

Современные представления о биосинтезе пептидного антибиотика грамицидина S

*Е. Р. МИТИНА¹, А. Б. ПШЕНИЧНИКОВА¹, О. В. ЕФРЕМЕНКОВА²

¹ ФГБУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия

Резюме

Грамицидин S — циклический декапептидный антибиотик, продуцируемый почвенной бактерией *Aneurinibacillus migulanus* (ранее *Bacillus brevis*, *Brevibacillus brevis*), один из первых открытых антибиотиков. В последние годы наблюдается возрождение интереса исследователей к грамицидину S, поскольку к нему не вырабатывается антибиотикорезистентность, и он высоко активен в отношении биоплёнок. В обзоре рассмотрены современные представления о структуре, биологической роли и антимикробном действии грамицидина S, а также о путях его биосинтеза и влиянии на биосинтез параметров культивирования и компонентов питательной среды.

Ключевые слова: грамицидин S; *Aneurinibacillus migulanus*; *Bacillus brevis*; нерибосомные пептиды; пептидные антибиотики

Для цитирования: Митина Е. Р., Пшеничникова А. Б., Ефременкова О. В. Современные представления о биосинтезе пептидного антибиотика грамицидина S. *Антибиотики и химиотер.* 2025; 70 (5–6): 64–71. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2025-70-5-6-64-71>. EDN: KPGFFW.

Current Concepts of the Peptide Antibiotic Gramicidin S Biosynthesis

*EKATERINA R. MITINA, ANNA B. PSHENICHNIKOVA, OLGA V. EFREMENKOVA

¹ MIREA — Russian technological university, Moscow, Russia

² Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russia

Abstract

Gramicidin S is a cyclic decapeptide antibiotic produced by the soil bacterium *Aneurinibacillus migulanus* (formerly *Bacillus brevis*, *Brevibacillus brevis*), one of the first antibiotics ever discovered. In recent years, a revival of research interest was observed towards gramicidin S due to its unique properties: it does not cause the development of antibiotic resistance and has high efficacy against biofilms. This review examines current understanding of the structure, biological role, and antimicrobial mechanisms of gramicidin S. It also explores the biosynthetic pathways of gramicidin S, as well as the influence of cultivation parameters and nutrient medium components on its biosynthesis.

Keywords: gramicidin S; *Aneurinibacillus migulanus*; *Bacillus brevis*; nonribosomal peptides; peptide antibiotics

For citation: Mitina E. R., Pshenichnikova A. B., Efremenkova O. V. Current concepts of the peptide antibiotic gramicidin S biosynthesis. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2025; 70 (5–6): 64–71. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2025-70-5-6-64-71>. EDN: KPGFFW.

Введение

Почвенные бактерии продуцируют множество антибиотиков, в том числе клинически значимых. Одним из первых выделенных и описанных антибиотиков был тиротрицин, выделенный из *Bacillus brevis* R.J. Dubos в 1939 г. в США [1]. Позже R.D. Hotchkiss и R.J. Dubos [2] было показано, что тиротрицин представляет собой смесь пептидных антибиотиков: циклического тироцидина и линейных грамицидинов A, B и C, совместно называемых

грамицидином D, по фамилии первооткрывателя. В то же время работы с *Bacillus brevis* велись и в СССР. В 1942 г. Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражникова в ходе активной работы по выделению и анализу почвенных штаммов *Bacillus brevis* удалось выделить новый антибиотик, продуцируемый данной бактерией [3]. Антибиотик был назван грамицидином S (т.е. советским) и сразу нашел свое применение в военных госпиталях, где спиртовые растворы грамицидина S использовали для профилактики и лечения раневых инфекций, что

*Адрес для корреспонденции:

E-mail: mitinakaterina@bk.ru



EDN: KPGFFW

*Correspondence to:

E-mail: mitinakaterina@bk.ru



значительно сократило число ампутаций во время Великой Отечественной войны. В 1944 г. в сотрудничестве с британским биохимиком Р. Сингом было показано, что грамицидин S — циклический декапептид. Применение грамицидина S в клинической практике ограничено из-за его гемолитической активности [4, 5], однако он применяется местно для лечения инфекций мягких тканей, остеомиелита, инфекций тканей глаза и уха.

Грамицидины, как и многие другие пептидные антибиотики, были открыты в середине XX века, в числе первых антибиотиков, но всё также вызывают интерес исследователей [6–9]. Проблема антибиотикорезистентности становится острее с каждым годом, а ко многим пептидным антибиотикам резистентность бактерий развивается медленно или не развивается вовсе. Грамицидин S сохраняет клиническую значимость благодаря своей способности эффективно уничтожать устойчивые бактериальные патогены, включая патогены группы ESKAPE [4, 10–14]. Мембранотропные пептидные антибиотики имеют множественные механизмы действия [14], независимые от классических мишеней (рибосом, клеточной стенки или ДНК), что препятствует развитию большинства механизмов резистентности к антибиотикам [15]. Так, за много десятилетий применения грамицидина S практически не было отмечено развития к нему резистентности.

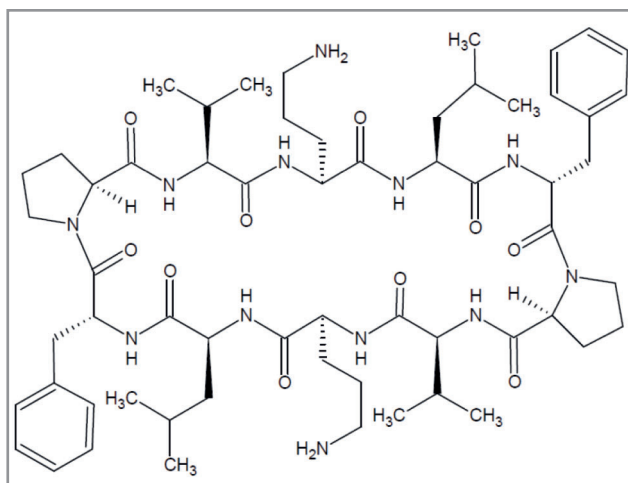
Еще одно важнейшее преимущество грамицидина S — активность в отношении бактериальных биоплёнок. Тогда как многие классические антибиотики стимулируют образование биоплёнок патогенными микроорганизмами [16], грамицидин S проявляет высокую активность против биоплёнок, в том числе, образованных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью [14, 17, 18].

