Forming Bacteria // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. V. 56, No 3. P. 292-297. DOI: 10.1134/S0003683820030102. IF(WoS): 0.886, SJR: 0.25, Q4]
5. Pigaleva M.A., Bulat M.V., Gromovykh T.I., **Gavryushina I.A.**, Lutsenko S.V., Gallyamov M.O., Novikov I.V., Buyanovskaya A.G., Kiselyova O.I. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019. V. 147. P. 59-69. DOI:10.1016/j.supflu.2019.02.009. IF(WoS): 4.036, SJR: 1.055, Q1

и соленых озер Кулундинской степи (Алтай, Россия) в течение 2010-2018 гг. 22 изолята были ранее отнесены к виду *E. alkalina*. Они показали высокое филогенетическое сходство по шести локусам (LSU и SSU рДНК, RPB2, TEF1- α , β -tub и ITS-район) [Grum-Grzhimaylo et al., 2013]. Идентификацию грибов проводили с использованием полифазного подхода (морфологического и молекулярного). Принадлежность к данному таксону определяли с использованием последовательностей участков рДНК ITS у 62 штаммов грибов, включая последовательности типовых культур видов рода *Emericellopsis* из GenBank [Grum-Grzhimaylo et al., 2013]. Штаммы рода *Emericellopsis* были сгруппированы в три экологические клады: 10 штаммов *E. alkalina* в кладу «содовая почва», 4 штамма (1KS17-1, 3KS17-1, 3KS17-2 и 3KS17-12) в кладу «морские», 2 штамма (1KS17-4, 2KS17-1) в «наземную» кладу (Приложение 1, Рис. 1). Два штамма (1KS17-1 и 2KS17-1) из морской клады были идентифицированы как *Emericellopsis* cf. *maritima*, так как они относятся к известному типу штамма *E. maritima* (CBS 491.71). Штамм 1KS17-4 из наземной клады был идентифицирован как *Emericellopsis* cf. *terricola*, так как он входит в группу известного штамма *E. terricola* (CBS 124.42). Остальные новые штаммы из засоленных почв образуют свои клады в линии рода *Emericellopsis*, не попадая в ранее известные, поэтому они идентифицированы как *Emericellopsis* sp. В результате исследования были отобраны 38 штаммов *E. alkalina*, обладающие антифунгальной активностью на жидкой щелочной среде для оценки способности к образованию противогрибковых пептидов (Таблица 3).

Установлено, что образование пептаиболов у 32 штаммов *E. alkalina* и 6 штаммов *Emericellopsis* sp. различается в зависимости от состава жидких питательных сред. Замечено, что эмерициллипсины у всех исследованных штаммов не образуются на среде Сабуро [Sabouraud, 1892]. При этом, отмечается резкое увеличение накопления биоактивного EmiA для всех штаммов *E. alkalina* на щелочной среде как в культуральной жидкости, так и в мицелии (Таблица 3).

Таблица 3. Штаммы рода *Emericellopsis*, выделенные из почв с различным типом минерализации, с указанием антифунгальной активности, содержания EmiA в экстрактах культуральной жидкости и мицелия, и наличия гомологов В-Е

№	Номера штаммов; номера коллекций ВКМ, ВКПМ	Номера генбанка	Антифунгальная активность, зона мм				EmiA в КЖ, мг/л	EmiA в мицелии, мг/г	Наличие гомологов В-Е
			Экстракты из КЖ		Экстракты из мицелия				
			<i>A. niger</i> 00760	<i>C. albicans</i> АТСС 2091	<i>A. niger</i> 00760	<i>C. albicans</i> АТСС 2091			
Содово-хлоридный тип засоления почвы									
1	A118, F-1428	КС987155	26	28	10	10	1,73	0,70	о.
2	M20, FW-3040	КС987169	16	20	10	10	1,85	0,51	о.
Содовый тип засоления почвы									
3	E101, F-4108	КС987171	17	12	8	10	2,21	1,01	о.
4	A121, VKM FW-1475	КС987158	11	13	11	0	0,51	0,17	н.о.
5	5KS17-3	ОМ489388	21	21	9	0	0,15	0,34	н.о.
6	6KS17-1	ОМ489390	14	28	0	-	0,67	0,35	о.
7	7KS17-1	ОМ489391	21	12	9	9	0,08	0,22	н.о.
8	8KS17-1	ОМ489392	16	28	0	0	0,66	0,72	о.
9	9KS17-3	ОМ489389	17	15	9	9	н.о.	0,32	н.о.
10	10KS17-1	ОМ489393	23	21	0	0	0,64	0,18	н.о.
11	14KS17-1	ОМ489394	17	18	9	0	0,18	0,65	о.

12	A120	KC987157	10	20	7	0	0,12	0,55	н.о.
13	M14, F-3905	KC987168	0	9	0	9	0,14	0,06	н.о.
14	A123	KC987160	9	12	17	0	0,68	0,47	о.
15	A124	KC987161	10	11	23	0	0,53	0,64	н.о.
16	6KS10-2	OM489386	11	14	9	9	0,30	0,52	о.
17	A112	KC987149	15	-	0	0	0,11	0,05	н.о.
18	A113, FW-1476	KC987150	10	20	7	-	1,35	1,06	о.
19	A125	KC987162	8	10	20	0	0,52	0,77	о.
20	A126, FW-1472	KC987163	9	11	15	0	0,69	0,22	н.о.
21	A127	KC987164	0	10	0	0	0,84	0,42	о.
Содово-хлоридно-сульфатный тип засоления почвы									
22	A103	KC987140	15	0	0	-	0,08	1,02	о.
23	A116	KC987153	10	19	8	0	0,15	1,06	о.
Хлоридный тип засоления почвы									
24	A114, FW-1473	KC987151	16	-	0	0	0,22	0,70	н.о.
25	A122	KC987159	10	14	9	0	0,66	0,65	н.о.
26	3KS17-13	OM489387	19	21	9	0	0,37	0,84	н.о.
27	2KS17-1*	OM489383	10	12	9	9	0,17	0,51	н.о.
28	3KS17-1*	OM489384	-	-	-	-	н.о.	н.о.	н.о.
29	3KS17-2*	OM489385	-	-	-	-	н.о.	н.о.	н.о.
30	3KS17-12*	OM489380	-	-	-	-	н.о.	н.о.	н.о.

31	1KS17-1*	OM489381	26	13	-	-	0,19	0,30	н.о.
32	1KS17-4*	OM489382	-	-	-	-	н.о.	н.о.	н.о.
Хлоридно-сульфатный тип засоления почвы									
33	A115, FW-1474	KC987152	9	18	8	0	0,41	0,15	н.о.
34	A117, FW-1471	KC987154	11	21	8	0	0,19	0,67	н.о.
35	A119	KC987156	10	9	10	0	0,39	0,40	н.о.
Сульфатно-содовый тип засоления почвы									
36	A128	KC987165	10	9	9	-	0,39	1,20	о.
37	M71, F-3907	KC987170	9	9	0	9	0,50	0,10	о.
Не определенный тип засоления почвы									
38	1KS18-5	OM489395	12	16	9	9	0,68	0,56	н.о.

Все изоляты относятся к *E. alkalina*, за исключением тех, которые отмечены звездочкой (*).

о. – обнаружено

н.о. – не обнаружено

Экстракты, полученные при культивировании штаммов *E. alkalina* и двух штаммов *Emericellopsis* sp., показали ингибирование роста тест-культур грибов.

При сравнительном анализе содержания EmiA выявлены различия между штаммами, выделенными из разных местообитаний. Так, у 20 изолятов количество целевого пептаибола преобладает в мицелии, а высокое содержание EmiA обнаружено у 9 изолятов в мицелии и у 5 изолятов в культуральной жидкости.

Высокие значения количества EmiA отмечены у изолятов *E. alkalina* из содовых и содово-хлоридных типов засоления почв. Максимальное количество EmiA обнаружено в культуральной жидкости типового штамма *E. alkalina* E101 – 2,21 мг/л среды. Штаммы A113 и M20 вида *E. alkalina* также характеризовались высокими уровнями EmiA как в культуральной жидкости, так и в мицелии, составляющими 1,35 и 1,06 мг/л для A113, и 1,85 и 0,51 мг/л для M20, соответственно. В то же время, штаммы этого же вида, изолированные из почв с хлоридным типом засоления, демонстрировали следовые количества EmiA в культуральной жидкости.

Другие виды рода *Emericellopsis* были выделены из хлоридных типов засоления почв, два штамма (1KS17-1 и 2KS17-1) из них образовывали EmiA при культивировании на щелочной среде [Георгиева и др., 2009], причем количество EmiA было выше в мицелии, чем в культуральной жидкости.

Резюмируя, хотелось бы отметить, что у большинства изолятов с хорошим выходом EmiA в мицелии также обнаружены EmiB-D. Ни один из изолятов, выделенных из хлоридных и хлоридно-сульфатных типов засоления почв, не образовывали гомологов B-D.

3.2 Выделение индивидуальных соединений EmiA-E из концентратов штаммов *Emericellopsis alkalina*

С целью выделения индивидуальных соединений EmiA-E из концентратов штаммов *Emericellopsis alkalina* использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Методом

аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ) был получен профиль, который содержит ряд пиков, элюированных с колонки от 60,0 до 66,5 мин. Одним из них оказался EmiA со временем удерживания 63,7 мин. Другие доминирующие пики также были собраны вручную для определения их аминокислотных последовательностей (Рис. 9). Общий выход всех фракций составил около 2,5% по отношению к массе всего концентрата.

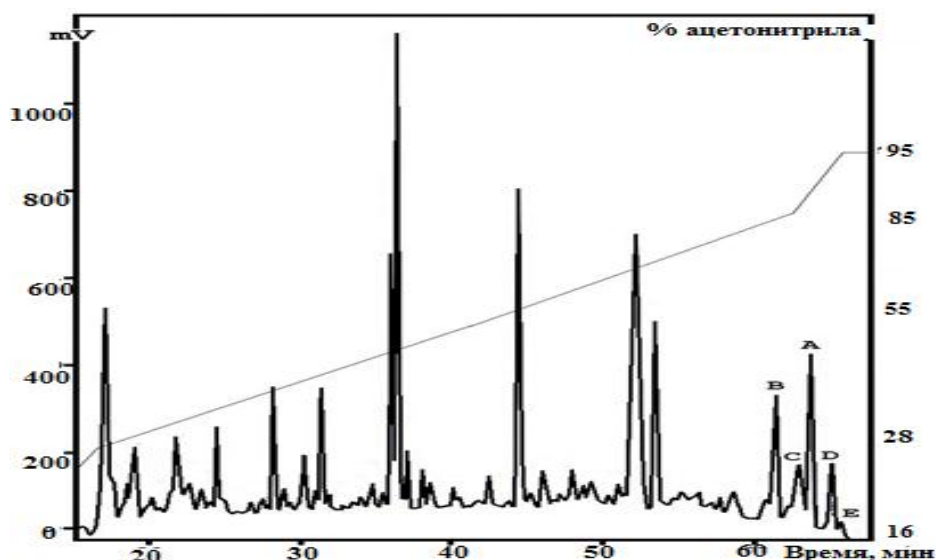


Рисунок 9. Фракционирование концентрата *Emericellopsis alkalina* с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ. Детектирование поглощения контролировали при $\lambda=214$ нм. Целевые компоненты отмечены буквами А-Е [Kuvarina et al., 2022]

Для выяснения молекулярного разнообразия пептаиболов использовалась аналитическая ОФ-ВЭЖХ. В зоне элюирования основного компонента, EmiA, были обнаружены соединения, которые оказались в разной степени гидрофобны (в зависимости от времени удерживания при разделении с помощью жидкостной хроматографии). Ранее было показано, что среди всего спектра метаболитов *E. alkalina* A118, два соединения помимо вещества A118/37 (EmiA) также обладали аналогичной функциональной активностью: A118/35 (B) и A118/36 (C). Эти два соединения были элюированы с колонки с более низким временем удерживания (61,4 и 62,9 мин соответственно) и продемонстрировали сильную антимикробную активность, близкую к активности EmiA.

В результате, удалось визуализировать набор сигналов, которые на основе их общих УФ-спектров (данные не показаны) предварительно классифицируются как эмерициллипсिनоподобные пептиды. Было предположено их структурное сходство с основным компонентом EmiA. Также было собрано еще два индивидуальных соединения со временем удерживания 65,1 (D) и 65,7 мин (E).

Согласно ранее полученным данным [Rogozhin et al., 2018], структура основного антибиотика, EmiA, определенная с помощью метода гетероядерной ЯМР-спектроскопии, имеет следующую форму: Methyldecanoyl-MePro-ANMOD-Ala-Aib-Ile-Iva-βAla-Alaol-Glyol. Кроме того, он содержит девять аминокислотных остатков с модификацией N-концевой аминогруппы и C-концевого гидроксила. На основе эталонной структуры проводили фрагментацию смеси соединений A, B, C, D и E вместе с исходным EmiA с помощью масс-спектрометрии LC-ESI/MS/MS (Рис. 10).

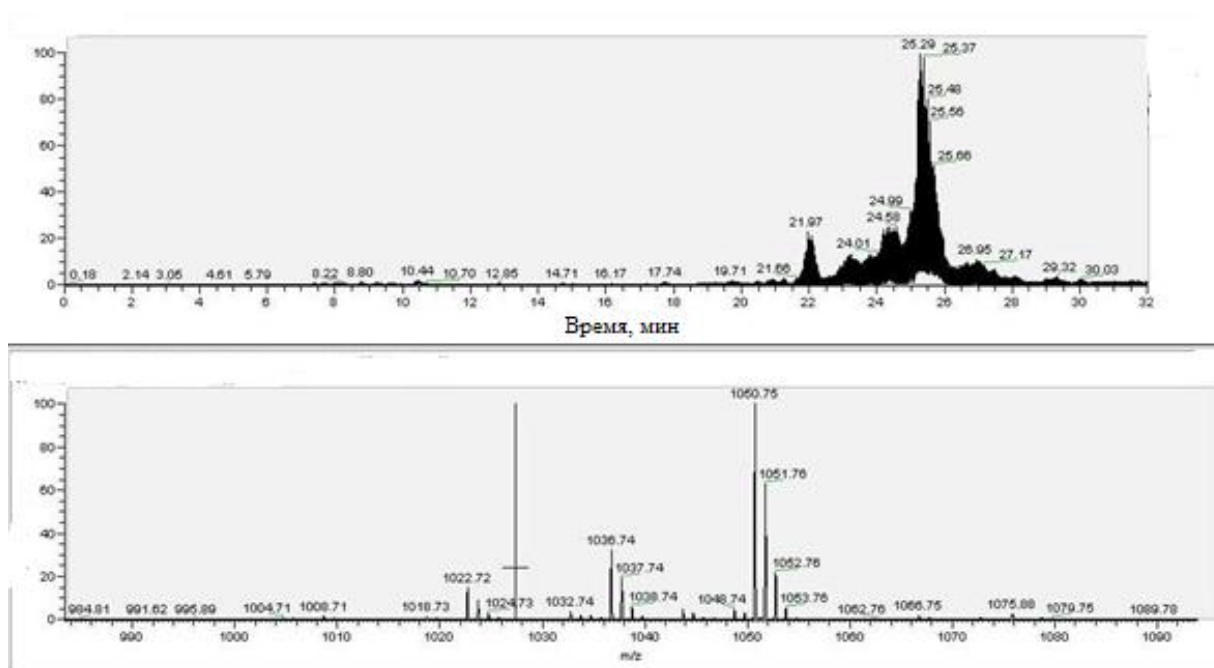


Рисунок 10. Профиль LC-ESI/MS/MS фракции смеси EmiA-E [Kuvarina et al., 2022]

Результаты позволили идентифицировать все четыре соединения как близкие гомологи EmiA с одиночными заменами аминокислотных остатков (Таблица 4): изовалин на α-аминоизомасляную кислоту в положении 7

(гомолог «В»), аланин на серин в положении 3 (гомолог «С»), α -аминоизомасляная кислота на изовалин в положении 4 (гомолог «D») и аланинол на α -аминоизомасляную кислоту в положении 8 (гомолог «E»).

Таблица 4. Структурная характеристика EmiA-E

Пептаибол	M+H, Da	Последовательность аминокислот
EmiA	1050.69	Methyldecanoyl-MePro-ANHMOD-Ala-Aib-Ile-Iva- β Ala-Alaol-Glyol
EmiB	1036.77	Methyldecanoyl-MePro-ANHMOD-Ala-Aib-Ile- Aib - β Ala-Alaol-Glyol
EmiC	1068.76	Methyldecanoyl-MePro-ANHMOD- Ser -Aib-Ile-Iva- β Ala-Alaol-Glyol
EmiD	1064.77	Methyldecanoyl-MePro-ANHMOD-Ala- Iva -Ile-Iva- β Ala-Alaol-Glyol
EmiE	1078.75	Methyldecanoyl-MePro-ANHMOD-Ala-Aib-Ile-Iva- β Ala- Aib -Glyol

*все замены, отличающиеся от первичной последовательности молекулы EmiA, выделены красным цветом.

Все идентифицированные молекулы принадлежат к группе пептаиболов и являются гомологами основного компонента EmiA. Выделенные минорные соединения были названы EmiB-E.

3.3 Образование EmiA и его дегидроформы разными видами рода *Emericellopsis*

У двух штаммов *E. cf. maritima* (1KS17-1, 2KS17-1), принадлежащих к морским и наземным кладам, выделенных из хлоридных типов засоления почв, выявлены сходные, но все же разные профили эмерициллипсинов. Дальнейшая очистка исходных экстрактов привела к обнаружению новой формы EmiA методами ВЭЖХ и MALDI-TOF MS/MS. Антимикробный анализ показал, что соединение оказывает сильное ингибирующее действие на *Aspergillus niger* и *Candida albicans*. Результаты, выявленные при биоавтографии, показали наличие двух зон задержки роста со значениями Rf: 0,2 и 0,55 соответственно в системе хлороформ : метанол в соотношении 3:1 (Рис. 11).

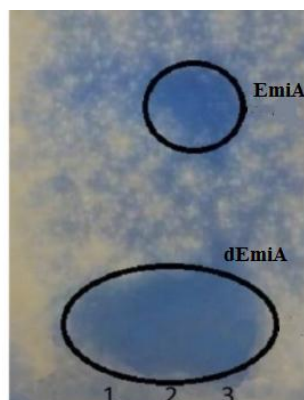


Рисунок 11. Биоавтографический анализ. Тестируемая культура – *A. niger*, система элюирования состоит из хлороформ : метанол (3:1) соответственно. Зоны торможения роста отмечены черными овалами. Цифры 1, 2 и 3 – концентрации растворов 0,25 мг/мл; 0,50 мг/мл и 1,00 мг/мл соответственно [Kuvarina et al., 2022]

Большинство молекулярных фрагментов примерно коррелируют друг с другом с небольшой разницей масс в ± 1 Да (вероятно, одинаковой), кроме одного мономерного фрагмента с массой 195,0 Да в спектре фрагментации молекулярного иона с массой 1032,7 Да, и 213,0 Да в спектре фрагментации молекулярного иона с массой 1050,7 Да.

3.4 Выделение и характеристика dEmiA

Для уточнения степени молекулярного разнообразия метаболитов грибов провели ряд исследований, представленных ниже. Сначала полученные в ходе выделения из культуральной жидкости концентраты, содержащие грибные метаболиты, были исследованы методом ОФ-ВЭЖХ. В результате были обнаружены соединения в зоне элюирования основного компонента – EmiA, проявившие разную степень гидрофобности (установлено по времени удерживания при разделении методом жидкостной хроматографии). Полученные результаты анализа ВЭЖХ свидетельствуют о наличии двух пиков: 1 ($t_R = 37,3$ мин) и 2 ($t_R = 39,4$ мин) (Рис. 12).

Эти два пика были собраны отдельно и проанализированы методом MALDI-TOF MS. Пик 1 содержал вещество с массой молекулярного иона 1050,7 Да (Рис. 13), а хроматографический пик 2 содержал вещество с

наибольшей массой молекулярных ионов 1032,7 Да (Рис. 14). Массы были определены как массы положительно заряженных ионов $[M+H]^+$.

