

УДК 579.6,606

ОБРАЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ ЭМЕРИЦИЛЛИПСИНОВ У *Emericellopsis alkalina* ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2023 г. А. Е. Куварина^{1, *}, М. А. Суконников¹, Е. А. Рогожин^{1, 2}, М. В. Серебрякова³, А. В. Тимофеева³, М. Л. Георгиева^{1, 4}, В. С. Садыкова^{1, **}

¹ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, 117997 Россия

³ НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119234 Россия

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

*e-mail: nastena.lysenko@mail.ru

**e-mail: sadykova_09@mail.ru

Поступила в редакцию 30.09.2022 г.

После доработки 20.10.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Проведена оценка способности образования противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А у штамма гриба *Emericellopsis alkalina* E101 в различных биотехнологических системах при нейтральных и щелочных pH. Установлено, что новый апробированный мембранно-жидкостной способ культивирования при pH 10 увеличивал выход основного компонента эмерициллипсина А в 1.7 раза. Показано, что новый способ культивирования штамма *E. alkalina* E101 также способствовал синтезу различных изоформ основного компонента эмерициллипсина А.

Ключевые слова: антибиотики, *Emericellopsis alkalina*, эмерициллипсин А, изоформы эмерициллипсина А

DOI: 10.31857/S0555109923020095, **EDN:** LLSKOD

В последние годы антимикробные пептиды (АМП) привлекают внимание исследователей как новые терапевтические агенты, имеющие ряд преимуществ: высокую селективность, низкую иммуногенность, хорошую возможность проникновения в клетку-мишень, и меньший риск развития устойчивости за счет действия на клеточную стенку или мембрану. За последние два десятилетия общее число АМП, одобренных на основных фармацевтических рынках, увеличилось в два раза [1]. К основным недостаткам АМП, которые препятствуют их применению, можно отнести цитотоксичность. В тоже время природные пептиды используют как для разработки лекарственных препаратов, так и в качестве модели для создания синтетических структурных аналогов на их основе [2]. На сегодняшний день АМП признаны многообещающим альтернативным классом новых соединений для борьбы с антибиотикорезистентностью [3, 4]. Увеличение выхода природного соединения возможно за счет расширения скрининга, усовершенствования методов экстракции, использования химического синтеза, а также за счет синтеза в клетках прокариот. Эти стратегии открывают возможность получения искусственных структурных аналогов, которые могут пре-

взойти по своим фармакодинамическим или фармакокинетическим свойствам оригинальное природное соединение [5].

Открытие пептаиоболов у микроскопических грибов, обитающих в холодных и засоленных почвах, в морских глубинах, а также в других экстремальных местообитаниях, расширяет возможности поиска новых антибиотиков, которые могут служить прототипами новых лекарственных средств. Известно, что эта группа нерибосомальных пептидов синтезируется исключительно микроскопическими грибами. Как правило, продуцент синтезирует комплекс из нескольких пептаиоболов, которые представляют собой гомологичные по структуре соединения, различающиеся расположением в пептидной цепи на одну или несколько аминокислот, что обуславливает также различия в их биологической активности. Из культур различных штаммов гриба *Emericellopsis salmossynnemata* было выделено до 11 изоформ зервамицинов, среди которых преобладающими являлись зервамицин IIA (ZrvIIA) и зервамицин IIB (Zrv-IIB) [6]. Zrv-IIA и Zrv-IIB по своей структуре отличаются друг от друга только одним аминокислотным остатком в четвертом положении. Несмотря

на большую гомологию в структурах, для этих изоформ показаны различия в цитотоксичности, нейротоксичности и антибактериальной активности [7]. Альбупептины В и D — пептаиболы, которые содержат оба стереоизомера изовалина (Iva) — D- и L- конфигурации. Они активны в отношении *Bacillus cinerea*, причем эффект ингибирования зависит от структуры и количества присутствующих остатков Iva (IC_{50} : 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 неактивен в отношении *Phytophthora infestans* (IC_{50} , >100 мкг/мл), а соединение D активно (IC_{50} , четыре остатка Iva = 16.3 мкг/мл) [8]. Из штаммов гриба *Emericellopsis alkalina* нами ранее был выделен комплекс пептаиболов с выраженной противогрибковой активностью, представляющий собой 5 изоформ пептидов с единичной заменой аминокислоты — эмерициллипсина А-Е. Доминирующий компонент комплекса — пептид эмерициллипсин А (EmiA) обладал значительной противогрибковой активностью в отношении клинических изолятов патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью. Ингибирующая активность EmiA и его дегидроформы против азолустойчивых патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. проявляется на уровне амфотерицина В — 1 мкг/мл, а для клинических патогенных изолятов *Cryptococcus* spp. превосходит препарат сравнения в 2–4 раза. В то же время активность изоформ В и С значительно ниже, а формы D и Е оказались неактивны в отношении патогенных изолятов *Aspergillus* spp., *Candida* spp. [9, 10]. Ранее было показано, что при культивировании количество синтезируемых изоформ и выход EmiA различался у разных штаммов.