Основной недостаток грамицидина S — его системная токсичность, проявляющаяся, главным образом, в гемолитическом эффекте. Однако в последние годы активно ведутся работы по получению его аналогов, селективных к бактериальным мембранам [10–13, 19] и современных форм доставки со сниженной токсичностью, но сохраняющих терапевтический эффект [20–24].

Грамицидин S остаётся незаменимым инструментом в борьбе с устойчивыми инфекциями, особенно сейчас, когда разработка новых антибиотиков замедлилась. В настоящем обзоре мы предпринимаем попытку рассмотреть современные представления о биосинтезе грамицидина S и его регуляции.

Структура и биологическая роль грамицидина S

Грамицидин S — циклический декапептид цикло-(Val-Orn-Leu-d-Phe-Pro)₂ (рисунки), син-



Грамицидин S.
Gramicidin S.

тезируемый почвенной грамположительной бактерией *Aneurinibacillus migulanus* (ранее *Bacillus brevis*, *Brevibacillus brevis*). Трипептидные последовательности Val-Orn-Leu образуют антипараллельный β-слой, а участки d-Phe-Pro образуют β-повороты. Структура стабилизируется четырьмя водородными связями между остатками лейцина и валина. Молекула грамицидина S амфифильна и проявляет высокое сродство к биологическим мембранам. С одной стороны цикла выступают остатки D-фенилаланина и положительно заряженные остатки орнитина, а с другой стороны гидрофобные остатки лейцина и валина. Образующаяся структура довольно стабильна и сохраняется как в фосфолипидных бислоях, так и в растворителях.

Антибиотики, продуцируемые бактериями, обычно рассматриваются как фактор выживания в конкурентной среде. Для грамицидина S, помимо его участия в борьбе с конкурирующими видами, показано, что он участвует в прорастании спор и повышает выживаемость спор в условиях высокой температуры. Так, авторы [25] получили ряд мутантов, не продуцирующих грамицидин S. Большинство из них сохраняли способность к спорообразованию на уровне, сопоставимом с исходным штаммом, однако споры мутантов оказались более чувствительными к нагреванию по сравнению со спорами дикого типа. При этом у мутантных спор наблюдалось пониженное содержание дипиколиновой кислоты — компонента, обеспечивающего устойчивость спор к неблагоприятным условиям. Время прорастания спор мутантов и дикого типа было схожим (80–110 мин), однако у мутантов отсутствовала задержка перед началом роста, тогда как у спор дикого типа наблюдалась лаг-фаза продолжительностью 9–10 ч. Добавление грамицидина S в среду, где происходило спорообразование мутантов, восстанавливало термостойкость спор, нормализовывало содержание дипиколиновой

кислоты и возвращало характерную для дикого типа задержку перед началом роста.

В работе [26] показано, что синтез грамицидина S осуществляется на внутренней стороне цитоплазматической мембраны, где по периферии локализуются NRPS-синтетазы GrsA и GrsB, обеспечивая секрецию продукта. После синтеза пептид не выделяется в среду, а формирует гранулы, аккумулирующиеся в вакуолях. Гранулы содержат нековалентные комплексы грамицидина S с фосфагенами — высокоэнергетическими фосфорсодержащими соединениями. Это позволяет защищать фосфаты от гидролиза. Компартментализация и связывание с фосфатами предотвращают токсичность накопленного грамицидина S, позволяя клеткам накапливать высокие внутриклеточные концентрации антибиотика.

Таким образом, грамицидин S — не только антибиотик, а мультифункциональная молекула: он играет важную роль в обеспечении устойчивости спор к тепловому воздействию и в регулировании времени их выхода из состояния покоя, участвует в формировании энергетических резервов клетки и обеспечивает конкурентное преимущество штаммам-продуцентам, подавляя рост чувствительных бактерий.

Антимикробная активность и механизм действия

Грамицидин S — пептидный антибиотик, активный и против грамположительных, и против грамотрицательных бактерий, применяемый наружно из-за выраженного гемолитического действия. Этот антибиотик высокоэффективен, его средняя минимальная ингибирующая концентрация составляет около 3–11 мкМ [27, 28]. Основным механизмом действия грамицидина S является нарушение упаковки липидов билипидного слоя, что приводит к нарушению целостности клеточной мембраны. Молекула грамицидина S имеет сродство к мембране клетки за счёт амфифильной природы: с одной стороны дискообразной молекулы расположены гидрофильные положительно заряженные остатки орнитина, а с другой — четыре гидрофобных остатка лейцина и валина. И такая амфифильность имеет решающее значение для антимикробной активности грамицидина S [29]: замена аминокислот, которая снижает амфифильные свойства молекулы, также снижает и антимикробную активность.

Детальный механизм действия грамицидина S остаётся неясен, однако предполагаются следующие гипотезы: детергентоподобное действие грамицидина S, формирование пор в мембране и ингибирование внутриклеточных ферментов. Традиционно механизм действия грамицидина S

трактовался как детергентоподобный, что обусловлено амфифильной природой молекулы: гидрофобные боковые цепи взаимодействуют с липидными хвостами, а гидрофильные участки остаются обращёнными к водной фазе [30, 31]. В результате такого взаимодействия происходит дестабилизация мембраны, утечка ионов, главным образом калия и протонов, разрушение протонного градиента и гибель клетки [29]. Эта модель объясняет высокую активность грамицидина S в отношении грамположительных бактерий и низкую вероятность развития устойчивости к нему.