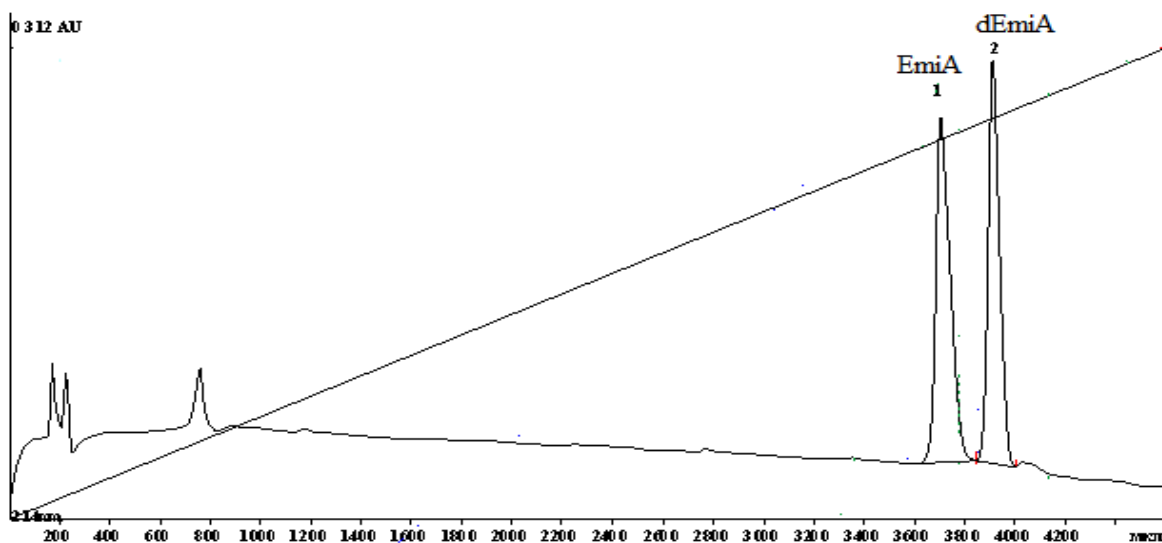


Рисунок 12. Профиль анализируемого образца методом ОФ-ВЭЖХ. Визуализировались только два пика 1 и 2 со временем удерживания 37,4 мин и 39,3 мин соответственно (на хроматограмме значения представлены в объемных единицах) [Kuvarina et al., 2022]

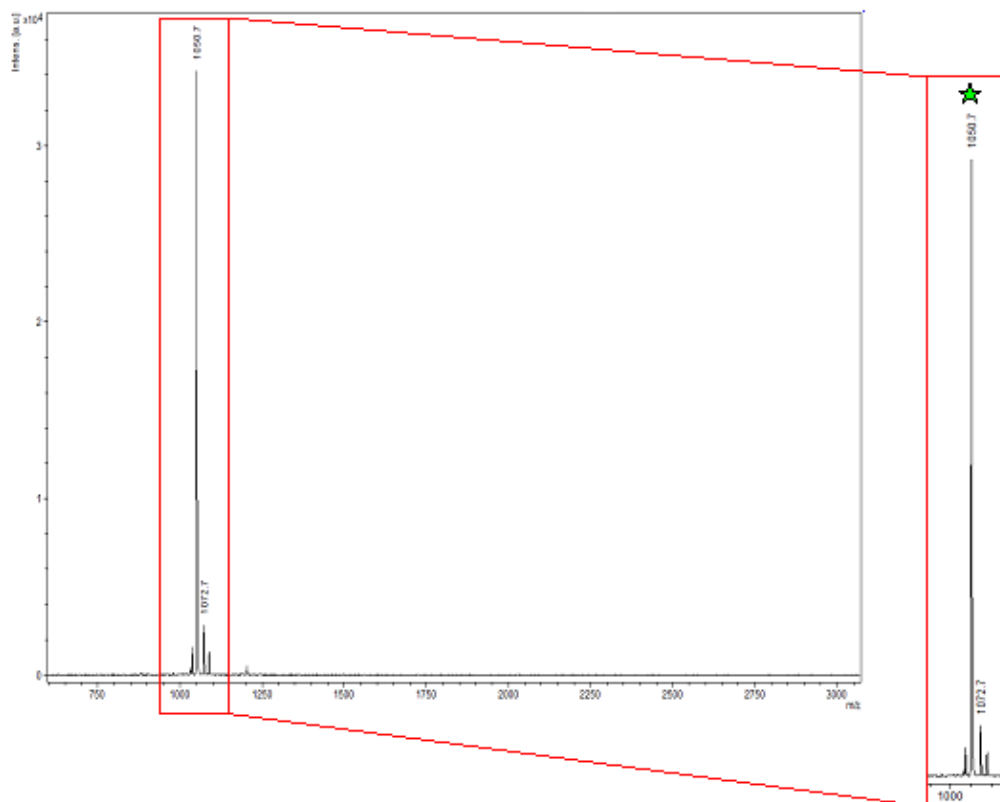


Рисунок 13. Масс-спектр MALDI-TOF MS фракции относится к пику EmiA со временем удерживания 37,4 мин [Kuvarina et al., 2022]

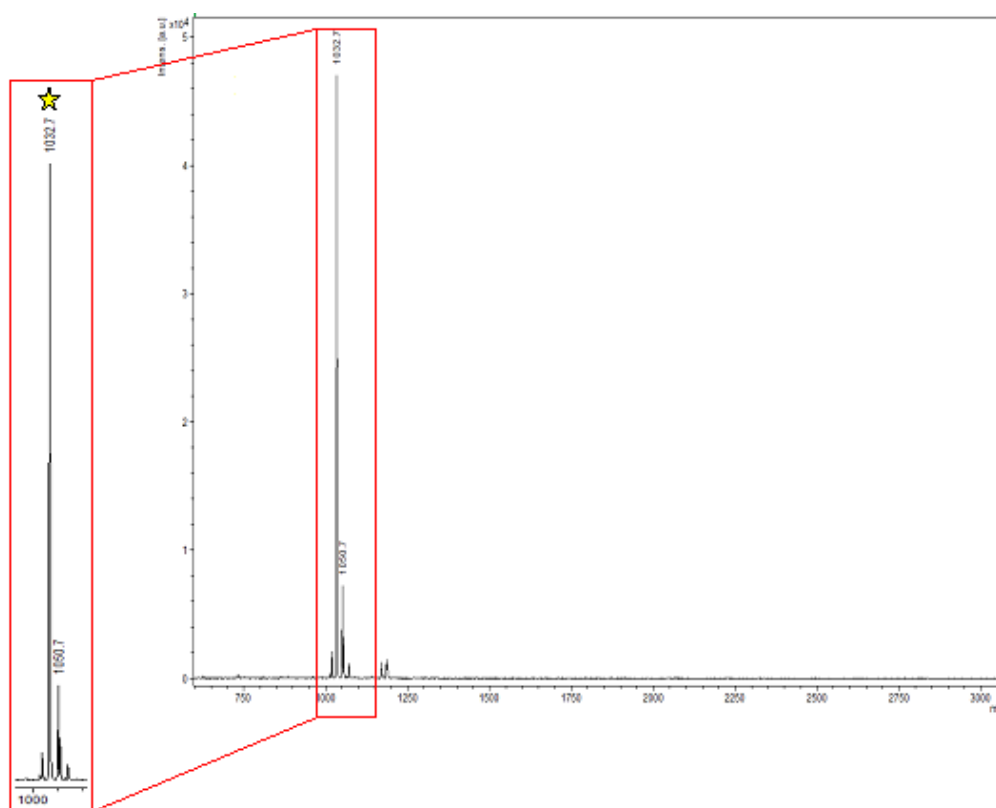


Рисунок 14. Масс-спектр MALDI-TOF MS относится к пику dEmiA со временем удерживания 39,3 мин [Kuvarina et al., 2022]

На основании полученных результатов MALDI-TOF MS можно сделать вывод, что к основным компонентам анализируемого образца относятся ионы с массами 1032,7 Да и 1050,7 Да. Масса молекулярного иона 1050,7 Да, скорее всего, связана с EmiA, потому что это соответствует значениям расчетной массы, обусловленной его структурой (Рис. 14). Вещество с массой иона 1032,7 Да не определено, отсутствует и какая-либо информация в библиографии метаболитов вида *Emericellopsis alkalina* с такой же массой. Чтобы получить больше информации об обоих веществах, они были проанализированы методом фрагментации с помощью MALDI-TOF MS/MS. Во-первых, следует отметить, что разница между массами двух молекулярных ионов в 18,0 Да коррелирует с молекулярной массой молекулы воды ($M_r \sim 18$ Да) (Рис. 13 и 14).

Был отмечен одинаковый характер распределения масс фрагментов, что указывает на одинаковую природу обоих соединений (Рис. 15а и 15б). Мы сравнили между собой массы всех фрагментных ионов и выявили

молекулярные различия между фрагментными ионами, связанные с возможными остатками в молекулярной структуре EтiA.

Кроме того, химическая структура остатка АНМОА включает вторичный гидроксил, расположенный через один атом углерода к амидной связи, и, таким образом, это, вероятно, является удачным сайтом для отщепления воды. В результате должна образовываться двойная связь между соответствующими атомами углерода с сохранением принципа валентности.

Таким образом, мономерный фрагмент с массой 195 Да, скорее всего, относится к остатку 2-амино-4-метил-8-оксодек-6-еновой кислоты (Рис. 16а и 16б), а наличие EтiA, относящегося к молекулярному иону с массой 1050,7 Да, было подтверждено спектром фрагментации.

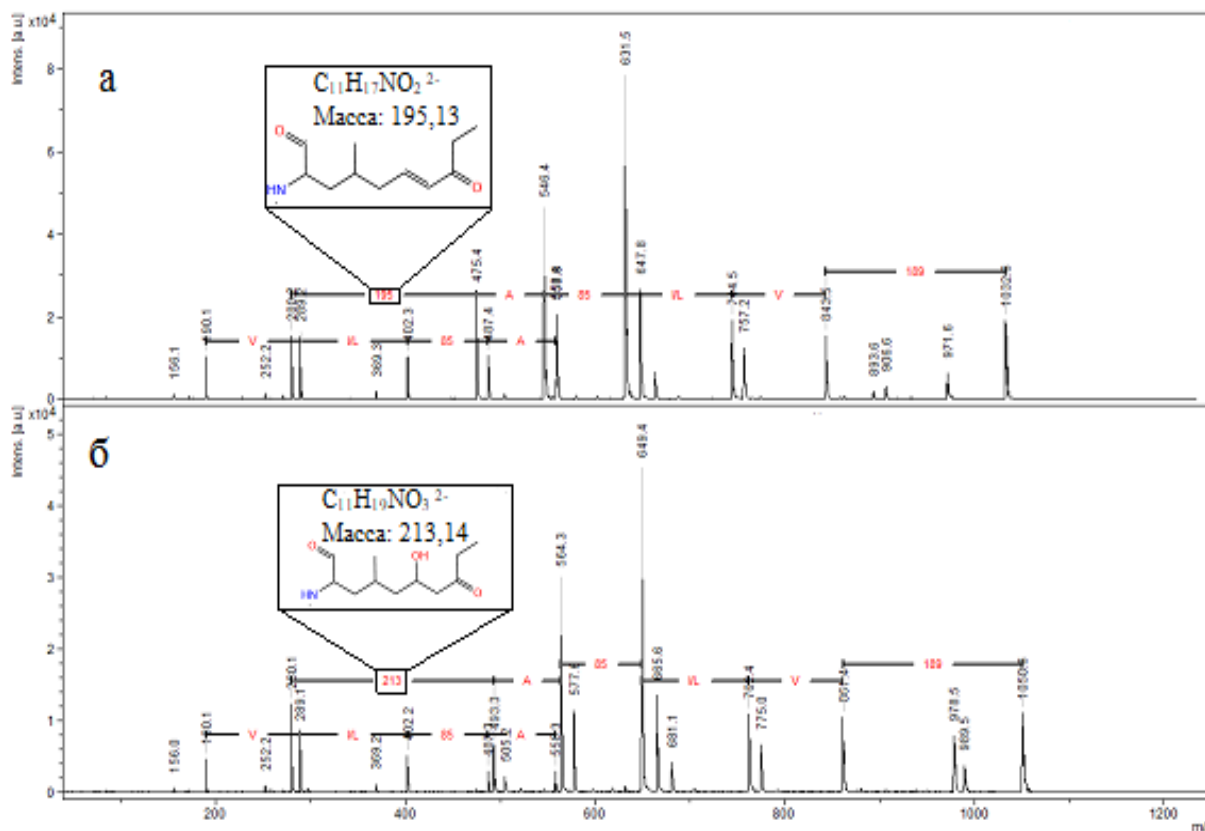


Рисунок 15а, 15б. Представлены спектры MALDI-TOF MS/MS молекулярных ионов с массами 1032,7 Да и 1050,7 Да, соответственно. Разность молекулярных масс фрагментов представлена прямой черной линией с аннотацией масс, окрашенной в красный цвет. Наиболее непохожий фрагмент с молекулярной формулой и моноизотопной массой был выделен

черным прямоугольником на обоих спектрах. **Рисунок 15а.** Фрагмент относится к остатку 2-амино-6-гидрокси-4-метил-8-оксодекановой кислоты (АНМОА). **Рисунок 15б.** Фрагмент относится к остатку 2-амино-4-метил-8-оксодек-6-еновой кислоты (АНМОЕА) [Kuvarina et al., 2022]

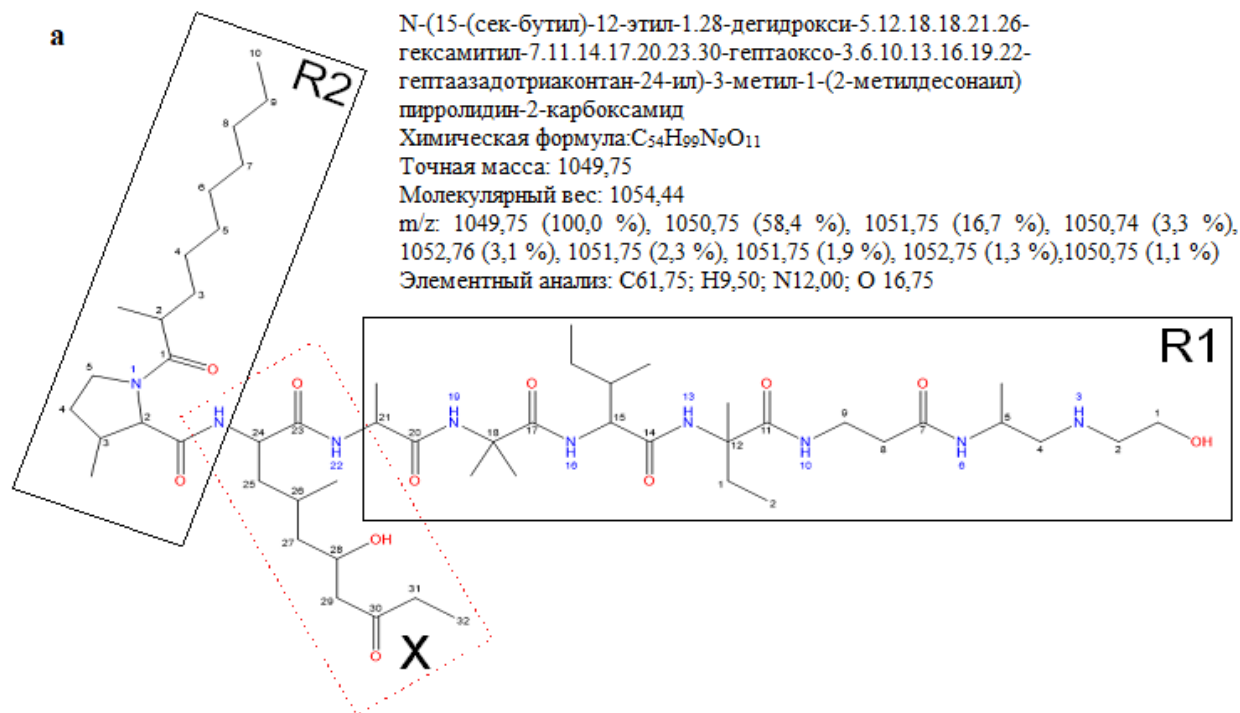


Рисунок 16а. Структура EmiA представлена без указания стереоцентров. Остаток, представляющий интерес в структуре EmiA, был назван X и выделен прямоугольником с красными точками. Правый и левый наборы остатков были выделены черными прямоугольниками и названы радикалами R1 и R2 соответственно. **Рисунок 16б.** Физико-химическая информация о полном названии EmiA, его точном молекулярном весе с сокращенной молекулярной формулой и информация об атомном составе [Kuvarina et al., 2022]

Анализ биологической активности dEmiA позволил выявить активность в отношении грибов *Aspergillus niger* ATCC 16404 и *Candida albicans* ATCC 14053 с МИК 4 и 2. Такие же результаты были получены ранее для EmiA [Rogozhin et al., 2018, Kuvarina et al., 2021]. Поскольку обе формы EmiA и dEmiA обладают одинаковой биологической активностью, можно предположить, что вторичная гидроксильная группа EmiA не играет решающей роли в механизме действия антибиотика.

3.5 Разработка биотехнологии получения EmiA

Для разработки биотехнологии получения эмерициллипсинов был использован типовой штамм-продуцент *E. alkalina* E101 как наиболее активный в отношении тест-культур и продуктивный по выходу основного компонента EmiA при поверхностном культивировании.

Оптимальное значение pH среды может влиять на выход антибиотиков продуцентами. В связи с этим исследовали образование эмерициллипсинов в культуральной жидкости и мицелии при различных начальных значениях pH (7,0; 9,0 и 10,0) в поверхностных и глубинных условиях культивирования в динамике на 7, 14 и 21 сутки.

Влияние pH среды

Оптимальным значением pH среды в глубинных условиях культивирования для накопления EmiA в мицелии штаммом *E. alkalina* E101 является pH 7,0 при этом его содержание в мицелии во всех вариантах значительно ниже, чем в культуральной жидкости. В стационарных условиях культивирования оптимальным являлся диапазон щелочных значений pH от 9,0 до 10,0 (Рис. 17, Таблица 5).

Влияние времени культивирования

Для поверхностного и глубинного способов культивирования оптимальная длительность процесса составила 14 суток. Максимальное содержание EmiA в культуральной жидкости достигается при поверхностном культивировании и составляет 6,0-6,5 мг/л, а в мицелии содержание EmiA выше при глубинном культивировании – 0,14-0,17 мг/г (Рис. 17, Таблица 5).

Таблица 5. Результаты антимикробной активности при различных типах культивирования, длительности культивирования и рН.

Образец	Антимикробная активность, зона, мм								
	<i>B. subtilis</i>			<i>A. niger</i> 00760			<i>C. albicans</i> ATCC 2091		
	Поверхностное культивирование (7 сутки)								
	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0
КЖ до экстракции	20,00±0,60	10,00±0,30	14,00±0,42	11,00±0,33	14,00±0,42	22,00±0,66	12,00±0,36	12,00±0,36	23,00±0,69
КЖ после экстракции	17,00±0,85	14,00±0,42	10,00±0,30	10,00±0,30	12,00±0,36	15,00±0,45	14,00±0,42	12,00±0,36	24,00±0,72
Экстракт из КЖ	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	10,00±0,30	12,00±0,36	14,00±0,42	-	-	-
Экстракт из мицелия	0	0	0	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	-	-	-
Поверхностное культивирование (14 сутки)									
	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0
КЖ до экстракции	20,00±0,60	10,00±0,30	16,00±0,48	10,00±0,30	12,00±0,36	18,00±0,54	14,00±0,42	14,00±0,42	20,00±0,60
КЖ после экстракции	16,00±0,48	14,00±0,42	12,00±0,36	10,00±0,30	14,00±0,42	18,00±0,54	12,00±0,36	14,00±0,42	21,00±0,63
Экстракт из КЖ	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	7,00±0,21	11,00±0,33	17,00±0,85	12,00±0,36	12,00±0,36	12,00±0,36
Экстракт из мицелия	0	0	0	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	10,00±0,30	8,00±0,24	10,00±0,30
Поверхностное культивирование (21 сутки)									
	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0	рН=7,0	рН=9,0	рН=10,0
КЖ до экстракции	10,00±0,30	10,00±0,30	20,00±0,60	16,00±0,48	16,00±0,48	28,00±0,84	10,00±0,30	12,00±0,36	28,00±0,84
КЖ после экстракции	18,00±0,54	20,00±0,60	14,00±0,42	14,00±0,42	17,00±0,85	23,00±0,69	12,00±0,36	12,00±0,36	17,00±0,85
Экстракт из КЖ	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	9,00±0,27	13,00±0,39	-	-	-
Экстракт из мицелия	0	0	0	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	-	-	-

Глубинное культивирование (7 сутки)									
	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0
КЖ до экстракции	10,00±0,30	10,00±0,30	28,00±0,84	16,00±0,48	18,00±0,54	25,00±0,75	12,00±0,36	10,00±0,30	23,00±0,69
КЖ после экстракции	16,00±0,48	10,00±0,30	32,00±0,96	12,00±0,36	10,00±0,30	12,00±0,36	12,00±0,36	12,00±0,36	24,00±0,72
Экстракт из КЖ	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	10,00±0,30	17,00±0,85	-	-	-
Экстракт из мицелия	0	0	0	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	-	-	-
Глубинное культивирование (14 сутки)									
	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0
КЖ до экстракции	20,00±0,60	12,00±0,36	14,00±0,42	11,00±0,33	11,00±0,33	12,00±0,36	10,00±0,30	10,00±0,30	26,00±0,78
КЖ после экстракции	12,00±0,36	12,00±0,36	14,00±0,42	14,00±0,42	12,00±0,36	26,00±0,78	12,00±0,36	14,00±0,42	22,00±0,66
Экстракт из КЖ	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	7,00±0,21	11,00±0,33	8,00±0,24	-	-	-
Экстракт из мицелия	0	0	0	10,00±0,30	8,00±0,24	12,00±0,36	-	-	-
Глубинное культивирование (21 сутки)									
	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0	pH=7,0	pH=9,0	pH=10,0
КЖ до экстракции	18,00±0,54	10,00±0,30	12,00±0,36	15,00±0,45	17,00±0,85	23,00±0,69	10,00±0,30	10,00±0,30	22,00±0,66
КЖ после экстракции	10,00±0,30	10,00±0,30	20,00±0,60	12,00±0,36	14,00±0,42	20,00±0,60	12,00±0,36	10,00±0,30	21,00±0,63
Экстракт из КЖ	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	11,00±0,33	10,00±0,30	-	-	-
Экстракт из мицелия	0	0	0	8,00±0,24	8,00±0,24	12,00±0,36	-	-	-

- не тестировали;

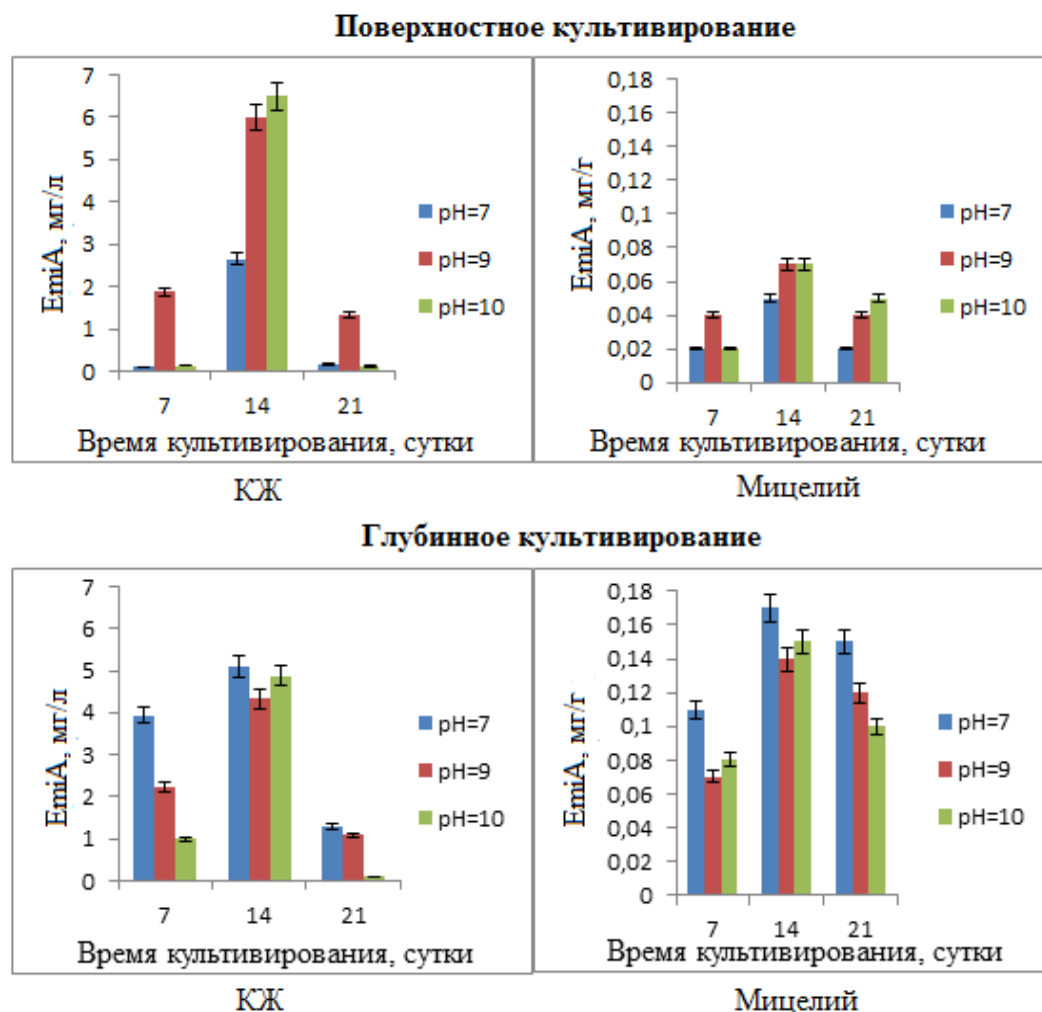


Рисунок 17. Динамика образования EmiA при различных начальных значениях pH в динамических и статических условиях культивирования

Изучение различных способов выращивания штамма-продуцента

С целью исследования наибольшего выхода эмерициллипсинов было проведено сравнительное изучение трех способов выращивания штамма-продуцента *E. alkalina* E101 – поверхностного, глубинного и стационарного мембранно-жидкостного культивирования на бактериальной целлюлозе (Рис. 18). Культивирование типового штамма *E. alkalina* E101 на матрице бактериальной целлюлозы осуществляли по авторской методике, разработанной А.В. Кураковым в ферментере [Шаркова и др., 2016], разработанном в МГУ им. М.В. Ломоносова.