Структурное многообразие синтезируемых пептаиболов может варьировать также у одного и того же штамма-продуцента в зависимости от способов культивирования, добавления предшественников и других физико-химических факторов. Недавно Х. Нао с соавт. [11] из штамма *Acremonium* sp. IMB18-0, культивируемого в присутствии биомассы бактерий, выделили новые изоформы акремопептаиболов, отличающиеся от уже описанных в литературе антимикробной активностью и отсутствием в молекуле высококонсервативных остатков треонина и гидроксипролина. Эти изоформы проявляли выраженную антимикробную активность в отношении метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Candida albicans*. Штамм *Trichoderma longibrachiatum* Rifai DMG-3-1-1 синтезирует 23 пептаибола. Структуры 13 новых пептаиболов были определены с помощью ЯМР и MALDI-MS/MS. Тщательное сравнение структур 1–23 показало, что в структурах варьируют только семь остатков: 2 (Gln2/Asn2), 3 (Ile3/Val3), 4 (Ile4/Val4), 6 (Pro6/Hyp6), 8 (Leu8/Val8), 10 (Pro10/Hyp10) и 11 (Leu11/Ile11/Val11). Пептаиболы 2, 5, 9, 11, 21 и 22 про-

являли умеренную антибактериальную активность в отношении *Staphylococcus aureus* MRSA T144, а также более сильную цитотоксичность в отношении клеток BV2 и MCF-7 по сравнению с другими пептаиболами этого штамма. При этом было показано, что аминокислотные остатки 2, 3 и 4 сильно влияют на цитотоксичность соединения [12]. Открытие новых уникальных структур АМП и знание принципов зависимости активности от структуры дает информацию для создания химическим синтезом новых соединений с большей противогрибковой активностью и меньшей токсичностью для хозяина, чем у природных соединений [5].

Цель работы — сравнительный анализ многообразия продуцируемых изоформ эмерициллипсина и оценка накопления основного компонента эмерициллипсина А при культивировании в различных биотехнологических системах и при разных рН.

МЕТОДИКА

Для оценки накопления и разнообразия изоформ эмерициллипсина был использован типовой штамм микелиального гриба *Emericellopsis alkalina* E101 (VKM F-4108; CBS 127350) из коллекции “Грибы экстремальных местообитаний” кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Россия). Штамм был выделен из образца почвы с побережья содового озера Танатар (Алтайский край, Россия) [13]. В результате скрининга 64 штаммов этого вида было выявлено [14], что штамм *E. alkalina* E101, наряду с изученным ранее штаммом-продуцентом *E. alkalina* A118 (VKMP F-1428), был наиболее продуктивным по выходу основного компонента EmiA.

Штамм-продуцент *E. alkalina* E101 выращивали на специализированной жидкой щелочной среде, подобранной ранее [15]. Для приготовления сред с различными рН использовали буферы: цитратно-фосфатный для рН 7.0, фосфатно-цитратный для рН 9.0 и карбонатно-бикарбонатный для рН 10.0. Культивирование проводили в течение 7, 14 и 21 сут стационарным способом в колбах Эрленмейера на 750 мл, глубинным способом на шейкере-инкубаторе Innova 40R (“Eppendorf New Brunswick”, США), а также в ферментере мембранно-жидкостным способом на матрице из бактериальной целлюлозы. Получали матрицы бактериальной целлюлозы культивированием штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 в стационарных условиях при температуре 27°C в течение 14 сут на жидкой среде Н-5. Полученную матрицу бактериальной целлюлозы отмывали от клеток продуцента 0.1 н раствором NaOH и дистиллированной водой, лиофильно высушивали и стерилизовали. Стационарное мембранно-жидкостное культивирование в щелочной среде осу-

шествовали на матрице бактериальной целлюлозы в качестве подложки.

Культуральную жидкость (КЖ) отделяли фильтрацией через мембранные фильтры на воронке Зейтца под вакуумом. Затем КЖ экстрагировали этилацетатом или бутанолом в соотношении 5 : 1 3 раза. Полученные экстракты упаривали в вакууме на роторном испарителе “Rotavapor-RBüchi” (Швейцария) при 42°C досуха, остаток растворяли в водном 50%-ном этаноле и получали спиртовые концентраты.

Оценку активности в отношении условно-патогенных грибов проводили в КЖ до экстракции и после, а также в экстрактах мицелия. Антимикробную активность определяли с помощью стерильных бумажных дисков (“НИИ Пастера”, Россия), смоченных в антибиотике и высушенных в стерильных условиях. В качестве контроля использовали стандартные диски с флуконазолом для грибов (40 мкг, “НИИ Пастера”, Россия) и амоксициллином/клавулоновой кислотой для бактерий (20/10 мкг, “НИИ Пастера”, Россия). Для оценки фунгицидной активности использовали тест-штаммы: плесневый гриб *Aspergillus niger* INA 00760 и дрожжи *Candida albicans* ATCC 2091.