Несмотря на классическую трактовку, современные данные указывают на возможность более специфичного взаимодействия грамицидина S с мембранами. Ряд биофизических исследований, включая твердотельную ЯМР-спектроскопию, ИК-спектроскопию и дифракцию рентгеновских лучей, демонстрируют, что грамицидин S может образовывать пороподобные структуры в липидных бислоях [32, 33]. В экспериментах с липосомами и моделями искусственных мембран установлено, что грамицидин S способен индуцировать проницаемость мембраны для ионов и малых молекул, что соответствует модели червоточины [29]. Предполагается, что димеризация молекул грамицидина S с последующим внедрением в бислой может приводить к образованию каналов, в которых участвуют как пептидные молекулы, так и липидные компоненты. Не все экспериментальные данные согласуются с этой моделью [34, 35], но потенциально она может объяснить избирательность действия пептида в отношении определённых типов мембран.

Помимо воздействия на липиды мембран грамицидин S проявляет активность также в отношении мембранных белков [35] и внутриклеточных мишеней. Так, продемонстрировано его ингибирующее действие на активность NADH-дегидрогеназы, цитохромоксидазы и других ключевых ферментов энергетического метаболизма бактерий [28]. Детально многогранный механизм действия грамицидина S рассмотрен в работах [14, 35].

Таким образом, грамицидин S реализует комбинированный механизм действия, включающий как деструкцию мембраны, так и специфическое ингибирование жизненно важных клеточных функций.

Генетика и метаболические пути биосинтеза грамицидина S

Грамицидин S — циклический декапептид, синтезируемый *A. migulanus* посредством нерибосомного механизма, характерного для синтеза многих биологически активных пептидов.

Биосинтез грамицидина S осуществляется нерибосомными пептидсинтетазами (NRPS), гигантскими мультидоменными ферментами, кодируемыми генами, локализованными в специализированном опероне биосинтеза грамицидина S (*grs*-опероне) [36, 37].

Grs-оперон у *A. migulanus* состоит из трёх генов: *grsT*, *grsA* и *grsB*. Гены *grsA* и *grsB* кодируют две NRPS-синтазы, ответственные за сборку пентапептида Val-Orn-Leu-d-Phe-Pro. Два таких пептида затем циклодимеризуются, что приводит к образованию симметричного декапептида. Транскрипция *grs*-оперона начинается в поздней экспоненциальной фазе и инициируется промотором, располагающемся на позиции –81 п. н. от гена *grsT*. Ген *grsA* кодирует фермент массой 126 кДа, содержащий один модуль с тремя доменами, обеспечивающими активацию и эпимерацию первой аминокислоты d-Phe. *GrsB* (~570 кДа) состоит из четырёх модулей, каждый из которых содержит три домена, необходимые для формирования пептидных связей между четырьмя оставшимися аминокислотами, и терминальный домен на последнем модуле, циклизующий пептид. Помимо генов структурных белков в составе оперона присутствует *grsT* — ген, гомологичный тиюэстеразе II жирных кислот, кодирующий белок с неизвестной функцией [37].

Нерибосомные пептидсинтазы (NRPS) работают по принципу «сборочного конвейера» (*assembly line*), где каждый модуль NRPS отвечает за включение одной аминокислоты в растущий пептид [38]. Основные структурные элементы каждого модуля NRPS включают следующие домены [39, 40]:

- А-домен (аденилационный) — активировывает аминокислоту, превращая её в аминоксил-AMP;
- РСР-домен (пептидилпереносающий, или тиоловый) — временно удерживает активированную аминокислоту, ковалентно связав её через тиюэфирную связь с фосфопантеновой группой;
- С-домен (конденсационный) — катализирует образование пептидной связи между аминокислотами;
- Е-домен (эпимеразный) — изомеризует L-аминокислоты;
- ТЕ-домен (тиоэстеразный) — завершает цикл, катализируя отщепление и циклизацию пептида.

Биосинтез грамицидина S в *A. migulanus* осуществляется двумя крупными NRPS-ферментами — *GrsA* и *GrsB* [40], общая молекулярная масса которых превышает 700 кДа. *GrsA* содержит 1 модуль, который катализирует активацию L-Phe и его эпимерацию до D-Phe, с последующим переносом на РСР-домен белка *GrsB*. *GrsB* содержит 4 модуля, которые последовательно активируют L-Pro, L-Val, L-Orn и L-Leu. Каждый модуль со-

держит домены А, С и РСР. Последний модуль имеет также ТЕ-домен, обеспечивающий циклизацию и отщепление готового продукта от фермента [41]. После завершения первого круга синтеза декапептид циклизуется и высвобождается, при этом NRPS-система может инициировать новый раунд синтеза.

Нерибосомный синтез грамицидина S происходит с высокой точностью благодаря координации доменов внутри каждого модуля. Современные данные показывают, что NRPS-ферменты обладают гибкой архитектурой, позволяющей доменам менять ориентацию и перемещаться по отношению друг к другу в зависимости от стадии сборки пептида [42]. Это обеспечивает как модульность, так и возможность инженерного redesignа ферментов для создания новых аналогов антибиотика.

Регуляция биосинтеза грамицидина S

Продуцентами грамицидина S являются бактерии, которые исторически известны как *Bacillus brevis*. К продуцирующим штаммам относятся *Bacillus brevis* var. G.-B., штамм 101, ATCC 9999. Позднее, в ходе таксономических исследований, штаммы, продуцирующие грамицидин S, были реклассифицированы и теперь относятся к виду *Aneurinibacillus migulanus* [43].