Выход EmiA зависел от способа культивирования. Наибольшее содержание EmiA в культуральной жидкости и мицелии отмечено при

стационарном мембранно-жидкостном культивировании на бактериальной целлюлозе.

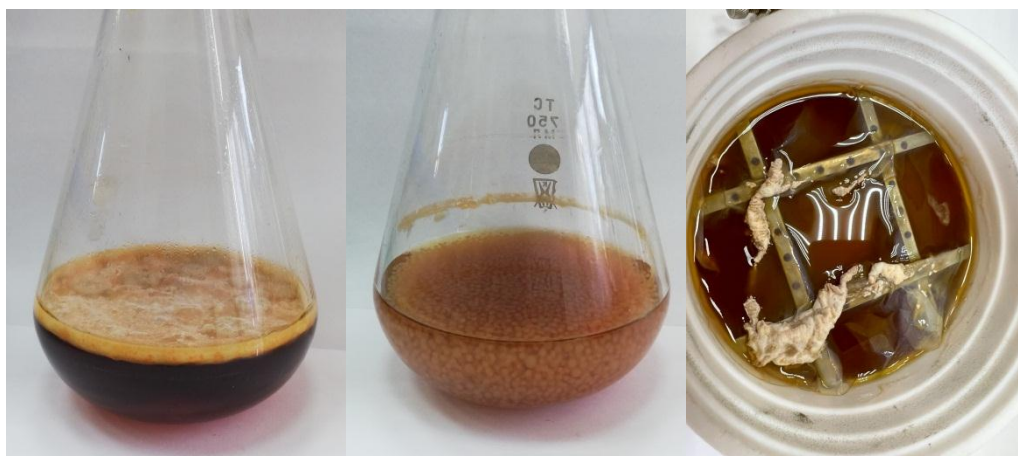


Рисунок 18. Рост штамма *Emericellopsis alkalina* E101 при различных способах культивирования: поверхностное, глубинное и стационарное мембранно-жидкостное на матрице бактериальной целлюлозы

Показано, что при росте на бактериальной целлюлозе в качестве подложки для типового штамма E101 выход EmiA увеличивается в 1,7 раза в сравнении с поверхностным способом культивирования и в 2,3 раза в сравнении с глубинным культивированием, при этом помимо основного целевого пептидола EmiA синтезируются его гомологи В и С (Таблица 6). При глубинном культивировании выход пептидов уменьшался в 1,3 раза, в сравнении с поверхностным культивированием.

Экстракты из культуральной жидкости и мицелия проявили антифунгальную активность в отношении условно-патогенных плесневых и дрожжевых грибов *A. niger* ATCC 16404 и *C. albicans* ATCC 14053. В отношении бактерий *E. coli* ATCC 25922 и *B. subtilis* ATCC 6633 активностью обладали только экстракты из культуральной жидкости (Таблица 6).

Таблица 6. Результаты антимикробной активности, содержания EmiA и наличия гомологов штамма E101 при различных типах культивирования (14 сутки).

Образец	Антимикробная активность, зона, мм				EmiA в КЖ, мг/л	EmiA в мицелии, мг/г	Наличие гомологов
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>A. niger</i> 00760	<i>C. albicans</i> ATCC 2091			
Поверхностное культивирование							
КЖ до экстракции	0	16,00±0,48	18,00±0,54	20,00±0,60	6,50±0,20	0,07±0,00	о.
КЖ после экстракции	0	12,00±0,36	18,00±0,54	21,00±0,63			
Экстракт из КЖ	8,00±0,24	8,00±0,24	17,00±0,51	12,00±0,36			
Экстракт из мицелия	0	0	8,00±0,24	10,00±0,30			
Глубинное культивирование							
КЖ до экстракции	0	14,00±0,42	12,00±0,36	20,00±0,54	4,87±0,15	0,15±0,01	о.
КЖ после экстракции	0	14,00±0,42	26,00±0,38	21,00±0,63			
Экстракт из КЖ	8,00±0,24	8,00±0,24	8,00±0,24	-			
Экстракт из мицелия	0	0	12,00±0,36	-			
Стационарное мембранно-жидкостное культивирование на бактериальной целлюлозе							
КЖ до экстракции	0	12,00±0,36	14,00±0,42	20,00±0,54	11,05±0,33	0,17±0,01	о.
КЖ после экстракции	0	11,00±0,33	12,00±0,36	21,00±0,63			
Экстракт из КЖ	0	8,00±0,24	9,00±0,27	-			
Экстракт из мицелия	0	0	17,00±0,51	-			

- не тестировали; о. – обнаружено наличие гомологов В-С

3.6 Антифунгальная активность EmiA-E

Наблюдались существенные различия в антифунгальной активности EmiA и его гомологов в отношении тест-штаммов на аспергиллы (Таблица 7). EmiA ингибирует рост и развитие условно-патогенных коллекционных и клинических изолятов. EmiD и EmiE были полностью неактивны в отношении коллекционных и клинических изолятов грибов рода *Aspergillus*. EmiB и EmiC показали низкую активность только в отношении штаммов *A. niger*. При этом оба этих пептида были неактивны в отношении другого штамма рода *Aspergillus*. После инкубации зоны ингибирования для клинических изолятов дрожжей рода *Candida* и плесневых грибов рода *Aspergillus* оказались равными 20-25 и 15-19 мм для EmiA, в то время как для AmpB они были 10-12 и 15-17 мм.

Значения МИК для EmiA находились в диапазоне 0,5-4,0 мкг/мл и продемонстрировали более высокую активность как в отношении условно-патогенных, так и клинических изолятов (Таблица 8). МИК EmiB для большинства изолятов рода *Aspergillus* колеблется от 4 до 8 мкг/мл. В отличие от EmiA, большинство изолятов *Aspergillus* были нечувствительны к EmiD (диапазон МИК 16-32 мкг/мл). Как и ожидалось для EmiE, активности против тестируемых штаммов также не наблюдалось (МИК > 64 мкг/мл). Изоляты *A. terreus* тоже оказались нечувствительны к AmpB.

Соединение EmiA было выбрано для дальнейшего функционального анализа из-за его сильной антимикотической активности и большого количества в общем экстракте.

Таблица 7. Антифунгальная активность экстракта и отдельных соединений EmiA-E на газонах изолятов клинических и условно-патогенных плесневых грибов рода *Aspergillus* (40 мкг/диск)

Виды и штаммы рода <i>Aspergillus</i>	Зона, мм						
	EmiA	EmiB	EmiC	EmiD	EmiE	Концентрат	AmpB
<i>A. niger</i> ATCC 16404	25,00±0,21	10,00±0,13	9,00±0,31	0	0	20,00±0,24	0
<i>A. niger</i> 1133 m*	18,00±0,27	11,00±0,17	0	0	0	12,00±0,21	10,00±0,14
<i>A. fumigatus</i> ВКМ F-37	20,00±0,30	0	0	0	0	12,00±0,20	12,00±0,23
<i>A. fumigatus</i> 390m*	20,00±0,40	0	0	0	0	10,00±0,21	15,00±0,51
<i>A. terreus</i> 3К*	12,00±0,25	0	0	0	0	10,00±0,31	0
<i>A. terreus</i> 497*	14,00±0,28	0	0	0	0	0	0

* патогенные клинические изоляты рода *Aspergillus*

AmpB – амфотерицин В

Таблица 8. Минимальная ингибирующая концентрация EmiA-E в отношении различных условно-патогенных коллекционных и клинических изолятов рода *Aspergillus*

Виды и штаммы рода <i>Aspergillus</i>	МИК (мкг/мл)					
	EmiA	EmiB	EmiC	EmiD	EmiE	AmpB
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	4	8	32	>64	>64	1
<i>A. niger</i> 1133m*	4	8	32	>64	>64	1
<i>A. terreus</i> 3К*	0,5	4	8	16	32	>64
<i>A. terreus</i> 497*	1	4	8	16	64	>64
<i>A. fumigatus</i> VKM F-37	2	8	16	32	>64	1
<i>A. fumigatus</i> 390m*	2	8	16	32	>64	1

* патогенные клинические изоляты рода *Aspergillus*

AmpB – амфотерицин В

3.7 Активность EmiA в отношении расширенного набора клинических изолятов дрожжей

В предыдущих исследованиях был показан фунгицидный эффект для трех основных компонентов EmiA, EmiB и EmiC (ранее обозначенных как A118/37, A118/35 и A118/36) для различных видов условно-патогенных аспергиллов и клинических изолятов *Aspergillus* spp. Чтобы исследовать антимикотическую активность EmiA более подробно, было решено протестировать его на панели клинических изолятов дрожжей, включающую *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* и *Cr. laurentii*. Изоляты были отобраны на основе их фенотипической устойчивости, в том числе к каспофунгину, азолам и амфотерицину В.

EmiA был активен в отношении изолятов *C. albicans*, *C. glabrata* и *Cr. neoformans* с МИК в диапазоне 0,5-2 мкг/мл. В соответствии с предварительными результатами, самая низкая активность (МИК = 2 мкг/мл) наблюдалась в отношении *C. albicans* 1402. Флуконазол продемонстрировал небольшую активность или не проявил никакой активности против всей панели изолятов рода *Candida*, что подтверждает предыдущие выводы, что данные виды устойчивы к коммерческим азолам. Интересно, что EmiA проявлял сильную противогрибковую активность, аналогичную AmpB, в отношении обоих видов изолятов *Cryptococcus*, которые обладали устойчивостью к каспофунгину и флуконазолу.

Антифунгальная активность была дополнительно подтверждена диапазоном МИК для большинства тестов. Было показано, что ведущее соединение, EmiA, является высокоэффективным и селективным по отношению к обоим штаммам *A. terreus*, которые обладают устойчивостью к амфотерицину В. В отличие от него, два второстепенных компонента комплекса EmiD и EmiE не проявляют антимикробной активности.

Таблица 9. Минимальная ингибирующая концентрация EmiA в отношении клинических изолятов грибов рода *Candida* и *Cryptococcus*

Штамм	МИК (мкг/мл)			
	EmiA	AmpB	CAS	FZ
<i>Candida albicans</i> 1402	2	0,5	0,06	64
<i>C. glabrata</i> 1402	0,25	1	0,06	128
<i>C. krusei</i> 1447	1	2	0,25	R
<i>C. tropicalis</i> 156	1	0,5	0,06	64
<i>C. parapsilosis</i> 571	1	1	1	128
<i>Cryptococcus neoformans</i> 297	0,5	0,5	>64	16
<i>Cr. laurentii</i> 325m	0,5	0,25	16	32

FZ – флуконазол, CAS – каспофунгин, AmpB – амфотерицин В, EmiA – эмерициллипсин А

Эти результаты весьма интересны, поскольку все новые гомологи EmlB-E содержат структурные отличия (Таблица 4) от эталонной структуры EmlA. В большинстве случаев они представлены заменой одной аминокислоты. Важно отметить, что нерибосомные пептиды, принадлежащие к пептаиболам, обычно имеют спиральную пространственную конформацию. Однако эта ориентация может быть α -спиральной с дополнительной 3 (10) -спиралью. Обнаружено, что EmlB-E близки к EmlA, но их антифунгальная активность была снижена, как указано выше. Это могло быть связано с локальными структурными смещениями с последующими изменениями спиральной конформации. Этот аспект имеет решающее значение для интеграции пептаиболов в плазматические мембраны грибов и образования пор.

3.8 Действие EmlA на разрушение биопленок, сформированных патогенными клиническими изолятами бактерий

В число наиболее опасных инфекционных биопленкообразующих бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний, включены грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus* spp. с множественной лекарственной устойчивостью. Среди грамотрицательных бактерий – возбудителей госпитальных инфекций наибольшую опасность представляют *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae*.

Эти патогенные микроорганизмы преимущественно обнаруживаются в больничной среде и демонстрируют режим выживания с множественной лекарственной устойчивостью, который усложняет антимикробную терапию с использованием конвенциональных антибиотиков. До настоящего времени в литературе нет сведений о влиянии АМП грибного происхождения на биопленкообразующие бактерии.

С целью исследования возможного механизма антибактериального действия EmlA была проверена его активность в отношении планктонных и прикрепленных клеток у культур грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов и образованных ими биоплёнок (Таблица 10). Значение

минимальной биоцидной концентрации увеличивается в 2-4 раза для подавления прикрепленных клеток.

Таблица 10. Значение минимальной биоцидной концентрации (для планктонных (МБКп) и прикрепленных (МБКд) клеток) и (МБКб) Еm1А в отношении клинических изолятов бактерий

Изоляты бактерий	МБКп	МБКд	МБКб
	мкг/мл		
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	12,5	25,0	100,0
<i>S. aureus</i> 2	12,5	25,0	50,0
<i>S. aureus</i> 3	25,0	100,0	100,0
<i>S. aureus</i> 4	12,5	25,0	100,0
<i>Enterococcus faecium</i> 5	25,0	100,0	200,0
<i>E. faecalis</i> 6	50,0	100,0	200,0
<i>E. faecalis</i> 7	50,0	100,0	200,0
<i>E. faecalis</i> 8	25,0	100,0	200,0
<i>E. faecalis</i> 9	25,0	100,0	200,0
<i>Acinetobacter baumannii</i> 10	50,0	> 200,0	> 200,0
<i>A. baumannii</i> 11	25,0	200,0	> 200,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 12	25,0	200,0	> 200,0

3.9 Действие Еm1А на формирование биопленок клиническими изолятами бактерий

С целью исследования возможного антибактериального действия Еm1А было оценено его действие в отношении клинических изолятов грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis* и образования ими биопленок. Установлено, что Еm1А предотвращал образование бактериальных биопленок *in vitro* в отношении грамположительных бактерий (Рис. 19 и 20).

Максимальный эффект наблюдался при концентрациях пептида, соответствующих ½ МБК, и составил от 73,2% до 97,8% в зависимости от

изолята. При концентрации 15 мкг/мл образование биопленки достоверно уменьшилось на 53,0%, 56,0%, 53,1% соответственно для *S. aureus* 1, 2, 3.

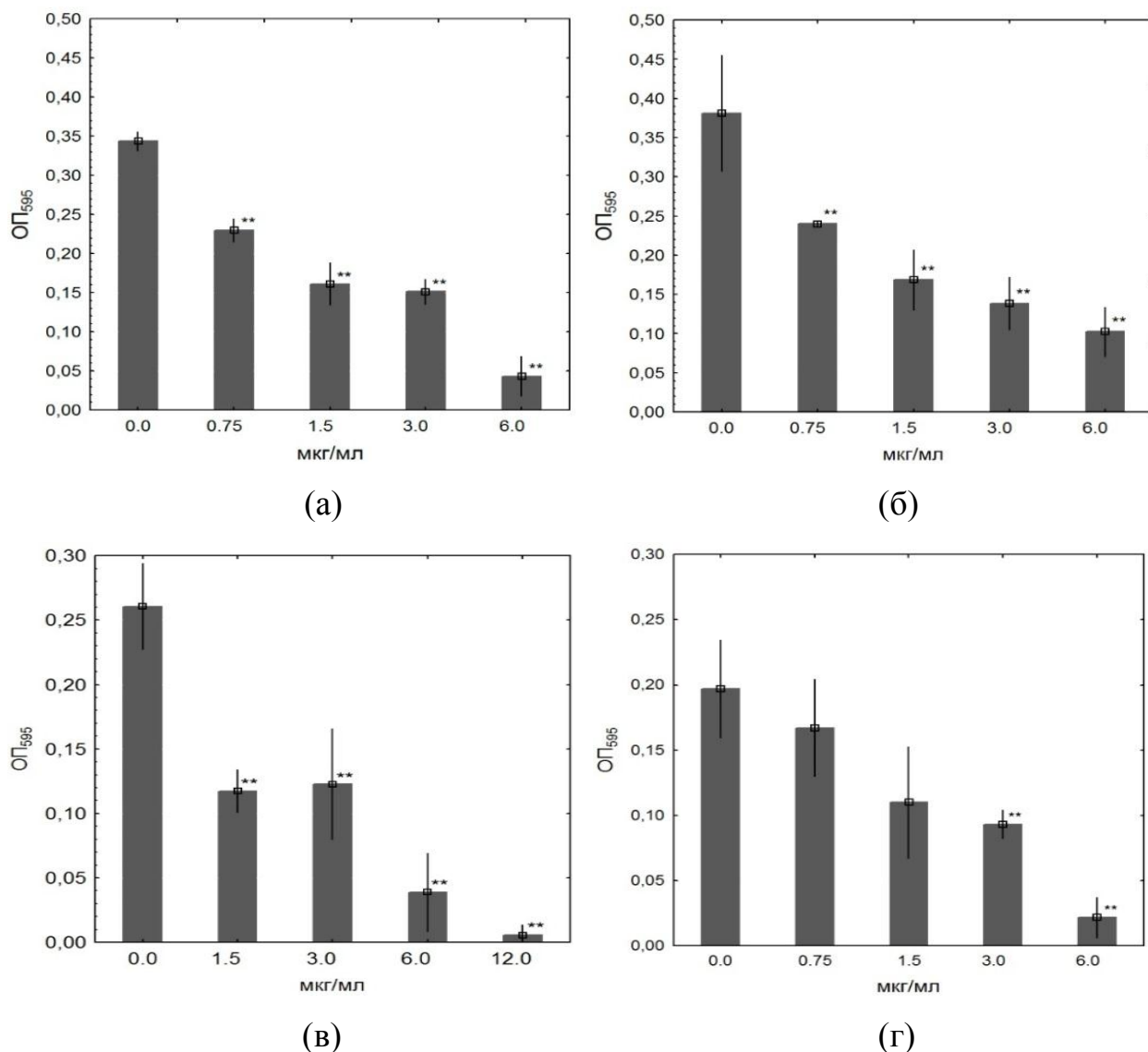


Рисунок 19. Анализ образования биопленки при ОП₅₉₅ штаммами *Staphylococcus aureus* (а – *S. aureus* 1, б – *S. aureus* 2, в – *S. aureus* 3, г – *S. aureus* 4) при различных концентрациях EriA (мкг/мл) [Садыкова и др., 2020]

** Концентрации пептида, при которых наблюдались статистически значимые различия между контрольными биоплёнками и биоплёнками, образующимися в присутствии пептида (p < 0,005).

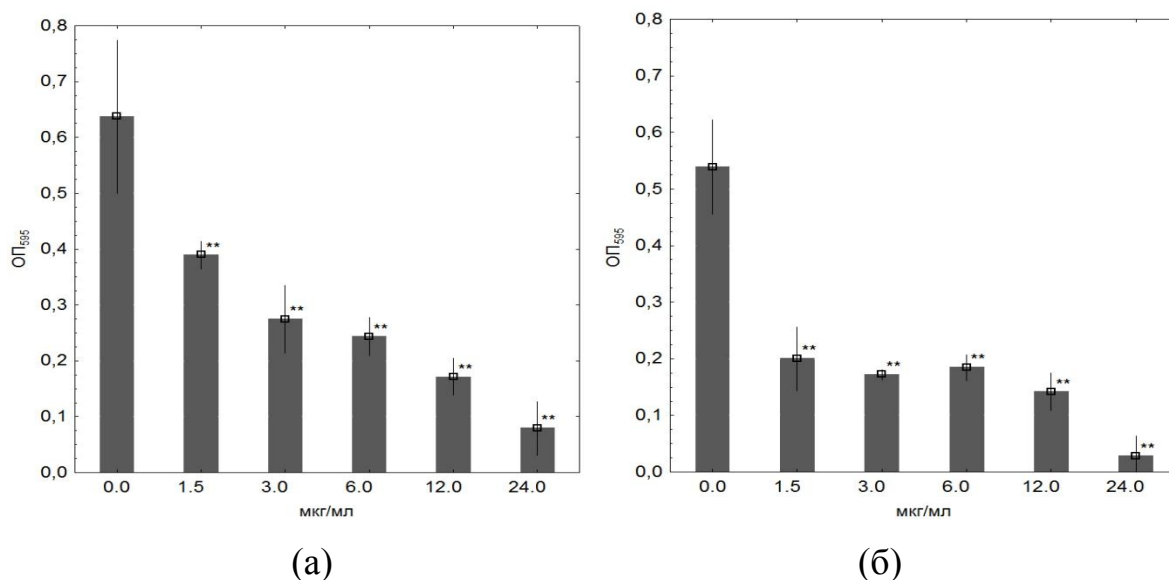


Рисунок 20. Анализ образования биопленки при ОП₅₉₅ штаммами рода *Enterococcus* (а – *E. faecalis* 6, б – *E. faecium* 7) при различных концентрациях EmiA (мкг/мл) [Садыкова и др., 2020]

** Концентрации пептида, при которых наблюдались статистически значимые различия между контрольными биоплёнками и биоплёнками, образующимися в присутствии пептида ($p < 0,005$).

Антибиопленочная активность пептида в отношении клинических изолятов грамположительных бактерий (*S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*) находилась в диапазоне от 50 до 200 мкг/мл, что свидетельствовало о слабом действии EmiA на предварительно сформированные биопленки этих бактерий.

Исследуемый антибиотик не обладал способностью к активному взаимодействию с экзополисахаридным матриксом, составляющим основу бактериальных биопленок, что, по-видимому, определяется, в первую очередь, отсутствием функциональных групп на его поверхности.

Таким образом, субингибирующие концентрации EmiA предотвращали образование бактериальных биопленок *in vitro* в отношении грамположительных бактерий наиболее эффективно, чем в отношении грамотрицательных, при этом наблюдалось достоверное различие как между

клиническими изолятами одного вида бактерий, так и между изолятами различной видовой принадлежности.

3.10 Цитотоксическая активность EmlA

Известно, что практически для всех противогрибковых препаратов, применяемых в клинике, одним из основных недостатков является высокая токсичность на нормальные клетки. Активные, но высокотоксичные соединения в экспериментах *in vitro* отбраковываются для дальнейшего изучения как потенциальные кандидаты для разработки антибиотиков. В дальнейших экспериментах оценивали возможное цитотоксическое действие EmlA на различных линиях опухолевых клеток и нормальных клетках - фибробластах человека *in vitro*. Результаты показывают, что EmlA также обладает цитотоксическими свойствами по отношению к широкому спектру линий опухолевых клеток различного происхождения. Отличительной особенностью EmlA является контрастная картина ингибирования роста клеток, которая выражается в значительном изменении в индексе IC₅₀. Например, на уровне доксорубина максимальная активность была продемонстрирована в отношении НСТ-116 (0,25 мкМ), в то время как для MCF-7 и В16 значение было более чем в 10 раз выше (11,00 и 16,00 мкМ соответственно) (Таблица 11; Рис. 21).