Антибактериальную активность оценивали по отношению к грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922 и грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Тест-культуру *B. subtilis* ATCC 6633 выращивали на среде Гаузе № 2 следующего состава (г/л): триптон — 2.5 (или бульон Хоттингера — 30 мл), пептон — 5, хлорид натрия — 5, глюкоза — 10; *E. coli* ATCC 25922 на среде LB (триптон-соевый агар). Культуры грибов *A. niger* INA 00760 и *C. albicans* ATCC 2091 выращивали на среде Чапека. Предварительно культуры выращивали в пробирках со скошенным питательным агаром, после чего клетки с поверхности агара суспендировали в физиологическом растворе до мутности 0.5 по стандарту McFarland (1.5×10^8 КОЕ/мл) и использовали в течение 15 мин. Для посева использовали суточные культуры бактерий и пяти-суточные культуры грибов и дрожжей. Все тест-культуры получены из коллекции культур “НИИНА им. Г.Ф. Гаузе”.

Полученные спиртовые концентраты объединяли, упаривали досуха на роторном испарителе (“Labconco”, США) и далее перерабатывали в 100 мкл 50%-ного этанола. Исследуемые в работе концентраты анализировали методом обращенно фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ). Анализ проводили на микроколоночном хроматографе Милихром А-02 (ЗАО “Эконова”, Новосибирск), использовали колонки из нержавеющей стали, Nucleosil-100-5-C18 ($L = 75.0$ мм; $D = 2.0$ мм; $d = 5$ мкм, “Macherey-Nagel”, Германия). Детектирование в ходе анализа проводили при 214 нм. Скорость потока 100 мкл/мин, температура термостатирования колонки 35°C, инжекционный объем — 15 мкл. Состав подвижной фазы: компонент А — H_2O (MQ) + + 0.02%-ная ТФУ (ВЭЖХ, “Sigma-Aldrich”, Герма-

ния), компонент Б — ацетонитрил + 0.02%-ная ТФУ. Градиент подвижной фазы от 0 до 100% Б за 40 мин и далее в изократическом режиме 4 мин при 100%-ном содержании элюента В.

Для анализа методом MALDI-TOF MS 0.3 мкл фракции ацетонитрил-вода (собранной при разделении методом ВЭЖХ) образца и 0.5 мкл 2,5-дегидроксibenзойной кислоты (“Sigma-Aldrich”, Германия) раствор в 20%-ном ацетонитриле + 79.5% вода (MQ) + 0.5% ТФУ (ВЭЖХ, “Sigma-Aldrich”) в концентрации 20 мг/мл смешивали на мишени спектрометра. Запись спектров и MS-анализа проводили на MS-спектрометре MALDI-TOF (Ultrafle Xtreme, “Bruker Daltonics”, Германия) с УФ-лазером (Nd) в режиме регистрации положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность определения массы составляла около 1 Да.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для штамма *E. alkalina* E101 [14], первоначально исследовали образование эмерициллипсинов в культуральной жидкости и мицелии при нейтральных и щелочных начальных pH (7.0, 9.0, 10.0) в стационарных и глубинных условиях культивирования. Было показано, что содержание EmiA в мицелии всегда оставалось значительно ниже, чем в КЖ в одних и тех же вариантах. Для мицелия отмечено большее содержание EmiA в условиях глубинного культивирования, в то время как в КЖ выявлено большее содержание EmiA в стационарных условиях во всех исследованных вариантах, что свидетельствует о том, что в этих условиях антибиотик лучше экскретирует в культуральную жидкость.

Содержание EmiA в мицелии (0.25 мг/г) достигало максимума на 7 сут при глубинном способе культивирования при pH среды 10.0. Наиболее высокие количества EmiA в КЖ зарегистрированы на 14 сут роста при всех исследованных начальных pH среды, но при щелочных pH (9.0 и 10.0) содержание EmiA было максимально и составило 6.0–6.5 мг/л (рис. 1). Проведенный эксперимент подтвердил, что несмотря на то, что штаммы *E. alkalina* способны к росту и развитию в широком диапазоне pH среды (4.0–11.0) с оптимумом роста при pH 10.0 [13], EmiA лучше образуется в щелочных условиях культивирования.

Алкалофильные грибы *E. alkalina*, обитающие на побережьях засоленных озер, часто сосуществуют с многочисленными и разнообразными прокариотами, образующими на поверхности раздела фаз биопленки. Считается, что моделирование природных условий для продуцента может способствовать увеличению накопления целевых антибиотиков в среде [16]. Было проведено сравнение выхода EmiA при стационарном культивировании и мембранно-жидкостном, где в качестве модели природной бактериальной пленки использовали подложки бактериальной целлюлозы. Наиболь-