Важной характеристикой этих бактерий является фенотипическая изменчивость, известная как бактериальная диссоциация. Фенотипическая нестабильность может создавать значительные проблемы в биотехнологических процессах, поскольку ценные свойства, такие как продукция грамицидина S, могут быть потеряны при переходе одного фенотипа в другой. Изначально для *B. brevis* var. G.-B. было описано спонтанное расщепление продуктивной формы с шероховатой (R) морфологией колоний на непродуктивную форму с гладкой (S) морфологией колоний [44, 45]. Дальнейшие исследования выявили, что различные штаммы и даже одна и та же культура из разных коллекций могут проявлять несколько вариантов фенотипов. В частности, типовой штамм *A. migulanus* ATCC 9999 содержит шесть различных морфологических вариантов колоний: R, RC, RP, RT, SC и SP, которые были выделены в чистые культуры и охарактеризованы. Была установлена корреляция между морфологией колоний и продуктивностью по грамицидину S. Оригинальная R форма является наилучшим продуцентом, за ней следуют RC, RP и RT с заметно более низкими выходами. Варианты SC и SP практически не продуцируют грамицидин S даже в средах, оптимизированных для сверхпродукции [46].

Диссоциация является обратимым процессом, и генотип бактерии при диссоциации остаётся неизменным. Экспрессия фенотипа сильно зависит от условий окружающей среды. Было показано, что различные факторы могут способствовать диссоциации или стабилизировать определённые фенотипы. Например, УФ-облучение или добавление определённых аминокислот, таких как β -аланин, фенилаланин, пролин, тирозин, метионин и треонин, в жидкую среду стабилизирует R форму, а гистидин и аргинин облегчают диссоциацию из R в S форму. Температура и состав среды являются наиболее важными факторами для культивирования и стабилизации продуктивности. Оптимальная температура для роста продуктивной R формы составляет 40–42°C, тогда как при температуре ниже 32°C продукция грамицидина S прекращается даже у R-штаммов [45–47].

В связи с частой диссоциацией штаммов *A. migulanus* особое значение имеет способ подготовки инокулята. Используются инокуляция суспензией спор [48], культурой, выращенной в жидкой среде [49], либо суспензией клеток, полученной из бактериальных колоний [46, 50]. Только инокуляция суспензией клеток, полученной из бактериальных колоний, напрямую позволяет контролировать фенотип культуры и представляется оптимальным способом [46].

Как вторичный метаболит грамицидин S начинает накапливаться при достижении высокой плотности популяции. Нерисобомные пептидсинтетазы GrsA и GrsB начинают экспрессироваться синхронно к концу экспоненциальной фазы роста, с началом стационарной фазы и споруляции их активность быстро падает [51]. В работе [52] продемонстрировано, что кривая зависимости накопления грамицидина S от времени повторяет форму кривой роста, но со сдвигом примерно в 7 ч. Общая продолжительность культивирования *A. migulanus* для получения грамицидина S зависит от способа культивирования, обычно процесс останавливают через 2–5 ч после наступления стационарной фазы роста [49, 50, 53].

При культивировании *A. migulanus* важно контролировать интенсивность аэрации. Исследования показывают, что существует обратная зависимость между высокой аэрацией и выходом грамицидина S. Так, в комплексной YP-среде высокий уровень аэрации приводит к получению высокой концентрации биомассы (до 11,5 г/л) [54]. Однако при таких условиях продукция грамицидина S остается очень низкой (0,17 г/л). Подобные результаты наблюдались и в химически определённых средах [54]. Снижение скорости аэрации приводит к значительному увеличению образования грамицидина S. Например, в YP-среде снижение аэрации привело к 12-кратному увеличению продукции грамицидина S (2,1 г/л), хотя скорость роста упала. В промышлен-

ных условиях культивирования *A. migulanus* 101 для получения грамицидина S рекомендуется поддерживать парциальное давление растворённого кислорода в культуре низким (0–10%). Это достигается путём постепенного увеличения скорости перемешивания (например, с 200 до 500 об/мин) по мере роста культуры, обеспечивая скорость массопередачи кислорода в диапазоне от $0,25 \times 10^{-3}$ до $1,0 \times 10^{-3}$ моль O_2 /л×мин [50]. Авторы [54] отмечают следующие возможные причины влияния аэрации на синтез грамицидина S: инактивация грамицидин-синтетаз кислородом возможна путём окисления тиоловых групп в активных центрах этих ферментов; снижение экспрессии синтетаз при высокой скорости роста; переход от аэробного к «анаэробному» метаболизму при низкой аэрации, что сопровождается замедлением роста и быстрым увеличением концентрации антибиотика.

A. migulanus — гетеротрофная бактерия и способна расти на широком спектре источников углерода. Глицерин является одним из часто используемых углеродных субстратов [48, 49, 55], однако, он может ингибировать образование грамицидина S в комплексных средах [55]. В средах для промышленного культивирования используется молочная кислота [49, 50], которая способствует хорошему росту и продукции грамицидина S, но при высоких концентрациях (10,5 г/л) может способствовать накоплению непродуктивных клонов [50]. Углеводы обычно не используют для культивирования *A. migulanus*, хотя в работе [56] отмечено положительное влияние d-фруктозы на рост бактерии и продуктивность по грамицидину S. Другие сахара не поддерживают рост *A. migulanus* в связи отсутствием систем транспорта этих углеводов в клетку [56].

В среды для *A. migulanus* включают как комплексные, так и химически определённые источники азота. Дрожжевой экстракт или автолизат и пептон являются одними из наиболее эффективных компонентов питательных сред. В питательной среде Гаузе–Бражниковой [57] использовался дрожжевой автолизат в концентрации 10%, что позволяло получать до 0,5 г/л грамицидина S. YP-среда, содержащая 50 г/л пептона и 50 г/л дрожжевого экстракта, была признана наиболее эффективной комплексной средой для биосинтеза грамицидина S [46, 48, 54, 55], обеспечивая до 2,5 г/л грамицидина S. Высокое содержание аминного азота (до 500 мг/л) в комплексных средах является ключевым фактором для высокой продуктивности грамицидина S.