Таблица 11. Цитотоксическая активность EmlA

Клеточные линии	IC ₅₀ , мкМ	
	EmlA	Доксорубин
НСТ-116	0,25±0,03	0,20±0,03
К-562	1,00±0,14	0,25±0,03
MDA-MB-231	8,00±1,04	0,80±0,09
MCF-7	11,00±1,20	0,50±0,06
В16	16,00±2,08	0,60±0,07
PFC	11,50±1,50	0,20±0,03

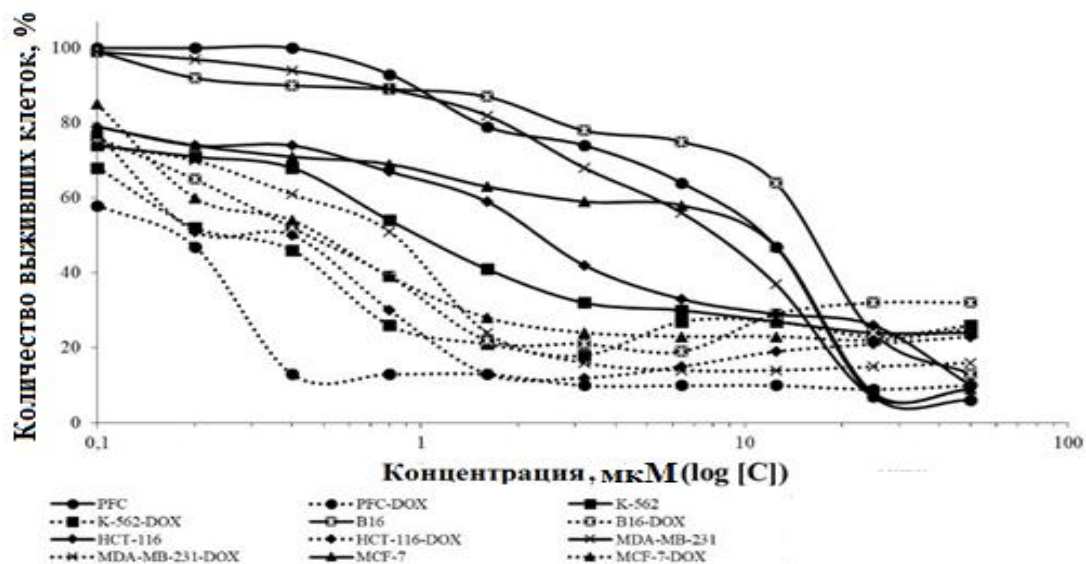


Рисунок 21. Цитотоксическая активность, вызванная пептаиболомом EpiA, по отношению к опухолевым и нормальным клеточным линиям *in vitro*. Клеточные линии: PFC – постнатальные фибробласты человека, K-562 – хронический миелоидный лейкоз человека, B16 – меланома мыши, HCT-116 – колоректальная карцинома человека, MDA-MB 231 – рак молочной железы, MCF-7 – инвазивная карцинома протоков молочной железы

В целом, антипролиферативная активность EpiA во всех вариантах линий значительно уступала таковой у эталонного противоопухолевого антибиотика доксорубина (от 4 до 25 раз), включая взаимодействие с PFC (в 60 раз). Соответственно, несмотря на высокие значения IC_{50} для этой молекулы, для подавления роста клеток *in vitro* требуется довольно значительное количество антибиотика. Рассчитанное значение терапевтического индекса достаточно высокое благодаря низкому уровню цитотоксичности для нормальных клеток, что является неоспоримым преимуществом по сравнению как с доксорубином, так и с большинством других противоопухолевых соединений, которые являются компонентами традиционной химиотерапии для лечения злокачественных онкологических заболеваний. Ранее было доказано, что EpiA проявляет избирательную цитотоксическую активность в отношении клеточных линий HepG2 и Hela ($EC_{50} = 2,8$ и $<0,5$ мкМ соответственно) [Rogozhin et al, 2018].

Чтобы определить влияние EmiA на рост опухолевых клеток HCT116, была использована система анализа клеток в реальном времени (RTCA) iCELLigence, которая позволяет отслеживать не только эффект ингибирования роста, но и оценить влияние на другие клеточные изменения. Данная информация может быть полезной при выборе дальнейших методов оценки действия соединений, а также помогает лучше понять механизмы токсичности и способствует выбору лучших соединений-кандидатов на ранней стадии разработки лекарств перед началом испытаний на животных. Клеточный индекс (CI) определяется как функция числа клеток и соотношения клеток в разные промежутки времени. Через 24 часа добавляли EmiA. Жизнеспособность, адгезию и пролиферацию клеток контролировали до и после добавления EmiA в режиме реального времени в течение 72 ч (Рис. 22). В течение первых суток CI увеличивался, что соответствовало процессу адгезии и пролиферации клеток в культуре. После обновления среды в лунках и внесения EmiA в различных концентрациях CI стал снижаться по сравнению с контролем. Различия в клеточной пролиферации под влиянием повышения концентрации EmiA вызывали изменения CI. После введения EmiA и в последующий период инкубации CI изменялся в зависимости от концентрации пептида: при 0,25 мкг/мл – от 0,4 до 1,1; при 1,0 мкг/мл – от 0,4 до 0,7; при 4,0 мкг/мл – от 0,4 до 0,6; при 16,0 мкг/мл – от 0,4 до 0,5. Контроль от 0,4 до 1,3. EmiA проявлял сильное ингибирующее действие на клеточные линии HCT116 и постоянно сохранял свои значения CI на низких уровнях при концентрациях $\geq 1,0$ мкг/мл.

Цитотоксические соединения, уменьшающие рост и деление клеток путем подавления пролиферации, от которой зависит клеточный цикл в фазах G0/1 и G2/M, используются при лечении многих видов онкологических заболеваний, кроме того, рост клеток может подавляться и за счет индукции апоптоза [Stefanowics-Hajduk et al., 2020]. Скрининг веществ и их концентраций в системе RTCA по отношению к опухолевым клеткам позволяет определить наименьшую концентрацию соединения, необходимую

для дальнейшего изучения их цитотоксического действия, включая морфофункциональные изменения клеток, а также степень гибели клеток. Последующий анализ клеток НСТ116 методом проточной цитофлуориметрии после 24-часового воздействия EmiA в концентрации 0,25 мкг/мл выявил апоптоз и привел к накоплению содержания ДНК в фазе G0/G1 (рис. 22).

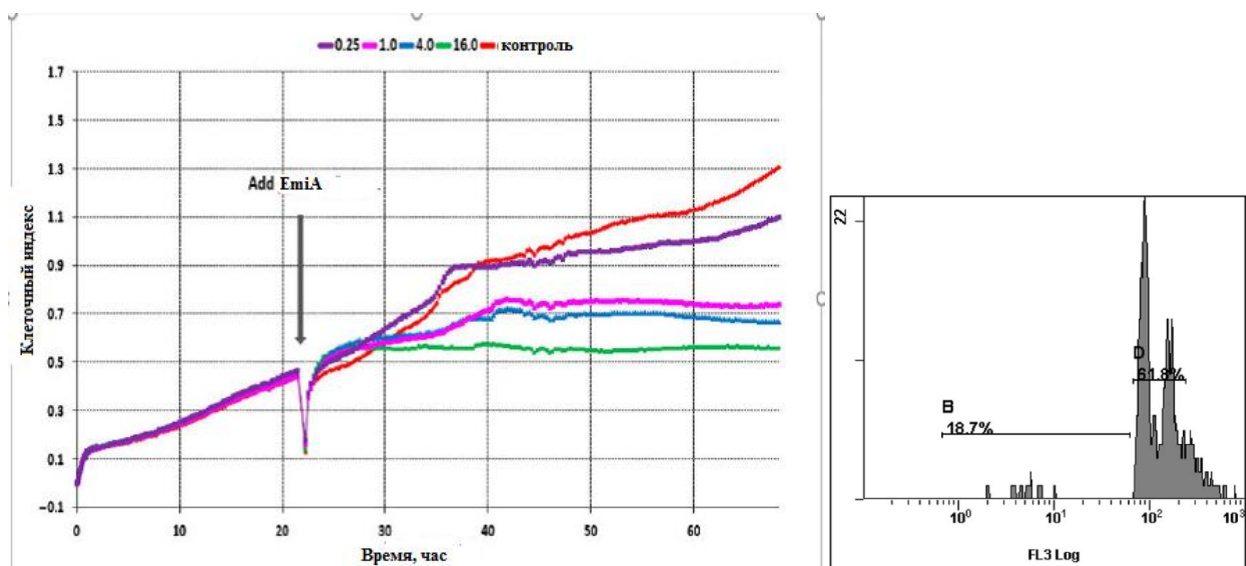


Рисунок 22. Клеточный индекс (CI) линии опухолевых клеток НСТ116 при различных концентрациях EmiA 0,25 мкг/мл; 1,0 мкг/мл; 4,0 мкг/мл; 16,0 мкг/мл. Уровень апоптоза клеток НСТ116 под влиянием EmiA в концентрации 0,25 мкг/мл: зона В – клетки с фрагментированной ДНК (апоптоз); зона D представляет собой процент клеток, находящихся в разных фазах клеточного цикла [Kuvarina et al., 2022]

Результаты анализа сопоставимы с результатами анализа цитотоксичности во многих исследованиях [Stefanowics-Hajduk et al., 2020; Hazeckawa et al., 2019]. В нашем исследовании в системе RTCA предварительный скрининг противоопухолевой активности пептида EmiA позволил сделать выводы, что при концентрации пептида 1,0 мкг/мл, эффективно снижается значение клеточного индекса (CI), а концентрация 0,25 мкг/мл является минимальной ингибирующей концентрацией в отношении клеток колоректальной карциномы (НСТ116).

3.11 Гемолитическая активность EmiA

Для более глубокого изучения EmiA как соединения с потенциально высоким терапевтическим индексом и, следовательно, низким токсическим действием по отношению к нормальным клеткам человека, была проведена серия экспериментов по его гемолитической активности, которая заключается в способности разрушать мембраны эритроцитов крови. EmiA продемонстрировала приблизительно 12,6%-ный гемолиз при концентрации 20 мкМ по сравнению со 100%-ным гемолизом для пептидного антибиотика грамицидина С (Рис. 23).

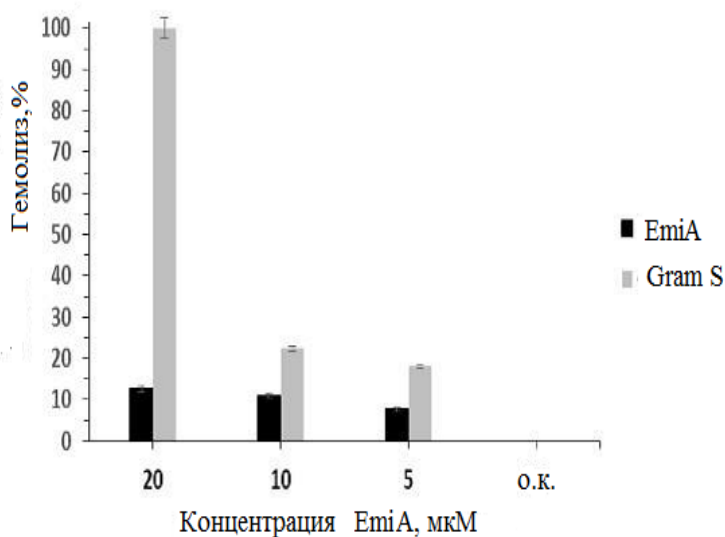


Рисунок 23. Гемолитическая активность EmiA и грамицидина С (Gram S) на эритроцитах человека. Обозначения: o.k. – отрицательный контроль (0,9% раствор NaCl) [Kuvarina et al., 2021]

Таким образом, в сравнении со многими пептидными антибиотиками EmiA практически не оказывает гемолитического действия на эритроциты в концентрациях до 20 мкМ, при выраженном противогрибковом действии в диапазоне концентраций 2-4 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках работы впервые изучены способность к образованию разных форм и компонентный состав новых пептаиболов эмерициллипсинов для коллекции штаммов алкалофильных грибов *E. alkalina*, выделенных из почв и донных отложений с разными типами засоления. Максимальные значения количества основного компонента EmiA отмечены у изолятов *E. alkalina* из содовых почв, что согласуется с ранее полученными данными по первичному скринингу нескольких культур этого вида – обитателей содовых озер [Rogozhin et al., 2018]. Были отобраны пять новых штаммов-продуцентов эмерициллипсинов EmiA-E, обладающих выраженной противогрибковой активностью в отношении широкого спектра грибов и дрожжей. Разработан более эффективный способ выделения антибиотиков из культуральной жидкости продуцента и показано его наличие в мицелии. Разработана технологическая схема для наработки основного компонента EmiA для отобранного штамма-продуцента.

Впервые установлено, что помимо EmiA, алкалофильные грибы *E. alkalina* образуют еще 4 гомолога, а штаммы близкородственных видов способны к образованию дегидратированной формы EmiA (dEmiA), не содержащей гидроксильную группу, что, однако, не влияет на противогрибковые свойства молекулы. Для гомологов В-Е изучена их противогрибковая активность, которая зависит от первичной структуры полипептидной цепи. Установлены минимальные ингибирующие концентрации для каждого из выделенных эмерициллипсинов. Ингибирующая активность основного соединения EmiA против азолустойчивых клинических изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. проявляется на уровне амфотерицина В.

Помимо выраженного противогрибкового действия, EmiA обладал слабым ингибирующим действием на формирование биопленок грамположительных бактерий из группы ESKAPE – клинически значимых

возбудителей инфекционных заболеваний. Антибиопленочная активность пептида находилась в диапазоне от 50 до 200 мкг/мл для грамположительных бактерий (*S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*).

Практическое применение АМП как потенциальных лекарственных средств в клинике ограничено их токсическим действием на клетки человека. Поэтому актуальна оценка гемолитических и цитотоксических эффектов при отборе соединения – кандидата для разработки новых антибиотиков [Carstens et al., 2017]. Установлено, что EmiA обладает низкой и избирательной цитотоксической активностью. В модельных системах на опухолевых и нормальных клеточных линиях цитотоксическое действие показано только в отношении колоректальной карциномы (HCT116). При концентрации пептида 1,0 мкг/мл достоверно снижается значение клеточного индекса CI и индуцируется апоптоз, а концентрация 0,25 мкг/мл является минимально ингибирующей концентрацией в отношении клеток колоректальной карциномы. При исследовании эффекта на эритроциты человека показано низкое гемолитическое действие пептида, в концентрации 20 мкМ лизису подвергалось не более 12 % клеток, что свидетельствует о перспективности данного соединения для дальнейшего изучения. Полученные экспериментальные результаты позволяют рекомендовать EmiA как потенциально эффективное соединение - антимикотик, проявившее одновременно высокую противогрибковую активность и низкую цитотоксичность. Полученные данные могут быть использованы в области создания и разработки новых антибиотиков с противогрибковым действием для лечения глубоких и инвазивных микозов.

ВЫВОДЫ

1. Изучены особенности образования антимикробных пептидов эмерициллипсинов для 38 штаммов микромицетов алкалофильных грибов рода *Emericellopsis*. Показано, что образование антибиотиков не является штаммоспецифичным признаком, но их суммарное количество варьирует в зависимости от штамма – продуцента.
2. Впервые выделены и охарактеризованы четыре новых антимикробных пептида EmiB-E, проведена идентификация первичной их структуры. У двух штаммов видов: *Emericellopsis* cf. *maritima* и *E.* cf. *terricola* была идентифицирована также дегидратированная форма основного компонента EmiA.
3. Показано, что спектр антифунгальной активности и ее выраженность зависят от первичной структуры эмерициллипсинов и снижаются в ряду A-E. Ингибирующая активность EmiA против азолустойчивых патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. проявляется на уровне антифунгального препарата амфотерицина В в диапазоне 0,25-2 мкг/мл. Кроме того, EmiA ингибирует формирование биопленок грамположительных бактерий из группы ESKAPE – клинически значимых возбудителей инфекционных заболеваний.
4. Установлено, что основной компонент EmiA практически не оказывает токсического действия на нормальные клеточные линии (PFC) и не проявляет гемолитическую активность по отношению к эритроцитам человека. Цитотоксическая активность в отношении колоректальной карциномы (HCT116) при концентрации пептида 1,0 мкг/мл эффективно снижает значение клеточного индекса (CI) и индуцирует апоптоз на клеточных линиях.
5. Разработан лабораторный регламент для наработки EmiA в стационарных биотехнологических системах и на полимерной подложке (бактериальной целлюлозе). Использование полимера позволяет повысить выход основного

компонента – ЕmіА в 1,7 раза в сравнении с поверхностным способом культивирования и в 2,3 раза в сравнении с глубинным культивированием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К. Биотехнология. Имобилизованные ферменты / под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. М.: Высшая школа. 1987. 159 с.
2. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. Биргера М.О.: Медицина. 1982. 464 с.
3. Блинов Н.О., Хохлов А.С. Бумажная хроматография антибиотиков / М.: Наука. 1970. 364 с.
4. Гаврюшина И. А., Георгиева М. Л., Куварина А. Е., Садыкова В. С. Пептаиболы как потенциальные антифунгальные и противоопухолевые антибиотики: современные исследования и перспективы (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 5. с. 432-440.
5. Гаврюшина И.А., Громовых Т.И., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Пономаренко В.И., Кисиль О.В., Садыкова В.С. Антимикробные свойства водорастворимых полисахаридов и спиртовых экстрактов мицелия *Laetiporus sulphureus* (bull.) MurriU и разработка биотехнологии его получения в иммобилизованной культуре на бактериальной целлюлозе // Антибиотики и химиотерапия. 2020. Т. 65. №. 1-2. с. 10-14.
6. Георгиева М.Л., Толстых И.В., Биланенко Е.Н., Катруха Г.С. Спектр антимикробной активности у мицелиальных грибов щелочных засоленных почв // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. №. 6. с. 84-91.
7. Громовых Т.И., Гаврюшина И.А., Садыкова В.С., Фельдман Н.Б., Дмитренко А.С., Айрапетова А.Ю., Луценко С.В. Получение иммобилизованного мицелия базидиомицета *Fomitopsis officinalis* Bond. et Sing. продуцента агарициновой кислоты // Антибиотики и химиотерапия. 2018. Т. 63. №. 9-10. с. 3-9.

8. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник для вузов, 6 издание, переработанное и дополненное /М.:Издательство московского университета. 2004. 528 с.
9. Патент №18919. Блиева Р.К., Искакбаева Ж.А., Сафуани Ж.Е., Калиева А.К. Способ получения лиазных и коллагенрасщепляющих ферментов. Опубл. 15.11.2007.
10. Патент RU 2707541. Громовых Т.И., Луценко С.В., Айрапетова А.Ю., Фельдман Н.Б., Садыкова В.С., Гаврюшина И.А., Каширин В.В. Способ получения иммобилизованного мицелия базидиомицета *Fomitopsis officinalis*. ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). №. 2017145642, заявл. 25.12.2017., опубл. 27.11.2019.
11. Патент RU 2464307. Громовых Т.И., Фан М. Х., Данильчук Т. Н. Штамм бактерии *Cluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 - продуцент бактериальной целлюлозы. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет пищевых производств» (RU). №. 2011121841/10, заявл. 31.05.2011., опубл. 20.10.2012.
12. Садыкова В.С., Гаврюшина И.А., Куварина А.Е., Маркелова Н.Н., Седых Н.Г., Георгиева М.Л., Барашкова А.С., Рогожин Е.А. Антимикробная активность липопептида Эмерициллипсина А, выделенного из *Emericellopsis alkalina* в отношении биопленкообразующих бактерий // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. Т. 56, № 3. С. 250-256.
13. Шаркова Т.С., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Образование протеиназ – активаторов плазминогена микроскопическим грибом *Tolyrocladium inflatum* K1 // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52, № 1. С. 38-43.

14. Abraham T., Lewis R.N., Hodges R.S., McElhaney R.N. Isothermal titration calorimetry studies of the binding of the antimicrobial peptide gramicidin S to phospholipid bilayer membranes // *Biochemistry*. 2005. V. 44. №. 33. p. 11279-11285.
15. Akramiene D., Kondrotas A., Didziapetriene J., Kevelaitis E. Effects of beta-glucans on the immune system // *Medicina*. 2007. V. 43. №. 8. p. 597-606.
16. Albergaria H., Francisco D., Gori K., Arneborg N., Gírio F. *Saccharomyces cerevisiae* CCMII 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. V. 86. №. 3. p. 965-972.
17. Aldholmi M., Marchand P., Ourliac-Garnier I., Le Pape P., Ganesan A. A Decade of antifungal leads from natural products: 2010-2019 // *Pharmaceuticals*. 2019. V. 12. №. 4. p. 182.
18. Alhassan M., Musaimi O.A., Collins J.M., Albericio F., de la Torre B.G. Cleaving protected peptides from 2-chlorotriptyl chloride resin. Moving away from dichloromethane // *Green Chemistry*. 2020. V. 22. №. 9. p. 2840-2845.
19. Allen D., Wilson D., Drew R., Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management // *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2015. V. 13. №. 6. p. 787-798.
20. Aoki W., Ueda M. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics // *Pharmaceuticals*. 2013. V. 6. №. 8. p. 1055-1081.
21. Atlas R.M., Snyder J.W. *Handbook of Media for Clinical Microbiology* (2nd ed.) // Boca Raton, Florida: CRC Press. 2006. p. 427.
22. Bahar A.A., Ren D. Antimicrobial peptides // *Pharmaceuticals*. 2013. V. 6. №. 12. p. 1543-1575.
23. Balashova T.A., Shenkarev Z.O., Tagaev A.A., Ovchinnikova T.V., Arseniev A.S., Raap J. NMR structure of the channel-former zervamicin IIB in isotropic solvents // *FEBS Letters*. 2000. V. 466. №. 2-3. p. 333-336.

24. Baranova A.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Andreev Ya.A., Rogozhin E.A., Sadykova V.S. Antimicrobial potential of alkalophilic micromycetes *Emericellopsis alkaline* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2017. V. 53. №. 6. p. 703-710.
25. Baranova A.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Kulko A.B., Yakushev A.V., Alferova V.A., Sadykova V.S. antimicrobial peptides produced by alkaliphilic fungi *Emericellopsis alkalina*: biosynthesis and biological activity against pathogenic multidrug-resistant fungi // Applied Biochemistry and Microbiology. 2019. V. 55. №. 2. p. 145-151.
26. Batta G., Barna T., Gáspári Z., Sándor S., Kövér K.E., Binder U., Sarg B., Kaiserer L., Chhillar A.K., Eigentler A., Leiter É., Hegedüs N., Pócsi I., Lindner H., Marx F. Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF - a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* // FEBS Journal. 2009. V. 276. №. 10. p. 2875-2890.
27. Becker J.M., Covert N.L., Shenbagamurthi P., Steinfeld A.S., Naider F. Polyoxin D inhibits growth of zoopathogenic fungi // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1983. V. 23. №. 6. p. 926-929.
28. Berg A., Grigoriev P.A., Degenkolb T., Neuhof T., Härtl A., Schlegel B., Gräfe U. Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276 // Journal of Peptide Science. 2003. V. 9. №. 11-12. p. 810-816.
29. Berg A., Schlegel B., Ihn W., Demuth U., Gräfe U. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, Bergofungins B, C and D, from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059 // The Journal of Antibiotics. 1999. V. 52. №. 7. p. 666-669
30. Bertinetti B.V., Peña N.I., Cabrera G.M. An antifungal tetrapeptide from the culture of *Penicillium canescens* // Chemistry and Biodiversity. 2009. V. 6. №. 7. p. 1178-1184.