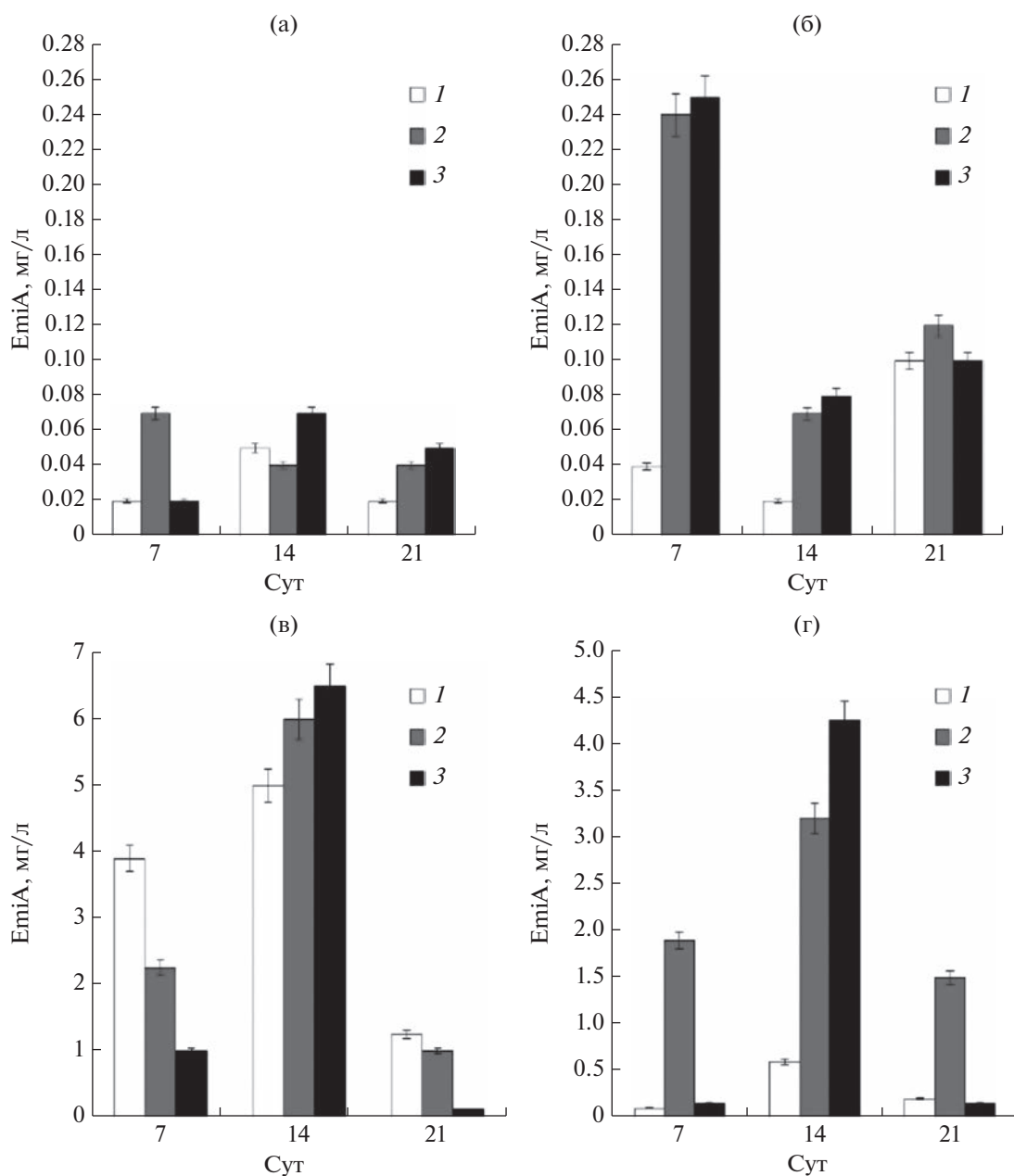


Рис. 1. Динамика образования EmiA (мг/л) при начальных pH 7.0 (1), 9.0 (2) и 10.0 (3) в мицелли (а, б) и КЖ (в, г) *E. alkalina* E101 при поверхностном (а, в) глубинном (б, г) культивировании.

шее содержание EmiA в КЖ и мицелли отмечено при стационарном мембранно-жидкостном культивировании (табл. 1). При росте на бактериальной целлюлозе в качестве подложки выход EmiA

у штамма *E. alkalina* E101 увеличивался в 1.7 раза по сравнению с поверхностным способом культивирования и составил 11.05 мг/л. При этом было установлено, что помимо основного целевого

Таблица 1. Содержание EmiA в штамме *Emericellopsis alkalina* E101 при различных типах культивирования

Тип культивирования	EmiA в КЖ, мг/л	EmiA в мицелли, мг/г
Поверхностное	6.50 ± 0.20	0.07 ± 0.01
Глубинное	4.87 ± 0.15	0.25 ± 0.01
Стационарное мембранно-жидкостное	11.05 ± 0.33	0.17 ± 0.01