В химически определённых средах как источники азота часто используются соли аммония. Сульфат аммония является наиболее эффективным индивидуальным источником азота [48, 55]. Также в состав определённых сред могут включаться хлорид аммония [49, 50, 58], фосфат [50] и оксалат [49] аммония. Другие соединения аммо-

ния (сукцинат, лактат, мочеви́на) поддерживают рост *A. migulanus* значительно хуже [55]. Значительный эффект на рост и продукцию грамицидина S оказывают аминокислоты как единственные источники азота или добавки к основному источнику. Аминокислоты L-аргинин и L-глутамин могут выступать индивидуальными источниками азота, однако комбинация пяти аминокислот L-глутамина, L-метионина, L-пролина, L-аргинина и L-гистидина оказалась очень эффективной для роста и продукции грамицидина S [55]. Также используются аминокислоты, входящие в состав грамицидина S (лейцин, фенилаланин, пролин, валин, орнитин). Изотопные эксперименты показали, что все пять аминокислот легко включаются в циклический полипептид при добавлении их в среду [53]. Наиболее значительный эффект на продуктивность по грамицидину S оказывают добавки орнитина [59], аргинина [59, 60] как предшественника орнитина и фенилаланина [60, 61] в среду.

Культивирование *A. migulanus* проводят как в комплексных, так и в определённых средах. В ряде работ показано, что комплексная среда YP с высокой концентрацией аминного азота способствует наибольшему накоплению грамицидина S [48, 52]. Продуктивность по биомассе может достигать 12,5 г/л. Рост начинается с короткой лаг-фазы, затем переходит в экспоненциальную фазу (3–4 ч), после чего замедляется, достигая максимальной плотности клеток через 24 ч [48]. Выход грамицидина S может достигать приблизительно 2,5 г/л за 24 ч ферментации. Образование грамицидина S начинается в конце экспоненциальной фазы роста и быстро происходит на протяжении перехода в стационарную фазу. Высокая общая активность грамицидин-синтетаз в этой среде обусловлена большей плотностью клеток и более медленным исчезновением ферментов по сравнению с химически определёнными средами [48]. Также имеются данные, что YP-среда может способствовать переходу непродуктивных фенотипов *A. migulanus* в продуктивный фенотип R при культивировании без перемешивания, что способствует образованию биоплёнки [52].

Хотя комплексные среды обеспечивают хороший рост и продуктивность *A. migulanus*, их использование связано со сложностями, типичными для сред, включающих природные компоненты: нестабильность результатов из-за вариативности партий компонентов; сложность контроля состава сред и оценки влияния на ростовые параметры индивидуальных компонентов среды; более сложный процесс выделения и очистки продукта. В ряде работ были предложены составы определённых сред, поддерживающие рост *A. migulanus* и продукцию грамицидина S, сравнимые с ферментацией на комплексных средах. На ранних этапах изучения биосинтеза грамицидина S в СССР пред-

ложены определённые среды с глицерином, обеспечивающие уровни грамицидина S 0,1–0,2 г/л [62] и 1–2,5 г/л [63]. Затем часто использовались модификации среды G с сульфатом аммония и глицерином. Наилучших результатов по продуктивности удалось добиться при увеличении концентраций сульфата аммония и глицерина и использовании добавок аминокислот [48, 55, 58, 60].

Заключение

Грамицидин S представляет собой уникальный циклический декапептид — ценный объект исследований в области микробиологии, биохимии и биотехнологии. Его амфифильная природа обеспечивает высокое сродство к биологическим мембранам, что лежит в основе его антимикробной активности. Однако грамицидин S — это не только антибиотик, а молекула с широким спектром биологических функций. Он играет ключевую роль в жизненном цикле *Aneurinibacillus migulanus*, участвуя в регуляции прорастания спор и формировании энергетических резервов клетки.

Механизм действия грамицидина S сочетает в себе как мембранотропные эффекты, так и влияние на внутриклеточные процессы, включая ингибирование ключевых ферментов метаболизма. Это делает его эффективным против широкого спектра бактерий, включая устойчивые к другим антибиотикам штаммы. Несмотря на токсичность, ограничивающую системное применение, грамицидин S остаётся важным инструментом в местной терапии инфекций, особенно в борьбе с биоплёнками.

Биосинтез грамицидина S, осуществляемый нерибосомными пептидсинтетазами, в значительной степени зависит от условий культивирования, состава среды и фенотипической стабильности продуцента. Оптимизация этих факторов принципиально важна для развития промышленного производства.

Таким образом, грамицидин S является не только классическим антибиотиком, но и многофункциональной молекулой, изучение которой продолжает раскрывать новые аспекты её биологической роли и потенциала для применения в медицине и биотехнологии. Дальнейшие исследования в области генетической инженерии, нанобиотехнологий и комбинированной терапии могут расширить возможности его использования в борьбе с антибиотикорезистентностью и сложными инфекциями.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов. В работе не содержится исследований с участием людей или животных.