31. Bielecki S., Krystinowicz A., Turkiewicz M., Kalinowska H. Bacterial cellulose in: polysaccharides and polyamide in the food industry// Wiley-VCH Verlag. 2005. p. 31-84.
32. Binder U., Bencina M., Eigentler A., Meyer V., Marx F. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFPNN5353 activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis // BMC Microbiology. 2011. V. 11. p. 209.
33. Blazyk J., Wiegand R., Klein J., Hammer J., Epan R.M., Epan R.F., Maloy W.L., Kari U.P. A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. Journal of Biological Chemistry. 2001. V. 276. №. 30. p. 27899-27906.
34. Bongomin F., Gago S., Oladele R., Denning D. Global and multi-national prevalence of fungal diseases // Journal of Fungi. 2017. V. 3. №. 4. p. 57.
35. Brogden K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? // Nature Reviews Microbiology. 2005. V. 3. №. 3. p. 238-250.
36. Brown A.J. Journal of the Chemical Societe. 1886. V. 49. p. 432.
37. Buda De Cesare G., Cristy S.A., Garsin D.A., Lorenz M.C. Antimicrobial peptides: a new frontier in antifungal therapy // ASM Journals – American Society Microbiology. 2020. V. 11. №. 4. p. e02123-20.
38. Cabiaux V., Agerberth B., Johansson J., Homblé F., Goormaghtigh E., Ruyschaert J.M. Secondary structure and membrane interaction of PR-39, a Pro+Arg-rich antibacterial peptide // European Journal of Biochemistry. 1994. V. 224. p. 1019-1027.
39. Campos-Olivas R., Bruix M., Santoro J., Lacadena J., Martinez del Pozo A., Gavilanes J.G., Rico M. NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism // Biochemistry. 1995. V. 34. №. 9. p. 3009-3021.
40. Carstens J.L., Correa de Sampaio P., Yang D., Barua S., Wang H., Rao A., Allison J.P., LeBleu V.S., Kalluri R. Spatial computation of intratumoral

- T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer // *Nature Communications*. 2017. V. 8. p. 15095.
41. Carreira Cátia P., Staal Marc S., Falkoski Daniel N., Vries R.P. Disruption of photoautotrophic intertidal mats by filamentous fungi // *Environmental microbiology*. 2015. V. 17. №. 8. p. 2910-2921.
42. Casagrande N., Borghese C., Gabbatore L., Morbiato L., De Zotti M., Aldinucci D. Analogs of a natural peptaibol exert anticancer activity in both cisplatin- and doxorubicin-resistant cells and in multicellular tumor spheroids // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. №. 16. p. 8362.
43. Casciaro B., Cappiello F., Loffredo M.R., Ghirga F., Mangoni M.L. the potential of frog skin peptides for anti-infective therapies: the case of Esculentin-1a (1-21) NH₂ // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2020. V. 27. №. 9. p. 1405-1419.
44. Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group // *Frontiers in Microbiology*. 2019. V. 10. p. 302.
45. Chandrasekar P.H., Manavathu E.K. Caspofungin // *Drugs Today*. 2002. V.38. №. 12. p. 829-846.
46. Chen Y., Liu R.H., Li, T.X., Huang S.S., Kong L.Y., Yang M.H. Enduspeptides A-F, six new cyclic depsipeptides from a coal mine derived *Streptomyces sp.* // *Tetrahedron*. 2017. V. 73. №. 5. p. 527-531.
47. Chen Z., Ao J., Yang W., Jiao L., Zheng T., Chen X. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an arctic sediment // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2013. V.97. №. 24. p. 10381-10390.
48. Christoffersen H.F., Hansen S.K., Vad B.S., Nielsen E.H., Nielsen J.T., Vosegaard T., Skrydstrup T., Otzen D.E. The natural, peptaibolic peptide SPF-5506-A4 adopts a β -bend spiral structure, shows low hemolytic activity

- and targets membranes through formation of large pores // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015. V. 1854. p. 882-889.
- 49.Clancy C.J., Nguyen M.H. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care // *Clinical Infectious Diseases*. 2013. V. 56. №. 9. p. 1284-1292.
- 50.Coelho A.R., Tachi M., Pagnocca F.C., Nobrega G.M., Hoffmann F.L., Harada K., et al. Purification of *Candida guilliermondii* and *Pichia ohmeri* killer toxin as an active agent against *Penicillium expansum* // *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2009. V. 26. №. 1. p. 73-81.
- 51.Cohen E. Chitin synthesis and inhibition: a revisit // *Pest Management Science*. 2001. V. 57. №. 10. p. 946-950
- 52.Conlon J.M., Mechkarska M. Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family pipidae // *Pharmaceuticals*. 2014. V. 7. №. 10. p. 58-77.
- 53.Cortez A.J., Tudrej P., Kujawa K.A., Lisowska K.M. Advances in ovarian cancer therapy // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2018. V. 81. №. 7. p. 17-38.
- 54.Czub J., Baginski M. Modulation of amphotericin B membrane interaction by cholesterol and ergosterol - A molecular dynamic study // *Journal of Physical Chemistry*. 2006. V. 110. №. 33. p.16743-16753
- 55.Debasree D., Ratan G. Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007. V. 57. №. 2. p. 353-357.
- 56.Debono M., Gordee R.S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development // *Annual Review of Microbiology* .1994. V. 48. p. 471-497.
- 57.Delgado J., Acosta R., Rodríguez-Martín A., Bermúdez E., Núñez F., Asensio M.A. Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium*

- chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products // International Journal of Food Microbiology. 2015. V. 205. p. 23-29.
58. Ding G., Chen L., Zhou C., Jia H.M., Liu Y.T., Chang X., Song B., Liu X.Z., Gu Y.C., Zou Z.M. Trichoderamides A and B, a pair of stereoisomers from the plant endophytic fungus *Trichoderma gamsii* // The Journal of Antibiotics. 2015. V. 68. №. 6. p. 409-413.
59. Ding N., Jiang Y., Han L., Chen X., Ma J., Qu X., Mu Y., Liu J., Li L., Jiang C., Huang X. Bafilomycins and odoriferous sesquiterpenoids from *Streptomyces albolongus* isolated from *Elephas maximus* feces // Journal of Natural Products. 2016. V. 79. №. 4. p. 799-805.
60. Duclouhier H. Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics // Current Pharmaceutical Design. 2010. V. 16. №. 28. p. 3212- 3223.
61. Dutta P.D., Das S. Mammalian antimicrobial peptides: promising therapeutic targets against infection and chronic inflammation // Current Topics in Medicinal Chemistry. 2016. V. 16. №. 1. p. 99-129.
62. Edwards M., Bigham A., Tan J., Li S., Gozdzik A., Ross K., Jin L., Parra E.J. Association of the OCA2 polymorphism His 615Arg with melanin content in East Asian populations: further evidence of convergent evolution of skin pigmentation // PLoS Genet. 2010. V. 6. p. e1000897.
63. Fernandes C., Anjos J., Walker L.A., Silva B.M., Cortes L., Mota M., Munro C.A., Gow N.A., Gonçalves T. Modulation of *Alternaria infectoria* cell wall chitin and glucan synthesis by cell wall synthase inhibitors // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014. V. 58. №. 5. p. 2894-2904.
64. Fernandes K.E., Carter D.A. the antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens // Frontiers in Microbiology. 2017. V. 8. p. 2.
65. Fry D.E. Antimicrobial peptides // Surgical Infections. 2018. V. 19. №. 8. p. 804-811.

66. Fukazawa Y., Kagaya K. Molecular bases of adhesion of *Candida albicans* // Journal of medical and veterinary mycology: bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology. 1997. V. 35. №. 2. p. 87-99.
67. GAFFI in the news Annual Report 2021.
68. Gandía M., Monge A. Garrigues S., Orozco H., Giner-Llorca M., Marcos J.F., Manzanares P. Novel insights in the production, activity and protective effect of *Penicillium expansum* antifungal proteins // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. V. 164. p. 3922-3931.
69. Gandía M., Monge A., Garrigues S., Orozco H., Giner-Llorca M., Marcos J.F., Manzanares P. Novel insights in the production, activity and protective effect of *Penicillium expansum* antifungal proteins // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. V. 164. p. 3922-3931.
70. Ganesan A. The impact of natural products upon modern drug discovery // Current Opinion in Chemical Biology. 2008. V. 12. №. 3. p. 306-317.
71. Ganesan L.T., Manavathu E.K., Cutright J.L., Alangaden G.J., Chandrasekar P.H. In-vitro activity of nikkomycin Z alone and in combination with polyenes, triazoles or echinocandins against *Aspergillus fumigatus* // Copyright by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004. V. 10. №. 11. p. 961-966.
72. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity // Nature Reviews Immunology. 2013. V. 3. №. 9. p. 710-720.
73. Garcia-Rubio R., de Oliveira H.C., Rivera J., Trevijano-Contador N. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus species* // Frontiers in Microbiology. 2019. V. 10. p. 2993.
74. Garrigues S., Gandía M., Marcos J.F. Occurrence and function of fungal antifungal proteins: a case study of the citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2016. V. 100. №. 5. p. 2243-2256.

75. Garrigues S., Gandía M., Popa C., Borics A., Marx F., Coca M. Marcos J.F., Manzanares P. Efficient production and characterization of the novel and highly active antifungal protein AfpB from *Penicillium digitatum* // Scientific Reports. 2017. V. 7. №. 1. p. 14663.
76. Gayathry G., Gopaldaswamy G. Production and characterization of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum* // Indian Journal of Fibre and Textile Research. 2014. V. 39. №. 1. p. 93-96.
77. Geddes-McAlister J., Shapiro R.S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics // New York Academy of Sciences. 2019. V. 1435. №. 1. p. 57-78.
78. Gessmann R., Axford D., Brückner H., Berg A., Petratos K. A natural, single-residue substitution yields a less active peptaibiotic: the structure of bergofungin A at atomic resolution // Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications. 2017. V. 73. №. 2. p. 95-100.
79. Gonçalves M.F., Vicente T.F., Esteves A.C., Alves A. Novel halotolerant species of *Emericellopsis* and *Parasarocladium* associated with macroalgae in an estuarine environment // Mycologia. 2020. V. 112. №. 1. p. 154-171.
80. Grigoletto D.F., Trivella D.B.B., Tempone A.G., Rodrigues A., Correia A.M.L., Lira S.P. Antifungal compounds with anticancer potential from *Trichoderma* sp. P8BDA1F1, an endophytic fungus from *Begonia venosa* // Brazilian Journal of Microbiology. 2020. V. 51. №. 3. p. 989-997.
81. Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Debets A.J., Bilanenko E.N. Are alkalitolerant fungi of the *Emericellopsis* lineage (Bionectriaceae) of marine origin? IMA Fungus. 2013. V. 4. №. 2. p. 213-228.
82. Guilhelmelli F. Vilela N. Albuquerque P. Derengowski L.D.S., Silva-Pereira I. Kyaw C.M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance // Frontiers in Microbiology. 2013. V. 4. p. 353.

83. Gun Lee D., Shin S.Y., Maeng C.Y., Jin Z.Z., Kim, K.L., Hahn K.S. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger* // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999. V. 263. №. 3. p. 646-651.
84. Gupta V.K., Mach R.L., Sreenivasaprasad S. Fungal biomolecules sources, applications and recent developments // Fungal Biomolecules. 2015. p. 1-10.
85. Hajji M., Jellouli K., Hmidet N., Balti R., Sellami-Kamoun A., Nasri M. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2010. V. 37. №. 8. p. 805-813.
86. Hall R.A., Bates S., Lenardon M.D., Maccallum D.M., Wagener J., Lowman D.W., Kruppa M.D., Williams D.L., Odds F.C., Brown A.J., Gow N.A.R. The Mnn2 mannosyltransferase family modulates mannoprotein fibril length, immune recognition and virulence of *Candida albicans* // PLoS Pathog. 2013. V. 9. №. 4. p. e1003276.
87. Hazekawa M., Nishinakagawa T., Kawakubo-Yasukochi T., Nakashima M. Evaluation of IC50 levels immediately after treatment with anticancer reagents using a real-time cell monitoring device // Experimental and Therapeutic Medicine. 2019. V. 18. p. 3197-3205.
88. Hector R.F., Zimmer B.L., Pappagianis D. Evaluation of nikkomycins X and Z in murine models of coccidioidomycosis, histoplasmosis, and blastomycosis // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1990. V. 34. №. 4. p. 587-593.
89. Hegedüs N., Marx F. Antifungal proteins: more than antimicrobials? Fungal Biology Reviews. 2013. V. 26. №. 4. p. 132–145.
90. Hilchie A.L., Wuerth K., Hancock R.E.W. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides // Nature Chemical Biology. 2013. V. 9. №. 12. p. 761-768.
91. Hiramoto F., Nomura N., Furumai T., Igarashi Y., Oki T. Pradimicin resistance of yeast is caused by a mutation of the putative N-glycosylation

- sites of osmosensor protein Sln1// Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 2005. V. 69. №. 1. p. 238-241.
- 92.Hiramoto F., Nomura N., Furumai T., Oki T., Igarashi Y. Apoptosis-like cell death of *Saccharomyces cerevisiae* induced by a mannose-binding antifungal antibiotic, pradimicin The Journal of Antibiotics. 2003. V. 56. №. 9. p. 768-772.
- 93.Holzknecht J., Kühbacher A., Papp C., Farkas A., Váradi G., Marcos J.F., Manzanares P., Tóth G.K., Galgóczy L., Marx F. The *Penicillium chrysogenum* Q176 antimicrobial protein PAFC effectively inhibits the growth of the opportunistic human pathogen *Candida albicans* // Journal of Fungi - Open Access Mycology Journal. 2020. V. 6. №. 3. p. 141.
- 94.Hospenthal M.K., Freund S.M.V., Komander D. Assembly, analysis and architecture of atypical ubiquitin chains // Nature Structural & Molecular Biology. 2013. V. 20. p. 555-565.
- 95.Huber A., Hajdu D., Bratschun-Khan D., Gáspári Z., Varbanov M., Philippot S., Fizil Á., Czajlik A., Kele Z., Sonderegger C., Galgóczy L., Bodor A., Marx F., Batta G. New antimicrobial potential and structural properties of PAFB: a cationic, cysteine-rich protein from *Penicillium chrysogenum* Q176 // Scientific Reports. 2018. V. 8. №. 1. p. 1751.
- 96.Hutchison M.L., Tester M.A., Gross D.C. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. Molecular Plant-Microbe Interactions. 1995. V. 8. №. 4. p. 610-620.
- 97.Inostroza A., Lara L., Paz C, Perez A., Galleguillos F., Hernandez V. Antibiotic activity of Emerimicin IV isolated from *Emericellopsis minima* from Talcahuano Bay, Chile // Natural Product Research. 2018. V. 32. №. 11. p. 1361-1364.
- 98.Ishiyama D., Satou T., Senda H., Fujimaki T. Heptaibin, a novel antifungal peptaibol antibiotic from *Emericellopsis sp.* BAUA8289 // The Journal of Antibiotics. 2000. V. 53. №. 7. p. 728-732.

99. Izadpanah A., Gallo R.L. Antimicrobial peptides // The Journal of the American Academy of Dermatology. 2005. V. 52. №. 3. p. 381-390.
100. Jeffery-Smith A., Taori S.K., Schelenz S., Jeffery K., Johnson E.M., Borman A., Manuel R., Brown C.S. *Candida auris*: a review of the literature // Clinical Microbiology Reviews. 2018. V. 31. №. 1. p. e00029-17.
101. Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E. Peptide antimicrobial agents // Clinical Microbiology Reviews. 2006. V. 19. №. 3. p. 491-511.
102. Jiao R., Cai Y., He P., Munir S., Li X., Wu Y., Wang J., Xia M., He P., Wang G., Yang H., Karunarathna S.C., Xie Y., He Y. *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 Produces Lipopeptides with Promising Biocontrol Activity Against Fungal Pathogen *Erysiphe Cichoracearum* // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021. V. 11. p. 598999.
103. Jin Y., Hammer J., Pate M., Zhang Y., Zhu F., Zmuda E., Blazyk J. Antimicrobial activities and structures of two linear cationic peptide families with various amphipathic beta-sheet and alpha-helical potentials // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005. V. 49. №. 12. p. 4957-4964.
104. Junior E.F.C., Guimarães C., Franco L.L., Alves R.J., Kato K.C., Martins H.R., de Souza Filho J.D., Bemquerer M.P., Munhoz V.H.O., Resende J.M., Verly R.M. Glycotriazole-peptides derived from the peptide HSP1: Synergistic effect of triazole and saccharide rings on the antifungal activity // Amino Acids. 2017. V. 49. №. 8. p. 1389-1400.
105. Kaiserer L., Oberparleiter C., Weiler-Görz R., Burgstaller W., Leiter E., Marx F. Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF // Archives of Microbiology. 2003. V. 180. №. 3. p. 204-210.
106. Katoch M., Singh D., Kapoor K.K., Vishwakarma R.A. *Trichoderma lixii* (IIM-B4), an endophyte of *Bacopa monnieri* L. producing peptaibols // BMC Microbiology. 2019. V. 19. №. 98. p. 1-10.
107. Kerenga B.K., McKenna J.A., Harvey P.J., Quimbar P., Garcia-Ceron D., Lay F.T., Phan T.K., Veneer P.K., Vasa S., Parisi K., Shafee T.M.A., van der Weerden N.L., Hulett M.D., Craik D.J., Anderson M.A., Bleackley M.R.

- Salt-tolerant antifungal and antibacterial activities of the corn defensin ZmD32 // *Frontiers in Microbiology*. 2019. V. 10. p. 795.
108. Kim H.J., Choi H.S., Yang S.Y., Kim I.S., Yamaguchi T., Sohng J.K., Park S.K., Kim J.C., Lee C.H., Gardener B.M., et al. Both extracellular chitinase and a new cyclic lipopeptide, chromobactomycin, contribute to the biocontrol activity of *Chromobacterium sp.* C61 // *Molecular Plant Pathology*. 2014. V. 15. №. 2. p. 122-132.
109. Kovács L., Virágh M., Takó M., Papp T., Vágvölgyi C., Galgóczy L. Isolation and characterization of *Neosartorya fischeri* antifungal protein (NFAP) // *Peptides*. 2011. V. 32. №. 8. p. 1724-1731.
110. Kredics L., Szekeres A., Czifra D., Vágvölgyi C., Leitgeb B. Recent results in alamethicin research // *Chemistry and Biodiversity*. 2013. V. 10. №. 5. p. 744-771.
111. Kuvarina A.E., Gavryushina I.A., Kulko A.B., Ivanov I.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. The Emericellipsins A-E from an alkalophilic fungus *Emericellopsis alkalina* show potent activity against multidrug-resistant pathogenic fungi // *Journal of Fungi*. 2021. V. 7. №. 2. p. 153.
112. Kuvarina A.E., Gavryushina I.A., Sykonnikov M.A., Efimenko T.A., Markelova N.N., Bilanenko E.N., Bondarenko S.A., Kokaeva L.Y., Timofeeva A.V., Serebryakova M.V., Barashkova A.S., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. Exploring peptaibol's profile, antifungal and antitumor activity of Emericellipsin A of *Emericellopsis* species from soda and saline soils // *Molecules*. 2022. V. 27. №. 5. p. 1736.
113. Larwood D.J. Nikkomycin Z-ready to meet the promise? // *Journal of Fungi*. 2020. V. 6. №. 4. p. 261.
114. Lau J.L., Dunn M.K. Therapeutic peptides: historical perspectives, current development trends, and future directions // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018. V. 26. №. 10. p. 2700-2707.

115. Lee J., Lee D.G. Antimicrobial peptides (AMPs) with dual mechanisms: membrane disruption and apoptosis // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015. V. 25. №. 6. p. 759-764.
116. Lee M.T., Chen F.Y., Huang H.W. Energetics of pore formation induced by membrane active peptides // *Biochemistry*. 2004. V. 43. №. 12. p. 3590-3599.
117. Leiter É., Gáll T., Csernoch L., Pócsi I. Biofungicide utilizations of antifungal proteins of filamentous ascomycetes: current and foreseeable future developments // *BioControl*. 2017. V. 62. №. 2. p. 125-138.
118. Lenardon M.D., Munro C.A., Gow N.A. Chitin synthesis and fungal pathogenesis // *Current Opinion in Microbiology*. 2010. V. 13. №. 4. p. 416-423.
119. Lennox E.S. Transduction of Linked Genetic Characters of the host by bacteriophage P1 // 1955. *Virology*. V.1. p.190-206.
120. Li T., Li L., Du F., Sun L., Shi J., Long M., Chen Z. Activity and mechanism of action of antifungal peptides from microorganisms: a review // *Molecules*. 2021. V. 26. №. 11. p. 3438.
121. Li Y., Lan N., Xu L., Yue Q. Biosynthesis of pneumocandin lipopeptides and perspectives for its production and related echinocandins // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. V. 102. №. 9. p. 9881-9891.
122. Lohans C.T., Vederas J.C. Structural characterization of thioether-bridged bacteriocins // *The Journal of Antibiotics*. 2014. V. 67 №. 11. p. 2330.
123. López-Meza J., Ochoa-Zarzosa A., Aguilar J., Loeza-Lara P. Antimicrobial peptides: diversity and perspectives for their biomedical application // *In Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*. 2011. p. 275-304.

124. Lu H.1., Jiang X. Structure and properties of bacterial cellulose produced using a trickling bed reactor // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014. V. 172. №. 8. p. 3844-3861.
125. Luong H.X., Thanh T.T., Tran T.H. Antimicrobial peptides – advances in development of therapeutic applications // *Life Sciences*. 2020. V. 260. p. 118407.
126. Mahlapuu M., Björn C., Ekblom J. Antimicrobial peptides as therapeutic agents: opportunities and challenges // *Critical Reviews in Biotechnology*. 2020. V. 40. №. 7. p. 978-992.
127. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 7th edition // Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2010. p. 3225-3240.
128. Manns D.C., Churey J.J., Worobo R.W. Variable efficacy of the proteinaceous antifungal YvgO in select fruit juices and teas as a complement with UV methods of food protection // *Journal of Food Protection*. 2015. V. 78. №. 10. p. 1851-1860.
129. Marcos J.F., Gandía M. Antimicrobial peptides: to membranes and beyond // *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2009. V. 4. № 6. p. 659-671.
130. Marcos J.F., Manzanares P. Antimicrobial peptides // *In Antimicrobial Polymers*. 2012. p. 195-212.
131. Marik T., Tyagi C., Balázs D., Urbán P., Szepesi A., Bakacsy L., Endre G., Rakk D., Szekeres A., Andersson M.A., Salonen H., Druzhinina I., Vágvölgyi C., Kredics L. Structural diversity and bioactivities of peptaibol compounds from the longibrachiatum clade of the filamentous fungal genus *Trichoderma* // *Frontiers in Microbiology*. 2019. V. 10. №. 1434. p.1-38.
132. Marik T., Tyagi C., Racic G., Rakk D., Szekeres A., Vágvölgyi C., Kredics L. New 19-Residue peptaibols from *Trichoderma* clade *viride* // *Microorganisms*. 2018. V. 6. №. 85. p. 1-16.