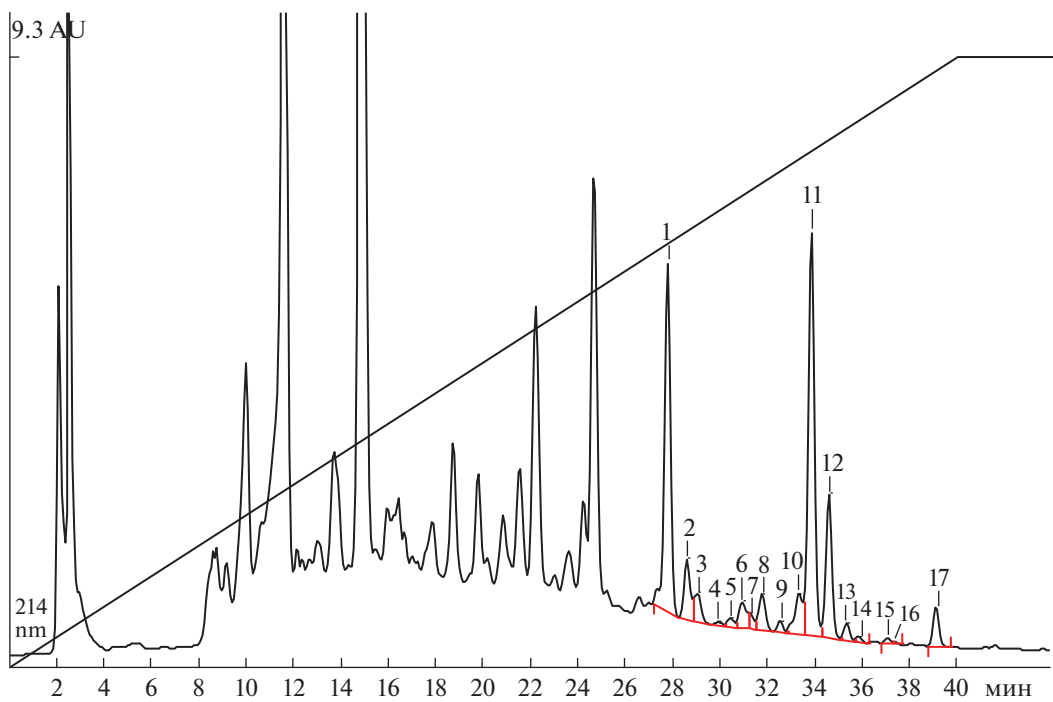


Рис. 2. ОФ ВЭЖХ спиртового объединенного концентрата в градиенте концентрации ацетонитрила.

пептаибола EmiA синтезируются другие минорные изоформы, ранее не обнаруженные в стационарных условиях. При этом экстракт из КЖ и мицелия, полученный в мембранно-жидкостных

условиях культивирования проявлял активность в отношении грамотрицательных бактерий, в то время как экстракт, полученный в условиях стационарного культивирования был не активен в

Таблица 2. Времена удерживания пиков на хроматограмме (рис. 2), данные о массах молекулярных ионов компонентов, содержащихся в пиках с 1 по 17*

Номер хроматографического пика	Время удерживания пика, мин	Масса [M + H] ⁺ , Да
1	27.90	1008.7; 1022.7*
2	28.73	990.7; 1022.7
3	29.17	994.5; 1036.7; 1069.6
4	30.07	994.5 ; 1052.8
5	30.55	994.5; 1022.8; 1036.8; 1052.8
6	31.04	994.5; 1022.8
7	31.36	825.5 ; 994.5; 1022.8
8	31.89	825.5; 994.5; 1022.8
9	32.64	1036.8
10	33.43	994.5; 1019.6; 1036.8
11	33.97	994.5; 1032.9; 1036.8
12	34.70	1050.8
13	35.46	994.5 ; 1050.8
14	35.59	994.5 ; 1016.5
15	37.17	994.5
16	37.46	994.5
17	39.20	994.6 ; 1036.9; 1058.9; 1225.0

* Полу жирным шрифтом выделены массы иона мажорного компонента в составе хроматографического пика.