Литература/References

- Dubos R. J., Cattaneo C. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus. J Exp Med. 1939; 70 (3): 249–256. doi: 10.1084/jem.70.3.249.
- Hotchkiss R. D., Dubos R. J. Bactericidal fractions from an aerobic sporulating bacillus. J Biol Chem. 1940; 136 (3): 803–804. doi: 10.1016/S0021-9258 (18)73041-X.
- Gause G. F., Brazhnikova M. G. Gramicidin S and its use in the treatment of infected wounds. Nature. 1944; 154 (3918): 703–703. doi: 10.1038/154703a0.
- Pavithra G., Rajasekaran R. Gramicidin peptide to combat antibiotic resistance: a review. Int J Pept Res Ther. 2020; 26 (1): 191–199. doi: 10.1007/s10989-019-09828-0
- Guan Q., Huang S., Jin Y., Campagne R., Alezra V., Wan Y. Recent advances in the exploration of therapeutic analogues of gramicidin S, an old but still potent antimicrobial peptide. J Med Chem. 2019; 62 (17): 7603–7617. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00156
- Moravej H., Moravej Z., Yazdanparast M., Heiat M., Mirhosseini A., Moosazadeh Moghaddam M., Mirnejad R. Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria. Microb Drug Resist. 2018; 24 (6): 747–767. doi: 10.1089/mdr.2017.0392.
- Mogi T., Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. Cell Mol Life Sci. 2009; 66 (23): 3821–3826. doi: 10.1007/s00018-009-0129-9.
- Guan Q., Huang S., Jin Y., Campagne R., Alezra V., Wan Y. Recent advances in the exploration of therapeutic analogues of gramicidin S, an old but still potent antimicrobial peptide. J Med Chem. 2019; 62 (17): 7603–7617. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00156
- Andryukov B. G., Besednova N. N., Zaporozhets T. S. To the 80th anniversary of gramicidin C creation: from the study of the asymmetry of bacterial molecules to the discovery of antimicrobial peptides. Antibiot Chemother. 2022; 67 (3-4): 85–92. doi: 10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-85-92
- Kalyvas J. T., Wang Y., Toronjo-Urquiza L., Stachura D. L., Yu J., Horsley J. R., Abell A. D. A new gramicidin S analogue with potent antibacterial activity and negligible hemolytic toxicity. J Med Chem. 2024; 67 (13): 10774–10782. doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c00261.
- Wang Y., Kalyvas J. T., Evans J. D., Toronjo-Urquiza L., Horsley J. R., Abell A. D. Expanding the therapeutic window of gramicidin S towards a safe and effective systemic treatment of methicillin-resistant *S. aureus* infections. Eur J Med Chem. 2025; 283: 117128. doi: 10.1016/j.ejmech.2024.117128.
- Kalyvas J. T., Wang Y., Romeo O., Horsley J. R., Abell A. D. Broad-spectrum gramicidin S derivatives with potent activity against multidrug-resistant gram-negative ESKAPE Pathogens. Antibiotics. 2025; 14 (5): 423. doi: 10.3390/antibiotics14050423.
- Swierstra J., Kapoerchan V., Knijnenburg A., Van Belkum A., Overhand M. Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016; 35 (5): 763–769. doi: 10.1007/s10096-016-2595-y.
- Berditsch M., Afonin S., Reuster J., Lux H., Schkolin K., Babii O., Radchenko D. S., Abdullah I., William N., Middel V., Strähle U., Nelson A., Valko K., Ulrich A. S. Supreme activity of gramicidin S against resistant, persistent and biofilm cells of staphylococci and enterococci. Sci Rep. 2019; 9 (1): 17938. doi: 10.1038/s41598-019-54212-z.
- Stauss-Grabo M., Atiye S., Le T., Kretschmar M. Decade-long use of the antimicrobial peptide combination tyrothricin does not pose a major risk of acquired resistance with gram-positive bacteria and *Candida* spp. Pharm. 2014; 69 (11): 838–841. doi: 10.1691/ph.2014.4686.
- Kaplan J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. Int J Artif Organs. 2011; 34 (9): 737–751. doi: 10.5301/ijao.5000027.
- Berditsch M., Jäger T., Stempel N., Schwartz T., Overhage J., Ulrich A. S. Synergistic effect of membrane-active peptides polymyxin b and gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59 (9): 5288–5296. doi: 10.1128/aac.00682-15.
- Berditsch M., Lux H., Babii O., Afonin S., Ulrich A. Therapeutic potential of gramicidin S in the treatment of root canal infections. Pharmaceuticals. 2016; 9 (3): 56. doi: 10.3390/ph9030056.
- Dubkara H., Lal J., Saxena D., Akhira A., Maitra R., Chopra S., Reddy D. N. Discovery of a potent ornithine-modified gramicidin S analogue against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* with minimal red blood cell toxicity. Eur J Med Chem. 2025; 292: 117654. doi: 10.1016/j.ejmech.2025.117654.
- Riool M., Patrulea V., Monteiro C. Antimicrobial peptide-polymer conjugates. Pharmaceuticals. 2022; 14 (10): 2171. doi: 10.3390/pharmaceutics14102171.