133. Marik T., Urbán P., Tyagi C., Szekeres A., Leitgeb B., Vágvölgyi M., Manczinger L., Druzhinina I.S., Kredics L. Diversity profile and dynamics of peptaibols produced by green mould *Trichoderma* species in interactions with their hosts *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* // *Chemistry and Biodiversity*. 2017. V. 14. №. 6. p. e1700033.
134. Martín Mazuelos E., Rodríguez-Tudela J.L. In vitro activity of anidulafungin. Comparison with the activity of other echinocandins // *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2008. V. 26. №. 14. p. 7-13.
135. Martínez-Culebras P.V., Gandía M., Boronat A., Marcos J.F., Manzanares P. differential susceptibility of mycotoxin-producing fungi to distinct antifungal proteins (AFPs) // *Food Microbiology*. 2021. V. 97. p. 103760.
136. Martins R.M., Sforça M.L., Amino R., Juliano M.A., Oyama S.Jr., Juliano L., Pertinhez T.A., Spisni A., Schenkman S. Lytic activity and structural differences of amphipathic peptides derived from trypsin // *Biochemistry*. 2006. V. 45. №. 6. p. 1765-1774.
137. Matsumori N., Tahara K., Yamamoto H., Morooka A., Doi M., Oishi T., Murata M. Direct interaction between amphotericin B and ergosterol in lipid bilayers as revealed by ²H NMR spectroscopy // *Journal of the American Chemical Society*. 2009. V. 131. №. 33. p. 11855-11860.
138. Matsuzaki K. Membrane permeabilization mechanisms // *Antimicrobial Peptides*. 2019. p. 9-16.
139. Matsuzaki K., Sugishita K., Harada M., Fujii N., Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1997. V. 1327. №. 1. p. 119-130.
140. Mesa-Arango A.C., Trevijano-Contador N., Román E., Sánchez-Fresneda R., Casas C., Herrero E., Argüelles J.C., Pla J., Cuenca-Estrella M., Zaragoza O. The production of reactive oxygen species is a universal

- action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014. V. 58. №. 11. p. 6627-6638.
141. Meyer V., Jung S. Antifungal peptides of the AFP family revisited: are these cannibal toxins? // *Microorganisms*. 2018. V. 6. №. 2. p. 50.
142. Mizuhara N., Kuroda M., Ogita A., Tanaka T., Usuki Y., Fujita K. Antifungal thiopeptide cyclothiazomycin B1 exhibits growth inhibition accompanying morphological changes via binding to fungal cell wall chitin // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011. V. 19. №. 18. p. 5300-5310.
143. Mohamed H., Jellouli K., Hmidet N., Balti R., Sellami-Kamoun A. A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010. V. 37. №. 8. p. 805-813.
144. Mohamed-Benkada M., Pouchus Y.F., Vérité P., Pagniez F., Caroff N., Ruiz N. Identification and biological activities of long-chain peptaibols produced by a marine-derived strain of *Trichoderma longibrachiatum* // *Chemistry and Biodiversity*. 2016. V. 13. № 5. p. 521-530.
145. Moniri M., Moghaddam A.B., Azizi S., Rahim R.A., Ariff A.B., Saad W.Z., Navaderi M., Mohamad R. Production and status of bacterial cellulose in biomedical engineering // *Nanomaterials*. 2017. V.7. p.257.
146. Moreno A.B., Martínez del Pozo A., San Segundo B. Biotechnologically relevant enzymes and proteins. antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *magnaporthe grisea* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006. V. 72. № 5. p. 883-895.
147. Muhialdin B.J., Algboory H.L., Kadum H., Mohammed N.K., Saari N., HassanZ., Meor Hussin A.S. Antifungal activity determination for the peptides generated by *Lactobacillus plantarum* TE10 against *Aspergillus flavus* in maize seeds // *Food Control*. 2020. V. 109. p. 106898.

148. Mueller J.H., Hinton J. A Protein-Free Medium for Primary Isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus* // *Experimental Biology and Medicine*. 1941. V. 48. p.330-333.
149. Muñoz A., Marcos J.F. Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides // *Journal of Applied Microbiology*. 2007. V. 101. № 6. p. 1199-1207.
150. Mylonakis E., Podsiadlowski L., Muhammed M., Vilcinskas A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides // *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*. 2016. V. 371. №. 1695. p. 20150290.
151. Nawrot R., Barylski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., Goździcka-Józefiak A. Plant antimicrobial peptides // *Folia Microbiologica*. 2014. V. 59. p. 181-196.
152. Neera 1., Ramana K.V., Batra H.V. Occurrence of cellulose-producing *Gluconacetobacter* spp. in fruit samples and Kombucha tea, and production of the biopolymer // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015. V. 176. №. 4. p. 1162-1173.
153. Nelissen J., Nuyts K., de Zotti M., Lavigne R., Lamberigts C., de Borggraeve W.M. Total synthesis of Septocylindrin B and C-terminus modified analogues // *PLoS One*. 2012. V. 7. №. 12. p. e51708.
154. Neuhoef R., Dieckmann R., Druzhinina I.S., Kubicek C.P., von Döhren H. Intact-cell MALDI-TOF mass spectrometry analysis of peptaibol formation by the genus *Trichoderma/Hypocrea*: can molecular phylogeny of species predict peptaibol structures? // *Microbiology*. 2007. V. 153. №. 10. p. 3417-3437.
155. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 // *Journal of Natural Products*. 2016. V. 79. №. 3. p. 629-661.
156. Niaz B., Saeed F., Ahmed A., Imran M., Maan A.A., Khan M.K.I., Tufail T., Anjum F.M., Hussain S., Suleria H.A.R. Lactoferrin (LF): a

- natural antimicrobial protein // International Journal of Food Properties. 2019. V. 22. №. 1. p. 1626-1641.
157. Nicolas P. Multifunctional host defense peptides: intracellular targeting antimicrobial peptides // FEBS Journal. 2009. V. 276. №. 22. p. 6483-6496.
158. Oh S.U., Yun B.S., Lee S.J., Kim J.H., Yoo I.D. Atroviridins A-C and Neoatroviridins A-D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities // The Journal of Antibiotics. 2002. V. 55. №. 6. p. 557-564.
159. Ortholand J.Y., Ganesan A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future // Current Opinion in Chemical Biology. 2004. V. 8. №. 9. p. 271-280.
160. Otto A., Laub A., Porzel A., Jürgen Schmidt J., Wessjohann L., Westermann B., Arnold N. Isolation and total synthesis of Albupeptins A-D: 11-Residue peptaibols from the fungus *Gliocladium album* // European Journal of Organic Chemistry. 2015. V. 34. p. 7449-7459.
161. Ovchinnikova T.V., Levitskaya N.G., Voskresenskaya O.G., Yakimenko Z.A., Tagaev A.A., Ovchinnikova A.Y., Murashev A.N., Kamenskii A.A. Neuroleptic properties of the ion-channel-forming peptaibol zervamicin: Locomotor activity and behavioral effects // Chemistry and Biodiversity. 2007. V. 4. №. 6. p. 1374-1387.
162. Papo N., Shai Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? // Peptides. 2003. V. 24. №. 11. p. 1693-1703.
163. Patil A., Majumdar S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2017. V. 69. №. 12. p. 1635-1660.
164. Patiño B., Vázquez C., Manning J.M., Roncero M.I.G., Córdoba-Cañero D., Di Pietro A., Martínez-del-Pozo Á. Characterization of a novel cysteine-rich antifungal protein from *Fusarium graminearum* with activity

- against maize fungal pathogens // International Journal of Food Microbiology. 2018. V. 283. p. 45-51.
165. Patocka J., Nepovimova E., Klimova B., Wu Q., Kuca K. Antimicrobial peptides: amphibian host defense peptides // Current Topics in Medicinal Chemistry. 2019. V. 26. №. 32. p. 5924-5946.
166. Perlatti B., Nichols C.N., Alspaugh J.A., James B. Gloer J.B., Bills G.F. Sphaerostilbellins, new antimicrobial aminolipopeptide peptaibiotics from *Sphaerostilbella toxica* // Biomolecules. 2020. V. 10. №. 1371. p. 1-15.
167. Pianalto K., Alspaugh J. New horizons in antifungal therapy // Journal of Fungi. 2016. V. 2. №. 4. p. 26.
168. Pitt J.I., Hocking A.D. Fungi and food spoilage. 2009. p. 519.
169. Plaza V., Silva-Moreno E., Castillo L. Breakpoint: cell wall and glycoproteins and their crucial role in the phytopathogenic fungi infection // Current Protein and Peptide Science. Sci. 2020. V. 21. №. 3. p. 227–244.
170. Rabanal F., Cajal Y. Therapeutic potential of antimicrobial peptides // New Weapons to Control Bacterial Growth. 2016. p. 433-451.
171. Ramachandran R., Chalasani A.G., Lal R., Roy U. A broad-spectrum antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* RLID 12.1 // The Scientific World Journal. 2014. p. 1-10.
172. Rautenbach M., Troskie A.M., Vosloo J.A. Antifungal peptides: to be or not to be membrane active // Biochimie. 2016. V. 130. p. 132-145.
173. Revie N.M., Iyer K.R., Robbins N., Cowen L.E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact // Current Opinion in Microbiology. 2018. V. 45. p. 70-76.
174. Riedl S., Zweytick D., Lohner K. Membrane-active host defense peptides—challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs // Chemistry and Physics of Lipids. 2011. V. 164. №. 8. p. 766-781.
175. Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Baranova A.A., Vasilchenko A.S., Lushpa V.A., Mineev K.S., Georgieva M.L., Kulko A.B., Krashennnikov

- M.E., Lyundup A.V., Vasilchenko A.V., Andreev Y.A. A novel lipopeptaibol Emericellipsin A with antimicrobial and antitumor activity produced by the extremophilic fungus *Emericellopsis alkalina* // *Molecules*. 2018. V. 23. №. 11. p. 1-12.
176. Rong S., Xu H., Li L., Chen R., Gao X., Xu Z. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2020. V. 162. p. 69-77.
177. Sabouraud K. *Ann. Dermatol. Syphilol.* 1892. V. 3. p.1061.
178. Santos J.R., Gouveia L.F., Taylor E.L., Resende-Stoianoff M.A., Pianetti G.A., César I.C., Santos D.A. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012. V. 56. №. 5. p. 2553-2558.
179. Sarkar T., Chetia M., Chatterjee S. Antimicrobial peptides and proteins: from nature's reservoir to the laboratory and beyond // *Frontiers in Chemistry*. 2021. V. 9. p. 691532.
180. Schaubert J., Gallo R.L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system // *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008. V. 122. №. 3. p. 261-266.
181. Schmidt G. Krings U., Nimtz M., Berger R.G. A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. V. 28. №. 4. p. 1623-1632.
182. Şener L.T., Albeniz G., Dinç B., Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines (Review) // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2017. V. 14. №. 3. p. 1866-1870.
183. Seyedjavadi S.S., Khani S., Zare-Zardini H., Halabian R., Goudarzi M., Khatami S., Imani Foolad A.A., Amani J., Razzaghi-Abyaneh M. Isolation, functional characterization, and biological properties of MCh-

- AMP1, a novel antifungal peptide from *Matricaria chamomilla* L // Chemical biology and drug design. 2019. V. 93. p. 949-959.
184. Shadrivova O., Gusev D., Vashukova M., Lobzin D., Gusarov V., Zamyatin M., Zavrazhnov A., Mitichki M., Borzova Y., Kozlova O., Desyatik E., Burygina E., Ignatyeva S., Oganesyanyan E., Vasilyeva N., Klimko N. COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis in Russia // Journal of Fungi. 2021. V. 7. p. 1059.
185. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides // Biochimica et Biophysica Acta. 1999. V. 1462. №. 1-2. p. 55-70.
186. Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Gizatullina A.K., Zhuravleva A.V., Tagaev A.A., Yakimenko Z.A., Telezhinskaya I.N., Kirpichnikov M.P., Ovchinnikova T.V., Arseniev A.S. Peptaibol Antiamoebin I: spatial structure, backbone dynamics, interaction with Bicelles and lipid-protein nanodiscs, and pore formation in context of barrel-stave model // Chemistry and Biodiversity. 2013. V. 10. №. 5. p. 838-863.
187. Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Nadezhdin K.D., Bocharov E.V. Antiamoebin I in Methanol Solution: Rapid Exchange between Right-Handed and Left-Handed 3_{10} -Helical Conformations // Chemistry & Biodiversity. 2007. V. 4. №. 6. p. 1219-1242.
188. Shokri D., Zaghian S., Khodabakhsh F., Fazeli H., Mobasherizadeh S., Ataei B. Antimicrobial activity of a UV-stable bacteriocinlike inhibitory substance (BLIS) produced by *Enterococcus faecium* strain DSH20 against vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) strains // Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2014. V. 47. №. 5. p. 371-376.
189. Shwaiki L.N., Lynch K.M., Arendt E.K. Future of antimicrobial peptides derived from plants in food application – a focus on synthetic peptides // Trends in Food Science & Technology. 2021. V. 112. p. 312-324.

190. Silva P.M., Gonçalves S., Santos N.C. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes // *Frontiers in Microbiology*. 2014. V. 5. p. 97.
191. Skouri-Gargouri H., Gargouri A. First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus* // *Peptides*. 2008. V. 29. №. 11. p.1871-1877.
192. Souza A.L.A., Díaz-Dellavalle P., Cabrera A., Larrañaga P., Dalla-Rizza M., De-Simone S.G. Antimicrobial activity of pleurocidin is retained in Plc-2, a C-terminal 12-amino acid fragment. *Peptides*. 2013. V. 45. p. 78-84.
193. Stefanowicz-Hajduk J., Asztemborska M., Krauze-Baranowska M., Godlewska S., Gucwa M., Moniuszko-Szajwaj B., Stochmal A., Ochocka J.R. Identification of Flavonoids and Bufadienolides and Cytotoxic Effects of *Kalanchoe daigremontiana* Extracts on Human Cancer Cell Lines // *Planta Med*. 2020. V. 86. p. 239-246.
194. Steiner H., Hultmark D., Engström A., Bennich H., Boman H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity // *Nature*. 1981. V. 292. p. 246-248.
195. Summers M.Y., Kong F., Feng X., Siegel M.M., Janso J.E., Graziani E.I., Carter G.T. Septocylindrins A and B: Peptaibols Produced by the Terrestrial Fungus *Septocylindrium* sp. LL-Z1518 \perp // *Journal of Natural Products*. 2007. V. 70. №. 3. p. 391-396.
196. Suzuki T., Umehara K., Tashiro A., Kobayashi Y., Dohra H., Hirai H., Kawagishi H. An antifungal protein from the culinary-medicinal beech mushroom, *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel. (Agaricomycetideae) // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2011. V. 13. №. 1. p. 27-31.
197. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi C. Peptaibols and Related Peptaibiotics of *Trichoderma* // *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2005. V. 52. №. 2. p. 137-168.

198. Tam J.P., Wang S., Wong K.H., Tan W.L. Antimicrobial peptides from plants // *Pharmaceuticals*. 2015. V. 8. №. 4. p. 711-757.
199. Tan Z., Lin B., Zhang R. A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25 // *SpringerPlus*. 2013. V. 2. №. 1. p. 543.
200. Theis T., Marx F., Salvenmoser W., Stahl U., Meyer V. New insights into the target site and mode of action of the antifungal protein of *Aspergillus giganteus* // *Research in Microbiology*. 2005. V. 156. №. 1. p. 47-56.
201. Thery T., Lynch K.M., Arendt E.K. Natural antifungal peptides/proteins as model for novel food preservatives // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019. V. 18. №. 1. p. 1327-1360.
202. Thery T., Tharappel J.C., Kraszewska J. Beckett M., Bond U., Arendt E.K. Antifungal activity of a synthetic human-defensin 3 and potential applications in cereal-based products // *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2016. V. 38. p. 160-168.
203. Tóth L., Kele Z., Borics A., Nagy L.G., Váradi G., Virágh M., Takó M., Vágvölgyi C., Galgóczy L. NFAP2, a novel cysteine-rich anti-yeast protein from *Neosartorya fischeri* NRRL 181: isolation and characterization // *AMB Express*. 2016. V. 6. №. 1. p. 75.
204. Tu C.Y., Chen Y.P., Yu M.C., Hwang I.E., Wu D.Y., Liaw L.L. Characterization and expression of the antifungal protein from *Monascus pilosus* and its distribution among various *Monascus species* // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016. V. 122. №. 1. p. 27-33.
205. Tyagi C., Marik T., Vágvölgyi C., Kredics L., Ötvös F. Accelerated molecular dynamics applied to the peptaibol folding problem // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. V. 20. №. 17. p. 4268.
206. Umegawa Y., Nakagawa Y., Tahara K., Tsuchikawa H., Matsumori N., Oishi T., Murata M. Head-to-tail interaction between amphotericin B and ergosterol occurs in hydrated phospholipid membrane // *Biochemistry*. 2012. V. 51. №. 1. p. 83-89.

207. Van der Weerden N.L., Bleackley M.R., Anderson M.A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides // Cellular and Molecular Life Sciences. 2013. V. 70. №. 19. p. 3545-3570.
208. Van Dijk I.A., Nazmi K., Bolscher J.G., Veerman E.C, Stap J. Histatin-1, a histidine-rich peptide in human saliva, promotes cell-substrate and cell-cell adhesion // The FASEB Journal. 2015. V. 29. №. 8. p. 3124-3132.
209. Vasan N., Baselga J., Hyman D.M. A View on drug resistance in cancer // Nature. 2019. V. 575. №. 7782. p. 299-309.
210. Verly R.M., Rodrigues M.A., Daghanli K.R., Denadai A.M., Cuccovia I.M., Bloch C.Jr., Frézard F., Santoro M.M., Piló-Veloso D., Bemquerer M.P. Effect of cholesterol on the interaction of the amphibian antimicrobial peptide DD K with liposomes // Peptides. 2008. V. 29. №. 1. p. 15-24.
211. Vila-Perelló M., Sánchez-Vallet A., García-Olmedo F., Molina A., Andreu D. Synthetic and structural studies on *Pyricularia pubera* thionin: a single-residue mutation enhances activity against gram-negative bacteria // FEBS Letters. 2003. V. 536. №. 1-3. p. 215-219.
212. Wagh F.H., Barai R.S., Gurung P., Idicula-Thomas S. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides Nucleic Acids Research. 2015. V. 44. №. 1. p. D1094-D1097.
213. Walker L.A., Gow N.A., Munro C.A. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2013. V. 57. №. 1. p. 146-154.
214. Walker L.A., Lee K.K., Munro C.A., Gow N.A. Caspofungin treatment of *Aspergillus fumigatus* results in chg-dependent upregulation of chitin synthesis and the formation of chitin-rich microcolonies // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015. V. 59. №. 10. p. 5932-5941.

215. Walsh T.J., Giri N. Pradimicins: a novel class of broad-spectrum antifungal compounds // *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1997. V. 16. №. 1. p. 93-97.
216. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins // *Pharmaceuticals* 2014. V. 7. №. 5. p. 545-594.
217. Wang G. Post-translational modifications of natural antimicrobial peptides and strategies for peptide engineering // *Current Biotechnology*. 2012. V. 1. №. 1. p. 72-79.
218. Wang G., Li X., Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education // *Nucleic Acids Research*. 2016. V. 44. p. D1087-D1093.
219. Wang J., Ma Y., Hou S., Miao Z., Ma Q. Interaction of amphotericin B and saturated or unsaturated phospholipid monolayers containing cholesterol or ergosterol at the air-water interface // *Biophysical Chemistry*. 2020. V. 258. p. 106317.
220. Wang N.N., Yan X., Gao X.N., Ni H.J., Kang Z.S., Huang L.L. Purification and characterization of a potential antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-J against *Valsa mali* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2016. V. 32. №. 4. p. 63.
221. Wasmann R.E., Muilwijk E.W., Burger D.M., Verweij P.E., Knibbe C.A., Brüggemann R.J. // *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Micafungin*. *Clinical Pharmacokinetics*. 2018. V. 57. №. 3. p. 267-286.
222. Wen C., Guo W., Chen X. Purification and Identification of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium citrinum* from the Southwest Indian Ocean // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014. V. 24. №. 10. p. 1337-1345.
223. Wu S., Jia S., Sun D., Chen M., Chen X., Zhong J., Huan L. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides Subpeptin JM4-A and Subpeptin JM4-B produced by *Bacillus subtilis* JM4 // *Current Biotechnology*. 2005. V. 51. p. 292-296.

224. Wu Y., He Y., Ge X. Functional characterization of the recombinant antimicrobial peptide *trx-ace-amp1* and its application on the control of tomato early blight disease // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011. V. 90. №. 4. p. 1303-1310.
225. Yamamoto T., Umegawa Y., Yamagami M., Suzuki T., Tsuchikawa H., Hanashima S., Matsumori N., Murata M. The perpendicular orientation of amphotericin b methyl ester in hydrated lipid bilayers supports the barrel-stave model // *Biochemistry*. 2019. V. 58. №. 17. p. 2282-2291.
226. Yan H., Yun J., Ai D., Zhang W., Bai J., Guo J. Two novel cationic antifungal peptides isolated from *Bacillus pumilus* HN-10 and their inhibitory activity against *Trichothecium roseum* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018. V. 34. №. 17. p. 21.
227. Yan J., Yuan S.S., Jiang L.L., Ye X.J., Ng T. Wu Z.J. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2015. V. 99. №. 17. p. 4961-4981.
228. Yang L., Harroun, T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores // *Biophysical Journal*. 2001. V. 81. №. 3. p. 1475-1485.
229. Yasuoka A., Oka S., Komuro K., Shimizu H., Kitada K., Nakamura Y., Shibahara S., Takeuchi T., Kondo S., Shimada K., et al. Successful treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice with benanomicin A (ME1451) // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V. 39. №. 3. p. 720-724.
230. Yount N.Y., Yeaman M.R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. V. 101. №. 19. p. 7363-7368.
231. Yu G., Baeder Desiree Y., Regoes R. R., Rolff J. Predicting drug resistance evolution: insights from antimicrobial peptides and antibiotics // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018. V. 285. №. 1874. p. 20172687.