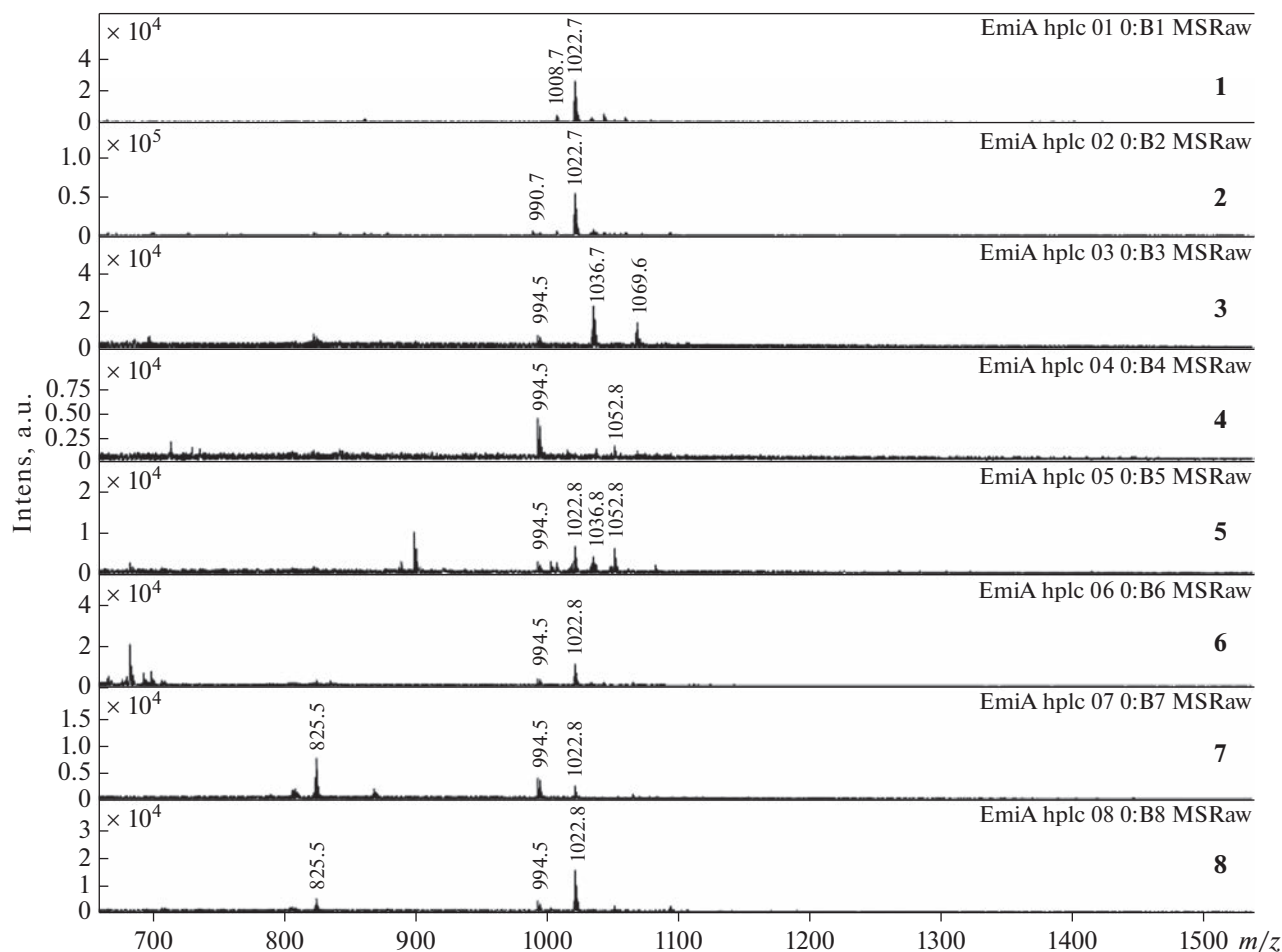


Рис. 3. Масспектры 1-8 (а) и 9-17 (б) хроматографических индивидуальных пиков концентрата, полученного в условиях мембранно-жидкостного культивирования.

отношении этих бактерий, что свидетельствовало о том, что помимо основного противогрибкового компонента в этих условиях продуцент начинал синтезировать антибактериальные соединения.

В дальнейшем была проведена оценка многообразия различных изоформ в пептидном комплексе, синтезируемом при выращивании мембранно-жидкостным способом на мембране из бактериальной целлюлозы. После проведения аналитической ОФ ВЭЖХ были собраны фракции пиков с различным временем удерживания при элюции градиентом концентрации ацетонитрила от 70 до 100% (рис. 2). При этом вблизи области локализации пиков EmiA на хроматограмме обнаруживались другие пики с большим и меньшим временем удерживания. Фракции с 1 по 17 (рис. 2) были собраны и проанализированы методом MALD-TOF-MS. Полученные массы молекулярных ионов $[M + H]^+$ компонентов фракций представлены в табл. 2.

Фрагментация индивидуальных пептаиболов с молекулярными массами 1022.8; 994.5 и 1036.7 позволила предположить, что для данных молекул существует несколько возможных (не менее 2) структур пептидов, соответствующих одной и той

же молекулярной массе, однако это требует дальнейшего подтверждения методом ЯМР — спектроскопии (рис. 3).

По результатам исследования разности масс между выделенными компонентами при проведении аналитической ОФ ВЭЖХ (табл. 2) удалось обнаружить, что различие их (по массе) соответствует либо “-CH₂-”-фрагменту ($M = 14$ Да), либо молекуле H₂O ($M = 18$ Да), что представлено графически на схеме (рис. 4). Зависимость показывает молекулярные связи отдельных уже обнаруженных форм пептаиболов, а также ожидаемые молекулярные массы (выделены красным). Ввиду близости времен удерживания компонентов (табл. 2, рис. 2), а также существования цепочки связей между молекулярными массами этих компонентов (рис. 3б), можно предположить, что массы компонентов, соответствуют соединениям одинаковой химической природы. Некоторые массы пептаиболов, представленные на схеме, ранее были не только обнаружены, но и идентифицированы. Так, например, масса 1050 Да соответствует самому EmiA [10], а масса 1032.9 Да —