- Pérez-Betancourt Y., Zaia R., Evangelista M. F., Ribeiro R. T., Roncolela B. M., Mathiazzi B. I., Carmona-Ribeiro A. M. Characterization and differential cytotoxicity of gramicidin nanoparticles combined with cationic polymer or lipid bilayer. Pharmaceuticals. 2022; 14 (10): 2053. doi: 10.3390/pharmaceutics14102053.
- Li W., Separovic E., O'Brien-Simpson N. M., Wade J. D. Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs. Chem Soc Rev. 2021; 50 (8): 4932–4973. doi: 10.1039/d0cs01026j.
- Vashchenko O. V., Berest V. P., Sviechnikova L. V., Kutsevol N. V., Kasian N. A., Sofronov D. S., Skorokhod O. Modifying membranotropic action of antimicrobial peptide gramicidin S by star-like polyacrylamide and lipid composition of nanocontainers. Int J Mol Sci. 2024; 25 (16): 8691. doi: 10.3390/ijms25168691.
- Antezana P. E., Municoy S., Bellino M. G., Martini M. F., Desimone M. F. Nanodelivery of the gramicidin peptide for enhancing antimicrobial activity. Eur J Lipid Sci Technol. 2021; 123 (8). doi: 10.1002/ejlt.202000389.
- Marahiel M. A., Danders W., Krause M., Kleinkauf H. Biological role of gramicidin S in spore functions: studies on gramicidin-S-negative mutants of *Bacillus brevis* ATCC9999. Eur J Biochem. 1979; 99 (1): 49–55. doi: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13229.x.
- Berditsch M., Trapp M., Afonin S., Weber C., Misiewicz J., Turkson J., Ulrich A. S. Antimicrobial peptide gramicidin S is accumulated in granules of producer cells for storage of bacterial phosphagens. Sci Rep. 2017; 7 (1): 44324. doi: 10.1038/srep44324.
- Kondejewski L. H., Farmer S. W., Wishart D. S., Kay C. M., Hancock R. W., Hodges R. S. Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs. J Biol Chem. 1996; 271 (41): 25261–25268. doi: 10.1074/jbc.271.41.25261.
- Mogi T., Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. Cell Mol Life Sci. 2009; 66 (23): 3821–3826. doi: 10.1007/s00018-009-0129-9.
- Prenner E. J., Lewis R. N. A. H., McElhaney R. N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. Biochim Biophys Acta BBA — Biomembr. 1999; 1462 (1–2): 201–221. doi: 10.1016/S0005-2736 (99)00207-2.
- Strøm M. B., Rekdal Ø., Svendsen J. S. Antimicrobial activity of short arginine- and tryptophan-rich peptides. J Pept Sci. 2002; 8 (8): 431–437. doi: 10.1002/psc.398.
- Капреляни А. С., Никифоров В. В., Мирошников А. И., Снежкова Л. Г., Еремин В. А., Островский Д. Н. Мембраны бактерий и механизм действия антибиотика грамицидина S. Биохимия. 1977; 42 (2): 329–337. [Kapreliants A. S., Nikiforov V. V., Miroshnikov A. I., Snezhkova L. G., Eremin V. A., Ostrovskii D. N. Membranes of bacteria and mechanism of action of the antibiotic gramicidin S. Biokhimiia. 1977; 42 (2): 329–337. (in Russian)]
- Llamas-Saiz A. L., Grotenbreg G. M., Overhand M., Van Raaij M. J. Double-stranded helical twisted β -sheet channels in crystals of gramicidin S grown in the presence of trifluoroacetic and hydrochloric acids. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2007; 63 (3): 401–407. doi: 10.1107/S0907444906056435.
- Afonin S., Dürr U. H. N., Wadhvani P., Salgado J., Ulrich A. S. Solid state NMR structure analysis of the antimicrobial peptide gramicidin S in lipid membranes: concentration-dependent re-alignment and self-assembly as a β -barrel. Top Curr Chem. 2008; 273: 139–154. doi: 10.1007/128_2007_20.
- Ashrafuzzaman Md., Andersen O. S., McElhaney R. N. The antimicrobial peptide gramicidin S permeabilizes phospholipid bilayer membranes without forming discrete ion channels. Biochim Biophys Acta BBA — Biomembr. 2008; 1778 (12): 2814–2822. doi: 10.1016/j.bbame.2008.08.017.
- Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J. A., Siersma T., Aisenbrey C. H. M., Zaitseva E., Laubscher W. E., Van Rensburg W., Behrends J. C., Bechinger B., Hamoen L. W. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. Haagsman H. P., Kline K. A., eds. mBio. 2018; 9 (5): e00802–18. doi: 10.1128/mbio.00802-18.
- Krause M., Marahiel M. A. Organization of the biosynthesis genes for the peptide antibiotic gramicidin S. J Bacteriol. 1988; 170 (10): 4669–4674. doi: 10.1128/jb.170.10.4669-4674.1988.
- Krättschmar J., Krause M., Marahiel M. A. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. J Bacteriol. 1989; 171 (10): 5422–5429. doi: 10.1128/jb.171.10.5422-5429.1989.
- Weissman K. J. The structural biology of biosynthetic megaenzymes. Nat Chem Biol. 2015; 11 (9): 660–670. doi: 10.1038/nchembio.1883.
- Marahiel M. A., Essen L.-O. Chapter 13. Nonribosomal peptide synthetases in: methods in enzymology. Vol 458. Elsevier; 2009: 337–351. doi: 10.1016/S0076-6879 (09)04813-7.
- Vater J., Stein T. H. Structure, function, and biosynthesis of gramicidin S synthetase. In: Comprehensive natural products chemistry. Elsevier; 1999: 319–352. doi: 10.1016/B978-0-08-091283-7.00128-4.