232. Zanjani N.T., Miranda-Saksena M., Cunningham A.L., Dehghani F. Antimicrobial peptides of marine crustaceans: the potential and challenges of developing therapeutic agents // inflammation // Current Topics in Medicinal Chemistry. 2018. V. 25. №. 19. p. 2245-2259.
233. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms // Nature 2002. V. 415. №. 6870. p. 389-395.
234. Zhang D., Miller M.J. Polyoxins and nikkomycins: progress in synthetic and biological studies // Current Pharmaceutical Design. 1999. V. 5. №. 2. p. 73-99.
235. Zhang Q.X., Zhang Y., Shan H.H., Tong Y.H., Chen X.J., Liu F.Q. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* W10 // Environmental Science and Pollution Research. 2017. V. 24. №. 32. p. 25000-25009.
236. Zhao P., Ren A., Dong P., Sheng Y. Antimicrobial peptaibols, trichokonins, inhibit mycelial growth and sporulation and induce cell apoptosis in the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2018. V. 54. №. 4. p. 396-403.
237. Zhao X., Zhou Z.J., Han Y., Wang Z.Z., Fan J., Xiao H.Z. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey // Microbiological Research. 2013. V. 168. №. 9. p. 598-606.
238. Zhao Z., Wang Q., Wang K., Brian K., Liu C., Gu Y. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components // Bioresource Technology. 2010. V. 101. №. 1. p. 292-297.
239. Zotti M.D., Biondi B., Peggion C., Park Y., Hahm K.S., Formaggio F., Toniolo C. Synthesis, preferred conformation, protease stability, and membrane activity of heptaibin, a medium-length peptaibiotic // Journal of Peptide Science. 2011. V. 17. №. 8. p. 585-594.

240. Zuccaro A., Summerbell R.C., Gams W., Schroers H-J., Mitchell J.I.
A new *Acremonium* species associated with *Fucus* spp., and its affinity with
a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* clade // *Studies in*
Mycology. 2004. V. 50. №. 1. p. 283-297.

Цитируемые сайты

1. <https://bioinfo.cristal.univ-lille.fr/norine/index.jsp>
2. <https://www.rcsb.org/>
3. <https://dbaasp.org/home>
4. <http://aps.unmc.edu/AP>
5. www.camp3.bicnirrh.res.in

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Филогенетическое дерево изолятов рода *Emericellopsis*

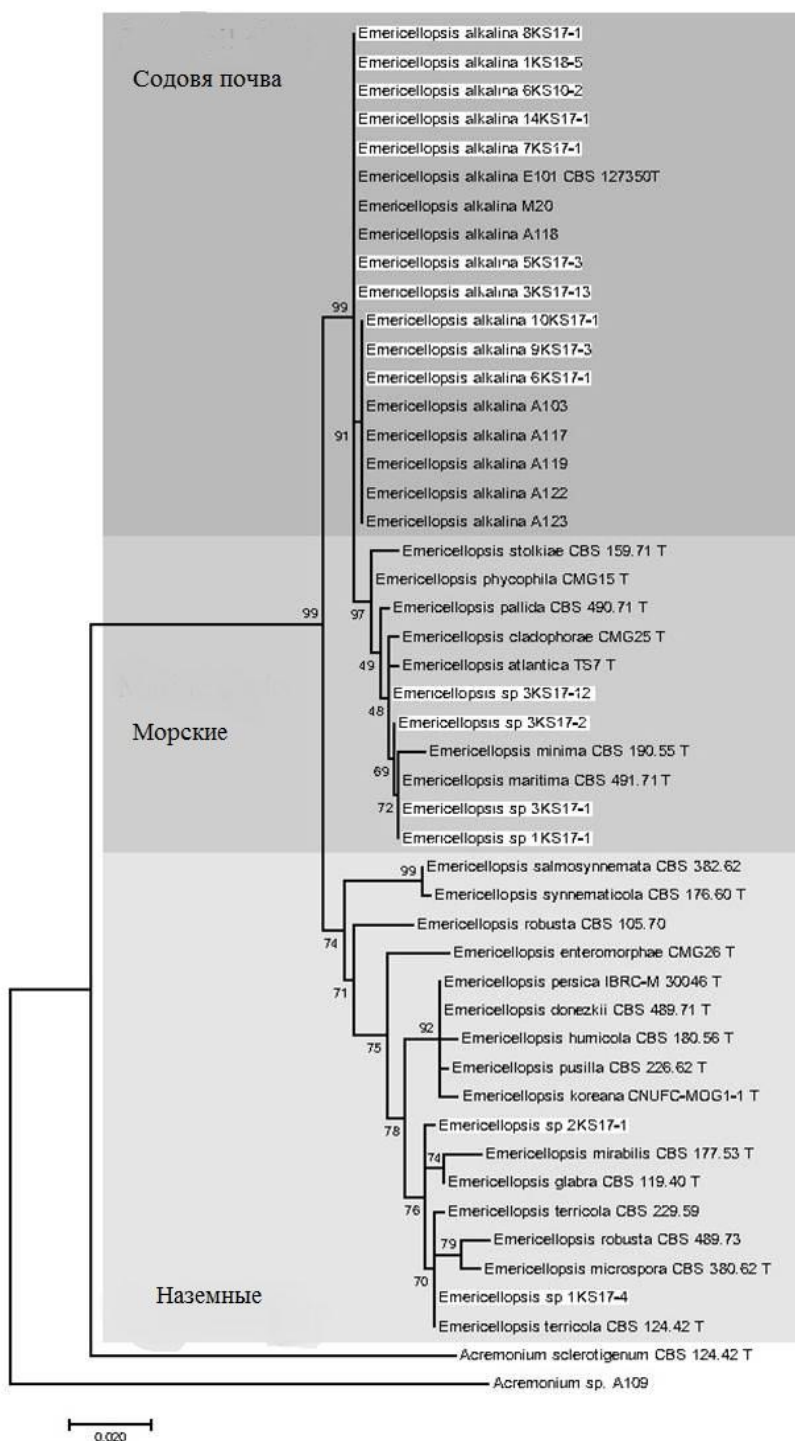


Рисунок 1. Дерево максимального правдоподобия для грибов рода *Emericellopsis* на основе частичных последовательностей области ITS рДНК (включая 5,8S рДНК). Длина ветвей пропорциональна предполагаемому

количеству нуклеотидных замен. Значения ВР отображаются на узлах (ВР; 1000 повторов). *Emericellopsis* spp. и родственные виды были сгруппированы в клады «Морские», «Содовые почвы» или «Наземные». Названия таксонов изолятов, полученных в этом исследовании, выделены светлым цветом. Буква «Т» рядом с названием каждого штамма указывает на то, что штаммы являются штаммами экс-типа [Kuvarina et al., 2022]

Приложение 2. Лабораторный регламент на производство противогрибкового пептида EmiA

Срок действия регламента до “ _____ ” _____ 20__ г

СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНОГО РЕГЛАМЕНТА

1. Характеристика конечной продукции производства
2. Аппаратурная схема и спецификация оборудования
3. Характеристика сырья, материалов и полупродуктов
4. Технологическая схема выделения противогрибкового пептида EmiA
 - 4.1 Стадия подготовки
 - 4.2 Ферментационная стадия
 - 4.3 Стадия выделения и очистки
 - 4.4 Побочные продукты
 - 4.5 Экономические затраты
 - 4.6 Технические требования
 - 4.7 Упаковка и маркировка
 - 4.8 Требования безопасности
 - 4.9 Приемка
 - 4.10 Хранение
5. Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария
6. Перечень инструкций

Препарат должен быть апиrogenным, нетоксичным, не должен содержать веществ гистаминного действия, влажность препарата должна быть не выше 15 %.

Препарат выпускают по (500 ± 25) мкг активного вещества во флаконах по ФИ-5-НС-1 ТУ 64-2-10-77, герметически укупоренные пробками из резиновой смеси марки ИР-119 по ТУ 38006108-78, обжатые алюминиевыми колпачками по ОСТ 64-7-85-79. На флакон наклеивают этикетки с указанием изготовителя, названия препарата на русском и латинском языках, содержание активного вещества в мг, «стерильно», № серии, срок годности.

Хранится препарат по списку Б, в сухом защищенном от света месте при температуре не выше $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Раздел 2. Аппаратурная схема и спецификация оборудования

При разработке настоящего регламента использовалась стандартная лабораторная посуда из стекла. Процесс биосинтеза, предварительной обработки и фильтрации культуральной жидкости, операции по выделению, очистке и сушке готового препарата EmiA не требует какой-либо специальной аппаратуры.

Таблица 1. Спецификация приборов и оборудования

№ п/п	Наименование	Количество единиц	Материал рабочей зоны, способ защиты	Техническая характеристика
1	Автоклав	1	Алюминий	Изготовитель «WAF», США. Автоклав автоматический, вертикальный, объём 13,6 л, температура 121-135°C
2	Колба качалочная	10	Стекло	Изготовитель: Россия, г. Клин, «Химлабприбор», на 750 мл
3	Ротационный испаритель	1	Стекло, металл	Изготовитель: Швейцария, “Rotavapor Rbüchi”. Rotavapor R-300 на 1 л, баня с электронагревателем для воды и масла, мощность до 1,5 кВт
4	Термометр технический	1	Стекло	Изготовитель: Россия, г.Клин, ПО «Термоприбор», СП-15, Б-3, Диапазон измерений от 0 до 100 °С, погрешность ± 2 °С
5	Холодильник фармацевтический	1	Сборный	Изготовитель: г. Зеленодольск, Татарстан, «Pozis». ХФ-400-4 на 400 л, температурный режим от +2°C до +15°C.
6	Фильтровальная установка: воронка Бюхнера, колба Бунзена, вакуумный насос	1	Сборный	Изготовитель: Россия. Объем воронки Бюхнера 0,5-2,0 л. Объем колбы Бунзена 0,5-2 л.
7	Воронка делительная	1	Стекло	Изготовитель: Россия. Объем 1 л, форма грушевидная, муфта 29/32
8	рН-метр	1	Сборная	Изготовитель: Россия, Гомельский завод измерительных приборов, ГОСТ 16454-70, тип рН-121, диапазон измерений от –1

				до 14 рН, основная погрешность $\pm 0,05$ рН.
9	Весы лабораторные общего назначения	1	Сборная	Изготовитель: Китай, «Ohaus». Предел взвешивания: 120 г. Точность: 0,01 г.
10	Термостат	1	Нержавеющая сталь	Изготовитель: Германия, «Binder». BD 115, объем внутренней камеры 115 л, диапазон температур до +100°C.
11	Лиофильная сушка	1	Сборная	Изготовитель: Германия, «Labconco», до - 50 °С, 6 л, 4 л/сутки, настольная
12	Колонки XBridge для ОФ-ВЭЖХ	1	Сборная	Изготовитель: Ирландия, «Waters». Колонка 5 мкм 130 Å размером 250 x 4.6 мм
13	Спиртовка лабораторная стеклянная	1	Стекло	Изготовитель: Россия, «МиниМед». Объем 100 мл, максимальная температура пламени до 900°C.
14	Пробирки	10	Стекло	Изготовитель: Россия, «Химлабприбор». П-1, диаметр 16 мм, высота 150 мм.
15	Цилиндры мерные градуированные	2	Стекло Пластмассовая основа	Изготовитель: Германия, «Vomex». Класс 2, с носиком, объем 500 мл
16	Пипетки градуированные	5	Полиэтилен	Изготовитель: Испания, «Dentalab». Объем до 1,5 мл, градуировка – 0,25 мл
17	Штативы для пробирок	1	Полипропилен	Изготовитель: Испания, «Dentalab». Сборные, с распоркой

18	Тара для хранения препарата	1	Стекло	Изготовитель: г. Клин, Россия, "Химлабприбор", темное стекло, объем 25-50 мл
----	-----------------------------	---	--------	--

Раздел 3. Характеристика сырья, материалов и полупродуктов

Таблица 2. Характеристика сырья, материалов, полупродуктов

Наименование	Обозначение НТД	Сорт или артикул	Показатели, обязательные для проверки
"А"- Основное сырье:			
Агар	(ГОСТ 16280-70)		
Этилацетат	(ГОСТ 22300-76)	хч	Массовая доля, % 99,7
Карбонат натрия	(ГОСТ 83-79)	хч	Массовая доля, % 99,8
Гидрокарбонат натрия	(ГОСТ 2156-76)	первый сорт	Массовая доля, % 99,5
Нитрат калия	(ГОСТ 4217-77)	хч	Массовая доля, % 99,8
Гидрофосфат калия	(ГОСТ 4198-75)	хч	Массовая доля, % 99,5
Соль поваренная	(ГОСТ 13830-68)	пищевая	Содержание NaCl, %, не менее 97,0.
Дрожжевой экстракт			
Сахароза	(ГОСТ 5833-75)	хч	
Гидрофосфат натрия	(ГОСТ 11773-76)	хч	Массовая доля, % 99
Сульфат аммония	(ГОСТ 10873-73)	оч	Массовая доля, % 99
Моногидрат лимонной кислоты	(ГОСТ 3652-69)	хч	Массовая доля, % 99,8
Гидроксид натрия			
Мальтакс (солодовый экстракт)	(ГОСТ 29294-2014)		

Вода дистиллированная	(ГФ X, стр. 73)	-	pH (5,5-7,0)
Силикагель	(ГОСТ 3956-76)	Высший сорт	Массовая доля зерен, % не менее 94,0
Хлористый метилен	(ГОСТ 9968-86)	Высший сорт	Плотность г/см ³ 1,326-1,328
Ацетонитрил	(ГОСТ 30333-2007)		Массовая доля, % 99,8
ТФУ (трифторуксусная кислота)			Массовая доля, % 99,8
Метанол (спирт метиловый)	(ГОСТ 2222-78)	Хч	Массовая доля, % не менее 98,5
Этанол	(ГОСТ 5962-67),	пищевой, в.оч.	Содержание, об. % 96,2.
"Б" Вспомогательное сырье			
1	2	3	4
Бактерицидные лампы	ТУ 16-535-173-75		
Скальпели и ножницы	ГОСТ 21240		
Пинцеты	ГОСТ 21241		
Чашки Петри			
Бумага этикеточная	ГОСТ 7625-55		
Бумага писчая	ГОСТ 18510-73		
Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026-76		
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556-75	Хирургическая	
Марля медицинская	ГОСТ 9412-77		
Мыло хозяйственное	МРТУ 18/233-68		

Мыло туалетное	ОСТ 18-326-78		
Перчатки резиновые или перчатки хирургические резиновые	ГОСТ 3-75		
Пленка полиэтиленовая пищевая	ГОСТ 10354-73		
Полотенце или полотеночная ткань льняная или полульняная	ГОСТ 10232-77		

Таблица 3. Перечень промежуточных продуктов, получаемых в производстве и требования к их качеству

Наименование промежуточного продукта	Нормативные требования к качеству промежуточных продуктов			Примечание (допустимые отклонения)
	Наименование показателя	Единица измерения	Величина показателя	
Посевной мицелий	Внешний вид		В среде должно быть не менее 30 % по объему мицелия в виде поверхностной пленки.	Отсутствие посторонней микрофлоры
	Посторонняя микрофлора		Отсутствует	
	рН		(10,50±0,30)	
	Стадия развития микроорганизма		Мицелий приобретает лососевый оттенок	
Культуральная жидкость	Содержание ЕтiА	мг/мл	Не менее 4	Отсутствие посторонней микрофлоры
	рН		(10,50±0,25)	
	Посторонняя микрофлора		Должна отсутствовать на всем протяжении	

			ферментации	
Бактериальная целлюлоза	Внешний вид Посторонняя микрофлора		В виде пленки Отсутствует	Отсутствие посторонней микрофлоры
Нативный раствор	pH Прозрачность Содержание Еm1A	мг/мл	(10,50±0,25) Раствор должен быть от светло-коричневого до темно-коричневого цвета Не менее 4	
Элюат с силикагеля	pH Содержание Еm1A	мг/мл	(5,25±0,25) Не менее 4	
Элюат с ОФ-ВЭЖХ	Содержание Еm1A pH	мг/мл	Не менее 4 (6,00± 0,30)	
Порошок Еm1A	Все показатели согласно проекту			

Раздел 4. Технологическая схема выделения противогрибкового пептида

EmiA

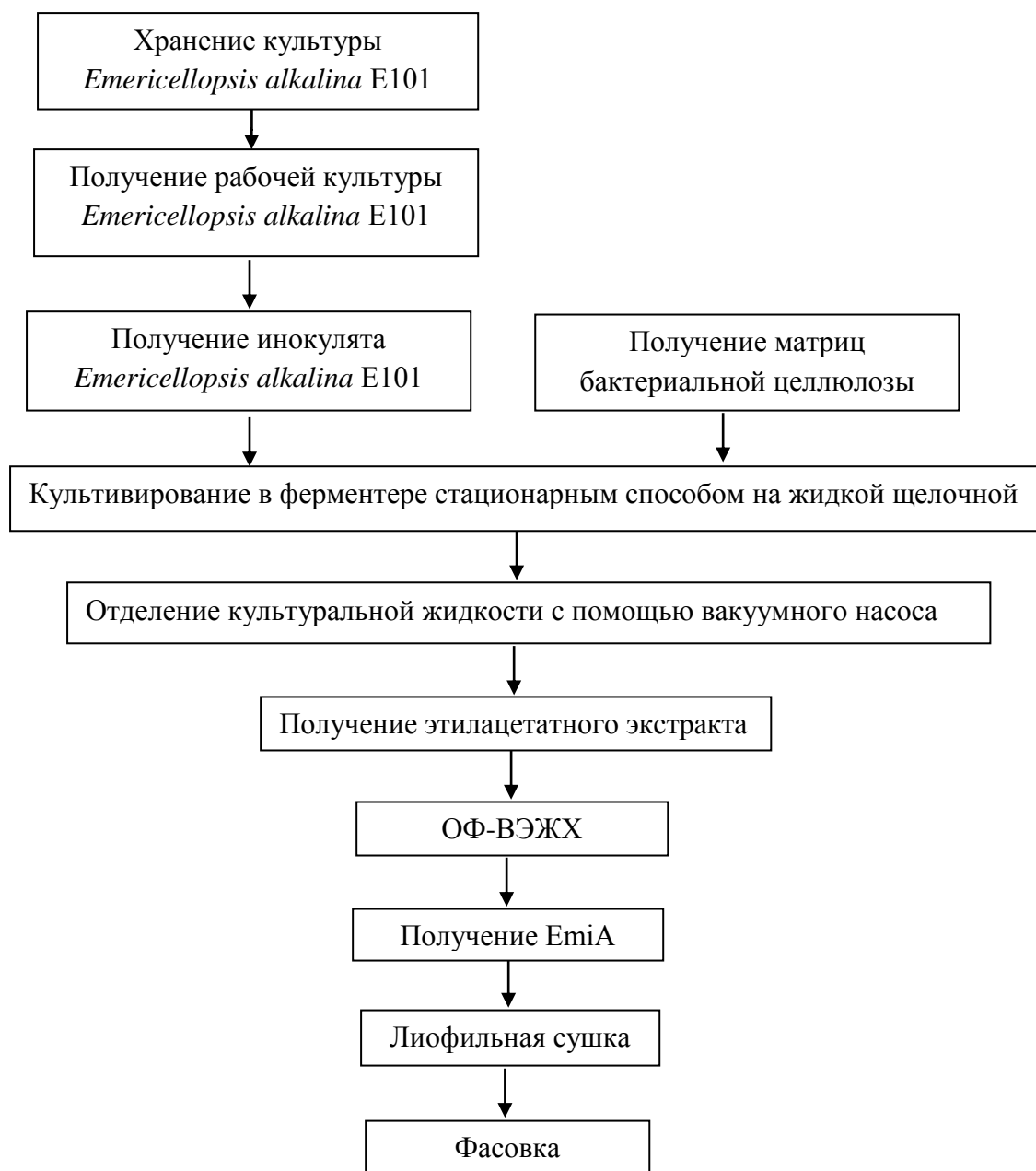


Рисунок 2. Схема получения EmiA из штамма *Emericellopsis alkalina* E101

4.1 Стадия подготовки

Подготовка питательных сред

Щелочная питательная среда для хранения и культивирования штамма-продуцента *Emericellopsis alkalina* ВКПМ F-1428, синтетическая питательная среда Н-5 для хранения и культивирования штамма-продуцента бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547), среда Сабуро для грибных тест-культур, среда МПА и LB для

бактериальных тест-культур предварительно стерилизуются в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121 °С в течение 30 мин.

Состав питательных сред

Щелочная среда, г/л: минеральная основа (Na_2CO_3 – 24,0; NaHCO_3 – 6,0; NaCl – 6,0; KNO_3 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0) и органическая основа (дрожжевой экстракт – 1,0; солодовый экстракт (15 °Баллинга) – 30,0 г). Минеральную и органическую основы стерилизовали отдельно в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121 °С в течение 30 мин. После стерилизации Минеральную и органическую основы объединяли при температуре 50 °С [Георгиева и др., 2009].

Синтетическая среда Н-5, г/л: сахароза – 70,0; дрожжевой экстракт – 5,0; Na_2HPO_4 – 2,7; K_2HPO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; моногидрат лимонной кислоты – 1,15 [Патент RU 2464307, 2012].

Среда МПА, г/л: мясо-пептонный бульон – 30,0; агар-агар – 20,0 [Биргер, 1982].

Среда Сабуро, г/л: сахароза – 40,0; пептон – 10,0; агар-агар – 20,0 [Sabouraud, 1892].

Среда LB, г/л: триптон – 10,0; NaCl – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; агар-агар – 20,0 [Lennox, 1955].

Подготовка стерильной воды

Осуществляется методом автоклавирования дистиллированной при давлении 1 атм. и температуре 121°С в течение 30 мин.

Подготовка чашек Петри с тест-культурами

Использовали суточные культуры бактерий и пятисуточные культуры грибов. Бактерии и грибы выращивают в пробирках со скошенным питательным агаром. Клетки бактерий суспендируют в физиологическом растворе до плотности $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл и используют в течение 15 мин.

Тест-культуры

Для оценки фунгицидной активности используют штаммы патогенных мицелиальных и дрожжевых микроскопических грибов *A. niger* INA 00760,

C. albicans ATCC 2091. Тест-штаммом для оценки бактериальной активности используют штамм *B. subtilis* ATCC 6633 и *E. coli* ATCC 25922.

Чашки с тест-культурами хранят при температуре от 0 до 4 °С, культивируют при температуре 28-37 °С.

Подготовка стерильных бумажных дисков для метода дисков

Бумажные диски диаметром 6 мм предварительно стерилизуют в автоклаве в стеклянной чашке Петри в дистиллированной воде при давлении 1 атм. и температуре 121 °С в течение 20 минут.

Хранение культур продуцентов

Хранение штамма-продуцента *E. alkalina* E101 осуществляют на косяках с агаризованной щелочной средой при температуре от 0 до 4 °С.

Хранение штамма-продуцента *G. hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) осуществляют в пробирках на жидкой синтетической среде Н-5 при температуре от 0 до 4°С.

Подготовка посевного материала

Культуру штамма *E. alkalina* E101 пересевают на свежие косяки с агаризованной щелочной средой. Инкубируют при температуре 28 °С в термостате в течении 5-7 суток. Далее в пробирки добавляют стерильную воду, взбалтывают для получения смыва спор и фрагментов мицелия штамма, получая, таким образом, посевной инокулят.