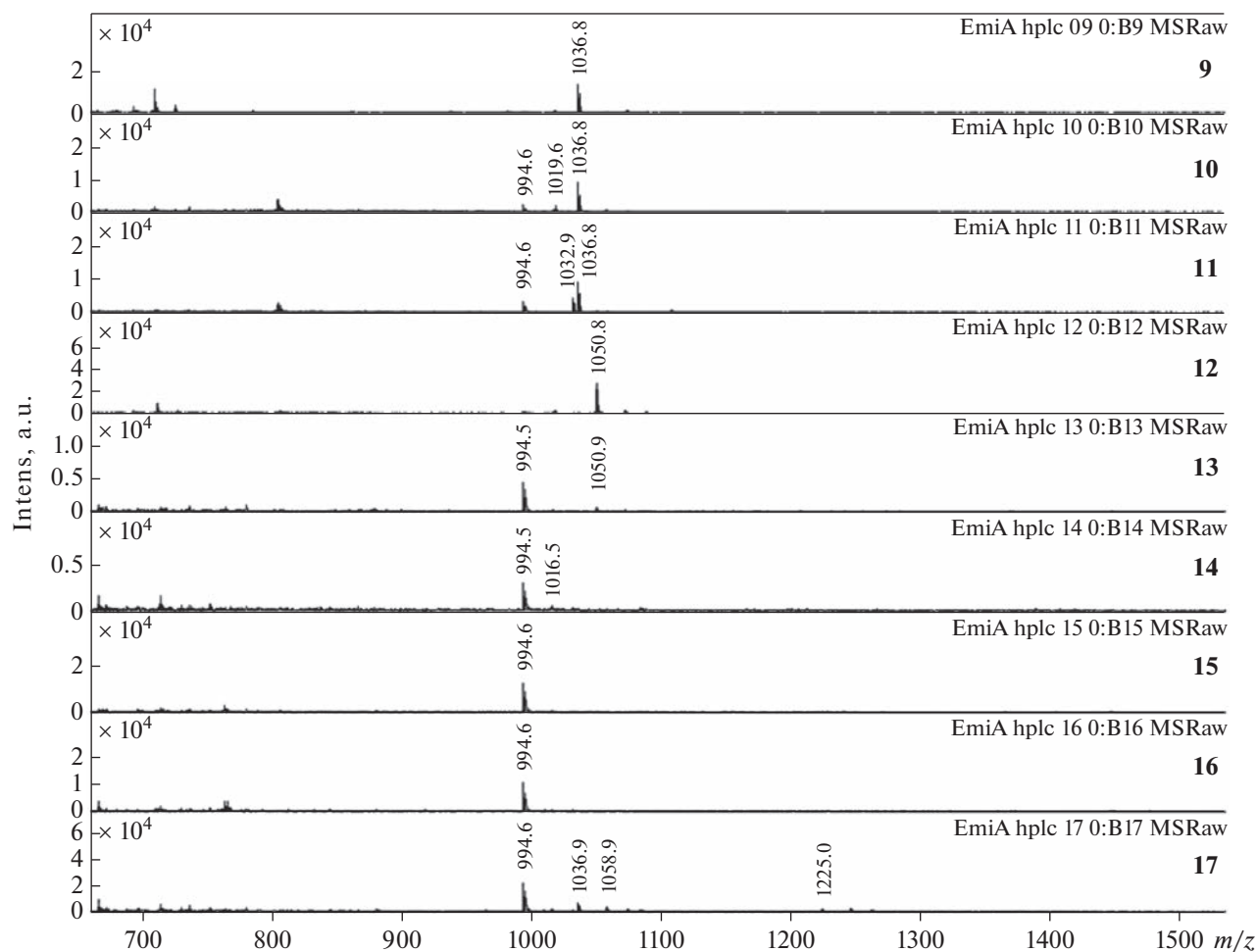


Рис. 3. Окончание.

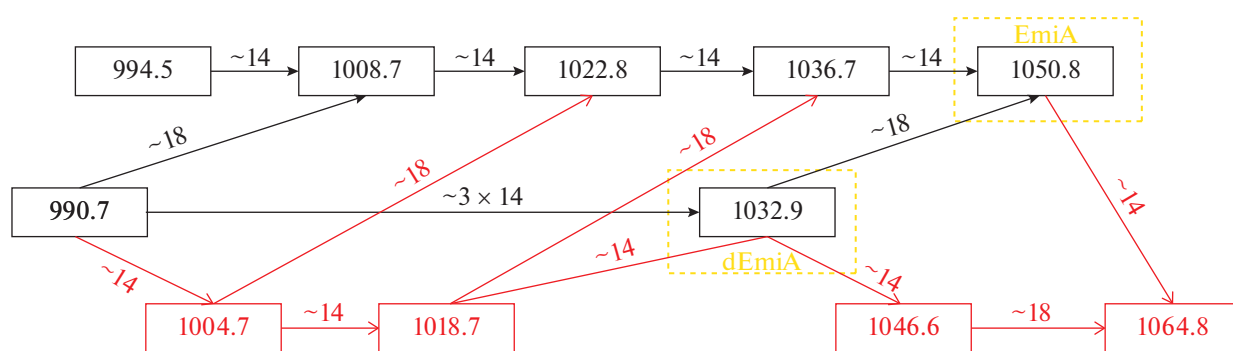


Рис. 4. Схема связи масс различных молекулярных ионов, обнаруженных в ходе анализа (отмечены черным цветом). Стрелками показана связь между формами; над стрелками цифры — разность молекулярных масс между соединенными блоками. Желтые прямоугольники — формы EmiA и dEmiA (дегидроформа); красными показаны предполагаемые молекулярные массы, красные стрелки показывают (предположительно) связи форм, над стрелками указаны разность масс связанных молекулярных форм.