41. Hoyer K. M., Mahler C., Marahiel M. A. The iterative gramicidin S thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. *Chem Biol.* 2007; 14 (1): 13–22. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.10.011.
42. Bonhomme S., Dessen A., Macheboeuf P. The inherent flexibility of type I non-ribosomal peptide synthetase multienzymes drives their catalytic activities. *Open Biol.* 2021; 11 (5): 200386. doi: 10.1098/rsob.200386.
43. Goto K., Fujita R., Kato Y., Asahara M., Yokota A. Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (= NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004; 54 (2): 419–427. doi: 10.1099/ijs.0.02906-0.
44. Жарикова Г. Г., Ковязин Н. В., Лукин А. А., Митронова Т. Н., Савченко Г. В. К вопросу о диссоциации *Bac. brevis* var. G.-B. Антибиотики. 1963; 8 (4): 327–332. [Zharikova G. G., Koviazin N. V., Lukin A. A., Mitronova T. N., Savchenko G. V. On the problem of the dissociation of *Bac. Brevis* var. G.-B. Antibiotiki. 1963; 8: 327–332. (in Russian)]
45. Жарикова Г. Г., Катруха Г. С., Силаев А. Б., Раджапов Р. А. Образование антибиотиков полипептидов различными вариантами *Bac. brevis* var. G.-B. В сб. Биология *Bacillus brevis* var. G.-B. М.: Изд-во Московского университета 1968; 45–61. [Zharikova G. G., Katrukha G. S., Silaev A. B., Radzhapov R. A. Obrazovanie antibiotikov polipeptidov razlichnymi variantami *Bac. brevis* var. G.-B. V sb. Biologiya *Bacillus brevis* var. G.-B. Moscow: Izd-vo Moskovskogo Universiteta. 1968; 45–61. (in Russian)]
46. Berditsch M., Afonin S., Ulrich A. S. The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73 (20): 6620–6628. doi: 10.1128/AEM.00881-07.
47. Жарикова Г. Г., Макарова Г. Я., Поглазова М. Н., Зарубина А. П. Формирование и развитие колоний диссоциированных форм *Bacillus brevis* var. G.-B. Микробиология. 1966; 35 (4): 647–650. [Zharikova G. G., Makarova G. Y., Poglozova M. N., Zarubina A. P. Formirovanie i razvitiye kolonii dissotsirovannykh form *Bacillus brevis* var. G.-B. Mikrobiologiya. 1966; 35 (4): 647–650. (in Russian)]
48. Matteo C. C., Glade M., Tanaka A., Piret J., Demain A. L. Microbiological studies on the formation of gramicidin S synthetases. *Biotechnol Bioeng.* 1975; 17 (1): 129–142. doi: 10.1002/bit.260170111.
49. Nesteruk V. V., Syrov K. K. Method for producing and purification of gramicidin S. European Patent EP3660141A1. 2020 Jun. 3.
50. Патент РФ на изобретение № 2447143C2/ 10.04.2012. Бюл. № 10. В. В. Дербышев, С. П. Клыков, Кураков В. В. Способ глубинного культивирования *Bacillus brevis* для получения грамицидина С. <https://patents.google.com/patent/RU2447143C2/ru>. [Patent RUS № 2447143C2/ 10.04.2012. Byul. № 10. Derbyshev V. V., Klykov S. P., Kurakov V. V. Sposob glubinnogo kul'tivirovaniya *Bacillus brevis* dlya polucheniya gramitsidina S. <https://patents.google.com/patent/RU2447143C2/ru>. (in Russian)]
51. Matteo C. C., Cooney C. L., Demain A. L. Production of gramicidin S synthetases by *Bacillus brevis* in continuous culture. *J Gen Microbiol.* 1976; 96 (2): 415–422. doi: 10.1099/00221287-96-2-415.
52. Berditsch M., Afonin S., Ulrich A. S. The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73 (20): 6620–6628. doi: 10.1128/AEM.00881-07.
53. Winnick R. E., Lis H., Winnick T. Biosynthesis of gramicidin S I. General characteristics of the process in growing cultures of *Bacillus brevis*. *Biochim Biophys Acta.* 1961; 49 (3): 451–462. doi: 10.1016/0006-3002(61)90242-6.
54. Vandamme E. J., Leyman D., De Visscher P., De Buyser D., Vansteenkiste G. Effect of aeration and pH on gramicidin S production by *Bacillus brevis*. *J Chem Technol Biotechnol.* 1981; 31 (1): 247–257. doi: 10.1002/jctb.503310134.
55. Vandamme E. J., Demain A. L. Nutrition of *Bacillus brevis* ATCC 9999, the producer of gramicidin S. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976; 10 (2): 265–273. doi: 10.1128/AAC.10.2.265.
56. Asatani M., Kurahashi K. Carbohydrate metabolism in *Bacillus brevis* ATCC 99991. *J Biochem (Tokyo).* 1977; 81 (4): 813–822. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131545.
57. Cause G. F., Brazhnikova M. G. Gramicidin S origin and mode of action. *The Lancet.* 1944; 244 (6327): 715–716. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)88377-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)88377-4).
58. Vogt T. C. B., Schinzel S., Bechinger B. Biosynthesis of isotopically labeled gramicidins and tyrocidins by *Bacillus brevis*. *J Biomol NMR.* 2003; 26 (1): 1–11. doi: 10.1023/A: 1023074911861.
59. Nimi O., Kubota H., Sugiyama M. Effect of arginine on gramicidin S biosynthesis by *Bacillus brevis*. *J Antibiot (Tokyo).* 1982; 35 (5): 615–621. doi: 10.7164/antibiotics.35.615.
60. Berditsch M., Afonin S., Steineker A., Orel N., Jakovkin I., Weber C., Ulrich A. S. Fermentation and cost-effective ¹³C/¹⁵N labeling of the nonribosomal peptide gramicidin S for nuclear magnetic resonance structure analysis. *Parales R. E., ed. Appl Environ Microbiol.* 2015; 81 (11): 3593–3603. doi: 10.1128/AEM.00229-15.
61. Demain A. L., Matteo C. C. Phenylalanine stimulation of gramicidin S formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976; 9 (6): 1000–1003. doi: 10.1128/AAC.9.6.1000.
62. Удалова Т. П., Федорова Р. И. Влияние различных питательных веществ на образование грамицидина S *Bacillus brevis* var. G.-B. Микробиология. 1965; 34 (4): 631–635. [Udalova T. P., Fedorova R. I. The effect of various nutrient compounds upon gramicidin formation in *Bacillus brevis* var. G.-B. Mikrobiologiya. 1965; 34 (4): 631–635. (in Russian)]
63. Коршунов В. В., Егоров Н. С. Синтетическая среда для развития *Bacillus brevis* var. G.-B. и образования им грамицидина S. Микробиология. 1962; 31 (3): 515–519. [Korshunov V. V., Egorov N. S. A synthetic medium for the development of *Bac. brevis* var. G.-B. and production of gramicidin S. Mikrobiologiya. 1962; 31: 515–519. (in Russian)]

Поступила / Received 31.05.2025

Принята в печать / Accepted 08.06.2025

Информация об авторах

Митина Екатерина Романовна — ассистент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий, РТУ МИРЭА, Москва, Россия. ORCID ID: 0009-0007-9143-4224

Пишеничникова Анна Борисовна — к. х. н., доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий, РТУ МИРЭА, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2602-9349

Ефременкова Ольга Владимировна — к. б. н., зав. сектором поиска природных соединений, преодолевающих устойчивость бактерий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе», Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-3131-1031

About the authors

Ekaterina R. Mitina — Assistant at the Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russia. ORCID ID: 0009-0007-9143-4224

Anna B. Pshenichnikova — Ph. D. in Chemistry, Associate Professor at the Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-2602-9349

Olga V. Efremenkova — Ph. D. in Biology, Head of the Resistance-Overcoming Natural Compounds Search Sector, Gause Institute of New Antibiotics Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-3131-1031