Получение пленок бактериальной целлюлозы

Инокулят штамма *G. hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) вносят в стеклянные колбы Эрленмейера в жидкую синтетическую среду Н-5. Штамм выращивают стационарно при температуре 27 °С в течении 14 суток. После культивирования матрицу бактериальной целлюлозы отделяют от культуральной жидкости и отмывают от клеток продуцента в течение 2 суток 0.1 Н раствором NaOH, а затем дистиллированной водой в течение 3 суток [Moniri et al., 2017]. Отмытую пленку бактериальной целлюлозы высушивают лиофильно и стерилизуют в автоклаве («WAF», США) при давлении 1 атм. и температуре 121°С в течение 30 мин.

4.2 Ферментационная стадия

Условия культивирования штамма E. alkalina E101 на матрице бактериальной целлюлозы

В ферментер наливают 100-120 мл стерильной щелочной среды, на металлическую решетку помещают лиофильно-высушенную матрицу бактериальной целлюлозы диаметром 10 см, толщиной 1 мм. В качестве посевного материала используют суспензию спор *E. alkalina* E101 плотностью $0,5 \times 10^5$ КОЕ/мл по 1 мл на колбу. Культивируют в течение 14 суток при температуре 28 °С.

Контроль выделения

Содержание EmiA в культуральной жидкости до экстракции определяют с помощью метода лунок. В слое агара, содержащего тест-культуру, пробочным сверлом вырезают лунку диаметром 10 мм и в нее вносят 100 мкл культуральной жидкости. Чашки тест-культур с лунками помещают в термостат и инкубируют при температуре 28-37 °С. Измеряют диаметр зоны ингибирования роста вокруг лунки.

4.3 Стадия выделения и очистки

Стадия выделения включает в себя фильтрацию с помощью вакуумного насоса, экстракцию, упаривание под вакуумом на роторном испарителе.

Фильтрация

Для отделения культуральной жидкости от мицелия штамма *E. alkalina* E101 используют мембранные фильтры на воронке Зейца под вакуумом.

Экстракция

Целевое вещество экстрагируют из культуральной жидкости штамма *E. alkalina* E101 трижды этилацетатом в соотношении (органический растворитель: КЖ) 1:5 в делительной воронке. По окончании времени остатки культуральной жидкости удаляются.

Упаривание под вакуумом

Упаривание под вакуумом осуществляется на роторном испарителе «Rotavapor-RV10i» (Швейцария). Упаривание происходит за счет внешнего нагрева роторной колбы с этилацетатом после экстракции культуральной жидкости. Вращательное движение поршня обеспечивает хорошее перемешивание и равномерное распределение температуры. Роторная колба нагревается на водяной бане, энергия к которой подается при помощи электричества. Пары выходят из колбы в месте ее соединения с вращающим мотором, протекают через вал, через вращающий элемент и достигают конденсатора, где конденсируются и охлаждаются на холодильнике. Затем конденсат собирается в приемнике. Специальная система приемников позволяет собрать конденсат как при нормальном давлении, так и в вакууме. В результате на стенках колбы остается сухой остаток, который растворяют в 50% водном этаноле (1:1), обрабатывают ультразвуком на бане в течение 1 мин и получают обогащенный водно-спиртовой экстракт комплекса эмерициллипсинов.

Для стадии очистки используют ОФ-ВЭЖХ.

Обращенно-фазовая высокоэффективная хроматография

Выделение антибиотических веществ проводят методом аналитической обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с использованием колонки XBridge ВЕН 4,6×250 мм («Waters», Ирландия) с неподвижной фазой С18 и осуществляли фракционирование в градиенте повышения концентрации ацетонитрила в воде с добавлением 0,1% трифторуксусной кислоты: 16-28% – за 12 мин; 28-55% – за 27 мин; 55-75% – за 20 мин и 75-85% – за 10 мин, с последующим изократическим элюированием в течение 25 мин. Регистрацию разделяемых веществ осуществляют с помощью УФ-детектора при $\lambda=214$ нм.

На каждом этапе проводится *оценка антифунгальной и антибактериальной активности* с помощью метода дисков.

Стадия придания товарных форм включает в себя лиофильную сушку и фасовку.

Лиофильная сушка

Сначала производят заморозку исходной активной фракции штамма *E. alkalina* E101, затем помещают ее в вакуумную камеру. Процесс возгонки продолжается до тех пор, пока концентрация водяных паров в камере не достигнет нормального для данной температуры уровня, в связи с чем избыточные водяные пары постоянно откачиваются.

Фасовка осуществляется в стерильные флаконы с резиновыми пробками с алюминиевым колпачком.

4.4 Побочные продукты

В качестве побочного продукта данного регламента является *мицелий* штамма *E. alkalina* E101, полученный при фильтровании культуральной жидкости на воронке Зейца.

4.5 Экономические затраты

В таблице приведены затраты по ценам 2022 года на сырье для получения препарата EmiA. Продуктивность по выходу пептида на бактериальной целлюлозе – 11 мг антибиотика на литр среды.

Таблица 4. Затраты на сырьё для получения препарата противогрибкового пептида EmiA на основе штамма *Emericellopsis alkalina* E101 (в рублях)

Наименование	Количество на флакон препарата	Стоимость, рубли
Карбонат натрия, г	6,00	1
Гидрокарбонат натрия, г	3,00	9
Нитрат калия, г	0,25	6
Гидрофосфат калия, г	0,75	6
Соль поваренная, г	1,50	1

Дрожжевой экстракт, г	1,50	15
Сахароза, г	17,50	33
Гидрофосфат натрия, г	1,35	14
Сульфат аммония, г	0,75	6
Моногидрат лимонной кислоты, г	0,29	2
Гидроксид натрия, г	1,00	2
Мальтакс (солодовый экстракт), мл	50,00	45
Ацетонитрил, л	0,20	242
Трифторуксусная кислота, мл	2,00	83
Вода, л	0,30	12
Этилацетат, л	0,15	37
Спирт, л	0,30	15
Силикагель, г	70,00	84
Хлорофористый метилен, л	0,33	69
Метанол, л	0,03	47
Итого		729

На 100 флаконов = 72 900 рублей, на 1000 флаконов = 729 000 рублей

Стоимость сырья на производство 100 флаконов составляет 72 900 рублей, с учётом 30% надбавки на период освоения 94 770 рублей. Согласно структуре распределения затрат, в производстве антибиотиков на долю сырья приходится 40-50%, таким образом с учётом 20 % рентабельности ориентировочная оптовая цена 100 флаконов составит 113 724 рублей.

4.6 Технические требования

Препарат должен изготавливаться в соответствии с данными условиями с соблюдением всех действующих санитарных норм и правил.

Таблица 6. Характеристика препарата

Наименование показателя	Характеристика препарата
Внешний вид	Воздушно-сухой порошок
Запах	Без запаха
Цвет	От белого до бежевого оттенка

Препарат должен соответствовать характеристикам, указанным в таблице.

По микробиологическим показателям препарат должен быть стерильным. Препарат готовят в асептических условиях, пользуются стерильной посудой, соблюдают стерильность при их упаковке, после приготовления стерилизуют.

Проверку стерильности производят в боксах со строгим соблюдением правил асептики. Делают посев на питательные среды. Если нет роста микроорганизмов на средах, то препарат является стерильным.

Если лекарственное средство обладает антимикробным действием, то стерильность определяют путем мембранной фильтрации. После фильтрации исследуемого препарата фильтр делят на части и вносят для роста задержанных микроорганизмов в жидкие питательные среды. При отсутствии роста препарат считается стерильным.

4.7 Упаковка и маркировка

Упаковка препарата в асептических условиях в стеклянные флаконы объёмом 10 мл с резиновыми пробками с алюминиевой фольгой.

Маркировку препарата осуществляют таким образом, что на каждую единицу препарата наносят маркировку трафаретом или наклеиванием этикетов, содержащих следующую информацию: наименование предприятия-изготовителя, адрес, наименование препарата, номер партии,

масса нетто, дата изготовления, состав, способ применения, срок годности, условия хранения.

4.8 Требования безопасности

Все операции производятся в специальных «чистых» помещениях, отвечающих требованиям «Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств [GMP] (от 01 февраля 2013 года)» в соответствии с рекомендациями сборника методических указаний «Организация и контроль производства лекарственных средств. Стерильные лекарственные средства» (МУ 42-51-1-93 + МУ 42-51-26-93 с изменениями, внесенными МУ 64-09-001-2002).

Технологический процесс осуществляется в помещениях 2–го класса чистоты (число частиц размером 0,5 мкм в литре воздуха не более 25) с использованием установок ламинарного потока стерильного воздуха – 1-й класс чистоты (число частиц размером 0,5 мкм в литре воздуха не более 2–х).

4.9 Приемка

Приемку каждой серии каждого вида поставляемых исходных, упаковочных и печатных материалов проводят в соответствии с письменной инструкцией. По результатам приемки должен быть оформлен протокол.

Протоколы приемки должны включать в себя следующие данные:

- a) наименование материала по накладной и обозначение на упаковке;
- b) внутризаводское наименование или код материала (если они отличаются от указанных в перечислении, а);
- c) дату приемки;
- d) наименования поставщика и производителя (по возможности);
- e) номер серии производителя;
- f) общее количество полученных материалов и число единиц упаковки;
- g) номер, присвоенный после приемки;
- h) замечания (например, о состоянии упаковки).

Следует разработать и утвердить инструкции по внутризаводской маркировке, карантину и хранению исходных, упаковочных и других материалов.

4.10 Хранение

Срок годности 2 года. Список Б. В сухом, защищенном от света месте при температуре не выше 25°C.

Раздел 5. Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария

Таблица 6. Основные параметры предотвращения и устранения аварийного состояния производства

Вид аварийного состояния производства	Предельно-допустимые значения параметров, превышение (снижение) которых может привести к аварии	Действия персонала по предотвращению и устранению аварийного состояния
Аварийная остановка сосудов, работающих под давлением:		
1) При повышении давления в сосуде выше разрешенного, несмотря на соблюдение всех требований	0,3 МПа (3,0 кгс/см ²)	Сосуд, работающий под давлением, отключить от источников давления, открыть вентили на линиях выхода воздуха и продувники, в рубашку сосуда или в змеевики дать охлаждение
2) При неисправности предохранительных клапанов	Давление в сосуде 0,3 МПа (3,0 кгс/см ²)	К работе на сосуде не приступать до устранения неисправности
3) При обнаружении в основных элементах сосуда трещин, выпучин, пропусков или потения в сварных швах, течи в заклепочных и болтовых соединениях, разрыва прокладок	Давление в сосуде 0,3 МПа (3,0 кгс/см ²)	К работе на сосуде не приступать до устранения неисправности
4) При возникновении пожара, непосредственно угрожающего сосуду под давлением	Возможность взрыва при нагревании сосуда	Отключить сосуд от источника давления, открыть вентили на линии выхода воздуха из сосуда и продувники. В рубашку сосуда дать охлаждение. Выключить приточно-вытяжную вентиляцию.

		Сообщить диспетчеру по телефону
5) При неисправности манометра и невозможности определения давления по другим приборам	Возможность взрыва при нагревании сосуда	К работе на сосуде не приступать до устранения неисправности
6) При неисправности или неполном количестве крепежных деталей крышек и люков	Возможность взрыва при нагревании сосуда	К работе на сосуде не приступать до устранения неисправности
7) При неисправности блокировочных предохранительных устройств	Возможность взрыва при нагревании сосуда	К работе на сосуде не приступать до устранения неисправности
8) При неисправности предусмотренных проектом контрольно-измерительных приборов и средств автоматики	Возможность взрыва при нагревании сосуда	К работе на сосуде не приступать до устранения неисправности
9) Загорание паров метанола, этилацетата, этанола		Прекратить работы, надеть противогаз, отключить все виды вентиляции, приступить к ликвидации аварии
10) Отключение электроэнергии		Остановить технологический процесс, перекрыть материальные линии, подачу вакуума. При всех авариях необходимо окриком предупредить об аварии. Всех людей, кроме тех, на кого возложена ответственность по ликвидации аварии, удалить из опасной зоны через основной и запасной выходы.

Таблица 7. Пожаровзрывоопасные свойства сырья, полупродуктов, готового продукта и отходов производства. Газы и жидкости*

№ п/п	Наименование вещества	Агрегатное состояние при нормальны х условиях	Плотность паров (газов) при норм. условиях, кг/м ³	Растворимост ь в воде, % масс.	Возможно ли		Температура, °С			
					воспламенение или взрыв вещества при воздействии на него	Воды (да, нет)	Кислорода воздуха (да, нет)	Кипения	Самовоспл аменения	Воспламене ния
1	Этилацетат	Жидк.	-	12,0	Нет	Нет	77,10	400	-	3
2	Хлористый метилен	Жидк.	-	20,0	Нет	Нет	39,80	580	-	14
3	Ацетонитрил	Жидк.	783,0	0,3	Нет	Нет	81,60	524	-	2
4	Метанол	Жидк.	795,0	Нет огр.	Нет	Нет	64,70	436	13	8
5	Трифторуксу сная кислота	Жидк.	-	-	Нет	Нет	72,40	-	-	-
6	Этанол	Жидк.	789,3	Нет огр.	Нет	Нет	78,37	365	-	13

*по данным Справочника «Пожарная опасность веществ и материалов», ч. 2. Изд-во литературы по
строительству, М. -1970

Таблица 8. Пожаровзрывоопасные свойства сырья, полупродуктов, готового продукта и отходов производства.

Твердые горючие продукты

№ п/п	Наименование вещества	Плотность, % масс.	Растворимость в воде, % масс.	Возможно ли		Температура, °С			
				воспламенение или взрыв вещества при воздействии на него		Воды (да, нет)	Кислорода воздуха (да, нет)	Плавле ния	Самовоспла менения
1	Бумага разная	70	Н/р	Нет	Нет	-	230	230	70/74
2	Хлопок (вата, марля)	в. в-во	Н/р	Нет	Нет	-	407	205	-
3	Карбонат натрия	2,53	Раствор.	нет	нет	852	-	-	-
4	Гидрокарбонат натрия	2,16	Раствор.	нет	нет	854	-	-	-
5	Соль поваренная	2,10		Нет	нет	801	-	-	-
6	Нитрат натрия	2,26	Раствор.	нет	нет	308	-	-	-
7	Гидрофосфат калия	2,44	Раствор.	нет	нет	282	-	-	-
8	Сахароза	1,59	Раствор.	нет	нет	186	-	-	-

9	Гидрофосфат натрия	2,07	Раствор.	нет	нет	250	-	-	-
10	Сульфат аммония	1,77	Раствор.	нет	нет	235-280	-	-	-
11	Моногидрат лимонной кислоты	1,66	Раствор.	нет	нет	153	-	-	-
12	Силикагель	0,40-0,80	Тв. в-во	нет	нет	1610	-	-	-
13	EmiA	-	Частично растворимы	нет	нет	-	-	-	-

Таблица 9. Токсические свойства сырья, полупродуктов, готового продукта и отходов производства

№ п/п	Наименование вещества	Агрегатное состояние	Характер воздействия на организм по ГОСТ 12.1.005-88	ПДК (ОБУВ) в воздухе рабочей зоны производственных помещений	Класс опасности	Мероприятия по оказанию первой доврачебной помощи	Метод и периодичность контроля в воздухе производственных помещений
1	Культура <i>Emericellopsis alkalina</i> E101	Твердый	Возможно возникновение аллергических реакций		3	Принять антигистаминный препарат, обильное питье	Высев проб воздуха на чашках с питательной средой
2	Культуральная жидкость	Жидк.	Возможно возникновение аллергических реакций	0,1	3	Принять антигистаминный препарат, обильное питье	

3	Этилацетат	Жидк.	Пары этилацетата раздражают слизистые оболочки глаз и дыхательных путей, при действии на кожу вызывают дерматиты и экземы	50,0	3	Обеспечить приток свежего воздуха, промыть большим количеством воды глаза, нос, прополоскать рот, щелочное питье	
4	Этанол	Жидк.	Наркотик, вызывает паралич центральной нервной системы	1000,0	3	Вызвать рвоту, принять молоко и яичный белок	
5	ЕтiА, порошок	Твердый	Возможны аллергические реакции	0,1 (расчетная)	3	Принять антигистаминный препарат, обильное питье	

6	Трифторук- сусная кислота	Жидк.	Поражение верхних дыхательных путей: затруднение дыхания, одышка, кашель	2,0	3	Промыть ротовую полость чистой водой комнатной температуры, обеспечить приток свежего воздуха	
7	Метанол	Жидк.	Головная боль, общая слабость, недомогание, озноб, тошнота, рвота	15,0	3	Энергичное промывание желудка 2% р-ром соды или перманганата. Обильное питье (3% раствор соды), покой, тепло.	

8	Хлористый метилен	Жидк.	Головокружение, головная боль, симптомы раздражения слизистых оболочек глаз и верхних дыхательных путей. В более тяжелых случаях - потеря сознания, состояние глубокого наркоза и смерти	50,0	3	Обеспечить приток свежего воздуха, дать крепкий чай или кофе; внутрь - амидопирин, кофеин; промыть глаза чистой водой или 2% раствором натрия гидрокарбоната, щелочные полоскания.	
---	-------------------	-------	--	------	---	--	--

9	Ацетонитрил	Жидк.	Головная боль, сердцебиение, тошнота, рвота, потеря сознания, судороги	10,0	3	Надеть на пострадавшего противогаз и удалить его из отравленной атмосферы, промыть кожные покровы и слизистые оболочки водой. При затруднении дыхания дать кислород. Показано раннее применение амилнитрита (вдыхать пары по 15-30 секунд несколько раз).
---	-------------	-------	--	------	---	---

Таблица 10. Санитарная характеристика производственных процессов

Наименование производственных процессов и помещений	Санитарная характеристика производственных процессов	Группа производственного процесса для определения состава специальных бытовых помещений и устройств
Выращивание посевного мицелия, образование EmiA	Тепловыделение, влаговыделение, возможно загрязнение открытых частей тела культуральной жидкостью	IIa
Обработка и фильтрация культуральной жидкости	Тепловыделение, влаговыделение, загрязнение спецодежды и открытых частей тела массами, содержащими антибиотик	IIIa
Получение EmiA	Пары органических растворителей, контакт с порошком антибиотика	

Таблица 11. Условия технической безопасности при приемке, складировании, хранении и перемещении горючих и токсических веществ

Наименование вещества	Характеристика опасности веществ и условий его хранения и перемещения	Средства контроля, управления и противоаварийной защиты	Методы обезвреживания при разливах и авариях
Метанол	Огнеопасен, хранить в металлических шкафах	Вытяжной шкаф, огнетушитель	Залить водой, собрать в стеклянную емкость
Этилацетат	Огнеопасен, хранить в герметично закрытой таре вдали от нагревательных приборов, в сухом, хорошо проветриваемом помещении, предохраняя от прямых солнечных лучей, влаги	Вытяжной шкаф, огнетушитель	Залить водой, собрать в стеклянную емкость
Этанол	Огнеопасен, хранить в металлических шкафах	Вытяжной шкаф, огнетушитель	Залить водой, собрать в стеклянную емкость
Трифторуксуная кислота	Огнеопасна, в стеклянной посуде с притёртыми стеклянными крышками или пластмассовыми пробками в эксикаторе	Вытяжной шкаф, огнетушитель	Залить водой, собрать в стеклянную емкость
Хлористый метилен	Огнеопасен, хранить в стальных герметичных резервуарах или в стальных герметичных бочках под навесом при естественных погодных условиях или в неотапливаемых складских помещениях	Вытяжной шкаф, огнетушитель	Залить водой, собрать в стеклянную емкость
Хлороформ	Неогнеопасен, в стальных герметичных	Вытяжной шкаф, огнетушитель	Залить водой, собрать в

	резервуарах, а в бочках - в крытых неотапливаемых складских помещениях, отвечающих требованиям, предъявляемым к складам, предназначенным для хранения ядовитых веществ		стеклянную емкость
Ацетонитрил	Огнеопасно, в стеклянной таре, металлических канистрах или бочках	Вытяжной шкаф, огнетушитель	Залить водой, собрать в стеклянную емкость

Таблица 12. Средства индивидуальной защиты работающих

Наименование стадий технологического процесса	Средства индивидуальной защиты	Наименование и номер НТД	Сроки носки	Рекомендации по способам дегазации и стирки	Периодичность стирки, химчистки защитных средств	Примечание
Работа с культурой <i>Emericellopsis alkalina</i> E101	Резиновые перчатки, респиратор, костюм х/б	ГОСТ 27574-87	6 месяцев	Перчатки обработать 1,0% формалином, халат в стирку	1 раз в неделю	Душ после работы
Работа с культурой <i>Gluconacetobacter hansenii</i> GH-1/2008 (ВКПМ В-10547)	Резиновые перчатки, респиратор, костюм х/б	ГОСТ 27574-87	6 месяцев	Перчатки обработать 1,0% формалином, халат в стирку	1 раз в неделю	Душ после работы
Работа с пленкой бактериальной целлюлозы	Резиновые перчатки, респиратор, костюм х/б	ГОСТ 27574-87	6 месяцев	Перчатки обработать 1,0% формалином, халат в стирку	1 раз в неделю	Душ после работы
Работа с кислотами и щелочами	Противогаз марки В, защитные герметические очки, резиновые перчатки и сапоги,	ГОСТ 12.4 029-79; ГОСТ 3-88; ГОСТ 12.4 013-85.	6 месяцев	Обработка водой с детергентом	1 раз в 2 дня	-

	фартук из кислотостойкой плотной ткани					
Работа с растворителями и порошком ЕmА	Перчатки, спецодежда, спецобувь, марлевый респиратор	ГОСТ 12.4 029-79; ГОСТ 3-88; ГОСТ 12.4 013-85	6 месяцев	Стирка с детергентом	1 раз в неделю	Душ после работы
Работа с паром	Работать в рукавицах, в очках	ГОСТ 12.4 013-85;	6 месяцев	Стирка с детергентом	1 раз в неделю	-

Раздел 6. Перечень инструкций

А. Технологические инструкции

1. По контролю стерильности питательных сред и культуральной жидкости
2. По фильтрации культуральной жидкости
3. По упариванию растворов EmiA
4. По получению порошков EmiA

Б. Инструкции по технике безопасности, пожарной безопасности и промсанитарии

По технике безопасности на этапе химической очистки

По технике безопасности на этапе сушки препарата

По технике безопасности на этапе ферментации

По технике безопасности и пожарной безопасности при работе в микробиологической лаборатории

По технике безопасности и пожарной безопасности при работе в химической лаборатории

По безопасной эксплуатации автоклава

По безопасной эксплуатации сосудов, работающих под давлением

По пользованию противогазом и индивидуальными средствами защиты

По безопасной эксплуатации вакуум-выпарной установки

По безопасной эксплуатации вакуум-сушильного шкафа

По технике безопасности на этапе фильтрации

По пожарной безопасности при получении EmiA

По эксплуатации вентиляционного оборудования

По эксплуатации лиофильной сушки

В. Инструкции по эксплуатации приборов контроля

1. По работе на рН-метре