дегидроформе [14]. Таким образом, построенная схема связывает различные формы уже обнаруженных эмерициллипсинов А — Е, с не обнаруженными ранее массами, 1004.7; 1018.7; 1046.8; 1064.8 [10], которые укладываются в общий гомологический ряд. Представленная схема масс но-

сит предположительный характер, ввиду того, что схожесть химических форм пока не была подтверждена более точными спектральными методами. Для выделенных изоформ эмерициллипсинов с массами 1032.9, 1036.7. Да ранее была показана противогрибковая активность [10].

Таким образом, установлено, что новый мембранно-жидкостной способ культивирования продуцентов пептаиболов эмериллипсина приводит к увеличению многообразия синтезируемых природных форм пептидов и увеличению выхода основного соединения в 1.7 раза. Изучение потенциального разнообразия АМП, синтезируемых продуцентом на уровне первичной или пространственной структуры, может послужить стимулом к обнаружению у них других типов биологической активности и созданию новых синтетических пептидов на их основе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-75-00062 (А.Е. Куварина, М.А. Суконников).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lau J.L., Dunn M.K. // Bioorg. Med. Chem. 2018. V. 26. № 10. P. 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
2. Casagrande N., Borghese C., Gabbatore L., Morbiato L., De Zotti M., Aldinucci D. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 16. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22168362>
3. Chen C.H., Lu T.K. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 24. P. 1–20. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9010024>
4. Bin H.A., Jiang X., Bergen P.J., Zhu Y. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 11691. P. 1–56. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>
5. Aldholmi M., Marchand P., Ourliac–Garnier I., Le Pape P., Ganesan A. // Pharmaceuticals. 2019. V. 12. № 4. P. 1–21. <https://doi.org/10.3390/ph12040182>
6. Egorova–Zachernyuk T.A., Shvets V., Versluis K., Heerma W., Creemers A.F.L., Nieuwenhuis S.A.M., Lugtenburg J., Raap J. // J. Pept. Sci. 1996. V. 2. P. 341–350. <https://doi.org/10.1002/psc.72>
7. Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Овчинникова Т.В. // Токсикологический вестник. 2008. № 3. С. 35–38.
8. Otto A., Laub A., Porzel A., Schmidt J., Wessjohann L., Westermann B., Arnold N. // Eur. J. Org. Chem. 2015. V. 34. P. 7449–7459. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501124>
9. Sadykova V.S., Gavryushina I.A., Kuvarina A.E., Markelova N.N., Sedykh N.G., Georgieva M.L., Barashkova A.C., Rogozhin E.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 3. P. 292–297. <https://doi.org/10.1134/S000368382003010>
10. Kuvarina A.E., Gavryushina I.A., Kulko A.B., Ivanov I.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. // J. Fungi. 2021. V. 7. № 153. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof7020153>
11. Hao X., Li Sh., Ni J., Wang G., Li F., Li Q., Chen Sh., Shu J., Gan M. // J. Nat. Prod. 2021. V. 84. № 11. P. 2990–3000. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00834>
12. Zhang S.-H., Zhao X., Xu R., Yang Y., Tang J., Yue X.-L., Wang Y.-T., Tan X.-Y., Zhang G.-G., Li C.-W. // Chem. Biodivers. 2022. V. 19. № e202200627. P. 1–26. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200627>
13. Grum–Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Debets A.J.M., Bilanenko E.N. // IMA Fungus. 2013. V. 4. № 2. P. 213–228. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2013.04.02.07>
14. Kuvarina A.E., Gavryushina I.A., Sykonnikov M.A., Efimenko T.A., Markelova N.N., Bilanenko E.N. et al. // Molecules. 2022. V. 27. № 1736. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules27051736>
15. Baranova A.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Andreev Y.A., Rogozhin E.A., Sadykova V.S. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 6. P. 703–710. <https://doi.org/10.1134/S0003683817060035>
16. Galloway W.R.J.D., Bender A., Welch M., Spring D.R. // Chem. Commun. 2009. P. 2446–2462. <https://doi.org/10.1039/b816852k>

Formation of Various Antimicrobial Peptide Emericellipsin Isoforms in *Emericellopsis alkalina* under Different Cultivation Conditions

A. E. Kuvarina^{a,*}, M. A. Sukonnikov^a, E. A. Rogozhin^{a,b}, M. V. Serebryakova^c,
A. V. Timofeeva^c, M. L. Georgieva^{a,d}, and V. S. Sadykova^{a,**}

^a Gause Institute New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

^b Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997 Russia

^c Belozersky Institute of Physico–Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^d Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: nastena.lysenko@mail.ru

**e-mail: sadykova_09@mail.ru

A microbiological screening of the target component of emericellipsin A of the *Emericellopsis alkalina* E101 strain was carried out in various biotechnological systems at various pH. The content of emericellipsin A was quantified under these conditions. It has been established that the new approved membrane–liquid cultivation method at pH 10 contributes to an increase in the yield of the main component of emericellipsin A. It was shown that the new method of cultivating the strain *E. alkalina* E101 also promotes the synthesis of various isoforms of the main component of emericellipsin A. Some comparative analysis of them was carried out.

Keywords: antibiotics, *Emericellopsis alkalina*, emericellipsin A, isoforms of emericellipsin A